Identification du facteur de transcription HOXA9 comme cible thérapeutique dans le carcinome à cellules rénales et ciblage par des ligands de l'ADN

Samy Jambon

▶ **To cite this version:**

Samy Jambon. Identification du facteur de transcription HOXA9 comme cible thérapeutique dans le carcinome à cellules rénales et ciblage par des ligands de l'ADN. Médecine humaine et pathologie. Université de Lille, 2018. Français. NNT : 2018LILUS045 . tel-02882075

HAL Id: tel-02882075

https://theses.hal.science/tel-02882075

Submitted on 26 Jun 2020

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

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

UNIVERSITE LILLE NORD DE FRANCE

UNIVERSITE DE LILLE

École Doctorale Biologie-Santé

Faculté de Médecine Henri Warembourg

THÈSE

Pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE LILLE

Spécialité : Biologie cellulaire et moléculaire

Présentée et soutenue publiquement par

M. Samy JAMBON

Le 3 décembre 2018

Identification du facteur de transcription HOXA9 comme cible thérapeutique dans le carcinome à cellules rénales et ciblage par des ligands de l'ADN

Composition du jury :

Pr Xavier LEROY	Président du jury
Pr Nathalie RIOUX-LECLERCQ	Rapporteur
Dr Annie SCHMID-ALLIANA	Rapporteur
Dr Michaël PERRAIS	Membre invité
Dr Marie-Hélène DAVID-CORDONNIER	Directeur de thèse

Laboratoire d'accueil :

Centre de Recherche Jean-Pierre Aubert

UMR-S 1172 Inserm-Université de Lille-CHU de Lille

CONFIDENTIEL

Identification du facteur de transcription HOXA9 comme cible thérapeutique dans le carcinome à cellules rénales et ciblage par des ligands de l'ADN

Identification du facteur de transcription HOXA9 comme cible thérapeutique dans le carcinome à cellules rénales et ciblage par des ligands de l'ADN

Le cancer du rein représente 3% des cancers de l'adulte. Il s'agit d'une pathologie tumorale hétérogène insidieuse dont le pronostic reste généralement bon lorsque le cancer est découvert précocement. Malheureusement, la survie à 5 ans ne dépasse pas les 10% lorsque la découverte se fait au stade métastatique. La prise en charge des patients repose sur la chirurgie et sur l'utilisation d'une thérapie systémique aux stades avancés ou métastatiques. Bien que ces dernières années, le cancer du rein ait fait l'objet d'une révolution thérapeutique avec l'arrivée de thérapies ciblées anti-angiogéniques et d'immunomodulateurs, les taux de réponse ne dépassent pas les 30%. Il y a donc un intérêt tout particulier à identifier de nouvelles cibles thérapeutiques dans ce cancer pour espérer de meilleurs traitements.
Pour cela, nous travaillons sur le rôle du facteur de transcription HOXA9 et sur son inhibition par de petites molécules, capables d'entrer en compétition avec sa liaison à l'ADN, d'inhiber son activité transcriptionnelle et, par conséquent, les programmes oncogéniques qu'il régule. Deux molécules inhibitrices ont été sélectionnées.

Dans un premier temps, nous avons utilisé une base de données publique et montré qu'HOXA9 était surexprimé dans le sous-type papillaire et que son expression était corrélée à la survie des patients dans le sous-type à cellules claires.
Puis, à l'aide de deux lignées cellulaires humaines représentant les deux principaux types histologiques de carcinome à cellules rénales, nous avons montré qu'elles exprimaient fortement HOXA9 et évalué ses effets biologiques par invalidation par ARN interférence. Les effets biologiques observés ont été comparés à ceux obtenus par le traitement avec les molécules inhibitrices. Nous avons ainsi pu montrer que l'invalidation d'HOXA9 entraînait la mort des cellules et impactait la migration cellulaire. De plus, le traitement par les molécules inhibitrices impacte également la survie des cellules et leur migration.

Pour identifier les gènes régulés indirectement ou directement par HOXA9, une analyse transcriptomique après invalidation a identifié qu'HOXA9 régule des gènes impliqués dans la voie du TNFα, et notamment certains gènes déjà décrits dans le carcinome rénal tels que BMP2. BMP2 étant connu pour réguler la sous-population de cellules souches cancéreuses (CSC), nous avons évalué le rôle d'HOXA9 dans cette population et montré qu'HOXA9 est surexprimé lors de la formation de tumorosphères, une caractéristique des CSC et que son invalidation abolit totalement la formation de ces sphères. Pour confirmer

ces résultats, des cellules invalidées pour HOXA9 ont été implantées orthotopiquement à des souris immunodéficientes et montrent qu'HOXA9 est nécessaire à la tumorigénicité. Enfin, pour évaluer le rôle d'HOXA9 dans les métastases du cancer rénal et leur ciblage potentiel, nous avons généré un modèle métastatique pulmonaire et montré que l'invalidation d'HOXA9 est associée à une diminution de la formation de métastases pulmonaires du carcinome rénal.

Nos résultats montrent qu'HOXA9 représente une cible thérapeutique intéressante dans le carcinome rénal et que l'utilisation de ligands de l'ADN inhibiteurs d'HOXA9 pourrait être une option thérapeutique pertinente dans ce cancer.

Identification of the transcription factor HOXA9 as a therapeutic target in renal cell carcinoma and targeting with DNA ligands

Kidney cancer accounts for 3% of adult cancers. It is a heterogeneous and insidious disease with a good prognosis when it is discovered early. Unfortunately, 5-year survival remains below 10% when it is diagnosed at metastatic stages. Treatment is based on surgery for localized tumors and on the use of systemic therapy for advanced of metastatic stages. Although, treatment has profoundly changed last decades, responses rates don't exceed 30%. Finding new therapeutic targets in this cancer is particularly important to improve patient care. For that, we are working on the role of the transcription factor HOXA9 and its inhibition with small molecules, able to compete with the binding of HOXA9 to DNA, inhibit its transcriptional activity and therefore oncogenic programs that it regulates. Two main compounds have been selected.

First, we analyzed a genomic public database and showed that HOXA9 is overexpressed in papillary renal cell carcinoma and that its expression correlates with survival in clear cell renal cell carcinoma. Then, in two cellular models representing the two main histological subtypes of renal cell carcinoma, we showed that HOXA9 is strongly expressed and we evaluated biological effects following invalidation using RNA interference. Biological effects were compared to the ones observed following treatment with inhibitory compounds. We showed that HOXA9 knock-down impairs cell survival and cell migration and we observed the same effects with HOXA9 inhibitors.

To identify direct and indirect HOXA9-regulated genes, a transcriptomic analysis upon invalidation of HOXA9 identified that HOXA9 regulates genes involved in the TNFα pathway, and in particular, genes already described in renal carcinoma such as BMP2. BMP2 is known to regulate cancer stem cell (CSC) features, so we evaluated the role of HOXA9 in this population and showed that HOXA9 is overexpressed when cells form tumorspheres, a specific CSC feature. Moreover, HOXA9 invalidation abolished sphere formation. To confirm these results, HOXA9-knock-downed cells implanted orthotopically in the left kidney of immunodeficient mice showed that HOXA9 is required for cell tumorigenicity.

Finally, to determine the role of HOXA9 in the formation of pulmonary metastases and its potential targeting in such cases, we generated a metastatic-derived cellular model and we showed that invalidation of HOXA9 is associated with lung metastases reduction.

Our results indicate that HOXA9 represents a pertinent therapeutic target in renal carcinoma and that the use of HOXA9 inhibitory DNA ligands could be a potential effective therapeutic strategy.

REMERCIEMENTS

Je remercie tout particulièrement ma directrice de thèse, le Dr Marie-Hélène David-Cordonnier, qui m'a permis de réaliser ce travail au sein de son équipe. Elle m'a permis d'acquérir l'autonomie et la rigueur scientifique dans la gestion d'un projet de recherche. J'ai énormément appris et pu développer des techniques variées au cours de ma thèse et je la remercie grandement pour cela.

Merci aux membres du jury,
Je remercie le Pr Xavier Leroy et le Dr Michaël Perrais, qui m'ont guidé au début de ma thèse et qui me font l'honneur de présider et de participer à mon jury de soutenance.
Un immense merci à mesdames les Pr Nathalie Rioux-Leclercq et Dr Annie Schmid-Alliana, qui ont pris le temps de lire ce manuscrit et me font l'honneur d'être rapporteurs de ce travail de thèse, et de parcourir plusieurs centaines de kilomètres !

Merci également au Pr Pierre Formstecher et au Pr Bruno Quesnel de m'avoir accueilli dans leurs équipes d'abord au sein de l'U837 puis au sein de l'UMR-S 1172. Merci aux membres du JPArc pour leur accueil et leur gentillesse, une petite pensée toute particulière pour les drôles de dames du secrétariat : Céline (ou Célinebran), Michèle, Nathalie, Sophie.

Je remercie l'ensemble des membres du groupe. Merci à Sabine, pour ton soutien et ton aide précieuse tout au long de cette thèse. Merci à vous Amine, Remco, Amandine, Elise, Baptiste, Camille, Audrey pour votre bonne humeur et votre aide. Un merci tout particulier à Mélanie, sans qui ma thèse n'aurait pas été la même. Je suis sûr que tu feras un excellent chercheur ici ou ailleurs, tu en as bien pris le chemin ! Merci pour ton amitié et j'espère que la distance ne changera rien...

Je remercie également tous les membres de l'équipe, avec un clin d'œil particulier pour Elisabeth, Hassiba et Pauline que je n'ai eu cesse d'embêter et avec qui on a bien ri. Merci aussi aux chercheurs : Sylvie (bientôt la retraite !!!), Thierry (trop facile de vous embêter aussi), Meyling (merci d'avoir participé à perfectionner mon English), Carine. Merci aux étudiants passés par là : Celine, Alexia, Julie, Anne, Raeeka, Ossama pour votre soutien et votre bonne humeur. Je vous souhaite à tous le meilleur dans la suite de votre carrière et dans votre vie personnelle !

Merci tout particulier à l'IRCL et à ses membres pour l'aide et l'implication de tous les jours qu'ils apportent à la recherche : Micheline, Matthias, Corinne, Michel. Merci aussi à Mumu pour ta gentillesse et ta bonne humeur. Désolé de m'être caché dans ton placard pour te faire peur ;-)

Merci à la Fondation ARC qui m'a financé pour la dernière année ainsi qu'à tous les organismes qui ont financé ces travaux de recherche.

Je remercie également toutes les plateformes techniques et leur personnel sans qui rien ne serait possible : Nathalie et Émilie pour votre disponibilité, votre gentillesse et votre flexibilité, Cyrille et Delphine pour toutes ces souris générées, Marie-Hélène pour votre rapidité d'exécution, votre gentillesse et les discussions que l'on a eu autour des microtomes. Un merci tout particulier également aux membres de la plateforme de spectrométrie de masse : Jean-François, Amandine, Brigitte et Mostafa pour tous ces cafés et grâce à qui j'ai pu ajouter une corde à mon arc.

En parlant de café, comment oublier toutes ces pauses café à vos côtés qui ont égayées tant de journées : Samuel, Christine, Nicole, Mélanie, Quentin. Et les derniers arrivés : Grégoire, Véronique, Ueno.

Le plus grand des mercis va à ma famille et ma belle-famille sans qui rien de tout ça n'aurait été possible. Merci d'avoir toujours été là pour me soutenir. Maman, je te dédie cette thèse. Je sais que d'où tu es, tu m'envoies toute la force pour réussir... Tu es mon modèle à tout jamais ! La famille s'agrandit et c'est bien dommage que tu ne sois plus là pour en profiter...

Enfin, je remercie la « femme derrière le génie », ma petite Clémentine. Merci pour tout, pour toute l'aide et le soutien que tu m'as apporté et que tu m'apportes encore. Merci de me suivre au bout du monde et de tout faire pour que tout roule, même si je sais que c'est pas facile pour toi... Ou qu'on soit, si on est tous les deux, ça roulera toujours... c'est promis ! Pour le moment, à nous le soleil et la plage !!!!!

TABLE DES MATIÈRES

TABLE DES FIGURES ET TABLEAUX *5*

LISTE DES ABREVIATIONS *8*

INTRODUCTION *10*

1. Le carcinome rénal, un cancer complexe **11**

1.1. Anatomie et physiologie rénale 11
1.1.1. Morphologie externe et interne du rein 11
1.1.2. Microanatomie 12
1.1.3. Vascularisation rénale 12
1.1.4. Rôle physiologique 13
1.2. Classification anatomo-pathologique et génétique des tumeurs rénales 13
1.2.1. Le carcinome rénal à cellules claires (ccRCC) 15
1.2.2. Le carcinome rénal papillaire (pRCC) 15
1.2.3. Le carcinome rénal chromophobe (chRCC) 15
1.2.4. Différenciation sarcomatoïde 16
1.3. Épidémiologie descriptive du cancer du rein 17
1.4. Facteurs pronostiques 17
1.4.1. Facteurs liés à la tumeur 17
Classification TNM 17
Stade de la pathologie 19
Type histologique 19
Grade nucléaire de Fuhrman et grade nucléolaire de l'ISUP 19
Caractéristiques histologiques de la tumeur 21
1.4.2. Facteurs liés au patient 22
1.4.3. Systèmes pronostiques 22
1.5. Étiologie 23
1.5.1. Facteurs de risque 23
Tabagisme 23
Obésité 23
Hypertension artérielle 24
Insuffisance rénale terminale 24
1.5.2. Formes familiales 24
1.5.3. Biologie du ccRCC 25
Voie VHL/HIF/VEGF 25
Voie PI3K/AKT/mTOR 27
Autres altérations 28
1.5.4. Biologie du pRCC 29
Altérations de *MET* 29
Autres altérations 30
1.5.5. L'hétérogénéité tumorale génétique 30
1.5.6. L'hétérogénéité tumorale phénotypique : les cellules souches cancéreuses 31
1.6. Diagnostic 33
1.7. Manifestations cliniques 34
1.8. Prise en charge thérapeutique 35
1.8.1. Stades localisés T1-T2 35
Chirurgie 35
Traitements ablatifs 36
Surveillance active 36
1.8.2. Stades localement avancés 37
Chirurgie 37
Traitement adjuvant et néo-adjuvant 37
1.8.3. Cancer rénal métastatique 37
Chirurgie 37
Traitement médical systémique 38
1.9. Nouvelles cibles thérapeutiques 41
1.9.1. Nouvelles cibles impliquées dans l'angiogenèse 41
1.9.2. Cibles immunitaires 41

1.9.3. Ciblage des cellules souches cancéreuses 42

2. HOXA9, un intérêt grandissant en thérapie anti-cancéreuse 44

2.1. Les gènes *HOX* : découverte, organisation, structure 44
2.2. Physiologie des gènes *HOX* 46
2.2.1. Rôles physiologiques 46
Développement 46
Chez l'adulte 48
Hématopoïèse adulte 49
2.2.2. Contrôle de l'expression des gènes *HOX* 50
Signaux extra-cellulaires 50
Facteurs de transcription CDX 51
Organisation tridimensionnelle des clusters HOX 51
Modifications épigénétiques 52
Rôle des ARN non codants 53
2.3. HOXA9 : structure et physiologie 54
2.3.1. Structure 54
2.3.2. Co-facteurs 54
2.3.3. Gènes cibles 56
2.3.4. Régulation post-transcriptionnelle et post-traductionnelle 56
Régulation post-transcriptionnelle 56
Régulation post-traductionnelle 56
2.4. HOXA9 et cancer 57
2.4.1. HOXA9 dans les leucémies aigues myéloïdes 57
Réarrangements du gène *MLL* 58
Mutations *NPM1* (*nucleophosmin 1*) 58
Fusions HOX-NUP98 (*nucleoporin 98*) 59
Autres mécanismes 59
2.4.2. HOXA9 dans les autres hémopathies malignes 59
2.4.3. HOXA9 dans les tumeurs solides 60
Cancer colorectal 60
Glioblastome 61
Cancer de l'ovaire 61
Cancer de la prostate 62
Cancer du pancréas 62
Carcinome rénal 62
Autres cancers 63
2.5. Ciblage d'HOXA9 : stratégies en développement 63
2.5.1. Ciblage indirect 64
2.5.2. Ciblage direct 64

3. Ciblage d'HOXA9 : une stratégie thérapeutique prometteuse ? 65

3.1. Ciblage des facteurs de transcription 65
3.1.1. Régulation de leur expression 65
3.1.2. Régulation de leur dégradation 65
3.1.3. Ciblage des interactions protéine-protéine 65
3.1.4. Ciblage d'un domaine de liaison 66
3.1.5. Ciblage de la liaison à l'ADN du facteur de transcription 66
3.2. Les composés DB : de la parasitologie à la cancérologie 67
3.2.1. Les composés DB en parasitologie 68
3.2.2. Les composés DB en cancérologie 70
3.3. Ciblage de l'interaction HOXA9/ADN par les composés DB 71

OBJECTIFS 73

RESULTATS 76

1. Analyse des données de la base *The Cancer Genome Atlas* 77

1.1. HOXA9 dans le carcinome papillaire (pRCC) 79
1.1.1. Expression d'*HOXA9* 79
1.1.2. Altérations du nombre de copies d'*HOXA9* 80
1.1.3. Survie globale 82
1.1.4. Expression d'*HOXA9* et données clinico-pathologiques 83
1.2. HOXA9 dans le carcinome rénal à cellules claires (ccRCC) 84
1.2.1. Expression d'*HOXA9* 84

1.2.1. Altérations du nombre de copies d'*HOXA9* 85
1.2.2. Survie globale 85
1.2.1. Expression d'*HOXA9* et données clinico-pathologiques 87
CONCLUSION PARTIE 1 88

2. Modèles cellulaires et validation des outils d'étude 89
2.1. Lignées cellulaires humaines utilisées 89
2.1.1. Expression d'HOXA9 89
2.2. Invalidation d'HOXA9 par shRNA 90
2.3. Effets de l'invalidation d'HOXA9 dans un modèle non cancéreux 91
CONCLUSION PARTIE 2 93

3. Analyse moléculaire de l'invalidation d'HOXA9 dans la lignée 786-O 94
3.1. Modulation de l'expression des gènes après invalidation d'HOXA9 94
3.2. Analyse avec le logiciel GSEA (*GeneSet Enrichment Analysis*) 95
3.3. Validation par q-RT-PCR 98
3.4. Évaluation de l'interaction directe d'HOXA9 avec le promoteur de BMP2 99
3.4.1. Analyse de la région promotrice du gène BMP2 99
3.4.2. Évaluation de la liaison d'HOXA9 sur la région promotrice de *BMP2* 100
CONCLUSION PARTIE 3 103

4. Effets cellulaires de l'invalidation d'HOXA9 et de son inhibition par les composés DB818 et DB1055 104
4.1. Évaluation des effets cellulaires de l'invalidation d'HOXA9 104
4.1.1. Impact sur la survie cellulaire 104
4.1.2. Impact de l'invalidation d'HOXA9 sur la migration cellulaire 106
4.1.3. Impact de l'invalidation d'HOXA9 sur les cellules souches cancéreuses 107
4.2. Effets cellulaires du traitement par les composés DB818 et DB1055 109
4.2.1. Sensibilité des cellules aux composés DB818 et DB1055 109
4.2.2. Impact du traitement sur la survie cellulaire 109
4.2.3. Effet du traitement par les DB818 et DB1055 sur la migration cellulaire 111
CONCLUSION PARTIE 4 113

5. Effets de l'invalidation d'HOXA9 sur la tumorigénicité *in vivo* 114
5.1. Tumorigénicité de la lignée 786-O après invalidation d'HOXA9 114
5.1.1. Suivi de la tumorigénicité par imagerie de bioluminescence 114
5.1.2. Aspects macroscopiques et microscopiques 116
5.2. Tumorigénicité de la lignée CAKI-2 après invalidation d'HOXA9 117
5.2.1. Suivi de la tumorigénicité par imagerie de bioluminescence 117
5.2.2. Aspects macroscopiques et microscopiques 118
CONCLUSION PARTIE 5 120

6. Impact de l'invalidation d'HOXA9 sur un modèle métastatique pulmonaire du carcinome rénal 121
6.1. Génération et caractérisation du modèle métastatique pulmonaire 121
6.2. Expression d'HOXA9 dans la population métastatique générée 123
6.3. Impact de l'invalidation d'HOXA9 sur les métastases pulmonaires du carcinome rénal 123
6.4. Sensibilité aux composés DB818 et DB1055 126
CONCLUSION PARTIE 6 128

7. Évaluation de la toxicité potentielle *in vivo* des composés DB818 et DB1055 129
CONCLUSION PARTIE 7 131

DISCUSSION & PERSPECTIVES 132

MATERIEL ET METHODES 144

1. Composés étudiés 145

2. Analyse *in silico* 145

3. Biologie moléculaire 145
3.1. Système lentiviral 145
3.1.1. Plasmides 145
3.1.2. Amplification des plasmides par transformation bactérienne 146
3.1.3. Purification des plasmides 146
3.1.4. Dosage et vérification des plasmides 146

3.1.5. Production des lentivirus ... 147
3.1.6. Titration des lentivirus ... 147
3.2. Analyse de l'expression des gènes ... 147
3.2.1. Extraction et dosage d'ARN ... 147
3.2.2. Rétro-transcription ... 148
3.2.3. Analyse transcriptomique par puce à ADN ... 148
3.2.4. Analyse par le logiciel GSEA ... 149
3.2.5. PCR quantitative ... 149
3.3. Analyse de l'expression protéique ... 150
3.3.1. Extraction des protéines ... 150
3.3.2. Dosage des protéines ... 150
3.3.3. Western Blot ... 151
3.4. Interaction entre HOXA9 et l'ADN par retard sur gel ... 151

4. Biologie cellulaire ... 152
4.1. Culture cellulaire ... 152
4.2. Évaluation de la sensibilité aux molécules ... 153
4.3. Infection lentivirale ... 153
4.4. Mort cellulaire ... 153
4.5. Analyse de la migration par test Transwell ... 154
4.6. Capacité de formation de sphères ... 155

5. Expérimentations animales ... 155
5.1. Implantation orthotopique de cellules ... 155
5.2. Formation de métastases pulmonaires ... 156
5.3. Suivi par imagerie de bioluminescence ... 157
5.4. Analyse histologique des organes au sacrifice ... 157
5.5. Évaluation de la toxicité des composés DB818 et DB1055 ... 158

6. Analyses statistiques ... 158

BIBLIOGRAPHIE ... 159

ANNEXES ... 177
Annexe 1 ... 178
Annexe 2 ... 214
Annexe 3 ... 236
Annexe 4 ... 244

TABLE DES FIGURES ET TABLEAUX

Figure 1 : Morphologie externe et interne du rein droit
Figure 2 : Microanatomie rénale : le néphron, unité fonctionnelle rénale
Figure 3 : Histologie des trois principaux types de RCC
Figure 4 : Classification TNM
Figure 5 : Représentation schématique de la classification TNM.
Figure 6 : Stade de la maladie selon la classification TNM
Figure 7 : Principales voies moléculaires impliquées dans le carcinome rénal
Figure 8 : Gènes significativement retrouvés mutés dans le ccRCC
Figure 9 : Gènes significativement retrouvés mutés dans le pRCC
Figure 10 : Hétérogénéité tumorale et génération de sous-populations par acquisition de mutations
Figure 11 : Modèles de tumorigenèse
Figure 12 : Schémas représentatifs de néphrectomie partielle et néphrectomie totale
Figure 13 : Organisation et expression spatiale des gènes homéotiques chez la drosophile et l'Homme
Figure 14 : Structure des gènes et protéines HOX
Figure 15 : Interaction de l'homéodomaine avec l'ADN
Figure 16 : « Code HOX » du développement du système reproducteur féminin
Figure 17 : Expression des gènes HOX au cours de l'hématopoïèse normale
Figure 18 : Organisation tridimensionnelle des clusters HOX
Figure 19 : Représentation des différents ncRNAs au sein des clusters HOX
Figure 20 : Structure des gènes et protéines des deux variants d'HOXA9
Figure 21 : Complexe HoxA9-Pbx1-ADN
Figure 22 : Séquence consensus de fixation d'Hoxa9 évaluée par ChIP-seq
Figure 23 : Régulation de l'expression d'*HOXA9* en contexte normal et en situation leucémique
Figure 24 : Expression d'HOXA9 dans les tissus adultes
Figure 25 : Remodelage du micro-environnement tumoral par d'HOXA9 dans le cancer épithélial ovarien
Figure 26 : Structures chimiques du bérénil et de la pentamidine
Figure 27 : Cristallographie de la pentamidine liée au petit sillon de l'ADN
Figure 28 : Structures chimiques des DB75 et DB820
Figure 29 : Localisation intracellulaire du DB75 et du DB820 après administration intraveineuse à des souris infectées par *T. brucei*
Figure 30 : Structure chimique du DB293
Figure 31 : Structures chimiques des composés DB818 et DB1055
Figure 32 : Expression d'*HOXA9* dans le carcinome rénal papillaire
Figure 33 : Altération du nombre de copies d'*HOXA9* dans le pRCC
Figure 34 : Corrélation entre l'expression d'*HOXA9* et le nombre de copies
Figure 35 : Corrélation entre le nombre de copies d'*HOXA9* et de *MET*
Figure 36 : Analyse de la survie globale selon l'expression d'*HOXA9* et le type ou les altérations géniques fréquemment retrouvées dans le pRCC
Figure 37 : Expression d'*HOXA9* dans le carcinome rénal à cellules claires
Figure 38 : Altération du nombre de copies d'*HOXA9* dans le ccRCC
Figure 39 : Analyse de la survie globale selon l'expression d'HOXA9 et les altérations géniques fréquemment retrouvées dans le ccRCC
Figure 40 : Expression absolue d'HOXA9 dans différentes lignées de LAM, de rein embryonnaire et de RCC
Figure 41 : Validation de la transduction lentivirale des shRNA ciblant HOXA9

Figure 42 : Validation de l'efficacité d'invalidation d'HOXA9 par les shRNAs shHOXA9-1F2 et shHOXA9-1F3
Figure 43 : Analyse de la mort cellulaire dans la lignée HEK-293T après invalidation d'HOXA9
Figure 44 : Modulation transcriptionnelle après invalidation d'HOXA9 par shRNA ciblant HOXA9 dans la lignée 786-O
Figure 45 : Enrichissement de gènes dérégulés après invalidation d'HOXA9 dans le *geneset* TNFA_SIGNALING_VIA_NFKB
Figure 46 : Enrichissement de gènes dérégulés après invalidation d'HOXA9 dans les *genesets* KEGG
Figure 47 : Validation de la modulation de l'expression des gènes communément dérégulés après invalidation d'HOXA9 dans la lignée 786-O
Figure 48 : Analyse de la région promotrice du gène *BMP2*
Figure 49 : Évaluation de la liaison d'HOXA9 sur la séquence promotrice de *BMP2*
Figure 50 : Évaluation de l'inhibition de la liaison d'HOXA9 sur la séquence promotrice de *BMP2* par les composés DB818 et DB1055
Figure 51 : Analyse de la mort cellulaire dans la lignée 786-O après invalidation d'HOXA9
Figure 52 : Analyse de la mort cellulaire dans la lignée CAKI-2 après invalidation d'HOXA9
Figure 53 : Analyse des capacités migratoires des cellules 786-O après invalidation d'HOXA9
Figure 54 : Expression d'HOXA9 dans des tumorosphères de 786-O
Figure 55 : Capacité des cellules 786-O à former des sphères après invalidation d'HOXA9
Figure 56 : Sensibilité des lignées CAKI-2 et 786-O aux composés DB818 et DB1055
Figure 57 : Analyse de la mort cellulaire dans la lignée 786-O après inhibition d'HOXA9
Figure 58 : Analyse de la mort cellulaire dans la lignée CAKI-2 après inhibition d'HOXA9
Figure 59 : Analyse des capacités migratoires après inhibition d'HOXA9
Figure 60 : Suivi de la croissance tumorale de la lignée 786-OLuc après invalidation d'HOXA9 et implantation orthotopique rénale
Figure 61 : Tumorigénicité *in vivo* de la lignée 786-OLuc après invalidation d'HOXA9
Figure 62 : Images représentatives de l'histologie des reins 58 jours après implantation de cellules 786-OLuc invalidées (shHOXA9-1F3) ou non (shCTR) pour HOXA9
Figure 63 : Suivi de la croissance tumorale de la lignée CAKI-2Luc après invalidation d'HOXA9 et implantation orthotopique rénale
Figure 64 : Tumorigénicité *in vivo* de la lignée CAKI-2 après invalidation d'HOXA9. Aspects macroscopiques des reins gauches au sacrifice
Figure 65 : Images représentatives de l'histologie des reins 58 jours après implantation de cellules CAKI-2Luc invalidées (shHOXA9-1F3) ou non (shCTR) pour HOXA9
Figure 66 : Comparaison des capacités de colonisation pulmonaire de la lignée parentale 786-OLuc et de sa population dérivée 786-OLucM1
Figure 67 : Histologie des poumons d'une souris après injection intraveineuse des cellules 786-OLucM1
Figure 68 : Expression d'*HOXA9* dans la population dérivée 786-OLucM1
Figure 69 : Impact de l'invalidation d'HOXA9 sur la colonisation pulmonaire et la formation de métastases pulmonaires
Figure 70 : Bioluminescence émise par les poumons *ex vivo* après invalidation ou non d'HOXA9
Figure 71 : Images représentatives de l'histologie des poumons 53 jours après injection intraveineuse de cellules 786-OLucM1 invalidées (shHOXA9-1F2 et shHOXA9-1F3) ou non (shCTR) pour HOXA9
Figure 72 : Sensibilité au DB818 et au DB1055 de la lignée parentale 786-OLuc et des cellules dérivées 786-OLucM1
Figure 73 : Schéma de traitement et d'analyse de la toxicité des DB818 et DB1055.

Figure 74 : Numérations sanguines de souris C57Bl/6 après 3 administrations de DB818 et DB1055
Figure 75 : Fonctions rénale et hépatique de souris C57Bl/6 après 3 administrations de DB818 et DB1055

Tableau 1 : Classification OMS 2016 des tumeurs rénales
Tableau 2 : Grade nucléaire de Fuhrman et grade nucléolaire de l'ISUP/OMS
Tableau 3 : Formes familiales de RCC
Tableau 4 : Molécules possédant une AMM dans le carcinome rénal avancé ou métastatique en France en 2018 et résultats des principaux essais cliniques de phase III
Tableau 5 : Recommandations 2018 actualisées de prise en charge du ccRCC métastatique émises par l'EAU
Tableau 6 : Corrélation entre l'expression d'*HOXA9* et la survie globale dans 18 bases de données TCGA représentant 18 cancers
Tableau 7 : Association des caractéristiques clinico-pathologiques avec l'expression d'*HOXA9* dans la base de données KIRP
Tableau 8 : Association des caractéristiques clinico-pathologiques avec l'expression d'*HOXA9* dans la base de données KIRC
Tableau 9 : Plasmides utilisés pour la production du système lentiviral
Tableau 10 : Liste des amorces utilisées pour la qPCR
Tableau 11 : Liste des anticorps utilisés
Tableau 12 : Lignées cellulaires utilisées

3C : Chromosome conformation capture
ADN : acide désoxyribonucléique
AJCC : American Joint Committee on Cancer
AKT : protéine kinase B
ALAT : alanine aminotransférase
ALK1 : Activin receptor-Like Kinase 1
AMM : Autorisation de Mise sur le Marché
ANKRD1, **ANKRD52** : ankyrin repeat domain 1 - 52
ARNT : aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator
APC : allophycocyanine
ARE : antioxidant responsive element
AREG : amphiregulin
ARN : acide ribonucléique
ARNm : acide ribonucléique messager
ASAT : aspartate aminotransférase
ATRA : acide tout-trans rétinoïque
Bad : BCL2 Associated Agonist Of Cell Death
BAP1 : BRCA1 Associated Protein 1
BCL2 : B-Cell CLL/Lymphoma 2
bFGF : basic fibroblast growth factor
BMP2 : bone morphogenetic protein 2
BRCA1 : breast cancer 1, early onset
BSA : albumin sérique bovine
CAF : fibroblastes associés au cancer
CAIX : carbonic anhydrase 9
CCAFU : comité de cancérologie de l'Association Française d'Urologie
CCDN1 : cyclin D1
CCL2 : C-C motif chemokine Ligand 2
CCR4 : C-C motif chemokine receptor 4
ccRCC : carcinome rénal à cellules claires
CD4/CD34/CD38/CD44/CD105 : cluster of differentiation
CDH3 : cadherin 3
CDK : cyclin dependent kinase
CDKN2A : Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 2A
cDNA : ADN complémentaire
CDX : Caudal Type Homeobox
chRCC : carcinome rénal chromophobe
CNV : copy number variation
CSC : cellules souches cancéreuses
CSF-1 : Colony Stimulating Factor 1
CSH : cellule souche hématopoïétique
CTLA-4 : Cytotoxic T-Lymphocyte Associated Protein 4
CUL-4A : Cullin 4A
CXCR4 : C-X-C Motif Chemokine Receptor 4
DAPI : 4',6-diamidino-2-phénylindole
DUSP5 : Dual Specificity Phosphatase 5
EAU : European Association of Urology
ECOG : Eastern Cooperative Oncology Group
EDTA : acide éthylènediaminetétraacétique
EGF : Epidermal Growth Factor
eiF4E : Eukaryotic Translation Initiation Factor 4E
eiF4EBP : Eukaryotic Translation Initiation Factor 4E Binding Protein
EMSA : Electrophoretic Mobility Shift Assay
EPO : érythropoïétine
ERG : Ets-Related Gene
ERK : Mitogen-Activated Protein Kinase 1 (MAPK1)
ETS : E26 transformation-specific
EZH2 : Enhancer Of Zeste 2 Polycomb Repressive Complex 2 Subunit
FGF : Fibroblast Growth Factor
FC : fold change
FHL2 : Four And A Half LIM Domains 2
GAB1 : GRB2 Associated Binding Protein 1
GFP : protéine fluorescente verte
GLUT1 : Glucose Transporter Type 1
GRB2 : Growth Factor Receptor Bound Protein 2
HBEGF : Heparin Binding EGF Like Growth Factor
HBS : HOX-binding site
HE : hématoxyline-éosine
HGF : Hepatocyte Growth Factor
HIF : Hypoxia Inducible Factor
HK1-**HK2** : hexokinase 1 - 2
HMGA2 : High Mobility Group AT-Hook 2
HMT : histone méthyltransférase
HOTAIR : HOX Transcript Antisense RNA
HOTTIP : HOXA Distal Transcript Antisense RNA
HOX : homeobox
IGF : Insulin Like Growth Factor
IL-10/IL-15 : interleukin-10 - 15
IMC : indice de masse corporelle
INHBA : Inhibin Subunit Beta A
IRM : imagerie par résonance magnétique
ISUP : international society of urological pathology
ITGB4 : Integrin Subunit Beta 4
KDM5C : Lysine Demethylase 5C
LAM : leucémie aigüe myéloïde
LDH : lactate déshydrogénase
lncRNA : long ARN non codant
LOH : perte d'hétérozygotie
MAP2K7 : Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase 7
MAPK : Mitogen-Activated Protein Kinase
MDM2 : Mouse Double Minute 2
MEIS : Myeloid Ecotropic Viral Integration Site

MET : Mesenchymal Epithelial Transition, Hepatocyte Growth Factor Receptor
miRNA : microARN
MiTF : microphthalmia-associated transcription factor
MLL : mixed lineage leukemia
MTOR : mammalian target of rapamycin
MTS : [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium
NCI : National Cancer Institute
ncRNA : ARN non codant
NIH : National Institutes of Health
NK : natural killer
NRF2 : Nuclear Factor, Erythroid 2 Like 2
NSG : NOD scid gamma
NUP98 : nucleoporin 98
OCT4 : Octamer-Binding Protein 4
OMS : Organisation Mondiale de la Santé
P27 : Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 1B
PAK : P21 (RAC1) Activated Kinase
PBRM1 : Polybromo 1
PBS : phosphate buffer saline
PBX : Pre-B-Cell Leukemia Homeobox
PCR : polymerase chain reaction
PD-1 : Programmed Cell Death 1
PD-L1 : Programmed Cell Death 1 Ligand 1
PDGF : Platelet Derived Growth Factor
PDGFR : Platelet Derived Growth Factor Receptor
PDK1 : Pyruvate Dehydrogenase Kinase
PHD : Pyruvate Dehydrogenase Kinase
PI3K : Phosphoinositide-3-Kinase
PIP2 : Phosphatidylinositol-bisphosphate
PIP3 : phosphatidylinositol-trisphosphate
PKC : protein kinase C
PRC1/PRC2 : polycomb repressor complex 1 - 2
pRCC : carcinome rénal papillaire
PTEN : Phosphatase And Tensin Homolog
PTHrp : parathyroid hormone related protein
Q-RT-PCR : quantitative reverse-transcription PCR
RCC : carcinome à cellules rénales
RIPA : Radioimmunoprecipitation assay buffer
S6K1 : S6 Kinase B1
SEMA5B/SEMA6A : semaphorin 5B – 6A
SETD2 : SET Domain Containing 2
shRNA : ARN en épingle à cheveux
siRNA : petit ARN interférent
SMD : syndrome myélodysplasique
SVF : sérum de veau fœtal
TALE : three amino acid loop extension
TAM : macrophages associés aux tumeurs
TCGA : The Cancer Genome Atlas
TDM : tomodensitométrie
TEM : transition epithélio-mésenchymateuse
TEP-FDG : tomographie par émission de positons au fluoro-désoxyglucose
TET1 : Ten-Eleven Translocation 1
TGFb : Transforming Growth Factor Beta
TLR-9 : Toll Like Receptor 9
TNF : tumor necrosis factor
TNFRSF11B : TNF Receptor Superfamily Member 11b
TNM : tumor-node-metastasis
TP53 : Tumor Protein P53
TPO : thrombopoïétine
TSC2 : Tuberous Sclerosis 2
TSS : site d'initiation de la transcription
UICC : Union for International Cancer Control
VEGFA : Vascular Endothelial Growth Factor A
VEGFR : Vascular Endothelial Growth Factor Receptor
VHL : Von Hippel-Lindau Tumor Suppressor
WDR5 : WD Repeat Domain 5

INTRODUCTION

1. Le carcinome rénal, un cancer complexe

1.1. Anatomie et physiologie rénale

Les reins sont des organes vitaux, faisant partie avec les uretères et la vessie, de l'appareil urinaire. Les reins possèdent plusieurs fonctions dont la principale est de réaliser les fonctions de filtration et d'excrétion via l'urine des déchets métaboliques.

1.1.1. Morphologie externe et interne du rein

Le rein est un organe pair et bilatéral situé dans l'espace rétropéritonéal, sous le diaphragme ; le rein droit se situant en dessous et en arrière du foie, le rein gauche en dessous et en arrière de la rate. Le rein est entouré d'une couche de graisse périrénale et d'une couche de tissu connectif appelé fascia de Gérota. De forme ovoïde aplati, d'une longueur moyenne de 12 cm et d'une largeur moyenne de 6 cm, il est constitué de deux faces (antérieure et postérieure), de deux bords (externe et interne) et de deux pôles (supérieur et inférieur). Le bord externe est convexe et le bord interne est creusé d'une cavité appelé sinus rénal d'où part le hile rénal délimitant les voies excrétrices supérieures (VES) intra-rénales et extra-rénales (Figure 1A).

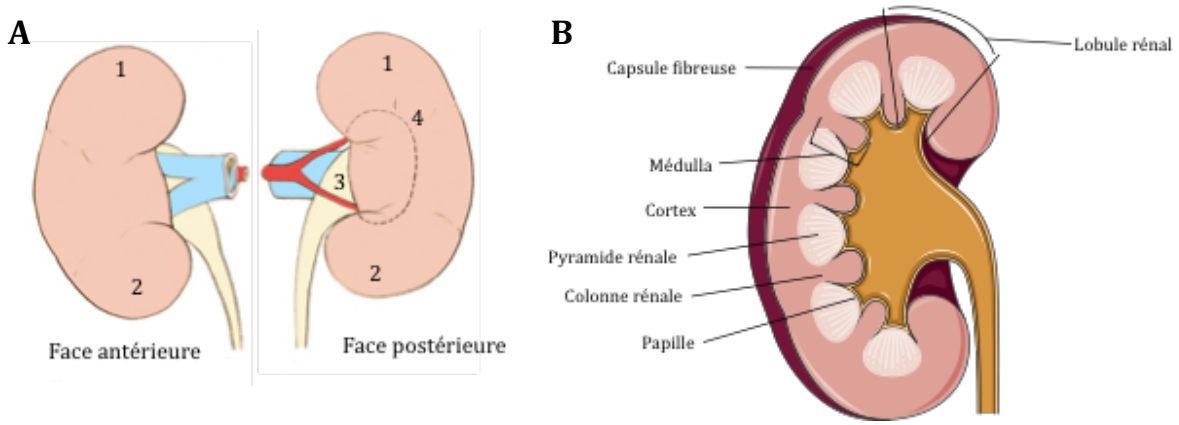


Figure 1 : **A. Morphologie externe du rein droit**. 1. Pôle supérieur, 2. Pôle inférieur, 3. Hile rénal, 4. Projection du sinus rénal. Tiré de Henry and Sèbe, 2008. **B. Morphologie interne.**

Le sinus rénal est entouré d'un parenchyme recouvert d'une capsule fibreuse rigide qui recouvre également les parois du sinus. Le parenchyme est lui formé de deux parties (Figure 1B) :

- la médulla rénale, centrale, constituée de zones triangulaires appelées pyramides rénales (ou pyramides de Malpighi). Elles contiennent les tubules rénaux droits et les tubules collecteurs et sont au nombre de huit à dix par rein.
- le cortex, périphérique, qui constitue la zone de filtration glomérulaire. Il s'insinue entre les pyramides formant la colonne rénale (ou colonne de Bertin). La portion de cortex au contact de la capsule, appelée portion contournée, contient les corpuscules

rénaux (ou corpuscules de Malpighi). La portion au contact des pyramides, appelée portion radiée, contient les pyramides corticales (ou pyramides de Ferrein) qui sont des prolongements de la médulla rénale. Chaque pyramide rénale avec la zone de cortex l'entourant forme un lobule rénal.

Le sinus rénal, quant à lui, est fait de papilles rénales. Il existe en moyenne autant de papilles que de pyramides. L'urine sécrétée est déversée dans la VES intra-rénale par de petits trous au sommet de chaque papille.

1.1.2. Microanatomie

L'unité fonctionnelle du rein est appelée le néphron. Chaque néphron se distingue en deux parties : le corpuscule rénal et le tubule rénal. Le corpuscule rénal est lui formé de la capsule glomérulaire (ou capsule de Bowman) et du glomérule. Le tubule rénal est lui formé de trois parties : le tubule rénal contourné proximal, proche du corpuscule rénal, les tubules rénaux droits ascendants et descendants constituant l'anse du néphron (ou anse de Henlé) et le tubule contourné distal qui se jette dans le tubule collecteur. Les tubules collecteurs, dans lesquels s'abouchent plusieurs néphrons se déversent au niveau des papilles (Figure 2).

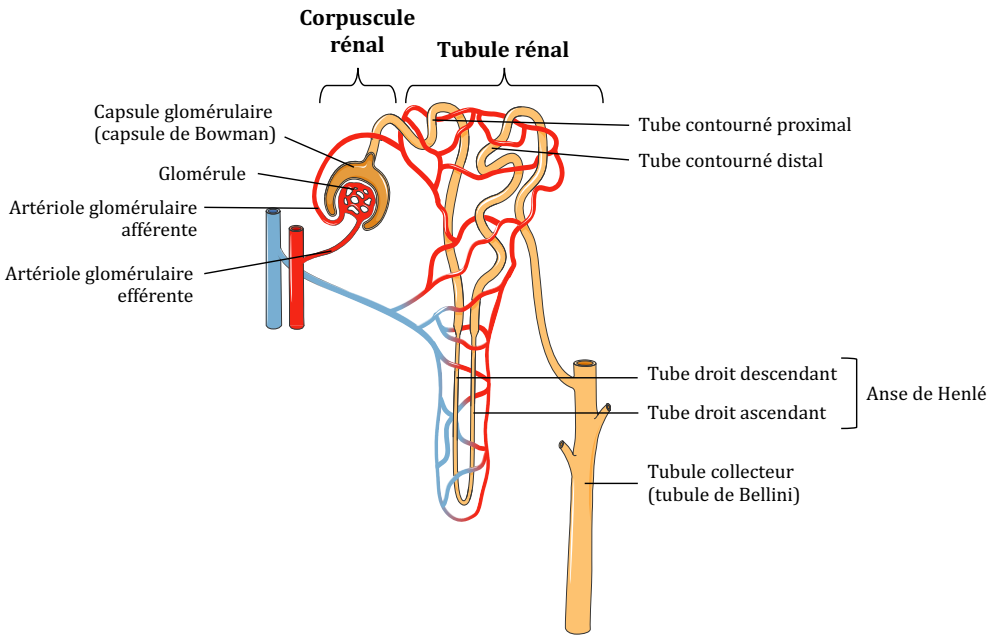


Figure 2 : **Microanatomie rénale : le néphron, unité fonctionnelle rénale.**

1.1.3. Vascularisation rénale

Le rein est un des organes les plus vascularisés du corps humain. Il s'agit d'une vascularisation terminale où chaque rein est vascularisé par une artère rénale qui nait de l'aorte abdominale. Chaque artère se divise ensuite en deux branches terminales

principales puis en branches intrarénales qui se divisent à nouveau permettant la perfusion du cortex et de la médulla. Les artères se capillarisent ensuite en artères glomérulaires afférentes puis en artériole afférente, au niveau de chaque néphron, qui s'organise en un réseau de capillaires en pelote, appelé glomérule rénal (ou glomérule de Malpighi) qui se rejoignent ensuite pour former l'artère glomérulaire efférente (Figure 2).

Les veines intra-rénales se réunissent au niveau du hile en une veine rénale par rein qui se jette ensuite dans la veine cave inférieure.

1.1.4. Rôle physiologique

Le rein possède diverses fonctions physiologiques. Son rôle principal est de participer à la filtration sanguine des déchets métaboliques et à leur excrétion dans l'urine. Le rein assure également des fonctions endocrines et métaboliques puisque c'est le siège de la production d'érythropoïétine (EPO), de la forme active de la vitamine D ou calcitriol et de la rénine, directement impliquée dans la régulation de l'équilibre hydro-électrolytique via le système rénine-angiotensine-aldostérone et par conséquent de la pression artérielle.

1.2. Classification anatomo-pathologique et génétique des tumeurs rénales

Les tumeurs rénales bénignes et malignes sont regroupées et distinguées dans la classification de l'OMS de 2016 (Moch *et al.*, 2016b, 2016a). Différents critères sont pris en compte et évalués : des critères anatomo-pathologiques (caractéristiques cytoplasmiques, architecturales, localisation anatomique des tumeurs), des pathologies associées, des altérations moléculaires spécifiques, l'association à des syndromes de prédisposition héréditaires.

Dans moins de 10% des cas, il s'agit de tumeurs bénignes, non cancéreuses. On distingue principalement l'adénome papillaire, l'oncocytome et l'angiomyolipome. Ces tumeurs sont le plus souvent asymptomatiques et d'évolution lente. L'oncocytome est une tumeur d'origine épithéliale représentant environ 5% des tumeurs rénales.

L'oncocytome partage des caractéristiques morphologiques avec le carcinome rénal à cellules rénales chromophobes, justifiant le plus souvent une ablation chirurgicale.

L'angiomyolipome, quant à lui, est une tumeur mésenchymateuse constituée de tissus adipeux, de fibres musculaires et de vaisseaux sanguins. L'angiomyolipome ne requiert aucun traitement, mais une surveillance par imagerie permet de suivre sa progression.

Tumeurs malignes à cellules rénales	**Tumeurs mésenchymateuses de l'adulte**
Carcinome à cellules claires du rein Néoplasie kystique multiloculaire rénale de faible potentiel de malignité Carcinome rénal papillaire Carcinome rénal associé à la HLRCC Carcinome à cellules chromophores Carcinome des tubes collecteurs Carcinome du rein médullaire Carcinome associé aux translocations MiTF Carcinome lié à un déficit en succinate déshydrogénase Carcinome tubuleux et mucineux à cellules fusiformes Carcinome tubulo-kystique Carcinome associé à la maladie kystique acquise Carcinome rénal papillaire à cellules claires Carcinome inclassé	Léiomyosarcome Angiosarcome Rhabdomyosarcome Ostéosarcome Sarcome d'Ewing Angiomyolipome Angiomyolipome épithélioïde Léiomyome Hémangiome Lymphangiome Hémangioblastome Tumeur à cellules juxtaglomérulaires Tumeur interstitielle rénale médullaire Schwannome Tumeur fibreuse solitaire
Tumeurs métanéphriques	**Tumeurs mixtes épithéliales et mésenchymateuses**
Adénome métanéphrique Adénofibrome métanéphrique Tumeur stromale métanéphrique	Néphrome kystique Tumeur mixte épithéliale et stromale Synovialosarcome
Tumeurs néphroblastiques	**Tumeurs neuroendocrines**
Restes néphrogéniques Néphroblastome Néphroblastome kystique partiellement différentié Néphrome kystique pédiatrique	Tumeur carcinoïde Carcinome neuroendocrine à grandes cellules Carcinome neuroendocrine à petites cellules Phéochromocytome
Tumeurs mésenchymateuses de l'enfant	**Tumeurs lymphoïdes et hématopoïétiques**
Sarcome à cellules claires Tumeur rhabdoïde Néphrome mésoblastique congénital Tumeur rénale ossifiante de l'enfant	Lymphome Leucémie Plasmocytome
Tumeurs métastatiques	**Tumeurs germinales**
	Tératome Choriocarcinome

Tableau 1 : **Classification OMS 2016 des tumeurs rénales**. D'après Moch *et al.*, 2016a et Bensalah *et al.*, 2016.

Les tumeurs malignes représentent la plus large proportion des tumeurs rénales. Le carcinome à cellules rénales (RCC - *renal cell carcinoma*) représente 80 à 85% des tumeurs rénales. Les RCC sont ensuite classifiés au sein de la classification OMS de 2016 selon des critères histologiques, cytogénétiques et évolutifs (Moch *et al.*, 2016a) (Tableau 1).

Les principaux types, détaillés dans cette introduction correspondent aux trois types de carcinomes à cellules rénales les plus fréquents : carcinome rénal à cellules claires (ccRCC – *clear cell RCC*), carcinome rénal papillaire (pRCC – *papillary RCC*),

carcinome rénal chromophobe (chRCC – *chromophobe RCC*). *Les deux premiers font l'objet de notre étude.*

1.2.1. Le carcinome rénal à cellules claires (ccRCC)

Il s'agit du type de carcinome rénal, le plus courant. Il représente 70% à 75% des RCC et touche les cellules épithéliales du tube contourné proximal. Macroscopiquement, il s'agit de tumeurs solides le plus souvent périphériques avec une limite entre tissu tumoral et tissu sain bien définie. Des zones de nécrose ou des remaniements hémorragiques, fibreux, des calcifications ou des zones d'ossification peuvent être présents en cas de tumeur volumineuse et grossissant rapidement. La tumeur est de couleur caractéristique, jaune d'or à brune.

Microscopiquement, les tumeurs solides ou kystiques présentent un stroma pauvre mais très riche en vaisseaux. Les cellules possèdent un cytoplasme riche en lipides et en glycogène, qui apparait donc clair, « vide » (Figure 3a). Le contenu cytoplasmique explique la couleur jaune des tumeurs. Des cellules éosinophiles sont également présentes au sein de la tumeur.

1.2.2. Le carcinome rénal papillaire (pRCC)

Il s'agit du deuxième type histologique de RCC le plus courant, représentant 10 à 15%. Les tumeurs sont périphériques, souvent à un pôle et ne dépassent pas le cortex rénal. Là encore, le tissu tumoral et le tissu sain sont bien séparés par l'existence d'une pseudocapsule. La tumeur est de couleur jaune beige. Les remaniements hémorragiques et les zones de nécrose ou kystiques sont fréquents, notamment dans les tumeurs volumineuses. Microscopiquement, les tumeurs présentent une architecture papillaire ou tubulopapillaire. On distingue deux types : le type 1 et le type 2.

Le type 1 (basophile) présente des papilles tapissées de petites cellules avec un cytoplasme étroit et au noyau de petite taille (Figure 3b). Le type 2 (éosinophile) présente des papilles tapissées de cellules plus larges avec un cytoplasme éosinophile granuleux (Figure 3c). Des nucléoles proéminents peuvent être présents dans les zones nécrotiques.

1.2.3. Le carcinome rénal chromophobe (chRCC)

Le carcinome rénal chromophobe représente environ 5% des RCC. Les chRCC se développeraient à partir des cellules intercalaires des tubes collecteurs. C'est une tumeur qui peut se confondre avec l'oncocytome, bénin, qui est parfois considéré par certains comme la forme bénigne du chRCC (Mancini *et al.*, 2008). Macroscopiquement, il s'agit de tumeurs solides bien délimitées, de couleur orangée à beige virant au gris après la fixation

histologique. Contrairement aux deux principaux autres types, le chRCC ne présente généralement pas de grand remaniement hémorragique ou nécrotique, sauf en cas de tumeurs volumineuses qui peuvent atteindre plus de 20 cm de diamètre. Microscopiquement, les tumeurs sont constituées de très larges cellules avec un cytoplasme réticulé riche en microvésicules et des halos périnucléaires (Figure 3d). La coloration spécifique au fer colloïdal de Hale permet de le distinguer de l'oncocytome, en colorant spécifiquement en bleu les microvacuoles cytoplasmiques.

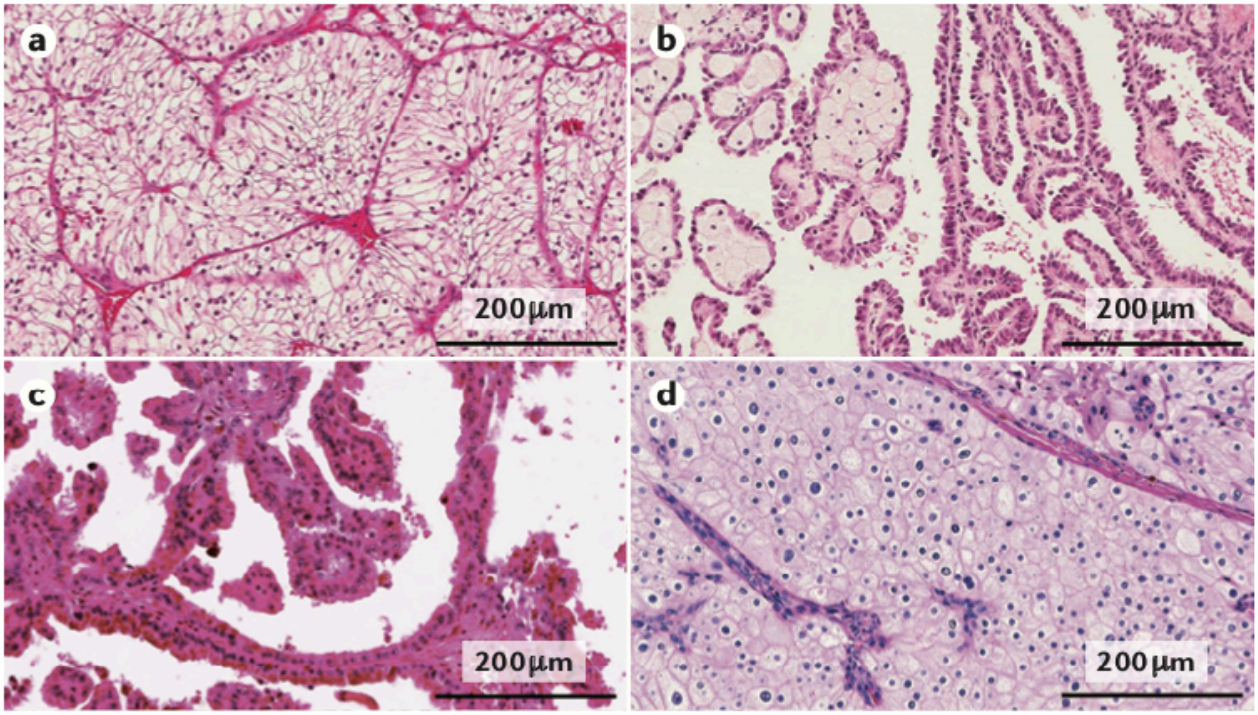


Figure 3 : **Histologie des trois principaux types de RCC**. a. Carcinome rénal à cellules claires, b. Carcinome rénal papillaire de type 1, c. Carcinome rénal papillaire de type 2, d. Carcinome rénal chromophobe. Tiré de Hsieh *et al.*, 2017.

1.2.4. Différenciation sarcomatoïde

Il s'agit d'un phénomène associé à un mauvais pronostic qui touche tous les types de RCC (Cheville *et al.*, 2004). Les RCC avec composante sarcomatoïde possèdent un caractère plus agressif, avec une activité proliférative accrue, un envahissement local plus important et une probabilité augmentée de formation de métastases. Macroscopiquement, il s'agit de zones blanchâtres, nécrotico-hémorragiques mal délimitées. Microscopiquement, les cellules tumorales atypiques présentent alors un cytoplasme fusiforme, semblable aux cellules sarcomateuses, mais conservent des caractéristiques immunohistochimiques épithéliales.

1.3. Épidémiologie descriptive du cancer du rein

Le cancer du rein est le troisième cancer le plus fréquent de l'appareil urogénital, après les cancers de la prostate et de la vessie. Il représente environ 3% des cancers de l'adulte. En France, selon les données de l'Institut de Veille Sanitaire, le cancer du rein est le 7ème cancer le plus fréquent chez l'homme et le 10ème chez la femme avec une projection de 14150 nouveaux cas pour 2017. Dans tous les pays industrialisés, l'incidence n'a cessé d'augmenter ces dernières années, sans qu'aucun facteur ne soit clairement identifié (Chow, 1999). L'âge médian au diagnostic est de 65 ans avec un *sex ratio* d'environ deux hommes pour une femme.
En termes de mortalité, le cancer du rein se place à la 7ème position chez l'homme comme chez la femme, avec une projection pour 2017 d'environ 4700 décès en France.

La survie à 5 ans après le diagnostic ne cesse d'augmenter, mais reste très liée au stade au diagnostic. Selon les chiffres de l'American Cancer Society, la survie à 5 ans s'établit à 81% au stade I, 74% au stade II, 53% au stade III et chute sous la barre des 10% au stade IV, avancé ou métastatique.

1.4. Facteurs pronostiques

L'évaluation du pronostic du cancer du rein repose sur l'utilisation de divers éléments et classifications spécifiques et non spécifiques au cancer du rein. Différents algorithmes prenant en compte des critères liés à la tumeur d'une part, et au patient d'autre part, ont par ailleurs été validés et sont utilisés dans la pratique clinique pour la prise en charge des patients.

1.4.1. Facteurs liés à la tumeur

Classification TNM

La classification TNM (*Tumor-Node-Metastasis*) est la classification de référence utilisée tant sur le plan clinique (classification cTNM – *clinical* TNM) que sur le plan pathologique (classification pTNM – *pathological* TNM) et permet d'établir un stade de la maladie. Cette classification émise conjointement par l'AJCC (*American Joint Commitee on Cancer*) et l'UICC (*Union for International Cancer Control*) est régulièrement mise à jour pour tous les types de cancer. La 8ème édition est utilisée à ce jour (American Joint Commitee on Cancer, 2010).

Pour le rein, elle prend en compte la taille de la tumeur primitive rénale et l'envahissement de territoires particuliers (stade T pour *Tumor*), la présence ou non de métastases ganglionnaires régionales (stade N pour *Node*) et la présence ou non de

métastases à distance (stade M pour *Metastasis*) (Figures 4 et 5). Les territoires les plus fréquemment touchés par des métastases à distance sont les os, le foie, les poumons, le cerveau.

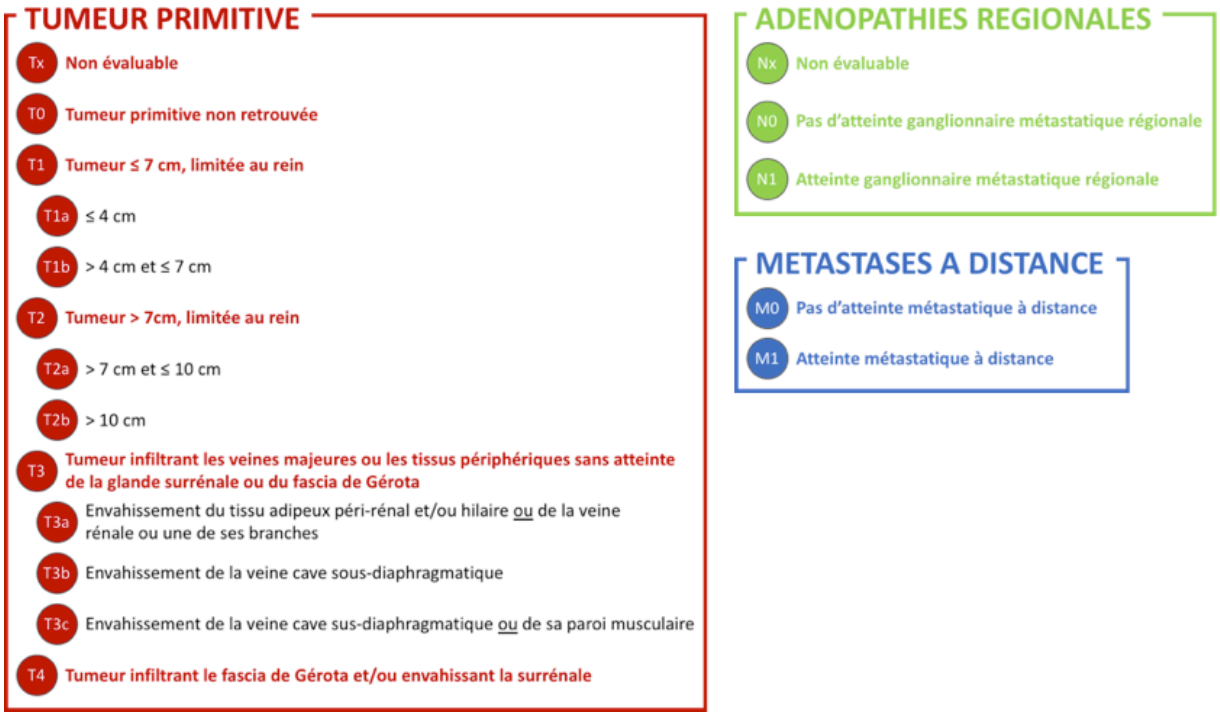


Figure 4 : **Classification TNM** (T, tumor – N, node – M, metastasis). D'après American Joint Commitee on Cancer, 2010

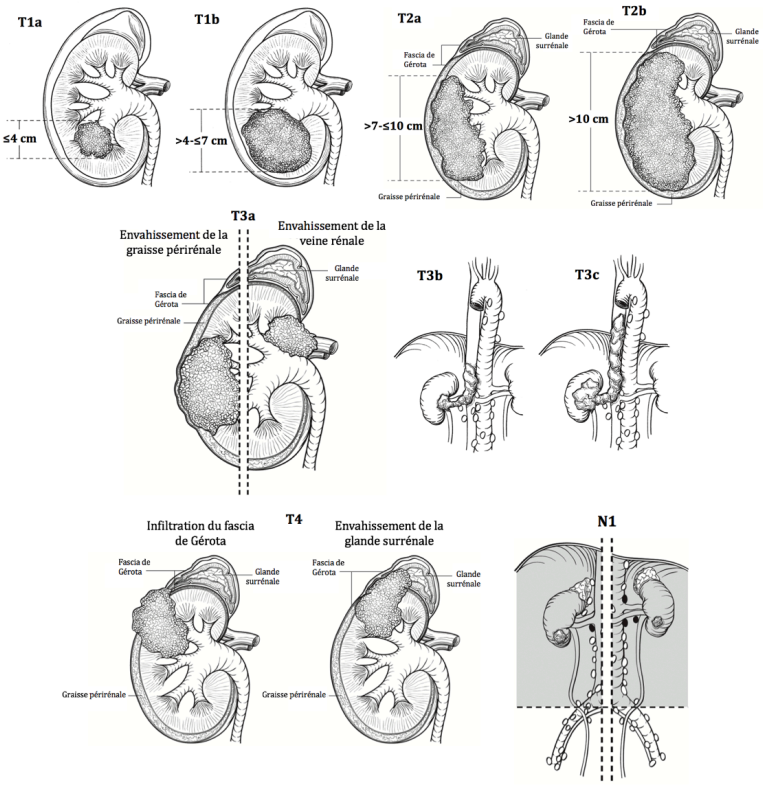


Figure 5 : **Représentation schématique de la classification TNM**. D'après American Joint Commitee on Cancer, 2010

Stade de la pathologie

La classification TNM est utilisée ensuite pour classifier les patients en stades, utilisés comme valeurs pronostiques. En effet, les stades I et II correspondent à des formes localisées, le stade III à des formes localement avancées et le stade IV à des formes métastatiques (Figure 6). Logiquement, le stade est corrélé avec la survie. Le stade IV, métastatique, présente une survie à 5 ans qui chute sous la barre des 10%.

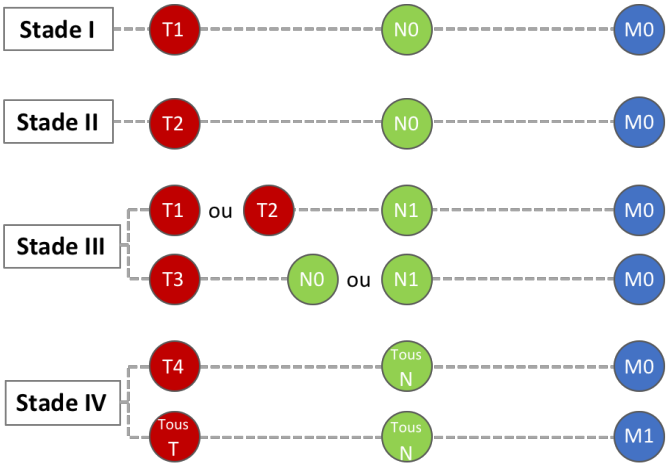


Figure 6 : **Stade de la maladie selon la classification TNM**.

Type histologique

Le type histologique de RCC impacte de façon significative le pronostic des patients. Ainsi, certains types présentent des caractéristiques d'agressivité plus importantes que d'autres. Le carcinome rénal à cellules claires est plus agressif que le carcinome papillaire, avec une survie diminuée à 5 ans (Steffens *et al.*, 2012), variant selon les études de 43 à 89% pour le ccRCC et de 57 à 86% pour le pRCC (Moch *et al.*, 2000; Amin *et al.*, 2002; Gudbjartsson *et al.*, 2005; Patard *et al.*, 2005, Moch, Patard, Gudbjartsson). Par ailleurs, le type 1 du carcinome papillaire est le plus souvent détecté à des stades moins avancés que le type 2 et présente donc un meilleur pronostic avec une survie améliorée (Moch *et al.*, 2000; Leroy *et al.*, 2002b; Pignot *et al.*, 2007). De plus, le type 2 est plus souvent associé à la présence de métastases ganglionnaires et à une infiltration microvasculaire plus importante, facteurs de mauvais pronostic (Pignot *et al.*, 2007).

Enfin, le carcinome rénal chromophobe présente lui un pronostic généralement bon, entre 76 et 100% selon les études (Moch *et al.*, 2000; Amin *et al.*, 2002; Gudbjartsson *et al.*, 2005; Patard *et al.*, 2005).

Grade nucléaire de Fuhrman et grade nucléolaire de l'ISUP

Afin de grader les tumeurs sur le plan histologique, le grade nucléaire de Fuhrman est encore le plus couramment utilisé à ce jour (Fuhrman *et al.*, 1982). Les trois premiers

grades reposent sur des caractéristiques nucléaires (taille des noyaux, contours, présence de nucléoles), tandis que le quatrième est défini par la présence d'un pléomorphisme nucléaire. Cette classification reflète l'état de différenciation des cellules, et ainsi représente un critère pronostique (Tableau 2). Bien qu'il s'agisse du système de gradation le plus utilisé, ce dernier n'est pas validé dans le carcinome chromophobe (Delahunt *et al.*, 2007) et de nombreux auteurs préconisent sa simplification, afin de diminuer les variabilités liées notamment à l'observateur (Rioux-Leclercq *et al.*, 2007; Delahunt *et al.*, 2011).

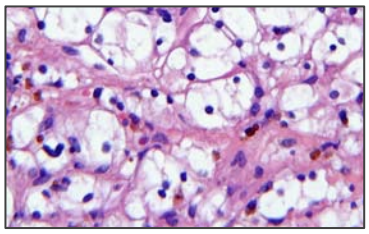
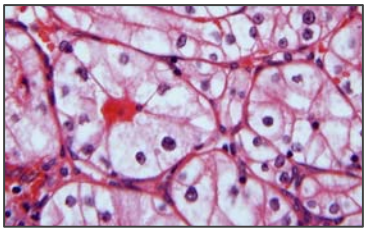
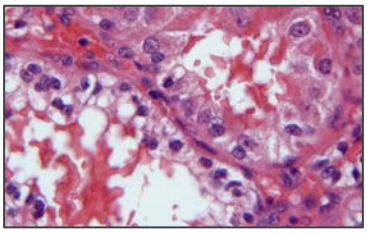
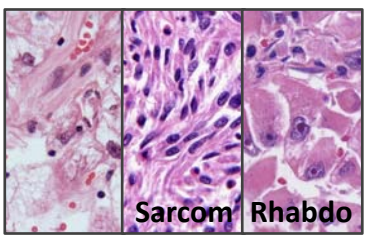
Grade I		
Fuhrman	Petits noyaux ronds (10 µm) à contours réguliers avec nucléole mal visible ou absent	
ISUP	Nucléoles absents ou peu visibles et basophiles à fort grossissement (x400)	
Grade II		
Fuhrman	Noyaux ronds (15 µm), un peu irréguliers avec un nucléole visible à x400	
ISUP	Nucléoles visibles et éosinophiles à fort grossissement (x400) mais pas proéminents	
Grade III		
Fuhrman	Noyaux volumineux (20 µm) à contours très irréguliers avec nucléoles visibles à x200	
ISUP	Nucléoles visibles et éosinophiles à faible magnification (x100)	
Grade IV		
Fuhrman	Présence de cellules monstrueuses avec noyaux multilobés et chromatine irrégulière	
ISUP	Présence de pléomorphisme nucléaire, de cellules géantes multinucléées, et/ou différenciation sarcomatoïde et/ou différenciation rhabdoïde	

Tableau 2 : **Grade nucléaire de Fuhrman et grade nucléolaire de l'ISUP/OMS** (d'après Fuhrman *et al.*, 1982; Moch *et al.*, 2016a). Les représentations sont tirées de Delahunt *et al.*, 2013.

Pour ces raisons, l'ISUP (*International Society of Urological Pathology*), conjointement avec l'Organisation Mondiale de la Santé, a établi en 2012 une nouvelle classification, qui est la classification recommandée par l'OMS (Delahunt *et al.*, 2013; Moch *et al.*, 2016a). Cette classification repose uniquement sur l'aspect des nucléoles pour les 3 premiers grades et sur la présence de pléomorphisme nucléaire et de cellules géantes multinucléées et/ou de transformation sarcomatoïde et/ou rhabdoïde pour le grade IV (Tableau 2). Cette classification n'est validée que pour le ccRCC et le pRCC.

Caractéristiques histologiques de la tumeur

D'autres caractéristiques histologiques peuvent également être utilisées.

La différenciation sarcomatoïde est un facteur pronostique péjoratif bien reconnu (Delahunt *et al.*, 2013). En effet, 90% des patients avec une tumeur de type RCC à composante sarcomatoïde sont symptomatiques. Ces tumeurs sont généralement associées à des stades plus avancés et à la présence de métastases à distance et sont classées de grade IV dans la gradation ISUP. La survie à 5 ans se situe autour des 15% (Cheville *et al.*, 2004).

Bien que cela reste discuté, la présence de zones tumorales nécrotiques semble être également un facteur pronostique péjoratif, particulièrement dans le ccRCC et le chRCC (Sengupta *et al.*, 2005; Pichler *et al.*, 2012; Dagher *et al.*, 2018). Cependant, il semble que cela ne soit pas corrélé à la survie dans le pRCC (Sengupta *et al.*, 2005).

Enfin, les tumeurs à cellules rénales faisant partie des tumeurs les plus vascularisées, l'infiltration microvasculaire a été évaluée comme facteur pronostique. Les résultats des études sont parfois discordants mais il semble que la microvascularisation tumorale soit corrélée au stade, au grade tumoral et à la présence de métastases (Yildiz *et al.*, 2008; Kroeger *et al.*, 2012).

Facteurs pronostiques biomoléculaires

De nombreux marqueurs moléculaires sont à l'étude actuellement. Parmi eux, on peut citer des marqueurs de prolifération tels que l'antigène Ki-67 ou les régions organisatrices du nucléole marquées à l'argent (AgNORs) qui sont corrélés au stade, au grade et représentent un facteur pronostique (Tannapfel *et al.*, 1996). D'autres protéines impliquées notamment dans la régulation du cycle cellulaire telles que p21 (Weiss *et al.*, 2007) ou p53 (Phuoc *et al.*, 2007) ont également été décrites comme marqueur pronostique. Ces facteurs sont toutefois aussi associés au pronostic de nombreux autres types de cancers. Des marqueurs plus spécifiques du RCC sont également évalués ; c'est le cas de protéines impliquées dans l'angiogenèse telles que le VEGF dont l'expression est

corrélée à un stade et un grade plus avancé mais sans qu'il ne soit un marqueur prédictif de la survie (Lee *et al.*, 2001) ou encore CAIX, qui représente un marqueur prédictif indépendant de la survie (Ingels *et al.*, 2017).

Enfin, l'expression de molécules impliquées dans l'adhésion cellulaire telles que MUC1 ou CD44 a été identifiée comme associée à un pronostic défavorable (Gilcrease *et al.*, 1999; Leroy *et al.*, 2002a).

Les recommandations actuelles de l'EAU (*European Association of Urology*) ne prennent toutefois pas en considération ces facteurs pour l'évaluation du pronostic (Ljungberg *et al.*, 2016).

1.4.2. Facteurs liés au patient

De nombreux facteurs liés à l'état du patient ont été évalués comme facteurs pronostiques. Le premier consiste en l'évaluation du statut de performance du patient à l'aide de deux échelles : l'échelle ECOG (*Eastern Cooperative Oncology Group*) et l'échelle de Karnofsky. Ces deux échelles évaluent l'état de dépendance du patient. Une altération du statut de performance est un critère péjoratif bien validé dans le carcinome rénal (Kawaciuk *et al.*, 2008).
Le deuxième facteur est la présence de symptômes locaux liés à la tumeur ou de symptômes liés à un syndrome paranéoplasique. Le syndrome paranéoplasique correspond à tous les symptômes liés au cancer se déclarant de manière systémique. Ainsi, la présence d'une cachexie pouvant être définie par une hypoalbuminémie, une perte de poids, une anorexie ou des malaises, est un facteur péjoratif de survie (Kim *et al.*, 2003, 2004).
Enfin, les valeurs pronostiques de certains paramètres sanguins et biochimiques tels que la présence d'une anémie, d'une thrombocytose (Bensalah *et al.*, 2006), l'augmentation de la protéine C-réactive (De Martino *et al.*, 2013), ou une hypercalcémie ont également été définis comme facteurs pronostiques dans le carcinome à cellules rénales. Ces facteurs sont à ce jour utilisés seulement dans l'évaluation du pronostic des cancers rénaux au stade métastatique.

1.4.3. Systèmes pronostiques

Afin d'évaluer le risque de récidive en cas de petite tumeur non métastatique et la survie pour les patients métastatiques et de guider le clinicien dans les différentes options thérapeutiques, divers systèmes pronostiques et nomogrammes ont été proposés. Ceux-ci reposent sur la combinaison des différents facteurs décrits ci-dessus. Les systèmes et

les critères d'évaluation diffèrent selon qu'il s'agisse d'une tumeur localisée ou d'un stade métastatique.

Pour exemple, on peut citer dans le cas d'un RCC localisé le modèle UISS (*University of California Los Angeles integrated staging system*) qui utilise le stade TNM, le statut de performance ECOG et le grade de Fuhrman et définit des risques bas, intermédiaire et élevé (Patard *et al.*, 2004). Dans le cas du RCC métastatique, on peut citer le système pronostique du MSKCC (*Memorial Sloan Kettering Cancer Center*) qui prend en compte l'index de performance Karnofsky, le délai entre le diagnostic et l'initiation du traitement et des paramètres biologiques comme le taux de LDH (lactate déshydrogénase), la calcémie ou le taux d'hémoglobine. Là encore, trois groupes de risque sont définis : favorable, intermédiaire et défavorable.

Les systèmes pronostiques sont utilisés en clinique pour prédire la survie chez les patients avec un cancer localisé ou métastatique et le risque de récidive après néphrectomie pour les patients opérés. Ils sont, par ailleurs, très utilisés dans les essais cliniques pour de nouvelles thérapies.

1.5. Étiologie

1.5.1. Facteurs de risque

Tabagisme

Il s'agit du facteur de risque lié au patient le mieux décrit dans le développement du carcinome rénal. En effet, il a été montré que le tabagisme entraînait une augmentation du risque de développer un cancer rénal avec un risque relatif chez l'homme de 1.54 et chez la femme de 1.22, soit un sur-risque de 50% chez l'homme et de 20% chez la femme, comparativement à un individu non-fumeur (Hunt *et al.*, 2005). Par ailleurs, le risque augmente avec le nombre de cigarettes fumées par jour. De plus, l'arrêt entraîne une diminution du risque chez l'homme comme chez la femme. Pour toutes ces raisons, au diagnostic d'un cancer rénal, les recommandations 2016-2018 du CCAFU (Comité de Cancérologie de l'Association Française d'Urologie) placent l'arrêt du tabagisme en recommandation de grade B (Bensalah *et al.*, 2016). Aucun mécanisme clair n'a toutefois été démontré.

Obésité

L'obésité est également un facteur de risque indépendant particulièrement décrit et validé dans le cancer rénal. Une méta-analyse a montré que le risque relatif estimé de développer un cancer rénal pour les personnes en surpoids était augmenté de 1.07 par

unité d'IMC (indice de masse corporelle) chez l'homme comme chez la femme (Marshall, 2002).

Plusieurs explications sont avancées : les adipocytes participeraient au remodelage du micro-environnement tumoral par la sécrétion d'hormones spécifiques appelées adipokines. Ces adipokines à caractère pro-inflammatoire favoriseraient la prolifération et l'invasion des cellules tumorales, l'angiogenèse et une immunocompétence anti-tumorale réduite (Gati *et al.*, 2014).

Hypertension artérielle

L'hypertension artérielle est également un facteur de risque reconnu dans le carcinome rénal (Corrao *et al.*, 2007; Weikert *et al.*, 2008). La prise d'antihypertenseurs permettant un contrôle efficace de la pression artérielle semble abolir ce risque (Weikert *et al.*, 2008). Concernant les mécanismes, ceux-ci ne sont pas clairement identifiés mais des associations plus fortes chez les patients hypertendus entre des polymorphismes de gènes du système rénine-angiotensine-aldostérone et le risque de RCC ont été décrites (Deckers *et al.*, 2015).

Insuffisance rénale terminale

Le risque de développer un cancer est fortement augmenté chez les patients présentant une insuffisance rénale terminale sous dialyse (Maisonneuve *et al.*, 1999). Par ailleurs, de nombreuses études ont depuis montré que le pronostic de ces patients était meilleur que celui des patients non insuffisants rénaux (Shrewsberry *et al.*, 2014). Il a également été montré que les facteurs génétiques étaient différents de ceux des patients de la population générale (Hughson *et al.*, 1996). Les patients insuffisants rénaux présentent ainsi des RCC de plus petite taille, asymptomatiques, de bas grade, avec un type histologique papillaire plus fréquent, expliquant une survie améliorée, comparativement à la population générale (Neuzillet *et al.*, 2011).

1.5.2. Formes familiales

Environ 2 à 3% des cas de RCC sont liés à des formes familiales. Différents syndromes héréditaires sont associés au développement précoce de carcinomes à cellules rénales dont les plus courants sont détaillés dans le tableau suivant (Pavlovich and Schmidt, 2004) :

	Gène	Tumeurs rénales	Autres manifestations
Maladie de Von-Hippel-Lindau (VHL)	*VHL*[1] 3p25-26	ccRCC multifocal et bilatéral	Hémangioblastomes de la rétine et du SNC, kystes et tumeurs neuroendocrines pancréatiques, tumeurs du sac endolymphatique, cystadénomes de l'épididyme ou du ligament large
Carcinome papillaire héréditaire	*MET* [2] 7q31	pRCC de type 1 multifocal et bilatéral	Aucune
Léiomyomatose héréditaire	*FH* [3] 1q42-43	pRCC de type 2 agressif, RCC des tubes collecteurs	Léiomyomes cutanés et utérins
Syndrome de Birt-Hogg-Dubé (BHD)	*BHD* [4] 17p11.2	chRCC, oncocytome, ccRCC multifocaux et bilatéraux	Lésions cutanées, kystes pulmonaires et pneumothorax spontanés
Hyperparathyroïdie avec tumeurs des mâchoires	*HRPT2* [5] 1q25-32	Tumeurs mixtes épithéliales et stromales, pRCC	Tumeurs parathyroïdiennes, tumeurs ostéofibreuses maxillomandibulaires
Translocation constitutionnelle du chromosome 3p	?/*VHL* [6]	ccRCC mutifocal et bilatéral	Aucune
Cancer papillaire de la thyroïde	Inconnu	pRCC, oncocytome	Carcinome papillaire de la thyroïde

Tableau 3 : **Formes familiales de RCC.** Les gènes indiqués en vert sont des gènes suppresseurs de tumeurs inactivés, ceux en rouge représentent des oncogènes présentant des mutations activatrices. [1] : Latif *et al.*, 1993, [2] : Schmidt *et al.*, 1997, [3] : Tomlinson *et al.*, 2002, [4] : Nickerson *et al.*, 2002, [5] : Carpten *et al.*, 2002, [6] : Cohen *et al.*, 1979.

1.5.3. Biologie du ccRCC

Voie VHL/HIF/VEGF

Une des principales voies touchées spécifiquement dans le carcinome rénal à cellules claires est la voie VHL/HIF/VEGF. En effet, le gène plus fréquemment retrouvé muté est le gène *VHL* (Gnarra *et al.*, 1994; Creighton *et al.*, 2013) (Figure 7). Sa perte complète est observée dans près de 90% des cas et se produit à la suite d'évènements génétiques (mutations ponctuelles, insertions ou délétions, perte du bras court du chromosome 3) et/ou épigénétiques (méthylation du promoteur). Cette perte constitue l'évènement précoce dit « *driver* ». Le gène *VHL* code la protéine VHL (ou pVHL). Cette dernière est un constituant du complexe E3 ubiquitine ligase responsable de la dégradation protéasomale des facteurs de transcription induits par l'hypoxie HIFs (HIF-1α et HIF-2α, *hypoxia-induced transcription factors*) (Gossage *et al.*, 2015).

En normoxie, les sous-unités α (HIF-1α ou HIF-2α) sont hydroxylées sur l'un ou les deux résidus proline conservés par les hydroxylases PHD1, PHD2, PHD3 (prolyl hydroxylases 1, 2 et 3). La reconnaissance de cette forme hydroxylée par pVHL conduit à la formation du complexe constitué de pVHL, de l'elongin B (ELB), de l'elongin C (ELC), de la cullin 2 (CUL2) et de la protéine RING finger RBX1, responsable de la poly-

ubiquitinylation de HIFα hydroxylé et de sa dégradation protéasomale (Gossage *et al.*, 2015).

En hypoxie, les PHDs ne sont pas actives, HIFα s'accumule, s'hétérodimérise avec son partenaire HIF-1β (ou ANRT, *aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator*) permettant la fixation du complexe sur des éléments de réponse à l'hypoxie et la transcription de gènes impliqués dans l'adaptation à l'hypoxie (Figure 7).

Dans le ccRCC, la non-fonctionnalité de pVHL entraîne l'accumulation des facteurs HIFα, et ce même en normoxie et par conséquent la transcription de gènes cibles (Figure 7). Ces gènes cibles sont impliqués dans le transport et le métabolisme du glucose (*GLUT1*, *HK1*, *HK2*), la migration cellulaire, l'angiogenèse (*VEGFA*, *EPO, PDGFβ*), la dédifférenciation cellulaire (*OCT4*), la prolifération (*TGFA*, *CCND1, PDGFβ*), la régulation de l'érythropoïèse (EPO) ou le contrôle du pH intra-tumoral (anhydrases carboniques comme *CAIX*). Par ailleurs, de nombreuses études ont montré les rôles opposés de HIF-1α et HIF-2α dans la progression tumorale du ccRCC. En effet, HIF-2α régulerait préférentiellement des gènes impliqués dans la croissance tumorale et l'angiogenèse, tandis qu'HIF-1α régulerait préférentiellement l'expression de gènes des voies apoptotiques et de glycolyse (Keith *et al.*, 2012).

Par ailleurs, la seule perte du gène *Vhl* chez la souris n'entraîne pas de développement de ccRCC (Kapitsinou and Haase, 2008). Cette étude démontre que la perte de VHL n'est pas suffisante et que d'autres évènements sont nécessaires pour le développement du ccRCC.

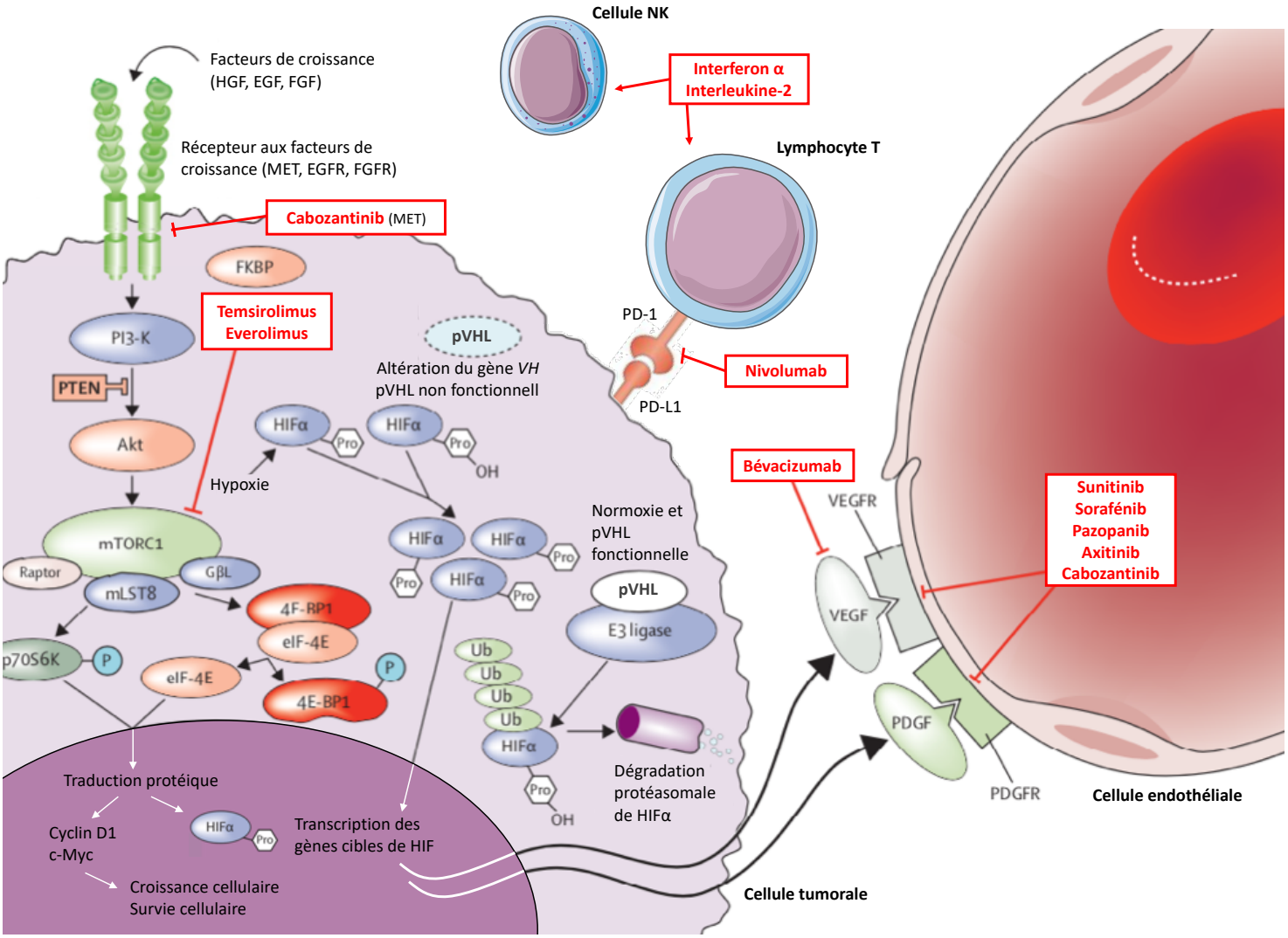


Figure 7 : **Principales voies moléculaires impliquées dans le carcinome rénal.** Les molécules possédant une AMM pour le traitement du carcinome rénal avancé ou métastatique sont indiquées en rouge. Modifié de Rini *et al.*, 2009.

Voie PI3K/AKT/mTOR

De nombreuses analyses génomiques à grande échelle ont permis d'identifier d'autres gènes significativement mutés tels que *PTEN* ou *MTOR* (Creighton *et al.*, 2013) (Figure 8). Ces deux gènes font partie de la voie PI3K/AKT/mTOR, une voie de signalisation intracellulaire activée en réponse à la fixation d'un facteur de croissance (EGF, HGF, IGF, PDGF) sur son récepteur à activité tyrosine kinase (rTK). Cette voie régule de nombreux phénomènes cellulaires : cycle cellulaire, prolifération, apoptose, angiogenèse.

L'activation du rTK entraîne le recrutement à la membrane de la PI3K (*phosphatidyl inositol 3-kinase*) qui déclenche une cascade de phosphorylation : la PI3K phosphoryle le PIP2 (*phosphatidyl inositol diphosphate*) en PIP3 (*phosphatidyl inositol triphosphate*), qui va permettre à la PDK1 (*phosphatidyl inositol 3-dependant kinase 1*)

d'activer par phosphorylation la sérine-thréonine kinase AKT qui active alors la sérine-thréonine kinase mTOR (*mammalian target of rapamycin*) par phosphorylation directe ou indirectement par phosphorylation et inactivation de TSC2 (*tuberous sclerosis complex 2*).

mTOR peut ensuite s'associer à d'autres protéines pour former deux complexes (Dreyer *et al.*, 2009) :

- mTORC1, en association avec Raptor. mTORC1 peut activer eIF4EBP libérant le facteur d'initiation de la traduction eIF4E et la kinase S6K1 (ou p70S6K). Cela entraîne la formation de polysomes et la traduction de la cycline D1 (prolifération), de HIF-1α et HIF-2α (angiogenèse) ou GLUT-1 (transport du glucose).
- mTORC2, en association avec Rictor. mTORC2 régule ensuite le cytosquelette et l'activité de la PKC (protein kinase C).

Cette voie est régulée, entre autres, par la phosphatase PTEN (*phosphatase and tensin homologue deteled on chromosome 10*). PTEN régule la voie par déphosphorylation de PIP3, inhibant de fait l'activation d'AKT (Figure 7).

Ainsi, les mutations touchant les gènes *PTEN* et *MTOR* impactent l'activité de cette voie. D'un côté, les mutations de *PTEN* sont des mutations inactivatrices, ayant pour conséquence une perte de régulation de cette voie. Les mutations de mTOR sont, elles, généralement des mutations faux-sens activatrices. L'activité de mTORC1 et mTORC2 est donc augmentée et la régulation des gènes impliqués dans la prolifération et l'angiogenèse également (Xu *et al.*, 2016a).

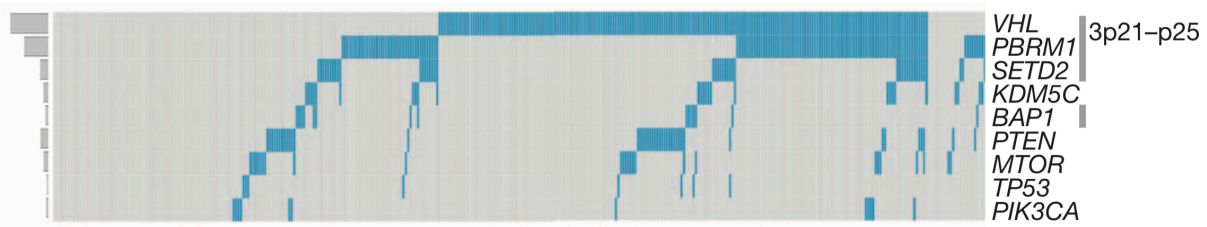


Figure 8 : **Gènes significativement retrouvés mutés dans le ccRCC**. (Creighton *et al.*, 2013).

Autres altérations

Les études à grande échelle ont permis de mettre en lumière d'autres gènes ou voies impliquées dans le ccRCC. Les gènes *PBRM1*, *SETD2*, *BAP1*, *KDM5C* ou *TP53* ont également été retrouvés significativement mutés (Figure 8) (Creighton *et al.*, 2013). *PBRM1*, *SETD2*, *BAP1* et *KDM5C* codent tous des protéines impliquées dans la régulation de l'expression des gènes par des mécanismes épigénétiques : PBRM1 fait partie du complexe SWI/SNF impliqué dans le remodelage chromatinien, SETD2 est une histone

méthyltransférase, BAP1 fait partie du complexe *Polycomb repressive deubiquitinase* et KDM5C est une histone démethylase.

Il est intéressant de noter que les 4 gènes les plus souvent retrouvés mutés *VHL*, *PBRM1*, *SETD2* et *BAP1* se situent tous sur le bras court du chromosome 3 (3p). Ainsi, de la perte d'une copie du 3p résulterait une haploinsuffisance pour ces 4 gènes suppresseurs de tumeurs. Cette perte constituerait un évènement quasi universel et précoce (Hakimi *et al.*, 2013).

Enfin, une étude globale récente, comparant les différents sous-types de RCC a montré que le ccRCC possède une signature immunitaire Th2 supérieure aux autres types, pouvant notamment expliquer la différence d'agressivité de ce type histologique (Ricketts *et al.*, 2018). Une autre étude publiée en 2016 avait comparé des échantillons de 19 cancers et avait montré que le ccRCC présentait le plus de signatures d'infiltration immunitaire, en lien avec un pronostic défavorable (Şenbabaoğlu *et al.*, 2016). Ces résultats expliquent en partie la place et l'efficacité de l'immunothérapie, notamment par les inhibiteurs de checkpoints immunitaires comme le nivolumab, capable de lever le frein immunitaire lié à l'interaction entre PD-L1 exprimé par la cellule cancéreuse et PD-1 exprimé par le lymphocyte T.

1.5.4. Biologie du pRCC

Altérations de *MET*

Les altérations du gène *MET* font partie des altérations qui caractérisent une grande partie des tumeurs papillaires héréditaires (Tableau 3). L'analyse moléculaire des échantillons de la base de données TCGA (*The Cancer Genome Atlas*) a permis de révéler que les mutations du gène *MET* étaient spécifiques du carcinome papillaire sporadique de type 1 (The Cancer Genome Atlas Research Network *et al.*, 2016) (Figure 9).

Le gène *MET*, localisé sur le bras long du chromosome 7 (7q31), code un récepteur à tyrosine kinase dont la fixation du ligand, le HGF (*hepatocyte growth factor*), induit l'homo-dimérisation du récepteur, la transphosphorylation des résidus Tyr1234 et Ty1235 et l'autophosphorylation des Tyr1349 et Tyr1356. Cela permet le recrutement des messagers secondaires GRB2 et GAB1, permettant l'activation des voies MAPK/ERK (via la signalisation Ras-Raf), PI3K/AKT, l'activation de PAK (p21-activated kinase). L'activation de ces voies entraîne la régulation de différents processus cellulaires : motilité et polarité cellulaires (cadhérines), prolifération (CDK6, pRB, P27), migration et invasion cellulaire (intégrines, métalloprotéases), survie cellulaire (Bad, caspase 9) (Birchmeier *et al.*, 2003; Pavlovich and Schmidt, 2004).

Les mutations faux-sens de *MET* touchent généralement le domaine tyrosine kinase de MET et permettent son activation en absence de ligand (Pavlovich and Schmidt, 2004).

Par ailleurs, la duplication du chromosome 7 (portant le gène *MET*) a été retrouvée dans un très grand nombre de cas (Schmidt *et al.*, 1997; The Cancer Genome Atlas Research Network *et al.*, 2016).

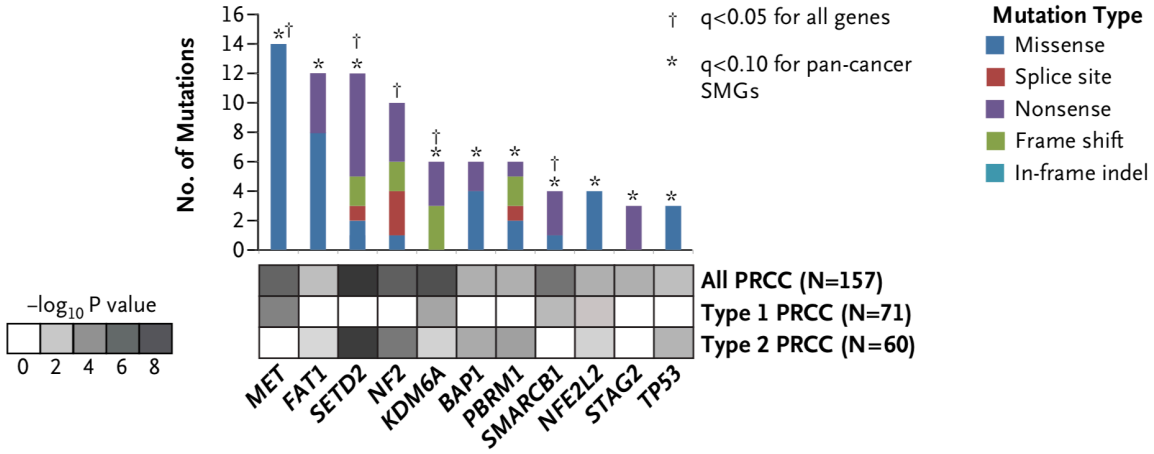


Figure 9 : **Gènes significativement retrouvés mutés dans le pRCC.** (The Cancer Genome Atlas Research Network *et al.*, 2016).

Autres altérations

D'autres altérations ont été décrites dans le pRCC. Ainsi, comme dans le ccRCC, des mutations de différents gènes impliqués dans le remodelage chromatinien (*PBRM1*, *SETD2*, *BAP1*) ont été décrites de façon spécifique aux pRCC de type 2 (The Cancer Genome Atlas Research Network *et al.*, 2016). De plus, des altérations de *CDKN2A*, impliqué dans la régulation du cycle cellulaire ont été retrouvées, là encore, spécifiquement dans le type 2. Enfin, l'analyse des voies cellulaires a permis d'identifier la voie NRF2-ARE comme spécifiquement activée dans le type 2, notamment en lien avec des mutations déjà décrites dans le pRCC dans d'autres études (Ooi *et al.*, 2013).

1.5.5. L'hétérogénéité tumorale génétique

L'hétérogénéité tumorale a été pour la première fois décrite en 1976 (Nowell, 1976) et très étudiée dans un grand nombre de pathologies tumorales. Elle est définie par la présence au sein d'une tumeur de différentes populations cellulaires se distinguant autant sur le plan génétique que phénotypique. Cette diversité génétique favoriserait l'adaptation des tumeurs à la pression de sélection du microenvironnement et aux changements métaboliques nécessaires, et également à la réponse aux traitements par l'émergence de sous-clones qui dériveraient tous d'un ancêtre commun (appelé dernier ancêtre commun ou MRCA, *most recent common ancester*) ayant acquis des

caractéristiques de cellule cancéreuse à partir d'une cellule normale (Figure 10) (Hsieh *et al.*, 2017). Cette pression aboutit à l'accumulation séquentielle et parallèle de mutations qui confère son hétérogénéité à la tumeur et l'évolution, notamment métastatique au cancer.

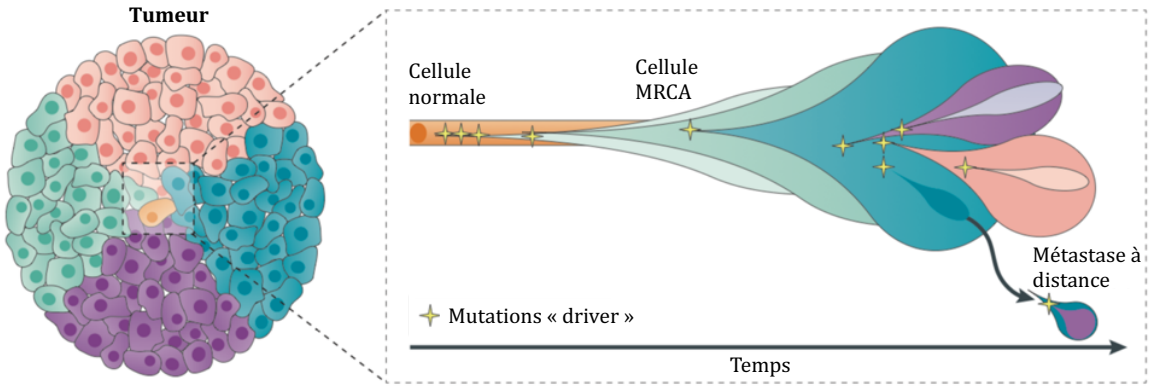


Figure 10 : **Hétérogénéité tumorale et génération de sous-populations par acquisition de mutations.** Tiré de Hsieh *et al.*, 2017.

Dans le ccRCC, l'équipe de Charles Swanton a réalisé une étude de l'hétérogénéité tumorale sur 4 patients et analysé les échantillons pré et post-traitement à différentes localisations de la tumeur primaire ou de métastases (Gerlinger *et al.*, 2012). Cette étude a permis de mettre en évidence la présence de mutations communes à tous les échantillons analysés pour un même patient. Ces mutations dites « *drivers* », sont dans le cas du carcinome rénal majoritairement représentées par des altérations du gène *VHL* et la perte d'hétérozygotie (LOH, *loss of heterozygosity*) du 3p. Puis d'autres mutations additionnelles ont ensuite été retrouvées de manière hétérogène dans les échantillons de la tumeur primaire ou les territoires métastatiques, comme des mutations *SETD2*, *PBRM1*, *MTOR*, *PI3KCA*, *PTEN* et *KDM5C*. Par ailleurs, certaines mutations d'un même gène ou impliquées dans une voie commune ont été retrouvées comme évènements secondaires principaux dans l'établissement de la tumeur primaire ou la formation de métastases. Ces découvertes expliquent les différences de réponse aux thérapies ciblées et pourraient être ainsi utilisées pour mieux traiter les patients.

1.5.6. L'hétérogénéité tumorale phénotypique : les cellules souches cancéreuses

L'hétérogénéité tumorale est également définie au niveau phénotypique, avec l'existence de populations spécifiques telles que les **cellules souches cancéreuses** (ou CSC, *cancer stem cell*). Les cellules souches cancéreuses représentent une population de cellules faiblement représentée au sein d'une tumeur, qui possèdent les caractéristiques des cellules souches normales, notamment d'auto-renouvellement et de différenciation.

Leur présence au sein des tumeurs était définie initialement selon le modèle des cellules souches ou modèle hiérarchique (Shackleton *et al.*, 2009) par opposition au modèle d'évolution clonale ou stochastique. Le modèle stochastique repose sur le fait que seule l'accumulation de mutations au sein de cellules différenciées donne naissance à la tumeur et à son hétérogénéité (Figure 11). Le modèle hiérarchique, lui, propose que la tumorigenèse et la croissance tumorale serait régulée par une population phénotypiquement distincte capable de donner naissance aux cellules formant la tumeur, et que l'éradication de cette seule population permettrait d'éradiquer totalement la tumeur (Figure 11).

Néanmoins, les nombreuses études récentes ont montré que les cellules souches et non-souches au sein d'une tumeur présentaient une plasticité importante, et surtout que la cellule originelle ne dérivait pas toujours d'une population souche. Pour ces raisons, un troisième modèle dit « unifié », plus dynamique, a été décrit et propose que les CSC pourraient acquérir des mutations générant des populations de CSC hétérogènes à l'origine de l'hétérogénéité tumorale et que les cellules non-souches seraient capables d'acquérir des caractéristiques de CSC, notamment par la transition épithélio-mésenchymateuse ou TEM (Figure 11) (Kreso and Dick, 2014).

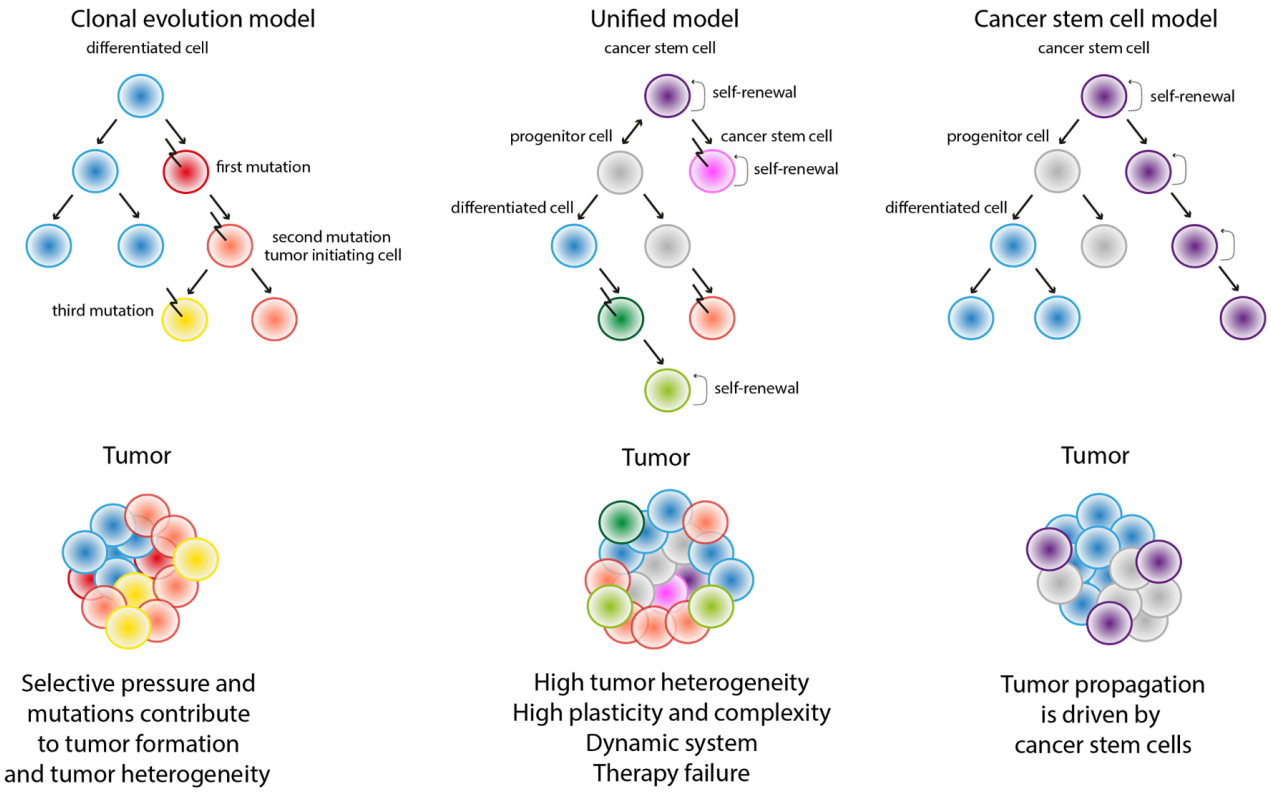


Figure 11 : **Modèles de tumorigenèse** : modèle stochastique (à gauche), modèle hiérarchique (à droite), modèle unifié (au centre). Tiré de Corrò and Moch, 2018.

Les CSC ont été décrites pour la première fois dans un modèle de leucémie aigüe myéloïde par la présence de cellules CD34+/CD38- (comme les cellules souches hématopoïétiques normales) (Lapidot *et al.*, 1994) et comme étant capables d'entraîner le développement d'une LAM dans la souris. Elles ont depuis été identifiées dans une variété importante de tumeurs solides et notamment dans le cancer rénal.

Ces cellules représentent une sous-population des tumeurs hautement radio- et chimio-résistante. En effet, de nombreux mécanismes sont mis en jeu dans ces cellules : expression de pompes d'efflux, quiescence les protégeant des agents ciblant les cellules en division, présence au sein de niches hypoxiques et donc difficilement accessibles aux molécules anti-cancéreuses utilisées, et expression accrue de gènes impliqués dans la réparation de l'ADN. Pour ces raisons, elles seraient responsables des rechutes après traitement et des récidives à long terme. De plus, elles seraient impliquées dans les phénomènes métastatiques par la libération de microvésicules contenant des signaux pro-angiogéniques permettant la formation d'une « niche pré-métastatique » pulmonaire (Grange *et al.*, 2011).

Si les CSC représentent une cible de choix pour l'éradication des tumeurs, leur élimination nécessite de pouvoir les caractériser. Dans le cas du RCC, de nombreuses études se sont intéressées à l'identification de marqueurs spécifiques des CSC (Corrò and Moch, 2018). Aucun marqueur universel n'a été identifié à ce jour parmi ceux évalués à ce jour : CD105/endogline (Bussolati *et al.*, 2008), CD44 (Zhang *et al.*, 2013), CXCR4 (Gassenmaier *et al.*, 2013; Micucci *et al.*, 2015).

1.6. Diagnostic

Les symptômes du cancer rénal étant peu fréquents et aspécifiques, la majorité des cancers rénaux est aujourd'hui diagnostiquée fortuitement. En effet, l'utilisation de plus en plus courante et facile des techniques d'imagerie telles que l'échographie abdominale, la TDM abdominale et l'IRM a permis d'augmenter les taux de diagnostic à des stades précoces.

L'échographie abdominale est l'examen pratiqué le plus facilement et permet le diagnostic clé de la majorité des tumeurs rénales. La TDM avec injection de produit de contraste est l'examen de référence réalisé ensuite afin de permettre la caractérisation de la tumeur. Le bilan d'extension locorégionale, veineuse (veines rénale et cave), ganglionnaire et métastatique est basé sur la TDM rénale, abdominale et thoracique. L'IRM peut également être réalisée et permet d'améliorer la caractérisation des masses indéterminées en TDM.

Le bilan biologique des patients est également réalisé et comprend classiquement le dosage de la créatinine pour l'évaluation de la fonction rénale, une numération formule sanguine, un bilan hépatique, le dosage des phosphatases alcalines, un dosage de LDH, une mesure de calcémie et un bilan de coagulation (Bensalah *et al.*, 2016).

Enfin, la biopsie percutanée peut être recommandée lorsque le diagnostic histologique peut modifier la prise en charge : en cas de petite tumeur et pour privilégier la surveillance, avant un traitement ablatif percutané, en cas d'incertitude sur l'imagerie (Bensalah *et al.*, 2016).
D'autres examens tels que le TEP-FDG ou la scintigraphie osseuse peuvent être indiqués pour la détection de territoires hypermétaboliques potentiellement métastatiques ou de lésions métastatiques osseuses.

1.7. Manifestations cliniques

Dans la majorité des cas, les RCC sont asymptomatiques expliquant leur découverte le plus souvent de façon fortuite. La triade classique constituée d'une hématurie, de douleurs lombaires et d'une masse lombaire est généralement présente aux stades avancés (Lee *et al.*, 2002; Patard *et al.*, 2003). L'hématurie et les douleurs lombaires sont le plus souvent retrouvés. Des signes généraux peuvent également être présents : asthénie, anorexie, amaigrissement, sueurs nocturnes.

Des signes cliniques peuvent également être associés à la présence de métastases à distance dont les sites les plus fréquents sont les poumons, les os et le cerveau même si les glandes surrénales, le rein controlatéral et le foie peuvent être aussi touchés (Bianchi *et al.*, 2012). Dans 15 à 25% des cas, les métastases sont présentes au diagnostic du carcinome à cellules rénales.

D'autres manifestations systémiques peuvent exister en lien avec des syndromes paranéoplasiques, présents dans 20% des cancers du rein. Ces signes peuvent être la conséquence de divers facteurs : production d'hormones spécifiques par la tumeur, production d'hormones spécifiques par le tissu sain en réponse au tissu tumoral, modulation du système immunitaire par la tumeur (Palapattu *et al.*, 2002). Les signes les plus courants sont une hypercalcémie (liées à la production d'un peptide semblable à l'hormone parathyroïdienne PTH-rp ou à des lésions métastatiques osseuses), de l'hypertension (par sécrétion de rénine ou compression rénale), une polycythémie (liée à la sécrétion d'EPO), de la fièvre ou une anémie.

1.8. Prise en charge thérapeutique

La stratégie thérapeutique dépend du stade de la pathologie. La prise en charge repose sur les recommandations des différentes sociétés savantes. En France, c'est le groupe rein du Comité de Cancérologie de l'Association Française d'Urologie (CCAFU) qui a émis en 2016 les recommandations de prise en charge pour la période 2016-2018 (Bensalah *et al.*, 2016).

1.8.1. Stades localisés T1-T2

Chirurgie

La chirurgie est la prise en charge de référence au stade localisé. C'est la seule thérapie efficace quel que soit le type histologique.

Pour les tumeurs ≤ 4 cm (stade T1a), la néphrectomie partielle permet d'obtenir les mêmes résultats que la néphrectomie totale et est recommandée car elle permet de limiter la perte néphronique (Scosyrev *et al.*, 2014). La tumeur est retirée avec une marge de tissu sain de quelques millimètres (Figure 12). Afin de préserver le tissu, le clampage vasculaire doit être le plus court possible, généralement moins de 30 minutes. La voie d'abord chirurgical ne semble pas avoir d'impact sur la mortalité mais la voie mini-invasive (par cœlioscopie) est recommandée avec une fréquence de complications moindre (Bensalah *et al.*, 2016).

Pour les tumeurs localisées > 4 cm (stades T1b et T2), la néphrectomie partielle doit être privilégiée pour les stades T1b lorsqu'elle est possible. Dans le cas contraire, c'est la néphrectomie totale qui est recommandée (Bensalah *et al.*, 2016). La laparoscopie doit là encore être privilégiée, surtout dans le cas d'une néphrectomie totale. Enfin, les recommandations indiquent que si possible la glande surrénale doit être conservée et que le curage ganglionnaire n'est pas recommandé en cas de stade N0.

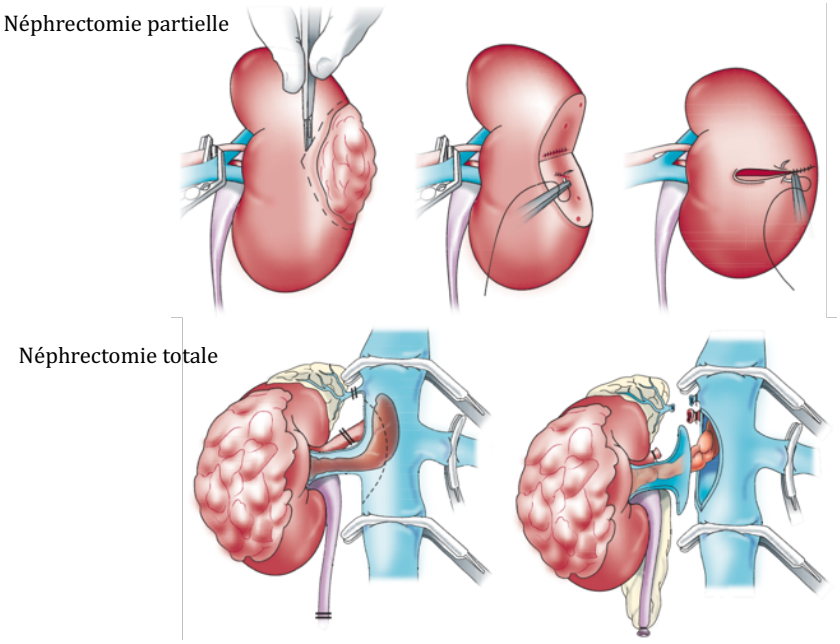


Figure 12 : **Schémas représentatifs de néphrectomie partielle et néphrectomie totale.** Tiré de Rini *et al.*, 2009.

Traitements ablatifs

Des traitements ablatifs tels que la radio-fréquence ou la cryothérapie peuvent être utilisés. Ces traitements sont recommandés pour la prise en charge de petites tumeurs rénales lorsque les patients ne sont pas de bons candidats à la chirurgie (comorbidités notamment âge avancé, contre-indication à la chirurgie, tumeurs multiples liées à des syndromes héréditaires ou en cas de risque d'insuffisance rénale terminale après néphrectomie).

Dans le premier cas, c'est une électrode émettant des rayonnements électromagnétiques non-ionisants qui entraîne la nécrose du tissu. Dans le deuxième, une sonde de cryothérapie permet de geler le tissu tumoral et son réchauffement provoque une ischémie entraînant la mort des cellules. L'électrode de radiofréquence, comme la sonde de cryothérapie peuvent être introduites par voie percutanée ou voie laparoscopique.

Surveillance active

La surveillance active par imagerie (échographie, TDM, IRM) ne montre pas d'infériorité chez les patients présentant de petites tumeurs rénales avec comorbidités en comparaison avec une attitude interventionniste (Pierorazio *et al.*, 2015). Pour cette raison, la surveillance peut être proposée comme option chez ces patients (Bensalah *et al.*, 2016).

1.8.2. Stades localement avancés

Chirurgie

La néphrectomie élargie avec des marges saines par voie ouverte est le traitement de référence recommandé pour les stades localement avancés (non T1, non T2) et non métastatiques (M0) (Figure 12). Dans le cas de la présence de ganglions identifiés par imagerie, un curage ganglionnaire peut être recommandé (Capitanio *et al.*, 2011).

Traitement adjuvant et néo-adjuvant

D'après les recommandations 2016-2018 du CCAFU, aucun traitement néo-adjuvant ni adjuvant après néphrectomie ne doit être mis en place en dehors d'essais cliniques. Par ailleurs, d'après les résultats d'une étude clinique, l'EAU (*European Association of Urology*) ne recommande pas non plus l'utilisation du sunitinib comme traitement adjuvant après néphrectomie chez les patients à haut risque de récidive (Bex *et al.*, 2017). D'autres essais cliniques avec les traitements systémiques courants sont en cours.

1.8.3. Cancer rénal métastatique

Chirurgie

La néphrectomie cyto-réductrice doit être pratiquée chez les patients présentant un bon état général, et ce avant la mise en place d'un traitement médical systémique par interféron-alpha ou anti-angiogéniques. Chez les patients atteints de ccRCC classés de pronostics intermédiaire et défavorable, les résultats de l'étude française CARMENA, publiés en août 2018, ont montré que le sunitinib seul n'était pas inférieur à la néphrectomie suivie du traitement au sunitinib (Méjean *et al.*, 2018). Les recommandations de l'EAU ont donc été modifiées et stipulent que la néphrectomie cyto-réductrice immédiate ne doit plus être pratiquée chez ces patients (Bex *et al.*, 2017).
Selon la localisation des métastases et en situation oligométastatique, l'exérèse chirurgicale peut être proposée.

Radiothérapie

Le RCC est un cancer radio-résistant. La radiothérapie peut être utilisée dans certains cas de métastases cérébrales et osseuses, notamment à visée palliative, avec pour objectif un soulagement des symptômes. Par ailleurs, une étude française publiée récemment a montré que la radiothérapie stéréotaxique était efficace en situation oligométastatique cérébrale et osseuse et qu'elle permettait de retarder l'utilisation d'un traitement médical systémique (Meyer *et al.*, 2018).

Traitement médical systémique

A l'heure actuelle et de par leur absence d'efficacité sur le RCC métastatique, aucune recommandation ne repose sur l'utilisation d'agents de chimiothérapie conventionnelle. Plusieurs thérapies ont été développées ces 15 dernières années et ont permis de modifier profondément les stratégies thérapeutiques. Les différentes options possédant une AMM en France à ce jour sont présentées dans le Tableau 4. Les cibles de ces molécules sont également représentées sur la Figure 7.

Les recommandations les plus récentes, existant à ce jour, sont celles de l'EAU (Ljungberg *et al.*, 2016). Ces recommandations diffèrent des recommandations françaises 2016-2018 du CCAFU et prennent en compte les résultats des derniers essais cliniques. Les recommandations de l'EAU pour la prise en charge du carcinome à cellules claires métastatique sont présentées dans le Tableau 5. L'utilisation séquentielle de molécules de classes différentes est validée dans la prise en charge du cancer métastatique et permet d'améliorer au mieux la survie des patients.

Groupes pronostic	1ère ligne	2ème ligne	3ème ligne
Favorable	sunitinib **ou** pazopanib	cabozantinib **ou** nivolumab	cabozantinib **ou** nivolumab
Intermédiaire Défavorable	ipilumumab+nivolumab	cabozantinib **ou** antiangiogénique	cabozantinib **ou** autre thérapie ciblée
	cabozantinib **ou** sunitinib **ou** pazopanib	antiangiogénique **ou** nivolumab	autre thérapie ciblée **ou** nivolumab

Tableau 5 : **Recommandations 2018 actualisées de prise en charge du ccRCC métastatique émises par l'EAU** (Ljungberg *et al.*, 2016).

Il est à noter que l'EAU place la combinaison nivolumab/ipilumumab (YERVOY®) comme le nouveau traitement de référence en cas de pronostic intermédiaire ou défavorable. L'ipilimumab est un anticorps anti CTLA-4 qui possède un mécanisme d'action proche de celui du nivolumab. L'inhibition du récepteur CTLA-4 permet de réactiver l'immunité anti-tumorale médiée par les lymphocytes T. L'ipilumumab ne possède pas d'AMM en Europe dans le cancer métastatique et l'EMA (*European Medicines Agency*) a émis un avis négatif sur l'utilisation de la combinaison en première ligne et ceci en dépit des résultats de l'essai clinique CheckMate 214 (Motzer *et al.*, 2018). En réponse, l'EAU a indiqué que cette décision ne modifiait pas les recommandations de prise en charge (Bex *et al.*, 2018).

Concernant les carcinomes non à cellules claires et étant donné qu'aucun essai clinique de phase III n'est réalisé sur ces types plus rares, les seules recommandations se basent sur les données d'efficacité obtenues avec de petits essais cliniques à un seul bras. Ainsi, le traitement à proposer en première intention est le sunitinib (Bensalah *et al.*, 2016; Ljungberg *et al.*, 2016).

						Essais cliniques de phase III			
		Molécule	**Spécialité**	**Voie**	**Cibles**	**Taux de réponse objective**	**Survie sans progression médiane**	**Médiane de survie**	**Essai**
Thérapies ciblées	Inhibiteurs de tyrosine kinase Antiangiogéniques	**Sunitinib**	SUTENT®	PO	VEGFR, PDGFR, c-KIT, FLT3, CSF-1R	40% (27% stables) 34% (29% stables) 31%	8,7 mois 8,3 mois 11 mois	n/a n/a >14 mois	1 seul bras [1] 1 seul bras [2] sunitinib vs IFNα [3]
		Sorafénib	NEXAVAR®	PO	VEGFR, PDGFR, c-KIT, FLT3 *CRAF, BRAF*	11% (74% stables) 8,7% (79,4% stables)	5,9 mois 5,7 mois	19,3 mois n/a	sorafénib vs. placebo [4] sorafénib vs. IFNα [5]
		Pazopanib	VOTRIENT®	PO	VEGFR, PDGFR, c-KIT	30% 31%	9,2 mois 8,4 mois	n/a 28,4 mois	pazopanib vs. placebo [6] pazopanib vs. sunitinib [7]
		Axitinib	INLYTA®	PO	VEGFR sélectif	23%	8,3 mois	20,1 mois	pazopanib vs. sorafénib [8]
		Cabozantinib	CABOMETYX®	PO	VEGFR, MET, c-KIT, FLT3, AXL, RET, ROSA, TYR03, MER, TRKB, TIE-2	17% 20%	7,4 mois 8,6 mois	21,4 mois 26,6 mois	cabozantinib vs. everolimus [9] cabozantinib vs. sunitinib [10]
	Anticorps monoclonal	**Bevacizumab**	AVASTIN®	IV	VEGF-A circulant	31% 25,5%	10,2 mois 8,5 mois	23,3 mois 18,3 mois	IFNα+bevacizumab vs. IFNα+placebo [11], [12] IFNα+bevacizumab vs. IFNα [13], [14]
	Inhibiteurs de mTOR	**Temsirolimus**	TORISEL®	IV	mTORC1	8%	4,3 mois	12,3 mois	temsirolimus vs. sorafénib [15]
		Everolimus	AFINITOR®	PO	mTORC1	1,8% (66,8% stables)	4,9 mois	14,8 mois	everolimus vs. placebo [16]
Immunothérapies	Cytokines	**Interféron α**	ROFERON®	SC	Modulation du système immunitaire	14% 13%	4 mois 5,4 mois	8,5 mois 21.3 mois	IFNα vs. hormonothérapie [17] IFNα+placebo vs. IFNα+bevacizumab [11], [12]
		Interleukine 2	PROLEUKIN®	IV SC		23,2% 21%	24 mois -	17,5 mois -	IL-2 vs IL-2+IFNα [18] IL-2 forte dose vs. IL-2 faible dose [19]
	Inhibiteur de checkpoint immunitaire	**Nivolumab**	OPDIVO®	IV	Anticorps anti PD-1	25%	4,6 mois	25 mois	nivolumab vs. everolimus [20]

Tableau 4 : **Molécules possédant une AMM dans le carcinome rénal avancé ou métastatique en France en 2018 et résultats des principaux essais cliniques de phase III.**

Références :

[1] : Motzer *et al.*, 2006a, [2] : Motzer *et al.*, 2006b, [3] : Motzer *et al.*, 2007, [4] : Escudier *et al.*, 2007a, [5] : Escudier *et al.*, 2009, [6] : Sternberg *et al.*, 2010, [7] : Motzer *et al.*, 2013b, [8] : Motzer *et al.*, 2013a, [9] : Choueiri *et al.*, 2016b, [10] : Choueiri *et al.*, 2018a, [11] : Escudier *et al.*, 2007b, [12] : Escudier *et al.*, 2010, [13] : Rini *et al.*, 2008, [14] : Rini *et al.*, 2010, [15] : Hutson *et al.*, 2014, [16] : Motzer *et al.*, 2010, [17] : Medical Research Council Renal Cancer, 1999, [18] : McDermott *et al.*, 2005, [19] : Yang *et al.*, 2003, [20] : Motzer *et al.*, 2015

1.9. Nouvelles cibles thérapeutiques

Ces 15 dernières années, l'arsenal thérapeutique du carcinome rénal a été profondément modifié par le développement des thérapies antiangiogéniques, des inhibiteurs de mTOR et l'avènement de l'immunothérapie comme le nivolumab.
Malgré ces avancées et le gain en termes de survie pour les patients, les taux de réponse objective ne dépassent pas les 30-40%. De nombreuses cibles thérapeutiques sont donc également en cours d'évaluation dans le carcinome rénal métastatique.

1.9.1. Nouvelles cibles impliquées dans l'angiogenèse

L'angiogenèse étant un des mécanismes principaux impliqués dans le cancer du rein, c'est tout naturellement que de nombreuses équipes se sont intéressées à des thérapies permettant de la moduler.

Parmi les cibles en cours de développement, on peut citer la protéine **ALK1**, protéine de la superfamille du TGFβ exprimée à la surface des cellules endothéliales et impliquée dans la signalisation de l'angiogenèse. Cette protéine présente un intérêt tout particulier puisque les voies de signalisation régulées sont indépendantes de celles du VEGFR. Des données précliniques montrent ainsi l'intérêt d'une combinaison entre un inhibiteur de ALK1, le dalantercept et un iTK anti-VEGFR (Wang *et al.*, 2016). Une étude de phase I a confirmé ces données, avec un bon profil de tolérance (Voss *et al.*, 2017) et une étude de phase II est en cours.
HIF-2α est une autre cible intéressante puisque de nombreuses études ont montré son rôle oncogène dans le ccRCC opposé à celui de son homologue HIF-1α, qui possède des caractéristiques suppressives de tumeur (Keith *et al.*, 2012). Pour cette raison, deux molécules apparentées ont été évaluées dans des modèles précliniques et ont montré une efficacité sur des modèles orthotopiques de ccRCC et de métastases pulmonaires, le PT2385 et le PT2399. Ces molécules sont capables d'inhiber la dimérisation entre HIF-2α et leur partenaire HIF-1β et donc la transcription HIF-2α-dépendante (Chen *et al.*, 2016; Cho *et al.*, 2016; Wallace *et al.*, 2016). Le PT2385 est actuellement en essais cliniques de phases I et II.

1.9.2. Cibles immunitaires

L'avènement de l'immunothérapie en thérapie anti-cancéreuse a permis de révolutionner la prise en charge des patients. C'est également le cas dans le RCC où le nivolumab et l'ipilumumab sont maintenant recommandés en première ligne chez les patients de pronostic intermédiaire et défavorable. Une dizaine d'essais cliniques est

d'ailleurs en cours avec d'autres inhibiteurs de checkpoint immunitaire, notamment en combinaison avec des thérapies ciblées (Zarrabi and Wu, 2018). Différentes stratégies de modulation du système immunitaire sont à l'étude.

Les deux premières stratégies consistent à cibler les cellules immunitaires constituant le micro-environnement tumoral et capables de promouvoir le développement tumoral. La première stratégie consiste à inhiber l'activité du récepteur **CCR4** à l'aide d'anticorps bloquants qui entraîne une modification de l'infiltrat immunitaire tumoral, avec un recrutement de cellules NK et une modification de la balance lymphocytaire CD4+ Th1/Th2 en faveur du phénotype Th1, possédant par conséquent une activité anti-tumorale (Berlato *et al.*, 2017). Un anticorps bloquant, le mogamulizumab est d'ailleurs en essai clinique de phase I et II (NCT02281409 et NCT02946671). La deuxième stratégie s'intéresse aux **macrophages associés aux tumeurs** ou TAMs (*Tumor-Associated Macrophages*). Les TAMs possèdent un phénotype M2-like de type anti-inflammatoire et sont ainsi capables de promouvoir l'angiogenèse tumorale, l'invasion et l'extravasation et donc le potentiel métastatique des cellules, la croissance tumorale, la résistance aux traitements (Santoni *et al.*, 2013). Pour ces raisons, ils représentent des cibles thérapeutiques de choix et différentes stratégies sont en développement préclinique : a) diminuer leur recrutement et leur accumulation (par blocage de l'action de cytokines telles que CCL2 ou CSF-1), b) « ré-éduquer » les TAMs vers un phénotype de type M1 pro-inflammatoire anti-tumoral (par l'utilisation combinée du ligand du TLR-9 et d'anticorps anti IL-10 par exemple), ou enfin c) par l'inhibition de molécules associées aux TAMs pouvant promouvoir l'angiogenèse (Santoni *et al.*, 2013).

Enfin, la troisième stratégie consiste à utiliser des vaccins antigéniques tumoraux. Pour cela, des monocytes des patients sont isolés, différenciés en cellules dendritiques et éduquées par contact avec du lysat tumoral. Les cellules dendritiques activées sont ensuite réintroduites chez le patient et montrent une réponse anti-tumorale médiée notamment par une réponse Th1 (Amato, 2003). Différents essais cliniques sont en cours.

1.9.3. Ciblage des cellules souches cancéreuses

Les CSC présentent également un intérêt tout particulier pour le traitement du carcinome rénal. Il existe ainsi différentes stratégies de ciblage spécifique des CSC. Les premières consistent à cibler directement des marqueurs de CSC identifiés (*voir 1.5.6*).

Le ciblage de **CD105/endogline**, qui est le marqueur le plus significatif dans l'identification des cellules souches cancéreuses et également exprimé par les cellules endothéliales, est à l'étude à l'aide d'un anticorps anti-CD105 induisant la mort des

cellules l'exprimant par cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps (ADCC, *antibody-dependant cell-mediated cytotoxicity*). Le TRC105 (carotuximab), un anticorps monoclonal chimérique humain/murin dirigé contre le CD105 présente un intérêt tout particulier puisqu'il est capable de cibler des mécanismes de l'angiogenèse différents de ceux induits par le VEGF et les CSC rénales. Pour cette raison, il est entré en essai clinique de phase I et de phase II en combinaison avec l'axitinib (Choueiri *et al.*, 2016a, 2018b, NCT01806064).

Le ciblage de **CXCR4** est également à l'essai. C'est le cas notamment avec le LY2510924, un peptide cyclique liant CXCR4, qui est entré en essai clinique de phase II mais n'a pas montré d'intérêt en association avec le sunitinib dans le RCC métastatique (Hainsworth *et al.*, 2016).

L'utilisation d'**interleukines** semble également être prometteuse pour cibler les CSC. En effet, l'interleukine-15 (IL-15), qui présente un profil de toxicité moindre que celui de l'IL-2, a montré des effets de différenciation épithéliale des cellules CD105+, une abolition de leur tumorigénicité *in vivo*, et de leur capacité à former des sphères, deux caractéristiques majeures des CSC (Azzi *et al.*, 2011).

Enfin, le ciblage des CSC pourrait se faire à l'aide de la protéine **BMP2** (*bone morphogenetic protein 2*). Il s'agit d'un membre de la famille du TGFβ qui régule des processus divers tels que la prolifération, la survie cellulaire, la différenciation. Des études dans le RCC ont montré que BMP2 inhibait la croissance cellulaire et induisait la formation de structures osseuses (Wang *et al.*, 2012). La même équipe a montré ensuite que BMP2 était capable d'inhiber la capacité d'initiation de tumeur des CSC rénales (Wang *et al.*, 2015). BMP2 représente en effet une cible intéressante puisque son inactivation par des mécanismes épigénétiques est associée à une survie moins bonne chez les patients atteints de RCC (Mitsui *et al.*, 2015).

2. HOXA9, un intérêt grandissant en thérapie anti-cancéreuse

2.1. Les gènes *HOX* : découverte, organisation, structure

Les premières descriptions de l'existence de gènes capables de réguler l'emplacement ordonné des différentes parties du corps ont été réalisées dans les années 1900. Ces descriptions émanent de l'observation chez la drosophile (*Drosophila melanogaster*) de l'existence de transformations dites « homéotiques ». L'homéose est l'apparition d'un organe correctement développé mais à une localisation anatomique incorrecte. Ainsi, chez la drosophile, Bateson observa l'apparition de pattes à la place des antennes ou encore l'apparition d'un deuxième thorax. C'est Calvin Bridges qui propose en 1921 l'existence de gènes responsables du développement spatial de la drosophile (Bridges, 1921). Ces gènes, alors appelés gènes « homéotiques » sont dénommés respectivement *antennapedia* et *bithorax*, en lien avec les transformations qu'ils sont supposés engendrer lorsqu'ils sont mutés. En 1951, Lewis définit les gènes contrôlant le développement thoracique comme faisant partie d'un complexe nommé bithorax ou BX-C (Lewis, 1951) et publie les cartes chromosomiques des complexes BX-C et Polycomb, répresseur du complexe BX-C (Lewis, 1978). Le complexe Antennapedia, ou ANT-C, est lui mis en évidence deux ans plus tard, et contrôle la segmentation de la partie antérieure du corps de la drosophile (Kaufman *et al.*, 1980).

D'un seul cluster chez la drosophile constitué des complexes BX-C et ANT-C et de 8 gènes au total, l'évolution des gènes homéotiques, ou gènes *Hox,* s'est faite par des processus de duplication et de divergence. Les gènes *Hox* ont été pour la première fois décrits en 1981 chez les mammifères, notamment la souris (Duboule *et al.*, 1986). Depuis, ils ont été décrits chez de très nombreux organismes : nématodes (*Caenorhabditis elegans*), les éponges, les plantes et leur apparition est estimée à environ 1000 millions d'années.

Chez l'Homme, les 39 gènes *HOX* font partie de la superfamille des gènes *Homeobox* et sont organisés en 4 clusters HOXA, HOXB, HOXC et HOXD. Chaque cluster comporte de 9 à 11 gènes. Les 4 clusters sont localisés sur 4 chromosomes différents : HOXA sur le chromosome 7 (7p14-15), HOXB sur le chromosome 17 (17q21-22), HOXC sur le chromosome 12 (12q12-13) et HOXD sur le chromosome 2 (2q31-37) (Figure 13). Selon leur homologie et leur position au sein de chaque cluster, les 39 gènes *HOX* ont été regroupés en 13 paralogues qui ne sont pas tous présents sur tous les clusters.
Ces gènes sont conservés et possèdent des homologues chez la drosophile, regroupés au sein du cluster unique nommé HOM-C (Figure 13).

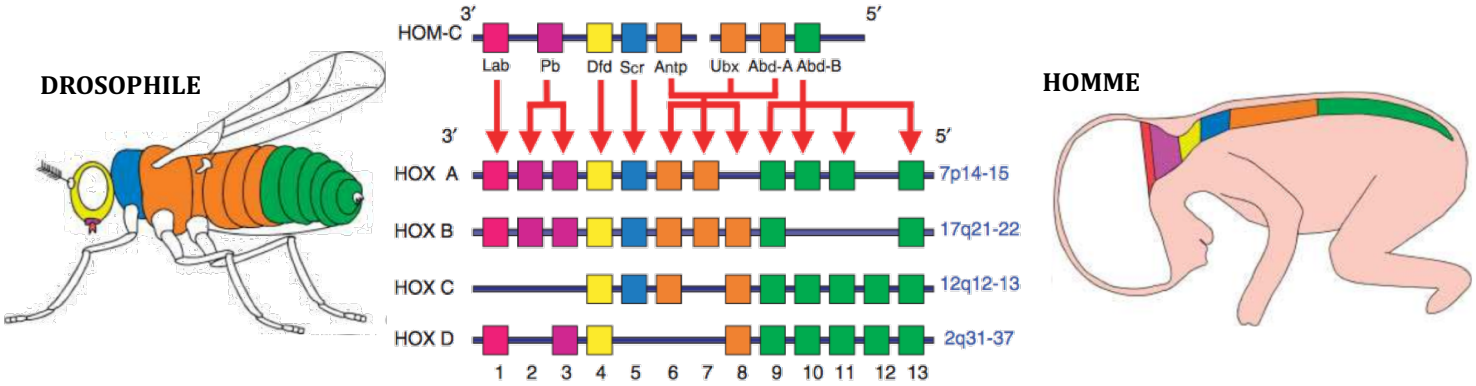


Figure 13 : **Organisation et expression spatiale des gènes homéotiques chez la drosophile (1 cluster unique HOM-C) et l'Homme (4 clusters HOXA, HOXB, HOXC et HOXD).** Tiré de Grier *et al.*, 2005.

Les gènes *HOX* codent des facteurs de transcriptions capables de lier l'ADN par une séquence hautement conservée d'environ 60 acides aminés, appelée **homéodomaine**, présente chez tous les membres de la famille HOX. Les gènes *HOX* sont de courte taille, constitués de deux exons et un seul intron, et dont la séquence d'environ 180 nucléotides codant l'homédomaine, appelée boîte homéotique ou homéoboîte (homeobox), est toujours située dans le deuxième exon (Figure 14).

Les protéines HOX, elles, sont ainsi constituées de l'homéodomaine situé dans la partie C-terminale de la protéine, ainsi que d'un ou plusieurs domaines de fixation de cofacteurs protéiques de la famille TALE (*three amino acid loop extension*) tels que MEIS ou PBX qui font aussi partie de la superfamille des gènes homéotiques (Figure 14).

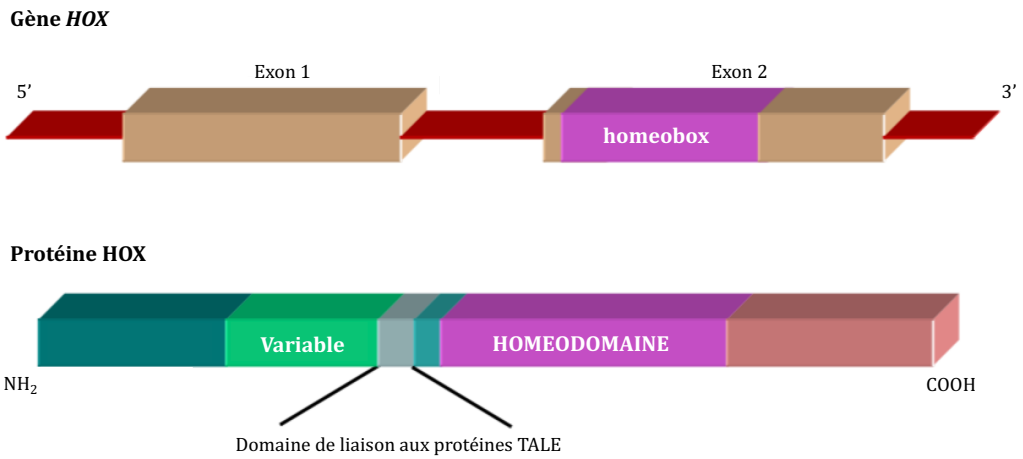


Figure 14 : **Structure des gènes et protéines HOX.** Tiré de Lappin *et al.*, 2006.

L'homéodomaine porte la fonction de liaison à l'ADN. Il est organisé en une structure hélice-tour-hélice (HTH, *helix-turn-helix*) formée de trois hélices alpha (α1, α2, α3). L'hélice α3 entre en contact direct avec le grand sillon de l'ADN tandis que les hélices α1 et α2 se positionnent perpendiculairement à l'hélice α3 pour stabiliser son interaction

à l'ADN. Enfin, le bras N-terminal de l'homéodomaine qui précède l'hélice α1 interagit avec le petit sillon de l'ADN et stabilise l'interaction de l'homéodomaine avec l'ADN (Figure 15) (Gehring *et al.*, 1994). Les sites consensus de fixation des différents gènes HOX sur l'ADN correspondent à des sites riches en bases A-T qui contiendraient la séquence consensus minimale 5-ATT(A/T)A-3' (Ekker *et al.*, 1991). Ces sites peuvent être modifiés et différer selon les facteurs HOX (antérieurs, centraux ou postérieurs) et par la fixation à l'ADN avec des co-facteurs comme PBX et/ou MEIS qui augmentent l'affinité de l'interaction à l'ADN et la spécificité de la séquence d'ADN reconnue (Chang *et al.*, 1996; Slattery *et al.*, 2011).

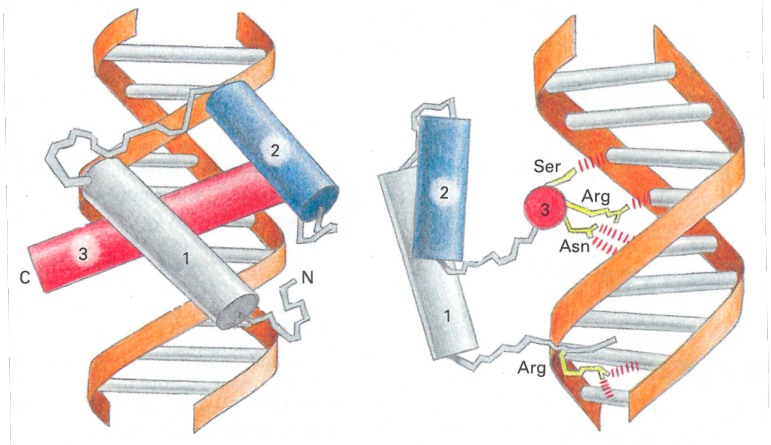


Figure 15 : **Interaction de l'homéodomaine avec l'ADN**. Tiré de Alberts *et al.*, 2011.

Pour réguler la transcription de leurs gènes cibles et principalement augmenter leur spécificité et sélectivité de liaison, les facteurs HOX peuvent se fixer à l'ADN sous la forme d'hétérodimères ou hétérotrimères avec des co-facteurs de la famille TALE, et plus précisément des familles PBX (*pre-b-cell leukemia*) et MEIS (*myeloid ecotropic viral integration site*). Les facteurs HOX1 à HOX10 interagiraient préférentiellement avec PBX (Shen *et al.*, 1996), tandis que les facteurs HOX9 à HOX13 interagiraient avec MEIS1 (Shen *et al.*, 1997a).

2.2. Physiologie des gènes *HOX*

2.2.1. Rôles physiologiques

Développement

Les gènes *HOX* sont impliqués dans le développement temporo-spatial normal des membres et des organes selon l'axe antéro-postérieur. En effet, au cours du développement, les cellules reçoivent des signaux spatiaux permettant d'assurer la formation des organes à la bonne place au cours du processus de différenciation des cellules. Ce sont ces signaux qui permettent la formation des membres et des organes.

Pour cela, l'expression des gènes *HOX* se fait selon trois grands principes :

- Colinéarité spatiale : La position d'un gène du 3' vers le 5' au sein d'un cluster correspond à son expression le long de l'axe antéro-postérieur. Ainsi, les gènes situés en 5' seront nécessaires à la formation des tissus caudaux, tandis que les gènes en 3' régiront la formation des tissus antérieurs (Figure 13) (Kmita and Duboule, 2003).
- Colinéarité temporelle : Les gènes *HOX* ne sont pas exprimés lors des stades précoces du développement. Ils sont exprimés progressivement ensuite dans chaque cluster des gènes en 3' (*HOX1*) vers les gènes en 5' (*HOX13*) (Kmita and Duboule, 2003).
- Prédominance postérieure : Les gènes en 5' possèdent un phénotype dominant sur les gènes en 3' (Capovilla and Botas, 1998).

Au-delà de la mise en place de l'axe antéro-postérieur, les gènes HOX semblent être impliqués dans la morphogenèse des membres et le développement structural de certains organes, comme les poumons ou les organes du tractus génital. En effet, les anomalies des gènes *HOX* n'aboutissent pas toujours, comme il était pensé avec les études des transformations chez la drosophile, à des modifications de l'emplacement des structures. Chez le poussin, plusieurs gènes *Hox* sont exprimés dans les bourgeons des membres, notamment *Hoxa9* dans la partie proximale où l'humérus et le fémur se développent. *Hoxa9*, *Hoxa10* et *Hoxa11* sont eux exprimés dans le membre antérieur où se développent le radius et l'ulna (Nelson *et al.*, 1996; Raines *et al.*, 2015). De plus, chez l'Homme, des anomalies congénitales des doigts tels que la synpolydactylie ou la brachydactylie ont pour cause des mutations d'*HOXD13* (Muragaki *et al.*, 1996; Nakano *et al.*, 2007).

Dans le poumon, les gènes *Hox* sont nécessaires au développement et à la maturation pulmonaire (Kim and Nielsen, 2000). Chez l'Homme, des expressions anormales de gènes *HOX* comme *HOXB5* ont été décrites dans des cas d'anomalies pulmonaires sévères (Volpe *et al.*, 2000).

Enfin, certains gènes *HOX*, notamment les gènes situés en 5' du cluster A réguleraient le développement du système reproducteur féminin (Figure 16) (Du and Taylor, 2016). Des mutations des gènes *HOXA10* et *HOXA13* seraient alors associées à une absence d'utérus ou de vagin (Ekici *et al.*, 2013).

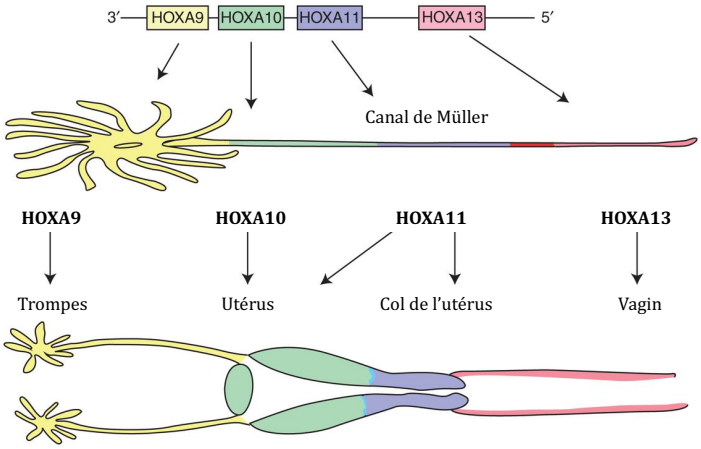


Figure 16 : **« Code HOX » du développement du système reproducteur féminin.** Tiré de Du and Taylor, 2016.

Chez l'adulte

A l'âge adulte, les gènes *HOX* sont exprimés de façon organe-spécifique. Ils le seraient de manière à maintenir une architecture spécifique, et notamment dans les organes en renouvellement continu (Takahashi *et al.*, 2004). Ainsi, des gènes *HOX* tels qu'*HOXA4* et *HOXD10* sont exprimés dans les cellules souches des cryptes intestinales responsables du renouvellement de ces dernières (Bhatlekar *et al.*, 2014). De nombreux autres tissus et particulièrement des organes postérieurs expriment à l'âge adulte les gènes HOX tels que les reins (Cillo *et al.*, 1992), la prostate, l'utérus, les testicules, sans que les fonctions précises des gènes *HOX* dans la fonction de ces organes adultes n'aient été identifiées. En revanche, les organes antérieurs comme le cerveau expriment peu ou pas les gènes *HOX* (Takahashi *et al.*, 2004).

Il a également été montré que l'expression d'*HOXA10* et *HOXA11*, varie au cours du cycle menstruel, participant au développement de l'endomètre après la phase post-ovulatoire (Taylor *et al.*, 1998, 1999b). Cette expression régulée par les hormones stéroïdiennes, participe ainsi à la fertilité féminine, notamment en facilitant l'implantation de l'embryon (Gendron *et al.*, 1997). Enfin, cette expression peut être altérée en cas d'endométriose chez la femme (Taylor *et al.*, 1999a).

Les gènes *HOX* réguleraient aussi le développement mammaire pour la lactation en réponse à la grossesse. En effet, il a été montré que la perte des gènes *Hoxa9*, *Hoxb9* et *Hoxd9* chez la souris ne modifiait pas la structure de la glande mammaire mais que cette dernière n'était plus capable de se développer en réponse à la gestation et après la parturition (Chen and Capecchi, 1999).

Enfin, ils seraient capables de réguler les processus d'angiogenèse et de cicatrisation avec des activités différentes selon les gènes *HOX* (Uyeno *et al.*, 2001; Bruhl *et al.*, 2004; Rhoads *et al.*, 2005; Kachgal *et al.*, 2012).

Hématopoïèse adulte

L'hématopoïèse est le processus par lequel des cellules indifférenciées appelées cellules souches hématopoïétiques (CSH) sont capables par des étapes successives de différenciation de donner naissance aux cellules sanguines matures. De nombreux gènes *HOX* sont exprimés au cours du processus et de façon spécifique à la lignée et au stade de différenciation. Certains gènes sont ainsi exprimés dans les stades précoces puis leur expression décroît au cours de la différenciation ou inversement, et peuvent être exprimés spécifiquement dans certains types de cellules. Au moins 22 gènes *HOX* seraient ainsi exprimés dans les cellules CD34+ (Grier *et al.*, 2005) tandis que leur expression est quasiment absente dans les cellules de moëlle osseuse CD34- considérées comme différenciées (Sauvageau *et al.*, 1994). Les gènes du cluster HOXA sont exprimés préférentiellement dans les cellules myéloïdes, ceux du cluster HOXB dans les cellules érythroïdes, et ceux du cluster HOXC dans les cellules lymphoïdes (Kawagoe *et al.*, 1999; Pineault *et al.*, 2002; Santoni *et al.*, 2013) mais aucun gène du cluster HOXD n'est exprimé dans les cellules hématopoïétiques.

Les gènes *HOX* ont été très étudiés dans l'hématopoïèse à l'aide d'étude de gain de fonction (expression rétrovirale *in vivo*/*in vitro*) ou de perte de fonction (modèles murins *knock-out*). De façon générale, la surexpression entraîne la prolifération et l'expansion des populations souches et progénitrices. Cette expansion s'accompagne d'un blocage de la différenciation. *HOXA9* et *HOXB4* sont préférentiellement nécessaires pour la prolifération des cellules souches hématopoïétiques (Alharbi *et al.*, 2013). Les études de perte de fonction ne sont pas toujours en accord avec les études de gain de fonction. En effet, en raison de l'homologie entre les différents gènes *HOX*, il semble possible que la perte d'un gène soit compensée par l'expression accrue d'un paralogue situé sur un autre cluster. Dans le cas d'*HOXA9*, les études de perte de fonction en modèle murin (*Hoxa9*$^{-/-}$) ont abouti à des déficiences marquées en cellules myéloïdes et lymphoïdes circulantes, et en progéniteurs myéloïdes, érythroïdes et lymphoïdes (Lawrence *et al.*, 1997).

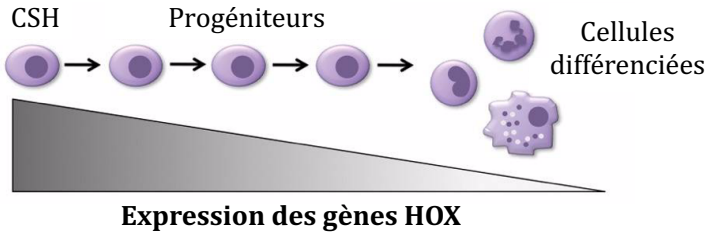


Figure 17 : **Expression des gènes HOX au cours de l'hématopoïèse normale**. Tiré de Collins and Hess, 2016a.

2.2.2. Contrôle de l'expression des gènes *HOX*

Dans le développement embryonnaire et la mise en place de l'axe antéro-postérieur, les gènes *HOX* sont exprimés selon des principes de colinéarité temporelle et spatiale. Dans l'hématopoïèse ou certains phénomènes à l'âge adulte, ils sont exprimés de façon transitoire. Pour toutes ces raisons, il est évident que leur expression doit être très finement régulée et que différents mécanismes sont à l'origine de cette régulation.

Avant la gastrulation, les gènes *HOX* sont maintenus silencieux et sont progressivement exprimés suivant le principe de colinéarité temporelle dans un premier temps, soit des gènes en 3' vers ceux en 5'. Au cours de la gastrulation, une première vague d'expression des gènes *HOX* se met en place au niveau de la partie postérieure de l'embryon et lors de la formation du sillon primitif (Forlani, 2003). Cette expression des gènes *HOX* en 3' s'étend ensuite antérieurement. L'expression de gènes *HOX* en 5' suit la même dynamique et s'étend de la même façon.

Signaux extra-cellulaires

L'initiation de l'expression des gènes *HOX* au moment de la gastrulation se fait en réponse à différents signaux extra-cellulaires. Parmi ces signaux, deux principaux ont été particulièrement étudiés. Il s'agit de la voie Wnt/β-catenin et de la voie médiée par le Fgf (*fibroblast growth factor*) (Dubrulle *et al.*, 2001). Au sein de l'embryon, les cellules sont exposées à des gradients de Fgf (Dubrulle and Pourquié, 2004) et de signaux activant la voie Wnt (Aulehla *et al.*, 2003). Il a d'ailleurs été montré que l'utilisation précoce d'agonistes de Wnt déclenchait l'expression des gènes situés en 3' *Hoxa1* et *Hoxb1* et que la délétion d'enhancers sensibles à l'activation par Wnt empêche l'activation de l'expression des gènes 3' Hoxa (Neijts *et al.*, 2016).

La signalisation médiée par l'acide rétinoïque est également un régulateur de l'expression des gènes *HOX* bien que son rôle dans l'initiation de leur expression ne reste pas démontré. La fixation de l'acide rétinoïque sur son récepteur nucléaire RAR (*retinoic acid receptor*) entraîne son hétérodimérisation avec RXR (retinoid X receptor) et la fixation sur des éléments de réponse à l'acide rétinoïque RAREs (*retinoic acid response elements*). Des sites consensus RAREs ont été décrits dans les régions régulatrices de plusieurs gènes *Hox* (Marshall *et al.*, 1994; Packer *et al.*, 1998) et il a été montré que l'utilisation d'acide rétinoïque sur des cellules entraîne l'expression des gènes *Hox* (Packer *et al.*, 1998). De plus, la délétion de RAREs à proximité du gène *Hoxa1* affecte son expression mais n'empêche pas l'initiation de l'expression des gènes *Hox* (Dupe *et al.*, 1997).

Facteurs de transcription CDX

Les facteurs de transcription de la famille CDX sont d'autres régulateurs importants de l'expression des gènes *HOX*. Il existe trois protéines dans cette famille : CDX1, CDX2 et CDX4. Tout comme les facteurs HOX, il s'agit de facteurs de transcription à homéodomaine faisant partie des gènes dits *paraHOX*. Des sites de fixation spécifiques aux facteurs CDX ont été décrits et sont retrouvés fréquemment au sein des clusters HOX (Tabaries *et al.*, 2005). Par ailleurs, et bien que certaines données soient contradictoires, il semble que les voies de signalisation Wnt, Fgf et de l'acide rétinoïque soient partiellement responsables de la régulation de l'expression des gènes *HOX* via la régulation des gènes *CDX* (Prinos *et al.*, 2001). Dans les cellules hématopoïétiques, il a été montré dans un modèle murin qu'*Hoxa9* était lui régulé par Cdx4 par la fixation sur des sites de fixation spécifiques (Yan *et al.*, 2006).

Organisation tridimensionnelle des clusters HOX

L'organisation 3D des clusters HOX représente également un mécanisme de régulation de leur expression particulièrement important, notamment au cours des étapes précoces de l'embryogenèse. Cette organisation a pu être profondément étudiée par l'essor des techniques d'analyse conformationnelle des chromosomes telles que la 3C (*Chromosome Conformation Capture*). Ces approches ont permis de montrer qu'il existait deux compartiments : l'un associé à une répression transcriptionnelle, l'autre à l'expression des gènes *HOX* et qu'il existait une dynamique pouvant expliquer en partie les principes d'expression des gènes *HOX* (Figure 18) (Noordermeer *et al.*, 2011; Montavon and Soshnikova, 2014). Les mécanismes qui contrôlent ces conformations ne sont pas connus mais semblent être liés aux différentes marques épigénétiques présentes, qui lorsqu'elles sont identiques pourraient s'agréger ensemble afin de former ces deux zones.

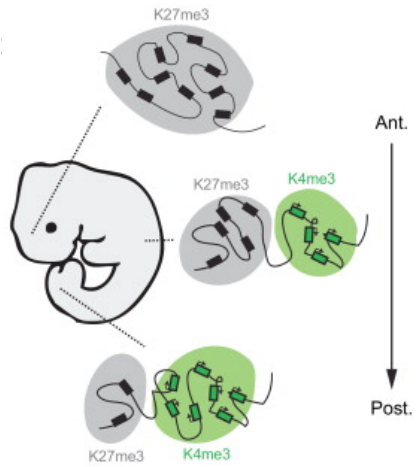


Figure 18 : **Organisation tridimensionnelle des clusters HOX**. En vert : zones transcriptionnellement actives, en gris : zones non actives. Tiré de Montavon and Soshnikova, 2014.

Modifications épigénétiques

Les modifications épigénétiques correspondent à toutes les modifications permettant la régulation de l'expression des gènes sans changement de la séquence nucléotidique d'ADN et qui sont transmissibles à la descendance. Dans le cas de la régulation des gènes *HOX*, ces mécanismes sont à l'origine de la répression globale observée dans les étapes précoces du développement et permettent la régulation au cours du développement et dans les tissus développés adultes.

Il s'agit de modifications au niveau des histones qui sont des petites protéines constituant les nucléosomes autour desquels l'ADN est enroulé pour former la chromatine et les chromosomes. Ces protéines basiques riches en lysines et en arginines peuvent subir des modifications qui changent leur capacité d'interaction à l'ADN et donc l'organisation de la chromatine. Ces modifications rendent donc l'ADN plus ou moins accessible aux autres protéines dont celles de la machinerie transcriptionnelle.

Les gènes *HOX* peuvent ainsi être régulés par l'action d'histone méthyltransférases (HMT) capables de méthyler différents résidus lysines des histones. Différentes marques épigénétiques activatrices comme H3K4me3 (pour la triméthylation de la lysine 4 de l'histone H3) ou répressives comme H3K27me3 ont été retrouvées au sein de tous les clusters HOX selon les stades embryonnaires. Ces marques participant à la régulation des gènes *HOX* sont déposées par des protéines codés par des gènes de deux groupes : le groupe Polycomb (PcG) et le groupe Trithorax (TrxG).

Les protéines du groupe PcG jouent le rôle de répresseurs par l'action de deux grands complexes PRC (*polycomb-group repressive complex*) 1 et PRC2. Tous deux participent à la répression de leurs gènes cibles et possèdent des rôles complémentaires. Le complexe PRC2 catalyse la tri-méthylation de la lysine 27 de l'histone H3 (H3K27me3) notamment grâce à une de ses protéines constituantes majeures EZH2 (*enhancer of zeste homolog 2*) (Cao *et al.*, 2002). Le complexe PRC1 maintient cet état silencieux par la mono-ubiquitinylation de la lysine 119 de l'histone H2A, augmentant ainsi la condensation chromatinienne (Wang *et al.*, 2004). Ce sont ces mécanismes qui sont à l'origine de la répression aux stades précoces du développement embryonnaire et qui reprennent notamment à l'âge adulte dans certains organes et au cours de la différenciation hématopoïétique (Boyer *et al.*, 2006).

Les protéines du groupe TrxG possèdent le rôle inverse en activant l'expression des gènes *HOX*. Chez l'Homme, c'est le complexe MLL qui réalise cette activation par triméthylation de la lysine 4 de l'histone H3 (H3K4me3). Ce complexe est notamment constitué de la protéine MLL (*mixed lineage leukemia*), WDR5 (*WD repeat protein 5*),

RBBP5 (*retinoblastoma binding protein 5*), ASH2L (*absent small homeotic 2 like protein*) et DPY-30 (*dumpy 30*).

Rôle des ARN non codants

Il existe deux types d'ARN non codants (ncRNAs, *noncoding RNAs*) : les longs ARN non codants (lncRNAs, *long noncoding RNAs*) et les micro ARN (miRNAs, *micro RNAs*). Les deux types jouent des rôles très importants dans la régulation des gènes *HOX*.
En 2007, 231 ncRNAs exprimés au sein des clusters HOX ont été identifiés (Rinn *et al.*, 2007) et on estime à 15% la proportion de ncRNAs fonctionnels (Figure 19).

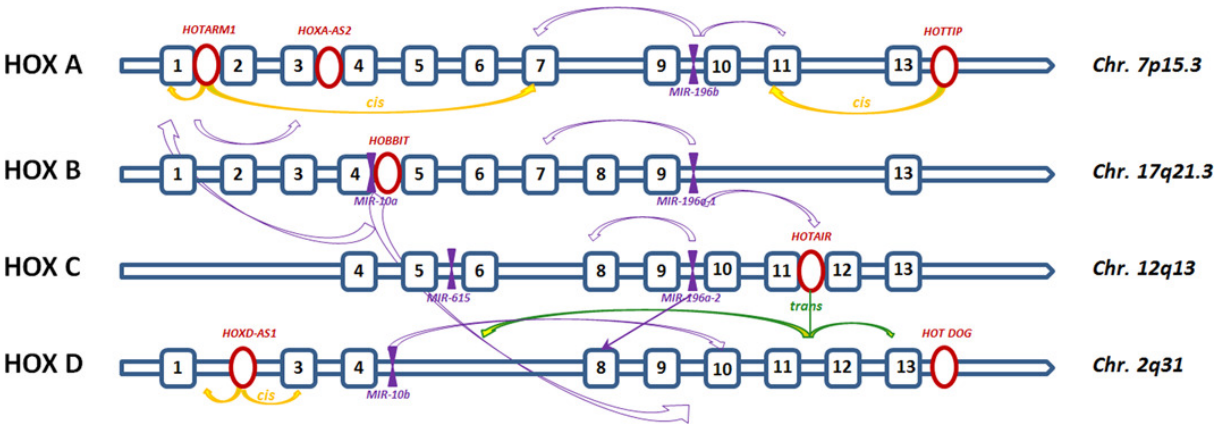


Figure 19 : **Représentation des différents ncRNAs au sein des clusters HOX**. Tiré de Botti *et al.*, 2018.

Les miRNAs sont de petits ncRNAs d'environ 22 nucléotides capables de reconnaître par complémentarité des ARN messagers cibles, entraînant l'inhibition de leur traduction ou leur dégradation. Deux familles de miR sont exprimées au sein des clusters HOX et peuvent ainsi réguler les gènes *HOX* : MIR196 et MIR10 (Ruby *et al.*, 2007; Wong *et al.*, 2015). HOXA9 est quant à lui directement régulé par miR-196b (Li *et al.*, 2012).

Les lncRNAs sont des ncRNAs de plus grande taille (> 200 nucléotides) épissés et polyadénylés. Les lncRNAs seraient capables d'activer la transcription d'un gène, d'entrer en compétition avec les gènes à proximité pour la machinerie de transcription, ou recruter des complexes répresseurs. Il existe des lncRNAs exprimés sur chaque cluster de gènes *HOX* (Figure 19). Les plus décrits HOTAIR et HOTTIP possèdent des rôles opposés. HOTTIP (*HOXA transcript at the distal tip*), situé au niveau du cluster A module positivement l'expression des gènes HOXA en 5' en permettant le recrutement de WDR5 et donc du complexe MLL (Wang *et al.*, 2011). HOTAIR (*HOX transcript antisens RNA*) est quant à lui situé au niveau du cluster C. Contrairement aux autres lncRNAs présents au niveau des clusters HOX, HOTAIR ne régule pas les gènes du cluster C mais ceux du cluster

D (Bhan and Mandal, 2015). HOTAIR réprime alors l'expression des gènes *HOXD* en 5' par le recrutement du complexe PRC2 (Tsai *et al.*, 2010).

2.3. HOXA9 : structure et physiologie

2.3.1. Structure

Comme tous les gènes *HOX*, le gène *HOXA9* est constitué de deux exons. Il se situe sur le bras court du chromosome 7. La protéine qu'il code est une protéine de 272 acides aminés composée de 3 domaines bien décrits :

- Un domaine de liaison à l'ADN ou homéodomaine
- Un domaine d'interaction à MEIS1
- Un domaine conservé d'interaction à PBX

Par ailleurs, un variant d'épissage d'*Hoxa9* a été décrit chez la souris en 1998 (Fujimoto *et al.*, 1998). Ce variant, nommé Hoxa9t ne possède pas d'homédomaine, et se distribue dans le noyau et le cytoplasme, contrairement à la forme longue d'Hoxa9 qui n'est présente que dans le noyau (Dintilhac *et al.*, 2004) (Figure 20).

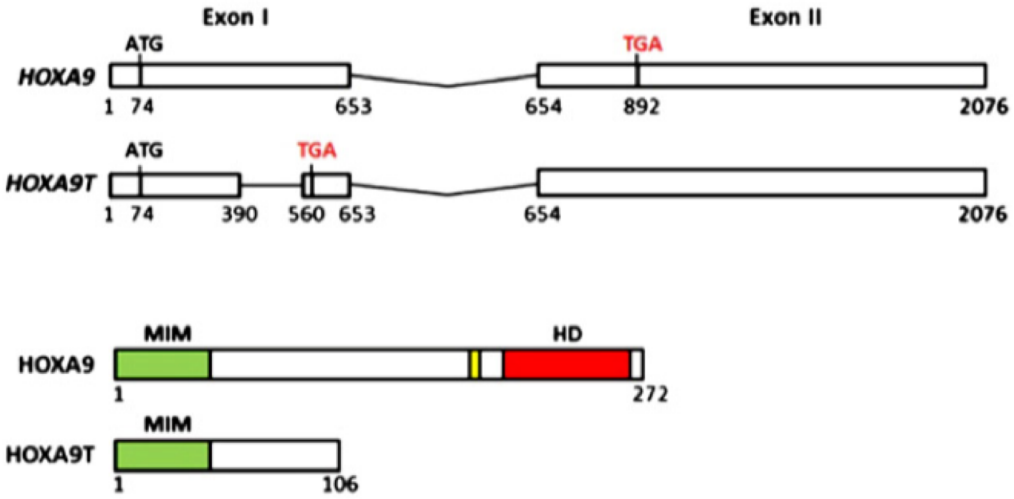


Figure 20 : **Structure des gènes et protéines des deux variants d'HOXA9.** En haut : ARN d'HOXA9 et d'HOXA9T. En bas : Protéines HOXA9 et HOXA9T. MIM : domaine d'interaction à MEIS1, en jaune : domaine conservé d'interaction à PBX, HD : homéodomaine. Tiré de He *et al.*, 2012.

2.3.2. Co-facteurs

HOXA9 possède comme tous les facteurs HOX un domaine conservé d'interaction à PBX, mais également un domaine d'interaction à MEIS1. Ainsi, il est capable d'interagir à l'ADN sous forme d'hétéro-trimère.

Les gènes *PBX* sont les homologues du gène *Exd* chez la drosophile. Il en existe 4 chez l'Homme : *PBX1*, *PBX2*, *PBX3*, *PBX4*. HOXA9 interagirait de façon préférentielle avec PBX1 au cours du développement. Cette interaction se ferait à l'aide d'un hexapeptide situé en N-terminal, à proximité de l'homéodomaine. Certains résidus spécifiques permettraient ainsi la reconnaissance, notamment un résidu tryptophane s'insérant dans la poche de PBX1 (LaRonde-LeBlanc and Wolberger, 2003) (Figure 21). Dans les cellules myéloïdes, il a été montré qu'HOXA9 pourrait plutôt s'associer avec PBX2 et MEIS1 (Shen *et al.*, 1999). Mais, dans un modèle de leucémie aiguë, il a été montré que c'est PBX3 qui agit comme co-facteur avec HOXA9 (Li *et al.*, 2013).

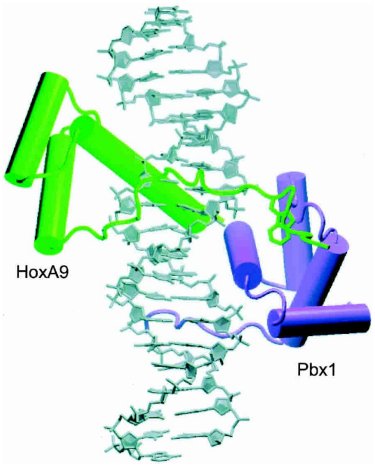


Figure 21 : **Complexe HoxA9-Pbx1-ADN.** Tiré de LaRonde-LeBlanc and Wolberger, 2003.

Différents sites de fixation d'HOXA9 à l'ADN ont été décrits et varient selon le type d'études effectuées (moléculaires ou cellulaires). Une étude en 1997 a décrit le site de fixation Hox-Pbx1 comme étant 5'-ATGATTTACGAC-3' (Shen *et al.*, 1997b). La séquence reconnue par HOXA9 serait la partie ATTTAC (LaRonde-LeBlanc and Wolberger, 2003). Enfin, à l'aide de cellules murines transformées par Hoxa9 murin, des études réalisées par ChIP-Seq ont permis de préciser la séquence de fixation optimale qui serait 5'-ATTTAT-3' (Figure 22) (Huang *et al.*, 2012). Il est à noter que cette séquence englobe un site TGAT dans sa partie 5', site qui est le siège de l'interaction de PBX au complexe HOXA9/PBX décrit par LaRonde-LeBlanc en 2003, suggérant que la plupart des sites reconnus par HOXA9 le sont dans le contexte d'une dimérisation avec PBX.

Figure 22 : **Séquence consensus de fixation d'Hoxa9 évaluée par ChIP-seq**. Tiré de Huang *et al.*, 2012.

2.3.3. Gènes cibles

Compte-tenu de son rôle prépondérant dans l'hématopoïèse normale, la grande majorité des études sur les gènes cibles d'HOXA9 ont été réalisées dans des modèles hématopoïétiques. Des gènes dont la transcription est activée ou réprimée par HOXA9 ont donc été identifiés.

HOXA9 étant exprimé dans les cellules souches, les gènes qu'il régule sont pour la plupart impliqués dans la prolifération et la survie cellulaire. Hoxa9 régulerait ainsi *Pim1* (Hu *et al.*, 2007), capable d'activer la prolifération par *c-Myb* et d'inactiver la protéine anti-apoptotique BAD. HOXA9 régule également positivement *ID2* ou négativement *BIM*, un facteur impliqué dans l'apoptose (Nagel *et al.*, 2010). Une autre étude en modèle murin a montré qu'Hoxa9 pouvait réguler positivement un certain nombre d'autres gènes impliqués dans la prolifération (*Camk2d, Cdk6, Erg, Etv6, Flt3, Foxp1, Gfi1, Kit, Lck, Lmo2, Myb, Sox4*) et négativement des gènes de l'inflammation et impliqués dans la différenciation (*Itfi1, Tlr4, Ccl3, Ccl4, Csf2rb, Ifngr1, Runx1, Cd28, Cd33*) (Huang *et al.*, 2012).
Par ailleurs, HOXA9 régulerait positivement l'expression d'autres gènes *HOX* tels qu'*HOXA7* ou *HOXA10* et également ses co-facteurs *PBX3* ou *MEIS1* (Faber *et al.*, 2009).

2.3.4. Régulation post-transcriptionnelle et post-traductionnelle

Au-delà des différents mécanismes régulant l'expression des gènes *HOX*, des mécanismes spécifiques à la régulation d'HOXA9 ont été identifiés.

Régulation post-transcriptionnelle

Comme les autres facteurs HOX, HOXA9 peut être régulé post-transcriptionnellement, notamment par l'action de miRNAs. Parmi ceux-ci, de nombreux ont été identifiés dans des contextes pathologiques de cancer. L'ARNm d'HOXA9 serait la cible de miR-196b, exprimé au sein du cluster HOXA et situé entre les gènes d'*HOXA9* et *HOXA10* (Li *et al.*, 2012; Yu *et al.*, 2016). HOXA9 serait aussi la cible de miR-126 (Shen *et al.*, 2008), miR-182 (Zhang *et al.*, 2017) et miR-133b (Wang *et al.*, 2017b).

Régulation post-traductionnelle

L'activité d'HOXA9 peut être régulée par sa localisation intracellulaire. Deux mécanismes opposés ont été décrits. Le premier favorise l'accumulation nucléaire d'HOXA9 et son association avec MEIS1 sous l'action de la thrombopoïétine (TPO), notamment par des signaux différents de localisation nucléaire (Kirito *et al.*, 2004). Le deuxième mécanisme diminuant l'activité nucléaire d'HOXA9 repose sur l'interaction

avec la protéine Smad4 au niveau de l'homéodomaine, empêchant la liaison à l'ADN (Wang *et al.*, 2006b). Cette interaction, médiée par la voie du TGFb, entraîne également la séquestration cytoplasmique d'Hoxa9 au sein du complexe Smad4-Hoxa9 (Quéré *et al.*, 2011).

La phosphorylation est un second mécanisme de régulation de l'activité d'une protéine. Dans le cas d'HOXA9, deux sites de phosphorylation ont été identifiés S205 et T206. Il a été montré qu'HOXA9 était substrat de la PKC (*protein kinase C*) et que celle-ci était responsable de la phosphorylation des résidus S205 et T206 (Vijapurkar *et al.*, 2004). La phosphorylation d'HOXA9 induit une diminution de sa capacité à se lier à l'ADN et à interagir avec ses co-facteurs. Ce mécanisme serait un des mécanismes utilisés par les cellules pour réguler la différenciation myéloïde au cours de l'hématopoïèse normale (Vijapurkar *et al.*, 2004).

Enfin, la protéine HOXA9 peut également être régulée par ubiquitinylation et dégradation protéasomale. C'est l'interaction entre l'homéodomaine et la protéine CUL-4A (*cullin 4A*) qui permettrait l'ubiquitinylation et la dégradation d'HOXA9 (Zhang *et al.*, 2003).

2.4. HOXA9 et cancer

Compte tenu de leurs rôles dans le développement embryonnaire et l'hématopoïèse, les facteurs de transcription HOX régulent des phénomènes majeurs dans le cancer tels que la prolifération cellulaire, la survie, la migration ou la différenciation. De très nombreuses études se sont donc intéressées à leurs différents rôles dans les cancers, autant hématologiques que solides. Concernant HOXA9 et son rôle prépondérant dans l'hématopoïèse normale, il a été extensivement étudié dans la transformation leucémique, mais depuis plusieurs années son rôle dans les tumeurs solides est de plus en plus étudié et décrit.

2.4.1. HOXA9 dans les leucémies aigues myéloïdes

Les études de gain de fonction d'HOXA9 ont montré qu'une surexpression entraînait l'expansion des cellules souches hématopoïétiques et un blocage de la différenciation des progéniteurs qui progresse en leucémie aiguë myéloïde (LAM) (Kroon *et al.*, 1998; Thorsteinsdottir *et al.*, 2002). Les leucémies aigües sont des pathologies prolifératives brutales caractérisées par la prolifération incontrôlée de cellules immatures appelées blastes qui envahissent la moelle osseuse puis le sang.

Dans les LAM, plusieurs études ont montré que l'expression d'*HOXA9* était un facteur pronostic péjoratif (Golub *et al.*, 1999). *HOXA9* est surexprimé dans environ 70% des LAM présentant un caryotype normal sans perte ou gain chromosomique. Cette surexpression est associée à plusieurs anomalies retrouvées dans les LAM (Collins and Hess, 2016b). Les anomalies les plus fréquemment retrouvées sont détaillées ci-après et reprises sur la Figure 23.

Réarrangements du gène *MLL*

Le gène *MLL* (*MLL1*, *KMT2A*) peut être impliqué dans une translocation avec différents partenaires de fusion. Ces fusions représentent environ 3 à 5% des LAM de l'adulte et jusqu'à 25% des LAM pédiatriques (Döhner *et al.*, 2010; Creutzig *et al.*, 2012). Plus de 60 partenaires de fusion ont été identifiés mais 9 principaux représentent plus de 90% de ces partenaires : AF1P (EPS15), AF4 (AFF1), AF6 (MLLT4), AF9 (MLLT3), AF10 (MLLT10), AF17 (MLLT6), ENL (MLLT1), ELL et SEPT7 (Meyer *et al.*, 2009). Ces fusions caractérisent un sous-type particulier de leucémies de lignée mixte (mixed-lineage leukemia ou MLL) à prédominance myéloide ou lymphoïde.
La surexpression d'*HOXA9* est liée à l'activité histone méthyltransférase augmentée des protéines de fusion (Milne *et al.*, 2010) qui seraient capables de recruter au sein du complexe l'histone méthyltransférase DOT1L, qui catalyse la diméthylation de la lysine 79 de l'histone H3 (H3K79me2) marque activatrice renforçant la surexpression d'*HOXA9* (Krivtsov *et al.*, 2008). Cette surexpression est nécessaire à la transformation leucémique des cellules (Ayton and Cleary, 2003; Faber *et al.*, 2009).

De plus, dans environ 5% des cas de LAM, le gène *MLL* peut faire l'objet de duplications partielles en tandem (ou MLL-PTD) qui sont également associées à une surexpression d'*HOXA9* (Dorrance *et al.*, 2006).

Mutations *NPM1* (*nucleophosmin 1*)

Les mutations *NPM1* sont les anomalies les plus courantes dans les LAM et sont présentes dans plus de 50% des cas de LAM à caryotype normal, correspondant à 35% de toutes les LAM confondues. Ces mutations entraînent une relocalisation cytoplasmique de cette protéine normalement nucléaire (Falini *et al.*, 2009). La protéine cytoplasmique NPM1c est ainsi capable d'entraîner la surexpression d'*HOXA9*, *HOXA10* et *MEIS1*. Une des hypothèses afin d'expliquer ce mécanisme repose sur la séquestration de NPM1c par HEXIM dans le cytoplasme, permettant au complexe transcriptionnel P-TEFb de jouer son rôle en activant la transcription d'*HOXA9* (Gurumurthy *et al.*, 2008).

Fusions HOX-NUP98 (*nucleoporin 98*)

Les gènes *HOX*, et notamment *HOXA9* peuvent eux-mêmes être impliqués dans la formation de protéines de fusion avec NUP98. NUP98 est une nucléoporine faisant partie du complexe du pore nucléaire qui permet le passage de métabolites et de molécules comme les ARN et les protéines du cytoplasme au noyau. La protéine de fusion NUP98-HOXA9 serait capable de se lier à l'ADN via l'homéodomaine d'HOXA9 et d'activer la transcription via les domaines répétés FG (phénylalanine-glycine) de NUP98 (Kasper *et al.*, 1999) aboutissant à la surexpression des gènes *HOX* dont *HOXA9* (Ghannam *et al.*, 2004). NUP98 peut également être fusionné avec d'autres partenaires tels que NSD1 ou JARID1A et entraîner également la surexpression d'*HOXA9* (De Rooij *et al.*, 2013).

Autres mécanismes

D'autres altérations observées dans les LAM sont également associées à des surexpressions d'*HOXA9* : mutations ou délétions d'*EZH2* (Khan *et al.*, 2013), surexpression des facteurs Cdx (Bansal *et al.*, 2006).

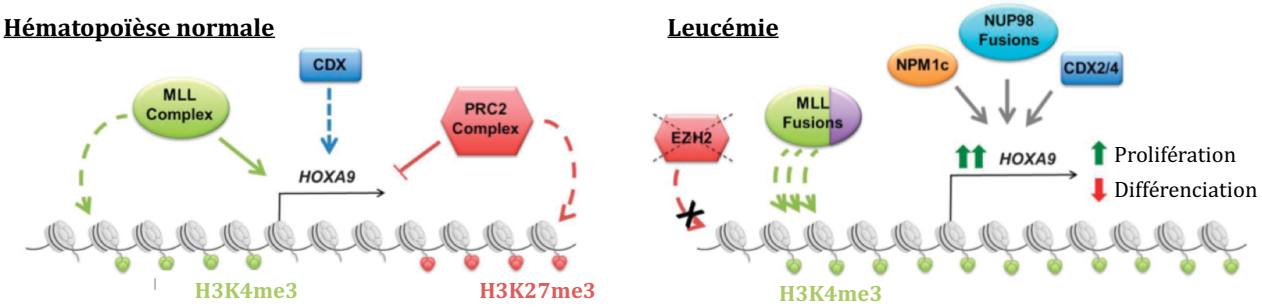


Figure 23 : **Régulation de l'expression d'*HOXA9* en contexte normal et en situation leucémique**. Tiré de Collins and Hess, 2016b.

2.4.2. HOXA9 dans les autres hémopathies malignes

Outre les leucémies aigues myéloïdes, les leucémies aigues lymphoblastiques (touchant la lignée lymphoïde) peuvent également présenter des réarrangements MLL, notamment chez les enfants, et aboutir à une surexpression d'*HOXA9* corrélée à l'agressivité de ce sous-type de leucémie (Adamaki *et al.*, 2015). *HOXA9* est également surexprimé en cas de translocation *TCR* (*T-cell receptor*)-*HOXA* (Speleman *et al.*, 2005), *CALM-AF10* (Novak *et al.*, 2012) ou *E2A-PBX1* (Hassawi *et al.*, 2014).

HOXA9 est également surexprimé dans d'autres pathologies hématologiques prolifératives telles que les syndromes myélodysplasiques (SMD), notamment associés à des mutations d'*ASXL1* (*Additional Sex Combs Like Transcriptional Regulator 1*), acteur le

plus souvent muté dans les SMD, entraînant l'inhibition de l'activité du complexe PRC2 (Inoue *et al.*, 2013).

Enfin, dans le myélome multiple, une grande analyse génomique a identifié HOXA9 comme un potentiel oncogène et une potentielle cible thérapeutique. Cette pathologie caractérisée par la prolifération de plasmocytes transformés est souvent caractérisée par des mutations au niveau d'histones méthyltransférases. L'étude a montré que l'expression d'*HOXA9* était inversement corrélée avec la présence de marques répressives H3K27me3 et que l'utilisation de shRNA (*short hairpin RNAs*) ciblant HOXA9 impactait plusieurs lignées cellulaires (Chapman *et al.*, 2011).

2.4.3. HOXA9 dans les tumeurs solides

Dans les organes adultes, HOXA9 est plus ou moins exprimé dans les tissus normaux et les analyses des bases de données montrent qu'il est principalement exprimé à l'âge adulte dans les tissus postérieurs : organes reproducteurs féminins, vessie, rein, colon (Figure 24). Dans les cancers, il peut être sur-exprimé ou sous-exprimé avec des rôles divers.

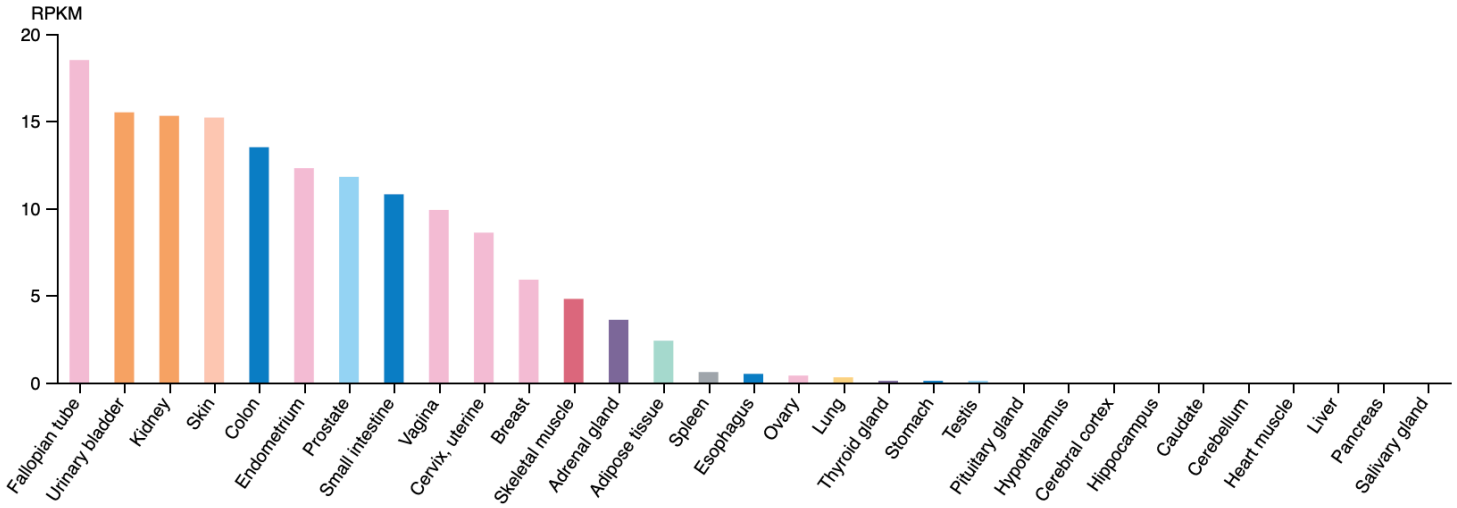


Figure 24 : **Expression d'HOXA9 dans les tissus adultes.** Données extraites de la base GTEx et présentées sur le site The Human Protein Atlas (https://www.proteinatlas.org/ENSG00000078399-HOXA9/tissue).

Cancer colorectal

HOXA9 est surexprimé dans les tissus tumoraux (Kanai *et al.*, 2010) et significativement plus exprimé à un stade tumoral plus avancé (Groene *et al.*, 2006). Sa surexpression participe à l'augmentation de la population de cellules souches cancéreuses et à leur auto-renouvellement (Bhatlekar *et al.*, 2018). De plus, la surexpression d'*HOXA9* est associée à la présence de métastases ganglionnaires

(Watanabe *et al.*, 2018) en lien avec la sous-expression de miR-133b, capable de cibler l'ARNm d'HOXA9 (Wang *et al.*, 2017b). HOXA9 serait également impliqué dans les phénomènes de chimiorésistance (Ju *et al.*, 2017).

Glioblastome

Le glioblastome est la tumeur cérébrale la plus fréquente et la plus agressive. Là encore, *HOXA9* est surexprimé et sa surexpression corrèle avec le grade et la survie (Pojo *et al.*, 2015). Son expression est par ailleurs associée à des signatures géniques de cellules souches cancéreuses, à la tumorigénicité dans des modèles de xénogreffes, et à la résistance au témozolomide (agent alkylant utilisé en clinique pour la prise en charge du glioblastome), notamment par la régulation du gène anti-apoptotique *BCL2* (Pojo *et al.*, 2015). Son activation est par ailleurs réversible par l'inhibition de PI3K (Costa *et al.*, 2010).

Cancer de l'ovaire

HOXA9 étant impliqué dans le développement du tractus génital féminin, son rôle dans le carcinome ovarien a été également étudié. L'épithélium ovarien n'exprime pas *HOXA9*, alors qu'il est fortement exprimé dans les cancers ovariens épithéliaux (Cheng *et al.*, 2005). L'expression d'*HOXA9* dans les cellules cancéreuses permet le remodelage du micro-environnement tumoral et favorise la croissance et la dissémination tumorale (Figure 25). Ce processus fait intervenir une régulation positive du TGF-β2 qui stimule les fibroblastes péritonéaux en fibroblastes associés au cancer (CAF, *cancer-associated fibroblasts*) et promeut ainsi la croissance tumorale locale (Ko *et al.*, 2012). De plus, via la régulation de la production de TGF-β2 et de CCL2, HOXA9 permet la polarisation des macrophages péritonéaux en macrophages de type M2 immunosuppresseur aussi appelés macrophages associés au cancer (CAM, *cancer-associated macrophages*) et donc favorise la progression tumorale (Ko *et al.*, 2014). Enfin, par la régulation positive du gène *CDH3* codant la P-cadhérine, HOXA9 permet la dissémination des cellules au sein de la cavité péritonéale et leur adhésion (Ko and Naora, 2014b).

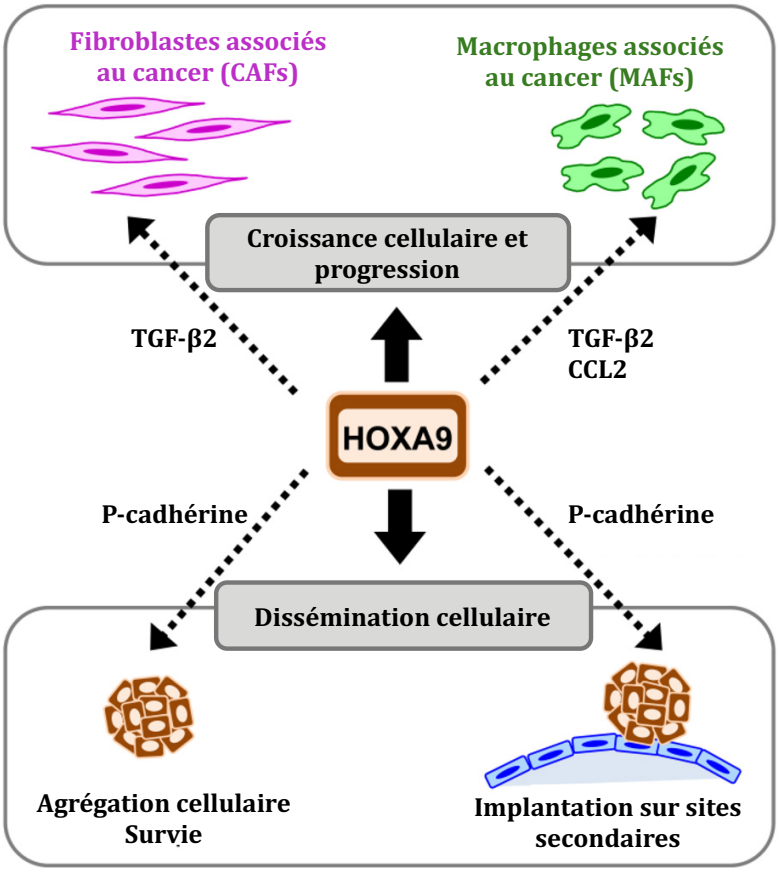


Figure 25 : **Remodelage du micro-environnement tumoral par d'HOXA9 dans le cancer épithélial ovarien**. Tiré de Ko and Naora, 2014a.

Cancer de la prostate

Dans le cancer de la prostate, le facteur de transcription TWIST1 connu pour être surexprimé est capable de se fixer directement aux séquences promotrices d'*HOXA9* et de réguler positivement son expression par le recrutement de WDR5 et de l'ARN non codant HOTTIP (Gajula *et al.*, 2013; Malek *et al.*, 2017). Cette surexpression d'*HOXA9* est associée à des caractéristiques cellulaires pro-métastatiques et à la formation de métastases.

Cancer du pancréas

La régulation positive d'HOXA9 par l'ARN non codant HOTTIP module la prolifération, la survie et la migration des cellules tumorales pancréatiques (Cheng *et al.*, 2015). De plus, l'expression d'*HOXA9* régule les propriétés des cellules souches cancéreuses et représente donc une cible thérapeutique intéressante (Fu *et al.*, 2017).

Carcinome rénal

HOXA9 est très exprimé dans le rein adulte (Figure 24) mais aucun rôle fonctionnel n'a été identifié à ce jour. Très peu d'études sur HOXA9 se sont intéressées au carcinome rénal mais il a été montré que le niveau de méthylation du promoteur d'*HOXA9* était significativement diminué entre les tumeurs bénignes (oncocytome) et cancéreuses

(RCC) (Pires-Luís *et al.*, 2017). De plus, le niveau de méthylation du promoteur d'*HOXA9* est significativement plus bas dans les cas de carcinome rénal papillaire (pRCC), en comparaison avec les autres types (Pires-Luís *et al.*, 2017). Une autre étude a montré qu'HOXA9 était plus exprimé dans des cas de RCC, en comparaison avec du tissu adjacent normal (Shears *et al.*, 2008).

Autres cancers

L'expression d'*HOXA9* et son rôle fonctionnel ont également été étudiés dans le cancer de l'estomac. Dans un premier temps, il a été décrit qu'*HOXA9*, comme d'autres gènes *HOXA*, est fortement exprimé dans une lignée en culture dérivant de cellules souches gastriques (KMU-CS12) ainsi que dans des xénogreffes chez la souris (Yang *et al.*, 2009). Plus récemment, il a été montré qu'HOXA9 régule la prolifération, la migration et l'invasion des cellules cancéreuses gastriques (Yu *et al.*, 2017) et que son expression corrèle avec une moindre survie des patients (Ma *et al.*, 2017).

Dans le cancer du poumon, il a plutôt été observé une diminution de l'expression d'*HOXA9* (Calvo *et al.*, 2000) en lien avec un promoteur significativement plus méthylé que dans le tissu normal (Hwang *et al.*, 2011). Fonctionnellement, la diminution de l'expression d'*HOXA9* est dans ce cancer associée à l'invasion cellulaire et l'agressivité, notamment par la régulation positive de miR-196b ciblant HOXA9 (Yu *et al.*, 2016) et à la récurrence (Hwang *et al.*, 2014).

Enfin, dans le cancer du sein, *HOXA9* est sous-exprimé et cette sous-expression promeut la croissance tumorale mammaire et la survie en lien avec la perte d'expression de *BRCA1* lorsque ce dernier n'est pas muté (Gilbert *et al.*, 2010). Cette sous-expression serait liée à l'inhibition de TET1, qui catalyse normalement la déméthylation du promoteur d'*HOXA9*, par HMGA2 (Sun *et al.*, 2013). Fonctionnellement, l'activité de cette voie HMGA2/TET1 et par conséquence la diminution de l'expression d'*HOXA9* régule la croissance cellulaire et les processus métastatiques. De plus, il a été montré que le niveau de méthylation du promoteur d'*HOXA9* corrèle avec une moindre survie des patients (Park *et al.*, 2017).

2.5. Ciblage d'HOXA9 : stratégies en développement

Différentes stratégies de ciblage existent à ce jour. Deux sont à l'étude et décrites dans la littérature : une par ciblage direct et l'autre par ciblage indirect.

2.5.1. Ciblage indirect

Les stratégies de ciblage indirect reposent sur l'inhibition d'effecteurs épigénétiques recrutés dans certains cas, notamment de LAM, et responsables de la surexpression d'HOXA9.

La première stratégie consiste à utiliser des composés inhibiteurs de l'histone méthyltransférase DOT1L, responsable de la méthylation H3K79me2. Cette HMT est recrutée par les protéines de fusion MLL et participe à la surexpression d'*HOXA9* (Krivtsov *et al.*, 2008). L'inhibition par des molécules telles que l'EPZ-5676 (pinometostat), qui est entré en essai clinique de phase I dans les leucémies MLL pédiatriques et les leucémies de l'adulte réfractaires ou en rechute, permet de diminuer l'expression d'*HOXA9* (Lillico *et al.*, 2018).

Une deuxième stratégie indirecte consiste à cibler l'interaction entre la menin et les protéines de fusion de MLL. En effet, il a été montré que cette interaction était indispensable au rôle leucémogène des fusions de MLL (Yokoyama *et al.*, 2005). Ainsi l'inhibition de cette interaction avec des molécules telles que le composé MI-2-2 entraîne la diminution de l'expression d'HOXA9 et induit la différenciation des cellules leucémiques (He *et al.*, 2016).

Diverses stratégies de ciblage des autres acteurs du complexe MLL sont aussi à l'étude (Lambert *et al.*, 2018).

2.5.2. Ciblage direct

Une seule stratégie de ciblage direct est en évaluation préclinique. Elle repose sur l'utilisation d'un peptidomimétique HXR9 développé par le groupe de Richard Morgan qui bloque l'interaction entre les facteurs HOX et leurs co-facteurs PBX. Cette stratégie n'est pas spécifique d'HOXA9, puisque tous les facteurs HOX interagissant avec un facteur PBX peuvent être ciblés.

Ce peptide a été évalué dans un très grand nombre de cancers et montre une efficacité importante *in vitro* et *in vivo* dans le mélanome (Morgan *et al.*, 2007), le cancer de l'ovaire (Morgan *et al.*, 2010), le cancer du sein (Morgan *et al.*, 2012), le myélome multiple (Daniels *et al.*, 2010), le méningiome (Ando *et al.*, 2014), le cancer de la prostate (Morgan *et al.*, 2014), la leucémie aigüe myéloïde (Alharbi *et al.*, 2017) et de manière intéressante dans le carcinome rénal (Shears *et al.*, 2008).

3. Ciblage d'HOXA9 : une stratégie thérapeutique prometteuse ?

3.1. Ciblage des facteurs de transcription

Bien que leur implication dans diverses pathologies, dont le cancer, soit étudiée depuis longtemps, les facteurs de transcription ont longtemps été considérés comme des cibles inatteignables et difficilement utilisables pour le développement de thérapies anticancéreuses. L'essor des nouvelles techniques d'étude en biologie a permis de mieux comprendre la régulation de leur expression, leurs modes d'action, leurs partenaires. Grâce à ces nouvelles connaissances, plusieurs stratégies de ciblage des facteurs de transcription sont à l'étude.

Ces différentes stratégies sont détaillées dans la revue :

> **Targeting Transcription Factors for Cancer Treatment**. Mélanie Lambert, Samy Jambon, Sabine Depauw, Marie-Hélène David-Cordonnier. *Molecules* 2018, 23(6). *La revue est placée en* ***Annexe 1****.*

3.1.1. Régulation de leur expression

Comme pour les facteurs HOX, la régulation des facteurs de transcription se fait souvent par des phénomènes épigénétiques. Il est donc aisé de cibler les différents acteurs régulateurs de ces phénomènes. C'est par exemple le cas du ciblage des facteurs de transcription de la famille MYC. c-MYC est un membre de cette famille très souvent retrouvé surexprimé dans le cancer (Dang, 2012). Ainsi l'expression de c-Myc peut être contrôlée par l'inhibition de BRD4, une protéine à bromodomaine de la famille BET, notamment avec le composé JQ1 (Zuber *et al.*, 2011).

3.1.2. Régulation de leur dégradation

La dégradation des facteurs de transcription peut être modulée par l'utilisation de molécules pouvant interférer dans les processus de dégradation protéasomale. C'est par exemple le cas avec des molécules comme le mébendazole, capable d'entraîner la dégradation du facteur de transcription Myb (Walf-Vorderwülbecke *et al.*, 2018) ou le composé naturel honokiol pouvant entraîner la dégradation de la protéine de fusion AML1-ETO présente dans certains cas de LAM (Zhou *et al.*, 2017).

3.1.3. Ciblage des interactions protéine-protéine

L'identification de co-facteurs de facteurs de transcription oncogènes a permis le développement de stratégies de ciblage des interactions protéine-protéine. De très

nombreux inhibiteurs sont à l'étude. Le premier exemple développé est la nutlin-3, composé entré en essai clinique, qui cible l'interaction entre la protéine p53 et son régulateur négatif MDM2 (*murine double minute 2*) souvent retrouvé surexprimé dans le cancer (Duffy *et al.*, 2014).

3.1.4. Ciblage d'un domaine de liaison

Certains facteurs de transcription appartiennent à la famille des récepteurs nucléaires et jouent leur rôle de régulation de l'expression des gènes en réponse à la fixation d'un ligand. Le domaine de liaison du ligand peut ainsi être ciblé. C'est le cas par exemple avec l'utilisation de l'acide tout-trans rétinoïque (ATRA) pour le ciblage du facteur de transcription de fusion PML-RARα, présent dans un sous-type de LAM, les leucémies aigues promyélocytaires. La liaison de l'ATRA sur le noyau RARα de PML-RARα permet le recrutement de co-activateurs et la dégradation de PML-RARα afin de restaurer la différenciation des cellules leucémiques (de Thé and Chen, 2010).

3.1.5. Ciblage de la liaison à l'ADN du facteur de transcription

Cette stratégie repose sur le ciblage de la séquence d'ADN reconnue par le facteur de transcription afin d'empêcher sa liaison pour inhiber son activité transcriptionnelle. Les molécules utilisées peuvent alors être des molécules alkylantes, des molécules intercalantes, des molécules se fixant dans le grand sillon ou enfin des molécules se fixant dans le petit sillon. C'est ce dernier mode de fixation qui nous intéresse ici.

Les premières molécules développées se fixant dans le petit sillon pour inhiber la fixation de facteurs de transcription sont la nétropsine et la distamycine A. Ces deux molécules reconnaissent des séquences spécifiques riches en bases A et T (Zimmer *et al.*, 1971). Par la suite, d'autres molécules ont été développées afin d'améliorer la sélectivité de liaison sur des séquences reconnues spécifiquement par des facteurs de transcription. C'est le cas des polyamides qui représentent une famille de molécules hétérogène capables de reconnaître des séquences spécifiques et d'inhiber une grande variété de facteurs de transcription. Cette spécificité est obtenue par l'ajout successif de groupements bien définis. Ainsi, avec ces molécules, il est possible d'inhiber la liaison à l'ADN du récepteur aux œstrogènes (Gearhart *et al.*, 2005) ou encore d'HIF-1α (Kageyama *et al.*, 2006).

Une autre famille, plus proche structurellement de la nétropsine et de la distamycine A a également été développée. Ces molécules appelées composés DB (pour les initiales du Pr **D**avid **B**oykin de l'Université d'Atlanta qui les a développées), de

structures proches de celle de la pentamidine, se lient au petit sillon de l'ADN et la diversité de molécules de cette famille permet la reconnaissance de séquences spécifiques ainsi que l'inhibition de différents facteurs de transcription.

3.2. Les composés DB : de la parasitologie à la cancérologie

Les composés DB ont été développés par l'équipe du Pr David Boykin de l'Université d'Atlanta (Géorgie, USA) avec un objectif d'utilisation dans la prise en charge des infections à *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania amazonensis* ou *Pneumocystis carinii*.

Les composés DB sont des diamidines hétérocycliques, dérivés de la pentamidine et du bérénil (Figure 26). Il existe à ce jour près de 3000 composés.

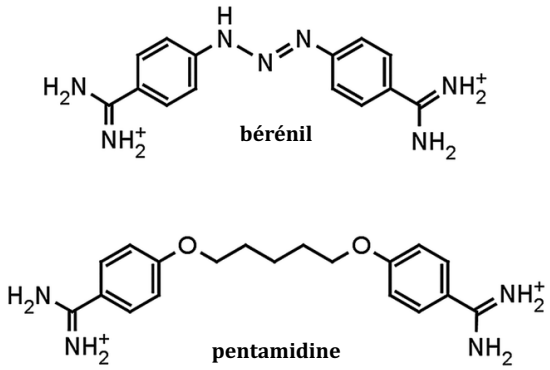


Figure 26 : **Structures chimiques du bérénil et de la pentamidine.**

La pentamidine PENTACARINAT® est un agent utilisé depuis des années dans le traitement de la maladie du sommeil (causée par *T. brucei*), de la maladie de Chagas (causée par *T. cruzi*), de la leishmaniose et de certaines infections à *P. carinii* (Bakshi and Shapiro, 2003; Bouteille *et al.*, 2003). Bien que son efficacité ne soit plus à prouver dans ces pathologies, la pentamidine nécessite souvent plusieurs injections et présente un certain nombre de toxicités pouvant être graves (Wilson *et al.*, 2008). De plus, elle présente une biodisponibilité insuffisante pour une utilisation par voie orale, voie la plus simple d'utilisation en particulier dans les pays d'Afrique les plus touchés. Pour ces raisons, de nouvelles molécules moins toxiques et utilisables par voie orale, telles que certains composés DB, sont développées.

La pentamidine est une molécule flexible capable d'acquérir une conformation convexe qui lui permet de se lier dans le petit sillon au niveau de sites riches en bases AT (Figure 27) (Reddy *et al.*, 1999; Wilson *et al.*, 2008).

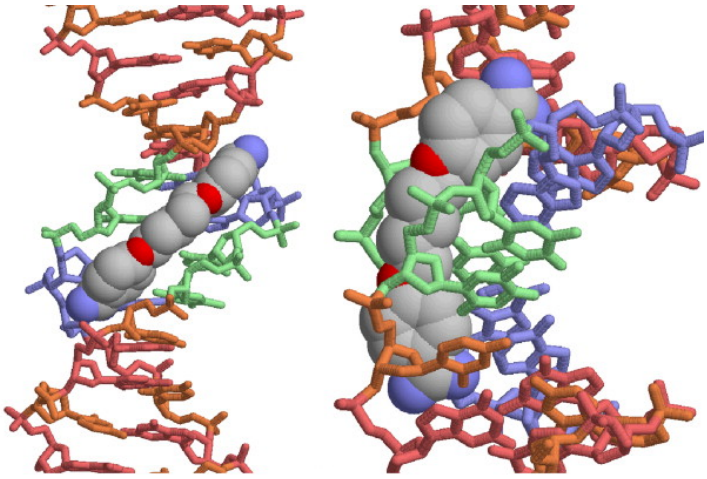


Figure 27 : **Cristallographie de la pentamidine liée au petit sillon de l'ADN.** La pentamidine se lie au site -AATT- (en vert/bleu). Tiré de Wilson *et al.*, 2008.

3.2.1. Les composés DB en parasitologie

De très nombreux composés ont été synthétisés en conservant les deux extrémités amidines responsables de la liaison à l'ADN. C'est la partie centrale des molécules qui peut ainsi être modulée pour reconnaître des séquences d'ADN différentes.

Le DB75 ou furamidine (Figure 28) est le chef de file des molécules utilisées dans cette application. Sa localisation cellulaire et celle d'un analogue, le DB820 a pu être étudiée en raison de leur fluorescence intrinsèque avec une absorption dans l'UV et une émission maximale dans le bleu à 460nm (Figure 28). Ainsi, tous deux entrent assez rapidement dans le parasite par l'intermédiaire de plusieurs transporteurs tels que le transporteur à adénosine/aminopurine P2 (Carter *et al.*, 1995) ou les transporteurs HAPT1 (high affinity pentamidine transporter 1) ou LAPT1 (low affinity pentamidine transporter 1) (De Koning, 2001).

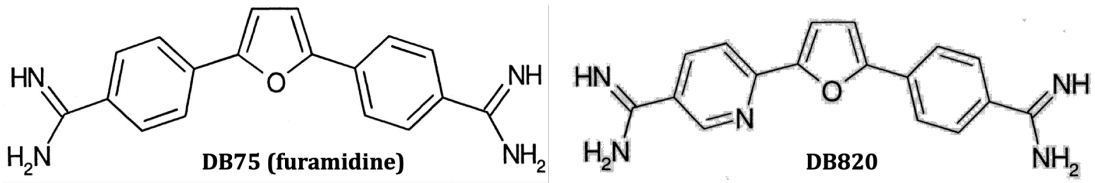


Figure 28 : **Structures chimiques des DB75 et DB820.**

Très rapidement, le DB75 comme le DB820 pénètrent dans les parasites et se localisent d'abord dans le noyau et le kinétoplaste du parasite, puis dans des organites du parasites ne contenant pas d'ADN (Mathis *et al.*, 2006) (Figure 29). Les parasites meurent généralement après 24 à 48h de traitement.

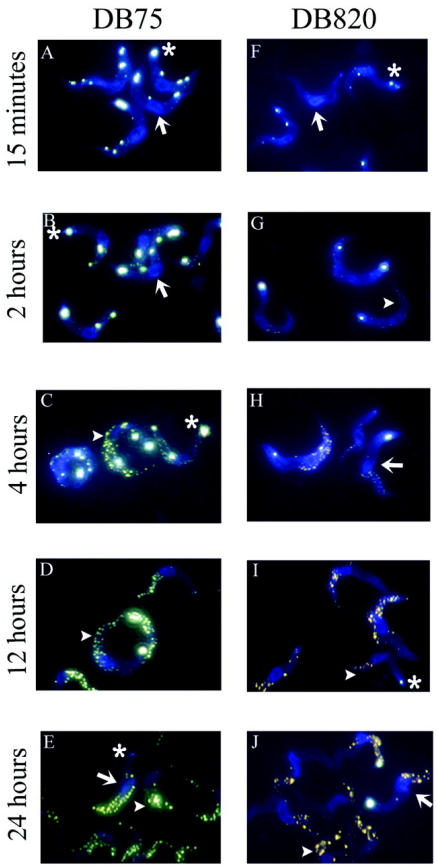


Figure 29 : **Localisation intracellulaire du DB75 et du DB820 après administration intraveineuse à des souris infectées par *T. brucei***. Le noyau est indiqué par une flèche, le kinétoplaste par un astérisque. Tiré de Mathis *et al.*, 2006.

Le kinétoplaste est un réseau d'ADN parasitaire constitué d'un grand nombre de copies d'ADN circulaire, utilisé par le parasite notamment pour produire de l'énergie. Les mini-cercles, un des types d'ADN circulaire du kinétoplaste, possèdent une structure courbée en double hélice, liée à la présence de séquences AT répétées (Marini *et al.*, 1982) qui semble être la cible des molécules. La fixation sur l'ADN du kinétoplaste entraîne sa dégradation par interférence directe avec l'activité de la topoisomérase II ou par modification de la conformation de l'ADN entraînant des erreurs de réplication ou inhibition d'interactions ADN-protéine (Bailly *et al.*, 1999).

Les diamidines, de par leurs fonctions NH_2 ionisables situées aux extrémités de la molécule sont mal absorbées par voie intestinale et ne sont pas utilisables par voie orale. Pour cela, des pro-drogues des molécules testées en parasitologie ont été développées par les chimistes. C'est par exemple le cas du DB289 (ou pafuramidine), prodrogue du DB75 où les deux fonctions amidine sont remplacées par des groupements amidoxime. Cette molécule, métabolisée par les enzymes des cytochromes P450 est bien absorbée et différentes études ont montré sa métabolisation à l'aide de systèmes humains, chez le rat et le singe et son efficacité après administration par voie orale (Wang *et al.*, 2006a;

Midgley *et al.*, 2007; Thuita *et al.*, 2008; Mdachi *et al.*, 2009). Le DB289 est entré en essai clinique jusqu'en phase III mais son évaluation a été arrêtée en raison des toxicités post-traitement notamment rénales potentiellement liées à des polymorphismes métaboliques (Burri *et al.*, 2016; Pohlig *et al.*, 2016).

D'autres molécules telles que le DB829 et sa prodrogue orale le DB868 sont actuellement à l'étude et semblent également efficaces, notamment sur la phase neurologique de la trypanosomiase africaine ou maladie du sommeil (Thuita *et al.*, 2015).

3.2.2. Les composés DB en cancérologie

Une des hypothèses de l'activité des composés DB en parasitologie est l'inhibition de l'interaction entre des protéines et l'ADN. Cette stratégie pourrait ainsi représenter en cancérologie une façon de cibler des facteurs de transcription oncogènes. En effet, de nombreux facteurs de transcription interagissent avec le petit sillon de l'ADN et l'utilisation de ces composés capables de reconnaître des séquences particulières pourrait déstabiliser la liaison du facteur de transcription et inhiber son activité transcriptionnelle.
Certains de ces composés DB ont donc été évalués sur des cellules tumorales humaines et il a été montré que les composés selon les modifications structurales étaient capables de pénétrer dans la cellule et de rejoindre le noyau, en se liant à l'ADN sur des séquences riches en AT (Lansiaux *et al.*, 2002).

Pour identifier d'autres molécules capables d'interagir avec des séquences spécifiques, de très nombreuses modifications ont été réalisées sur la structure des composés DB.
C'est par exemple le cas du DB293 (Figure 30) où la modification du groupement phényl par un groupement benzimidazole permet la reconnaissance supplémentaire de la séquence 5'-ATGA-3' (Bailly *et al.*, 2001). Ainsi, grâce à ces modifications, il a été montré que le DB293 était capable de se fixer dans le petit sillon à la séquence ATGA et d'inhiber la fixation des facteurs de transcription Pit-1 et Brn-3 et ceci de façon spécifique puisqu'il n'inhibe pas la fixation d'Irf-1 qui se fixe pourtant sur un site contenant la même séquence ATGA (Peixoto *et al.*, 2008).

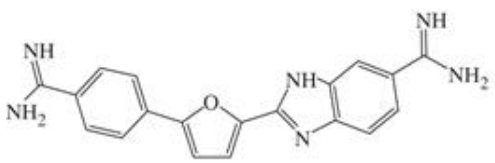


Figure 30 : **Structure chimique du DB293.**

D'autres facteurs de transcription oncogènes semblent pouvoir être également modulés par des composés DB. C'est le cas des facteurs de la famille ETS et plus précisément le facteur de transcription ERG dont l'interaction avec l'ADN peut être inhibée par le DB1255 par la sélectivité de fixation en partie sur le site consensus minimal de fixation des facteurs ETS 5-GGAA(A/T)-3' (Nhili *et al.*, 2013). Cette étude a prouvé le rôle d'inhibition de la transcription médiée par ERG par le DB1255.

Enfin, la preuve de concept de l'utilisation de ces molécules DB en pathologie humaine a également été montrée par l'inhibition du facteur de transcription PU.1 dans un modèle de leucémie aiguë myéloïde avec le DB2313. Dans ce modèle, l'utilisation du DB2313 permet d'augmenter la survie *in vivo* et impacte des modèles cellulaires de LAM et des cellules leucémiques de patients (Antony-Debré *et al.*, 2017).

3.3. Ciblage de l'interaction HOXA9/ADN par les composés DB

Comme nous l'avons vu, les facteurs de transcription de la famille HOXA9 interagissent avec l'ADN au niveau de séquences riches en bases AT. Deux molécules capables de reconnaître et se fixer à l'ADN au niveau de ces séquences ont été sélectionnées au laboratoire : le DB818 et le DB1055 (Figure 31).

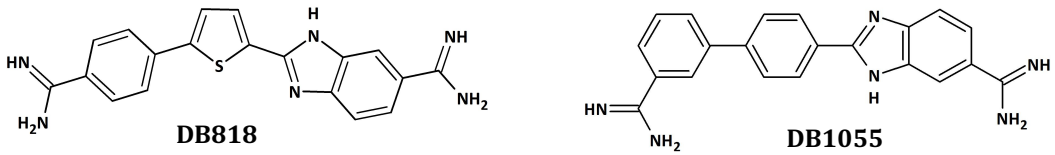


Figure 31 : **Structures chimiques des composés DB818 et DB1055.**

Les résultats de la sélection des composés DB818 et DB1055 comme inhibiteurs de la liaison d'HOXA9 à l'ADN sont actuellement soumis pour publication dans la revue *Journal of Medicinal Chemistry* et sont présentés en ***Annexe 2*** :

Heterocyclic Diamidine DNA ligands as HOXA9 Transcription Factor Inhibitors: Design, Molecular Evaluation and Cellular Consequences in HOXA9-Dependant Leukemia Cell Model. Sabine Depauw*, Mélanie Lambert*, Samy Jambon*, Paul Peixoto, Raja Nhili, Ananya Paul, Laura Marongiu, Martin Figeac, Christelle Dassi, Charles Paul-Constant, Benjamin Billoré, Arvind Kumar, Abdelbasset A. Farahat, Mohamed A. Ismail, Ekaterina Mineva, Daniel P. Sweat, Chad E. Stephens, David W. Boykin, W. David Wilson, Marie-Hélène David-Cordonnier. (* co-first authors)

Par test dérivé de l'ELISA, il a ainsi été montré que le DB818 et le DB1055 sont capables d'inhiber la liaison d'HOXA9 à l'ADN. Ceux-ci se fixent au niveau du petit sillon de l'ADN et plus précisément sur la séquence consensus HOX 5'-ATT(T)A-3'.
De plus, ces composés sont capables d'entrer dans la cellule et de se localiser au noyau. Par test luciférase, il a été montré que les DB818 et DB1055 inhibent la transcription médiée par HOXA9.

Enfin, sur un modèle leucémique murin dépendant d'HOXA9, les deux composés DB818 et DB1055 inhibent la prolifération et induisent la différenciation des cellules.

Ces résultats, prometteurs dans les leucémies aigues ont été validés par l'utilisation de modèles cellulaires humains de LAM et sur des échantillons de patients atteints de LAM. Le DB1055 a montré une efficacité anti leucémique *in vivo* marquée à la fois sur des lignées cellulaires et sur des blastes leucémiques de patients surexprimant *HOXA9*.
Ces travaux ont fait l'objet de la thèse du Dr Mélanie Lambert et seront publiés prochainement.

OBJECTIFS

HOXA9 est un facteur de transcription possédant un rôle oncogène démontré dans de nombreux cancers hématologiques et solides (Grier *et al.*, 2005). Des données de la littérature montrent que l'inhibition de sa fixation à l'ADN par l'homéodomaine dans un modèle leucémique est indispensable à la survie des cellules (Vijapurkar *et al.*, 2004). Il semble donc que son ciblage par des molécules capables de déplacer sa liaison puisse être efficace pour inhiber son activité.

Au laboratoire, deux composés appelés DB818 et DB1055 ont été sélectionnés sur leur capacité d'inhibition de la formation du complexe HOXA9-ADN et sur leur capacité d'inhibition de l'activité transcriptionnelle d'HOXA9 (***Annexe 2***). Dans un modèle de leucémie aiguë myéloïde, ces composés sont capables de lever le blocage de la différenciation des cellules leucémiques et présentent *in vivo* une activité anti-leucémique marquée.

Afin d'évaluer de potentielles niches thérapeutiques pour ces composés, mon projet de thèse s'est orienté sur l'identification du rôle du facteur de transcription HOXA9 dans un modèle de tumeur solide et des potentialités de son ciblage par les composés DB818 et DB1055. Nos premières études et les données de la littérature ont montré que l'expression d'*HOXA9* était maintenue dans des modèles de carcinome rénal (Shears *et al.*, 2008) sans pour autant qu'HOXA9 n'ait un rôle identifié dans ces modèles ou même dans le rein normal adulte qui exprime *HOXA9* (Figure 24). De plus, l'utilisation d'un peptide capable d'inhiber la liaison entre les facteurs HOX et leurs co-facteurs PBX entraîne la mort de lignées cellulaires de carcinome rénal (Shears *et al.*, 2008).

Pour ces raisons, nous émettons l'hypothèse que l'inhibition d'HOXA9 par les composés DB818 et DB1055 puisse être une stratégie thérapeutique pertinente. Il s'agissait ainsi d'identifier dans un premier temps le rôle d'HOXA9 non décrit dans la littérature. Ainsi, les objectifs de ce travail étaient :

1. Évaluer la signification de l'expression d'HOXA9 chez les patients atteints de carcinome rénal par l'analyse d'une base de données publique

2. Évaluer au niveau moléculaire et cellulaire les conséquences de l'invalidation d'HOXA9 par modèle d'ARN interférence à l'aide de lignées cellulaires de carcinome rénal et comparer les effets à ceux obtenus par le traitement avec les composés DB818 et DB1055

3. Évaluer les effets de l'invalidation d'HOXA9 sur la tumorigénicité *in vivo* à l'aide d'un modèle orthotopique de carcinome rénal et sur l'implantation et la formation de métastases pulmonaires

4. Évaluer les potentielles toxicités notamment rénales liées a*u* traitement par les composés DB818 et DB1055

RESULTATS

Ce travail se divise en différentes parties. Dans un premier temps, nous avons analysé la base de données TCGA (*The Cancer Genome Atlas*) afin d'évaluer la signification de l'expression d'*HOXA9* chez les patients.
Puis à l'aide de modèles cellulaires humains, nous avons évalué le rôle d'HOXA9 sur le plan moléculaire, cellulaire et *in vivo*.

1. Analyse des données de la base *The Cancer Genome Atlas*

La base de données TCGA (*The Cancer Genome Atlas*) est composée de divers jeux de données regroupées par type de cancer. Cette base américaine gérée par le *National Cancer Institute* (NCI) au sein des *National Institutes of Health* (NIH) comporte dans le cas du carcinome rénal trois jeux de données pour les trois principaux types histologiques : le carcinome rénal papillaire avec le jeu *KIRP*, le carcinome rénal à cellules claires avec le jeu *KIRC* et le carcinome rénal chromophobe avec le jeu de données *KICH*.
Pour notre étude, nous nous sommes focalisés sur les deux types les plus courants : carcinome rénal papillaire et carcinome rénal à cellules claires.

Dans un premier temps et comparativement aux autres cancers, nous avons évalué la corrélation entre la survie globale chez les patients selon l'expression d'*HOXA9*. Pour cela, nous avons utilisés les données de l'outil OncoLnc (http://www.oncolnc.org) qui reprend les différentes données des bases du TCGA et les lie à la survie. Sur ces données, nous avons analysé la position des bases KIRC et KIRP en termes de corrélation de l'expression d'*HOXA9* avec la survie.

De manière intéressante, le carcinome rénal à cellules claires (KIRC) est retrouvé à la quatrième place des cancers pour lesquels la corrélation entre l'expression d'*HOXA9* et une moindre survie est la plus importante (Tableau 6). Cette corrélation est de plus retrouvée significative.
En revanche, il n'existe pas de corrélation significative pour le carcinome rénal papillaire (KIRP).

Base TCGA	Cancer	Coefficient de corrélation Cox	p-value
CESC	Adénocarcinome endocervical et carcinome cervical squameux	0.212	0.11
LAML	Leucémie aigüe myéloide	0.199	0.073
UCEC	Carcinome de l'endomètre	0.18	0.067
KIRC	**Carcinome rénal à cellules claires**	**0.177**	**0.024**
LUAD	Adénocarcinome pulmonaire	0.176	0.02
READ	Adénocarcinome rectal	0.114	0.58
KIRP	**Carcinome rénal papillaire**	**-0.11**	**0.47**
LIHC	Carcinome hépatocellulaire	0.109	0.26
OV	Cystadénocarcinome séreux de l'ovaire	0.097	0.21
PAAD	Adénocarcinome pancréatique	0.093	0.37
STAD	Adénocarcinome gastrique	-0.089	0.29
GBM	Glioblastome multiforme	0.078	0.43
COAD	Adénocarcinome du colon	-0.07	0.48
SARC	Sarcome	0.057	0.6
SKCM	Mélanome cutané	0.057	0.45
BLCA	Carcinome urothélial de la vessie	-0.036	0.63
ESCA	Carcinome de l'œsophage	-0.033	0.82
HNSC	Carcinome à cellules squameuses de la tête et du cou	0.025	0.71
BRCA	Carcinome mammaire invasif	0.018	0.84

Tableau 6 : **Corrélation entre l'expression d'*HOXA9* et la survie globale dans 18 bases de données TCGA représentant 18 cancers**. Données obtenues sur le site OncoLnc. Le coefficient de corrélation est obtenu par modèle de régression mutivarié Cox avec la p-value associée à chaque test. L'analyse réalisée est détaillée dans Anaya, 2016.

Nous avons ensuite extrait différents types de données collectées dans ces bases : des données d'expression (par RNA-sequencing), des données de variations du nombre de copies (par puces à CNVs – *copy number variation*), des informations sur le statut mutationnel des patients (par séquençage haut débit) et enfin des informations cliniques. L'intégralité des données brutes est disponible sur le portail GDC (*Genomic Data Common* - https://portal.gdc.cancer.gov). Nous avons également utilisé des données normalisées et analysées par des équipes du Broad Institute à Cambridge (Massachussetts, USA) (http://firebrowse.org).

Pour chaque type, nous nous sommes ainsi intéressés à l'expression d'*HOXA9* dans le tissu tumoral, en comparaison à des échantillons de tissu sain adjacent. Nous avons également analysé l'expression en fonction des anomalies génétiques les plus fréquemment retrouvées chez les patients. Dans un second temps, nous avons analysé grâce aux données de CNV les amplifications ou délétions concernant *HOXA9*.

La survie globale selon l'expression d'*HOXA9* et selon les altérations génétiques a également été analysée. Enfin et à l'aide des données clinico-pathologiques, nous avons déterminé s'il existait des corrélations entre ces données et l'expression d'*HOXA9*.

1.1. HOXA9 dans le carcinome papillaire (pRCC)

1.1.1. Expression d'*HOXA9*

Afin de normaliser les données entre les échantillons de tissu sain et les échantillons tumoraux, nous avons exprimé les données extraites en Z-scores (voir Matériel et Méthodes) et comparé l'expression d'*HOXA9* entre tissu sain et tissu tumoral.

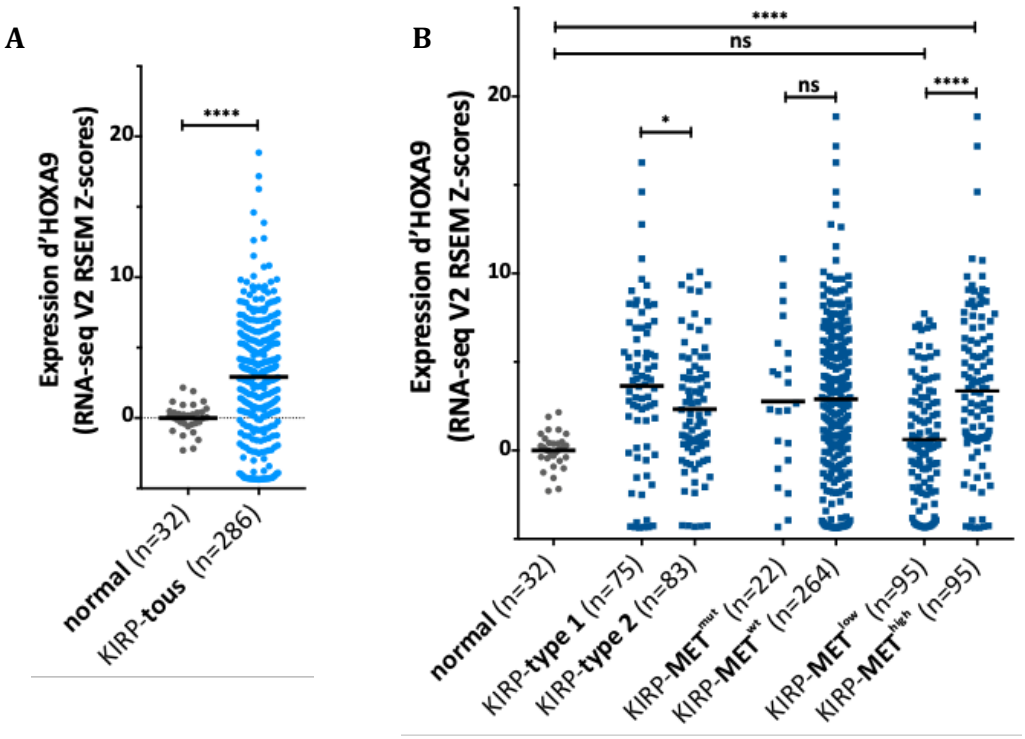


Figure 32 : **Expression d'*HOXA9* dans le carcinome rénal papillaire**. **A**. Expression dans le tissu normal et le tissu tumoral. **B**. Expression d'*HOXA9* selon le type histologique et les altérations génétiques. Les données d'expression sont exprimées en Z-score normalisés avec les valeurs d'expression des échantillons normaux. Test de Mann-Whitney, * $p<0.05$, **** $p<0.0001$.

Le rein fait partie des organes exprimant le plus HOXA9 (Figure 24). En considérant tous les patients atteints de pRCC, il apparaît qu'*HOXA9* est surexprimé comparativement au tissu sain (Figure 32A). Pour déterminer si cette augmentation d'expression est liée à un type ou une altération génétique particulière, nous avons comparé l'expression selon le type de pRCC (type 1 ou type 2), selon la présence de mutations du gène *MET* et selon son expression, ce dernier pouvant être amplifié ou muté de façon significative dans le pRCC (*Introduction – 1.5.4*).

Ainsi, il existe un différentiel d'expression entre les deux types avec une expression significativement plus élevée dans le type 1, caractérisé par les altérations de *MET* (Figure 32B). Nous avons alors évalué l'impact des mutations de *MET* et montré que ces mutations

ne modifiaient pas l'expression d'*HOXA9* (Figure 32B). Pour terminer, nous avons alors évalué l'expression d'*HOXA9* selon deux groupes d'expression de *MET* (*MET*^{low} et *MET*^{high} correspondant aux tiers de patients exprimant le moins et le plus *MET*). De manière intéressante et en accord avec la différence observée entre le type 1 et le type 2, *HOXA9* est significativement plus exprimé chez les patients présentant des hauts niveaux d'expression de *MET* (Figure 32B). Quant aux patients présentant des niveaux de *MET* bas, l'expression n'est pas significativement différente des échantillons normaux.

1.1.2. Altérations du nombre de copies d'*HOXA9*

Le gène *HOXA9* est situé sur le bras court du chromosome 7 et il apparait fortement surexprimé chez les patients présentant des hauts niveaux de *MET*. Le pRCC est caractérisé dans un très grand nombre de cas par la présence d'altérations du gène *MET* et notamment par des amplifications (Schmidt *et al.*, 1997; The Cancer Genome Atlas Research Network *et al.*, 2016). Comme *HOXA9*, le gène *MET* est situé sur le chromosome 7 mais sur le bras long. Pour déterminer si les différences d'expression sont liées à l'amplification du locus d'*HOXA9*, nous avons analysé les données de CNV pour la région d'*HOXA9*.

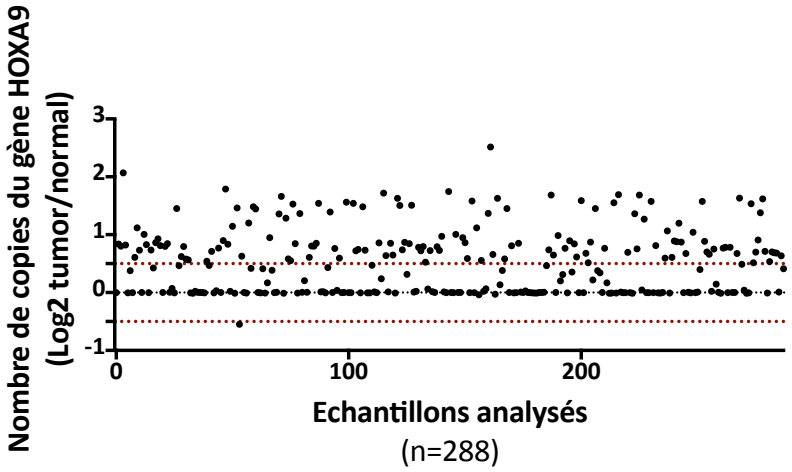


Figure 33 : **Altération du nombre de copies d'*HOXA9* dans le pRCC.** Le nombre de copies est présenté en log2 normalisé par les échantillons normaux. Les données proviennent d'analyses réalisées par des équipes du Broad Institute grâce au module Gistic 2.0 (Mermel *et al.*, 2011). Les valeurs de nombres de copies normales se trouvent entre les deux lignes pointillées rouge.

HOXA9 est amplifié (Log2 tumor/normal ≥0.5) dans exactement 50% des cas (144 cas sur 288 analysés) (Figure 33). Pour déterminer si l'augmentation d'expression observée est liée à l'augmentation du nombre de copies, nous avons recherché s'il existait une corrélation entre l'expression et le nombre de copies.

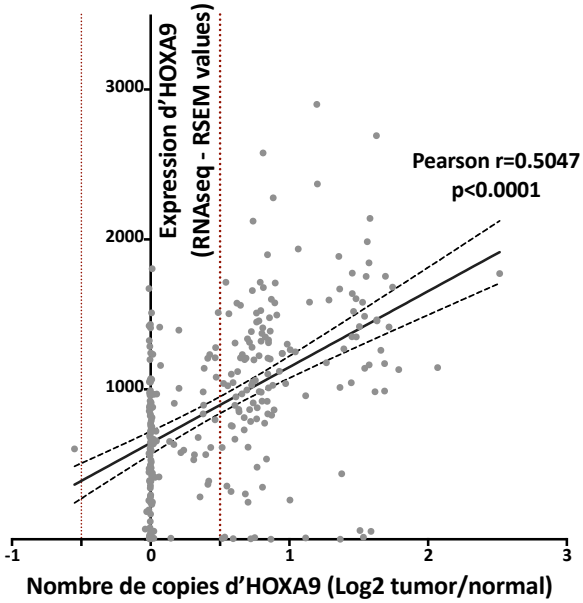


Figure 34 : **Corrélation entre l'expression d'*HOXA9* et le nombre de copies**. Les données d'expression sont obtenues par normalisation RSEM et disponibles sur le site Firebrowse. La droite représente la droite de régression linéaire avec intervalle de confiance à 95% (traits pointillés). Le coefficient de corrélation est calculé par test de Pearson.

La Figure 34 montre qu'il existe une corrélation entre le nombre de copies et l'expression d'*HOXA9* avec un coefficient de corrélation de 0.5047. De manière logique, les patients présentant des amplifications (Log2 tumor/normal ≥0.5) présentent les expressions d'*HOXA9* les plus importantes.

Enfin, et pour déterminer si l'amplification d'*HOXA9* est lié à l'amplification de *MET*, nous avons comparé leurs valeurs respectives de nombres de copies et déterminé s'il existait une corrélation.

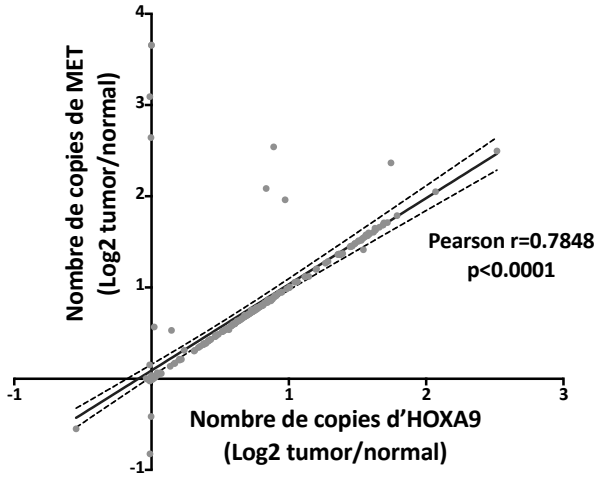


Figure 35 : **Corrélation entre le nombre de copies d'*HOXA9* et de *MET*.** La droite représente la droite de régression linéaire avec intervalle de confiance à 95% (traits pointillés). Le coefficient de corrélation est calculé par test de Pearson.

La Figure 35 montre qu'il existe une corrélation forte (r=0.7848) entre le nombre de copies d'*HOXA9* et le nombre de copies de *MET*, montrant que l'amplification de *MET*, très fréquemment décrite dans le pRCC et notamment dans le type 1 est associée à l'amplification du bras court du chromosome 7 et donc à la surexpression d'HOXA9.

1.1.3. Survie globale

La survie globale a été analysée selon l'expression d'*HOXA9* après la formation de deux groupes *HOXA9*^{low} et *HOXA9*^{high} correspondant au tiers de patients exprimant le moins et le plus, respectivement. Nous avons analysé la survie globale chez tous les patients, puis selon les types et les altérations géniques de *MET*.

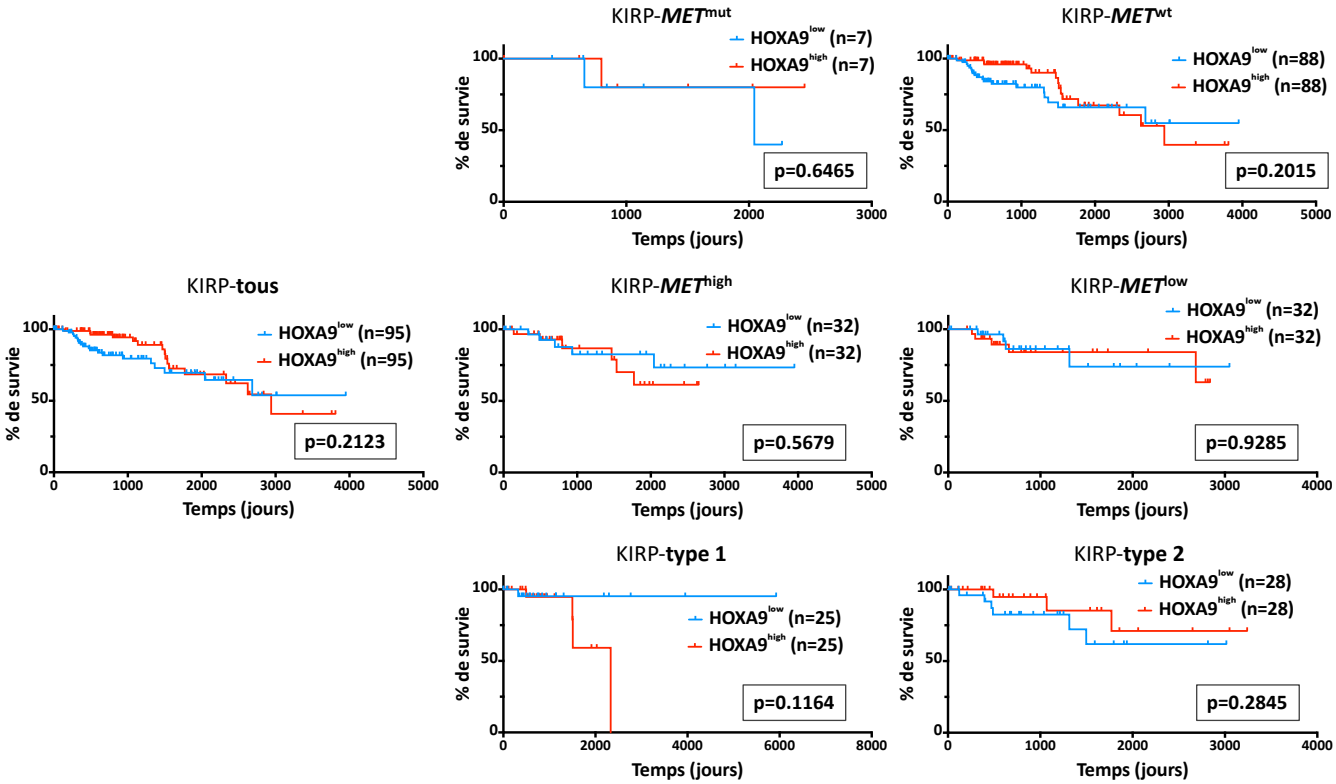


Figure 36 : **Analyse de la survie globale selon l'expression d'*HOXA9* et le type ou les altérations géniques fréquemment retrouvées dans le pRCC**. Pour toutes les analyses, les groupes HOXA9^{low} et HOXA9^{high} sont déterminés afin de représenter le tiers de patients exprimant le moins et le plus *HOXA9*. Courbes de survie de Kaplan-Meier – Test du log-rank (Mantel-Cox). Les *p-value* sont considérées comme significatives si <0,05.

La survie n'est pas liée à l'expression d'*HOXA9* dans le carcinome rénal papillaire (Figure 36, *p-value*=0.2123). En s'intéressant plus précisément aux altérations de *MET*, aucune analyse n'a démontré de lien entre l'expression d'*HOXA9* et la survie chez les patients (Figure 36). Dans le type 1, la forte expression d'*HOXA9* modifie la survie avec tous les patients avec une médiane de survie de 2331 jours, tandis que quasiment tous les

patients exprimant le plus faiblement sont encore vivants. Malgré cela, les survies dans les deux groupes ne sont pas significativement différentes (Figure 36, *p-value*=0.1164).

1.1.4. Expression d'*HOXA9* et données clinico-pathologiques

Nous avons comparé les données clinico-pathologiques dans les deux groupes d'expression d'*HOXA9* (*HOXA9*^{low} et *HOXA9*^{high}). Pour cela, nous avons réalisé une analyse univariée en comparant les distributions dans chaque groupe.

	***HOXA9*^{low}**		***HOXA9*^{high}**		**p-value**
Total	95		95		
Age					
≤60 ans	39	41.1%	33	34.7%	0.4547
>60 ans	56	58.9%	62	65.3%	
Sexe					
Masculin	67	70.5%	75	78.9%	0.2424
Féminin	28	29.5%	20	21.1%	
Statut T					
T1, T2	69	72.6%	85	89.5%	**0.005**
T3, T4	26	27.4%	10	10.5%	
Statut N					
N0	24	25.3%	16	16.8%	0.2126
N1, Nx	71	74.7%	79	83.2%	
Statut M					
M0	31	32.6%	30	31.6%	>0.999
M1, Mx	64	67.4%	65	68.4%	
Stade					
I, II	66	69.5%	83	87.4%	**0.0044**
III, IV	29	30.5%	12	12.6%	

Total	52		47		
Type histologique					
Type 1	19	36.5%	29	61.7%	**0.016**
Type 2	33	63.5%	18	38.3%	

Tableau 7 : **Association des caractéristiques clinico-pathologiques avec l'expression d'*HOXA9* dans la base de données KIRP**. Les *p-values* calculées sont obtenues par analyse univariée par test exact de Fisher.

Nous avons retrouvé une association entre le statut T, le stade et l'expression d'*HOXA9*. Ces résultats sont en lien avec le fait qu'*HOXA9* est surexprimé plus fréquemment dans le type 1, en association avec des altérations de *MET* et que le type 1 est moins agressif que le type 2 (Moch *et al.*, 2000; Leroy *et al.*, 2002b; Pignot *et al.*, 2007).

Nous avons également confirmé les résultats précédents en démontrant une association entre l'expression d'*HOXA9* et le type (Tableau 7, *p-value*=0.016).

1.2. HOXA9 dans le carcinome rénal à cellules claires (ccRCC)

Nous avons réalisé les mêmes analyses sur les échantillons des patients atteints de carcinome rénal à cellules claires (base KIRC).

1.2.1. Expression d'*HOXA9*

Comme précédemment, pour normaliser les données entre les échantillons de tissu sain et les échantillons tumoraux, nous avons exprimé les données extraites en Z-scores et comparé l'expression d'*HOXA9* entre tissu sain et tissu tumoral.

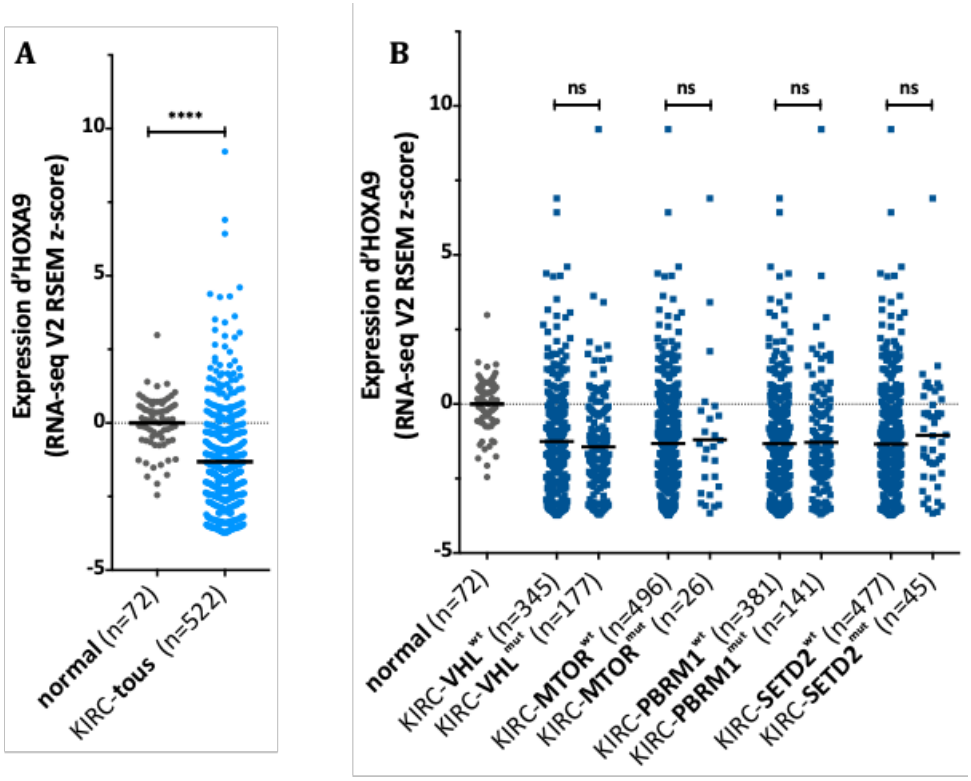


Figure 37 : **Expression d'*HOXA9* dans le carcinome rénal à cellules claires**. **A**. Expression dans le tissu normal et le tissu tumoral. **B**. Expression d'*HOXA9* selon les altérations génétiques majeures du ccRCC. Les données d'expression sont exprimées en Z-score normalisé avec les valeurs d'expression des échantillons normaux. Test de Mann-Whitney, **** p<0.0001.

Dans le carcinome rénal à cellules claires, *HOXA9* est globalement sous-exprimé en comparaison au tissu adjacent sain (Figure 37A). Par ailleurs, il est à noter qu'il existe une hétérogénéité importante d'expression et qu'environ 20% des patients présentent des Z-scores supérieurs à la moyenne des Z-scores des échantillons normaux. L'analyse des différentes mutations retrouvées le plus fréquemment dans le ccRCC : *VHL*, *MTOR*, *PBRM1*

et *SETD2* ne nous a pas permis de montrer de différences d'expression d'*HOXA9* entre les échantillons mutés et ceux non mutés (Figure 37B).

1.2.1. Altérations du nombre de copies d'*HOXA9*

Comme précédemment, pour préciser si cette régulation est liée à une diminution du nombre de copies, nous avons analysé les variations du nombre de copies de la région d'*HOXA9*.

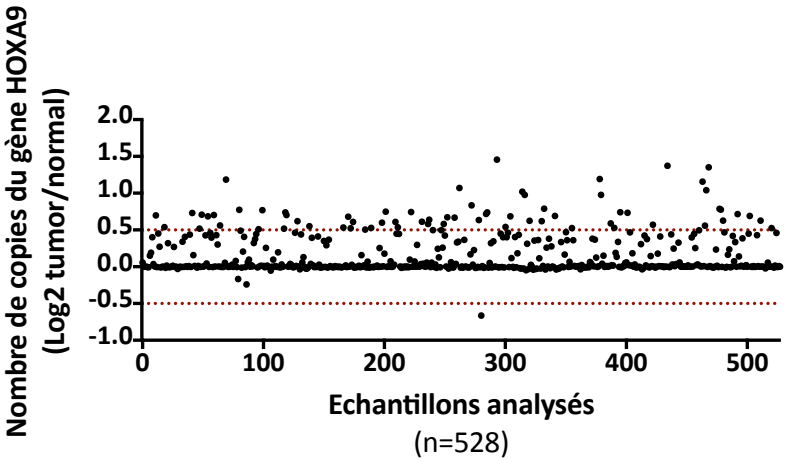


Figure 38 : **Altération du nombre de copies d'*HOXA9* dans le ccRCC**. Le nombre de copies est présenté en log2 normalisé par les échantillons normaux. Les données proviennent d'analyses réalisées par des équipes du Broad Institute grâce au module Gistic 2.0 (Mermel *et al.*, 2011). Les valeurs de nombres de copies normales se trouvent entre les deux lignes pointillées rouge.

HOXA9 est amplifié (Log2 tumor/normal ≥0.5) dans seulement 13% des cas (68 cas sur 510 analysés) (Figure 38). Il n'existe en revanche pas de perte de copies. La diminution de l'expression observée est donc due à d'autres phénomènes de régulation.

1.2.2. Survie globale

Comme pour le pRCC, la survie globale a été analysée selon l'expression d'*HOXA9* après la formation de deux groupes *HOXA9*^{low} et *HOXA9*^{high} (tiers de patients exprimant le moins et le plus *HOXA9*). Nous avons analysé la survie globale chez tous les patients, puis selon la présence ou non de mutations des gènes les plus fréquemment retrouvés mutés *VHL, MTOR, PBRM1 et SETD2* (Creighton *et al.*, 2013).

Bien qu'*HOXA9* soit sous-exprimé dans les tumeurs comparativement au tissu sain, son expression est corrélée à une moindre survie chez les patients (Figure 39, *p-value*=0.0011). Nous nous sommes alors intéressés à la survie selon l'expression d'*HOXA9*

chez les patients présentant des mutations. De manière tout à fait intéressante, nous avons mis en évidence que l'expression d'*HOXA9* est un facteur péjoratif uniquement chez les patients mutés pour le gène *VHL* (Figure 39, haut, *p-value*=0.0022 pour *VHL*^{mut} contre *p-value*=0.0521 pour *VHL*^{wt}).

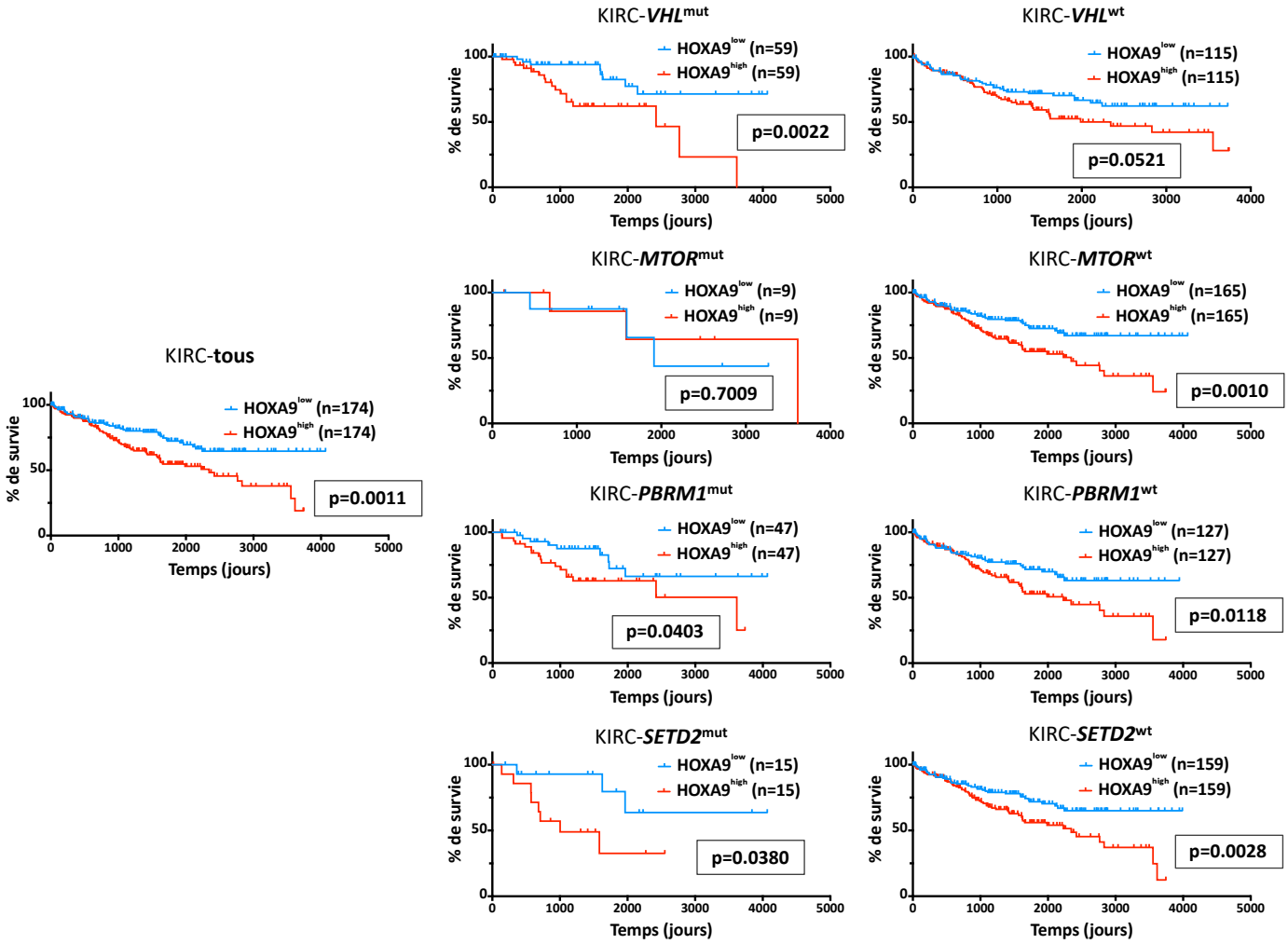


Figure 39 : **Analyse de la survie globale selon l'expression d'HOXA9 et les altérations géniques fréquemment retrouvées dans le ccRCC.** Pour toutes les analyses, les groupes HOXA9^{low} et HOXA9^{high} sont déterminés afin de représenter le tiers de patients exprimant le moins et le plus *HOXA9*. Courbes de survie de Kaplan-Meier – Test du log-rank (Mantel-Cox). Les *p-value* sont considérées comme significatives si <0,05.

Pour *MTOR*, compte-tenu du faible nombre de patients mutés, la différence entre les groupes *HOXA9*^{high} et *HOXA9*^{low} n'est pas significative comparativement aux patients sans mutation (Figure 39, *p-value*=0.7009 pour *MTOR*^{mut} et *p-value*=0.0010 pour *MTOR*^{wt}). Pour les autres gènes, dans les cas mutés comme non mutés, la différence de survie entre les groupes *HOXA9*^{high} et *HOXA9*^{low} reste significative (Figure 39). Une étude élargie à un plus grand nombre d'individus, notamment présentant les mutations, permettrait de conforter ces résultats.

1.2.1. Expression d'*HOXA9* et données clinico-pathologiques

Nous avons comparé les données clinico-pathologiques dans les deux groupes d'expression d'*HOXA9* (*HOXA9*^{low} et *HOXA9*^{high}). Pour cela, nous avons réalisé une analyse univariée en comparant les distributions dans chaque groupe.

	***HOXA9*^{low}**		***HOXA9*^{high}**		**p-value**
Total	174		174		
Age					
≤60 ans	84	48.3%	80	46.0%	0.7474
>60 ans	90	51.7%	94	54.0%	
Sexe					
Masculin	115	66.1%	107	61.5%	0.435
Féminin	59	33.9%	67	38.5%	
Statut T					
T1, T2	109	62.6%	109	62.6%	>0.999
T3, T4	65	37.4%	65	37.4%	
Statut N					
N0	77	44.3%	80	46.0%	0.8295
N1, Nx	97	55.7%	94	54.0%	
Statut M					
M0	143	82.2%	132	75.9%	0.1877
M1, Mx	31	17.8%	42	24.1%	
Stade					
I, II	106	60.9%	99	56.9%	0.5134
III, IV	68	39.1%	75	43.1%	
Grade histologique					
g1, g2	80	46.0%	80	46.0%	>0.999
g3, g4	94	54.0%	94	54.0%	

Tableau 8 : **Association des caractéristiques clinico-pathologiques avec l'expression d'*HOXA9* dans la base de données KIRC**. Les *p-values* calculées sont obtenues par analyse univariée par test exact de Fisher.

L'analyse de ces caractéristiques clinico-pathologiques ne nous a pas permis de détecter d'association significative avec l'expression d'*HOXA9* (Tableau 8).

CONCLUSION PARTIE 1

La base de données publique *The Cancer Genome Atlas* est un outil précieux en cancérologie pour l'analyse de la signification de l'expression de gènes. Dans le carcinome rénal, la base correspondant au carcinome rénal à cellules claires comporte les données de plus de 500 patients et celle correspondant au carcinome rénal papillaire plus de 250 patients.

Le rein représente un des organes exprimant le plus HOXA9 (Figure 24). Dans le carcinome rénal, très peu d'études se sont intéressées à son expression et à son rôle. Nous avons donc utilisé dans un premier temps les données présentes dans la base de données TCGA pour étudier l'expression chez les patients, en comparaison avec les données correspondant aux tissus normaux. Dans un second temps, nous avons analysé s'il existait un lien entre l'expression et la survie d'une part, et entre l'expression et les caractéristiques clinico-pathologiques d'autre part.

Nous avons montré que le facteur de transcription HOXA9 était surexprimé dans le carcinome rénal papillaire comparativement aux échantillons normaux. L'étude des variations des nombres de copies a montré qu'il était amplifié en lien avec les amplifications du gène *MET*, situé sur le même chromosome. En ce sens, sa surexpression est particulièrement associée au type 1 de carcinome rénal papillaire. En revanche, dans le carcinome papillaire, l'expression d'HOXA9 n'est pas corrélée à la survie des patients.

Dans le carcinome rénal à cellules claires, nous avons pu observer que son expression était diminuée alors qu'aucune étude ne fait de lien fonctionnel. Bien qu'il soit moindre que dans le pRCC, son expression est un facteur important de mauvais pronostic corrélée à la survie. De manière intéressante, nous avons montré que cette corrélation était spécifique des patients mutés pour le gène *VHL*.

Enfin, nous n'avons montré d'association entre l'expression d'*HOXA9* et des caractéristiques clinico-pathologiques que dans le pRCC, notamment avec le statut T, le stade et le type.

2. Modèles cellulaires et validation des outils d'étude

2.1. Lignées cellulaires humaines utilisées

Afin d'évaluer les rôles fonctionnels d'HOXA9 et les effets des composés DB818 et DB1055 sur les plans moléculaire, cellulaire et *in vivo*, nous avons choisi d'utiliser deux modèles cellulaires représentant les deux principaux types histologiques : le carcinome à cellules claires (ccRCC) et le carcinome papillaire (pRCC).

Deux lignées cellulaires humaines ont donc été sélectionnées comme modèles d'études :

- La lignée **786-O** dérivée de la tumeur primaire d'un patient de 58 ans (Williams *et al.*, 1976, 1978). Cette lignée possède les caractéristiques du ccRCC et présente une mutation du gène *VHL* associée à l'activation des gènes de la voie HIF/VEGF.
- La lignée **CAKI-2** dérivée de la tumeur primaire d'un patient de 69 ans (Fogh *et al.*, 1977). Bien qu'elle ait été considérée pendant longtemps comme de type ccRCC, la lignée CAKI-2 forme des tumeurs papillaires kystiques chez la souris et présente de hauts niveaux d'expression de MET et a été reconsidérée sur ces bases comme d'origine papillaire (Looyenga *et al.*, 2011).

2.1.1. Expression d'HOXA9

Sur chacune de ces deux lignées cellulaires, nous avons évalué l'expression de l'ARNm d'*HOXA9* par PCR quantitative, en comparaison avec les lignées de leucémie aiguë myéloïde (LAM) U937 et THP-1 étudiées au laboratoire et connues pour surexprimer fortement HOXA9. Nous avons également comparé cette expression avec la lignée HEK-293T qui est une lignée cellulaire humaine de rein embryonnaire.

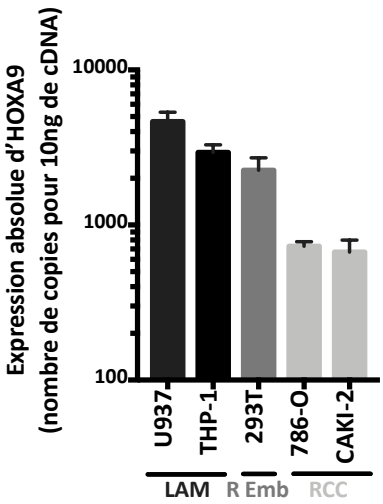


Figure 40 : **Expression absolue d'HOXA9 dans différentes lignées de LAM, de rein embryonnaire et de RCC.** L'expression a été déterminée par qPCR et est exprimée en nombre de copies d'ARNm pour 10ng d'ADN complémentaire. LAM : leucémie aigüe myéloïde, R Emb : rein embryonnaire, RCC : carcinome à cellules rénales. n=3 à 4, moyenne +/- sem.

S'il est exprimé de façon moins importante que dans les lignées de LAM U937 et THP-1 connues pour leur forte surexpression (Figure 40), HOXA9 est bien exprimé dans les lignées 786-O et CAKI-2. Les deux lignées présentent en moyenne autour de 700 copies pour 10ng d'ADN complémentaire, soit 3 à 4 fois moins de copies que les lignées U937 et THP-1. La lignée HEK-293T présente une expression d'*HOXA9* importante du niveau de la lignée THP-1, justifiable par son origine embryonnaire, période durant laquelle les gènes *HOX* sont très exprimés.

2.2. Invalidation d'HOXA9 par shRNA

Afin d'étudier le rôle fonctionnel d'HOXA9 dans le carcinome rénal, nous avons utilisé un modèle d'ARN interférence spécifique de l'ARNm d'*HOXA9*.

Trois shRNAs ont ainsi été utilisés : deux dirigés contre l'ARNm d'*HOXA9* (shHOXA9-1F2 et shHOXA9-1F3) et un shRNA ne ciblant aucune séquence connue (shCTR). Le système lentiviral permettant la transduction de ces shRNAs permet la co-expression de la GFP qui est mesurée à chaque expérience par cytométrie en flux pour confirmer que les cellules sont bien infectées. Un seuil de 95% de cellules infectées est nécessaire (Figure 41).

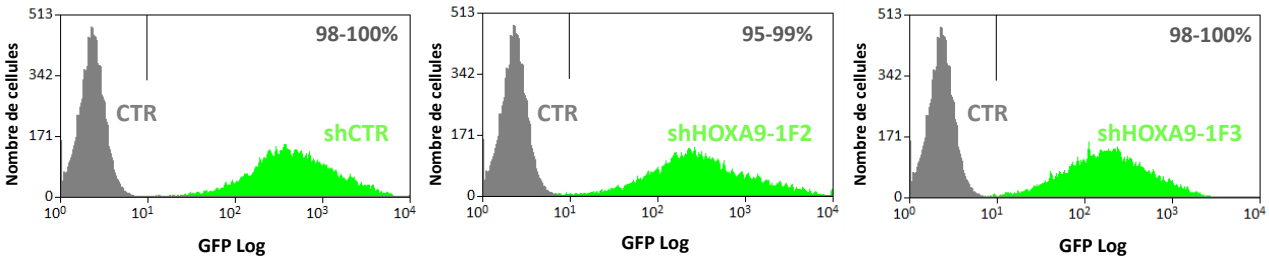


Figure 41 : **Validation de la transduction lentivirale des shRNA ciblant HOXA9**. Le pourcentage de cellules 786-O GFP-positives 48h après infection est déterminé par cytométrie en flux. La GFP est co-exprimée avec le shRNA et permet de suivre le taux de cellules infectées qui expriment le shRNA.

Les deux séquences des shRNAs ciblant l'ARNm d'HOXA9 sont des séquences utilisées et validées dans la littérature (Faber *et al.*, 2009).

Nous avons validé l'efficacité des deux shRNAs ciblant HOXA9 utilisés pour la suite de nos expériences par RT-PCR quantitative (q-RT-PCR) et par Western Blot.

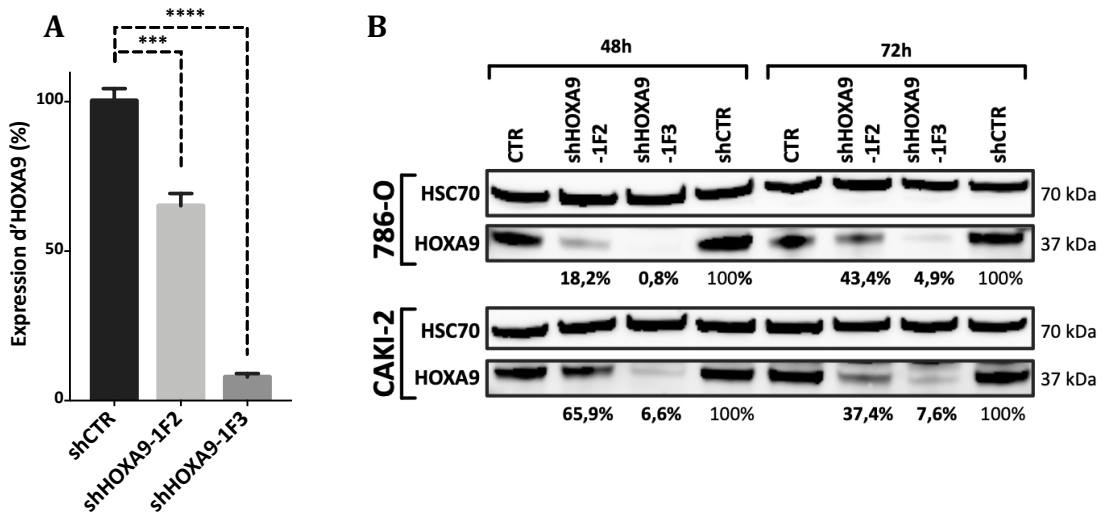


Figure 42 : **Validation de l'efficacité d'invalidation d'HOXA9 par les shRNAs shHOXA9-1F2 et shHOXA9-1F3**. **A**. Expression d'*HOXA9* évaluée par q-RT-PCR 48 heures après infection lentivirale dans la lignée 786-O. n=5, moyenne +/- SEM, Student t-test non apparié, *** p-value <0.001, **** p-value <0.0001. **B**. Expression protéique d'HOXA9 par Western Blot 48h et 72h après infection lentivirale dans les lignées 786-O et CAKI-2. Les données sont normalisées avec le shCTR. n=1.

Par PCR quantitative 48 heures après infection, nous avons pu valider l'efficacité d'inhibition transcriptionnelle d'HOXA9 qui est d'environ 60% avec le shHOXA9-1F2 et de près de 90% avec le shHOXA9-1F3, comparativement au shCTR (Figure 42A).

Par Western Blot, l'analyse de l'expression protéique d'HOXA9 montre également une importante diminution après expression des shRNAs, qui est comme attendu selon l'efficacité observée par q-RT-PCR, plus importante avec le shHOXA9-1F3 qu'avec le shHOXA9-1F2. (Figure 42B). Dans les deux lignées, la quantification nous montre bien que le shHOXA9-1F3 diminue presque totalement l'expression de la protéine HOXA9, tandis que le shHOXA9-1F2 n'entraîne une diminution que de 30 à 60% de la quantité de protéine HOXA9.

2.3. Effets de l'invalidation d'HOXA9 dans un modèle non cancéreux

L'analyse TCGA nous a permis de montrer que comparativement au tissu rénal normal, *HOXA9* est surexprimé dans des échantillons de patients atteints de carcinome papillaire mais sous-exprimé chez les patients atteints de carcinome rénal à cellules claires, mais que son expression est un facteur de moindre survie.

Avant d'aller plus loin sur ces modèles cellulaires et pour étudier si éteindre l'expression d'*HOXA9* dans une lignée non tumorale l'exprimant fortement avait un impact sur les cellules, la survie après infection lentivirale pour expression des deux shRNA ciblant HOXA9 a été évaluée par cytométrie en flux.

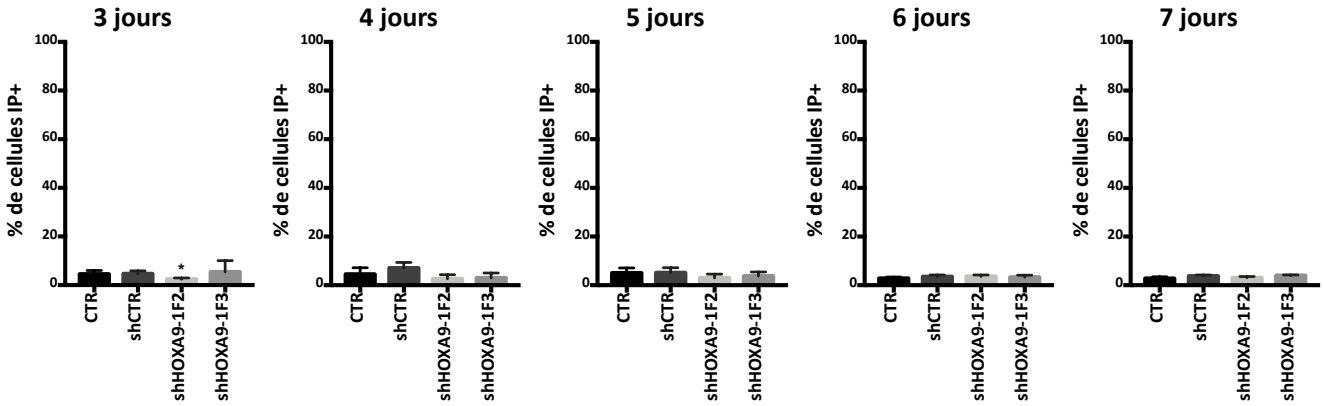


Figure 43 : **Analyse de la mort cellulaire dans la lignée HEK-293T après invalidation d'HOXA9**. Le pourcentage de cellules nécrotiques (IP+) est déterminé par cytométrie en flux. n=3, moyenne +/- SEM, Student t-test non apparié (shHOXA9 vs shCTR, shCTR vs CTR), * p<0,05.

Bien que cette lignée présente des taux d'expression d'HOXA9 importants, l'invalidation d'HOXA9 n'impacte pas la survie cellulaire (Figure 43). L'expression d'HOXA9 n'est donc pas primordiale à la survie de ce modèle normal embryonnaire.

CONCLUSION PARTIE 2

Ainsi, afin de représenter les deux principaux types histologiques de carcinome à cellules rénales, nous avons choisi d'étudier deux modèles cellulaires d'étude : la lignée 786-O, modèle de ccRCC et la lignée CAKI-2, modèle de pRCC.

Nous avons évalué l'expression d'HOXA9 par RT-PCR quantitative et montré que les deux lignées exprimaient HOXA9.

Pour déterminer les rôles fonctionnels d'HOXA9 dans le carcinome rénal au niveaux moléculaire, cellulaire et *in vivo*, nous avons choisi d'utiliser un système d'ARN interférence avec des shRNAs transduits à l'aide d'un système lentiviral et nous avons validé l'efficacité d'invalidation des deux shRNAs ciblant l'ARNm d'HOXA9. Ceux-ci entraînent une inhibition transcriptionnelle d'HOXA9 supérieure à 60% et entraînent la diminution de la quantité de la protéine HOXA9 dans les deux lignées.

Par ailleurs, nous avons montré que la lignée HEK-293T, modèle de rein embryonnaire normal exprimant fortement HOXA9 n'est pas dépendante d'HOXA9 pour sa survie.

3. Analyse moléculaire de l'invalidation d'HOXA9 dans la lignée 786-O

Pour identifier les voies cellulaires et les gènes régulés directement ou indirectement par le facteur de transcription HOXA9, nous avons réalisé une analyse transcriptomique par puces à ADN (technologie Agilent™) sur la lignée 786-O après invalidation d'HOXA9.

Les cellules ont donc été infectées par les lentivirus permettant l'expression des trois shRNAs : shHOXA9-1F2, shHOXA9-1F3 ou shCTR. Les modifications de l'expression des gènes obtenus suite à l'invalidation d'HOXA9 ont été comparées à celles obtenues par l'infection permettant l'expression du shCTR. Les analyses ont été réalisées à 48h après infection lentivirale afin de permettre l'intégration de la séquence du shRNA, son processing intracellulaire et la diminution de l'expression d'HOXA9, comme validé par q-RT-PCR et Western Blot.

Après analyse statistique par t-test modéré, une liste de gènes dont l'expression est significativement modifiée après invalidation d'HOXA9 a été obtenue. L'analyse a été réalisée en 4 à 5 réplicats biologiques indépendants.

3.1. Modulation de l'expression des gènes après invalidation d'HOXA9

En s'intéressant aux gènes dérégulés de façon significative avec un FC (*fold change*) > 1,5 et communément dérégulés entre shHOXA9-1F2 et shHOXA9-1F3, nous avons extrait une liste de 258 gènes (Figure 44A). Parmi ceux-ci, 100 gènes voient leur expression communément augmentée et 92 voient leur expression diminuée. Seule l'expression de 66 gènes est modifiée en sens opposé entre les deux shRNAs (Figure 44B). La liste des gènes est placée en ***Annexe 3***.

On remarque par ailleurs, que le shHOXA9-1F3 module significativement et avec un FC>1,5 l'expression d'un très grand nombre de gènes (2224 gènes) tandis que le shHOXA9-1F2 ne modifie l'expression que de 872 gènes.

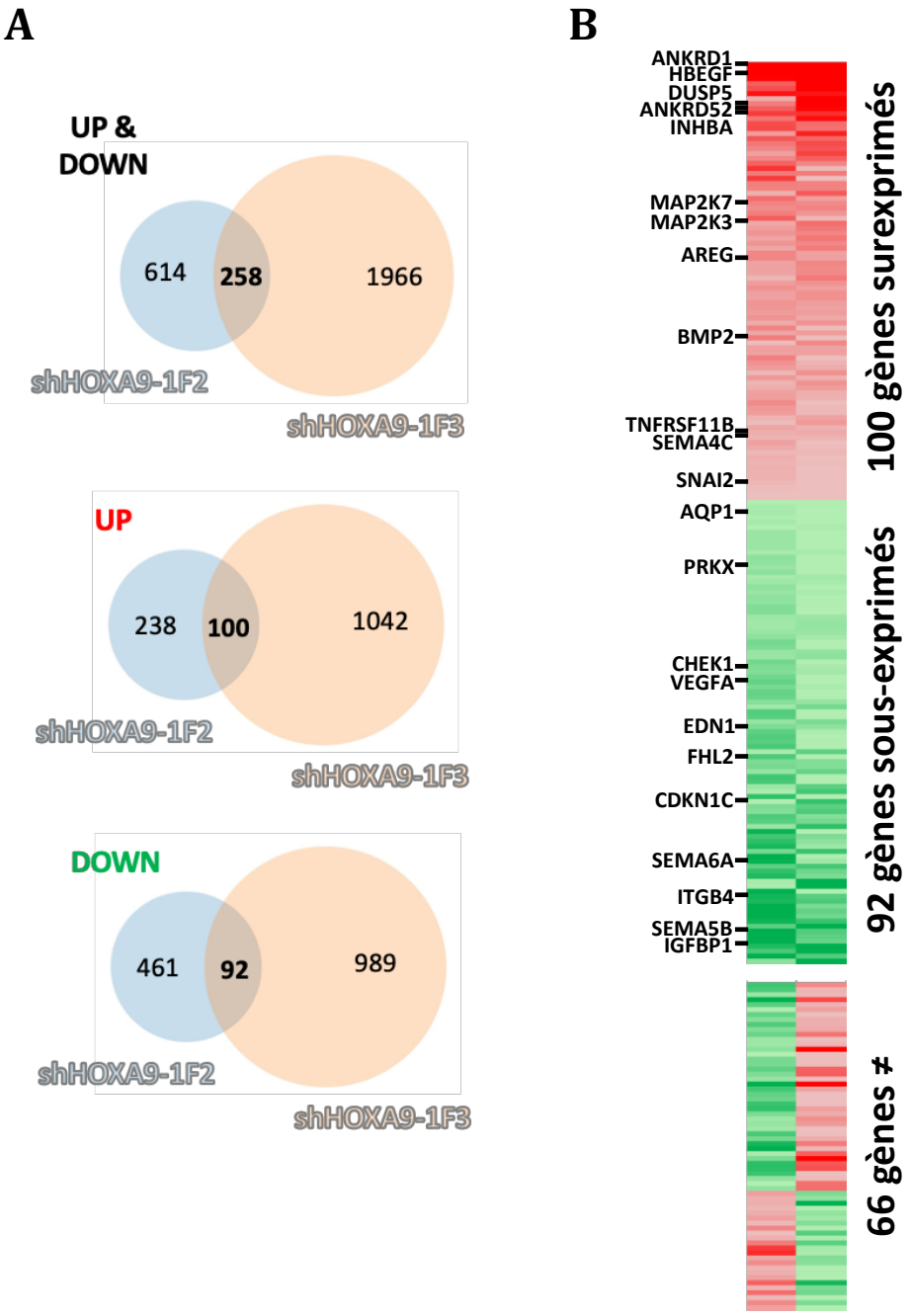


Figure 44 : **Modulation transcriptionnelle après invalidation d'HOXA9 par shRNA ciblant HOXA9 dans la lignée 786-O. A.** Diagrammes de Venn représentant les intersections entre les gènes dont l'expression est modifiée suite à l'invalidation d'HOXA9. **B.** Gènes dont l'expression est retrouvée modulée suite à l'invalidation d'HOXA9 communément entre les deux shRNAs. Gènes modulés avec un FC>1,5 et de façon significative ($p<0,05$), n=4 à 5 réplicats.

3.2. Analyse avec le logiciel GSEA (*GeneSet Enrichment Analysis*)

Pour analyser plus généralement si une voie semblait dérégulée suite à l'invalidation d'HOXA9, nous avons réalisé une analyse globale par le logiciel GSEA (*GeneSet Enrichment Analysis*). Ce logiciel permet à l'aide de données de la littérature et

de *genesets* préconçus de déterminer dans une analyse l'enrichissement en gènes d'une voie donnée ou d'un *geneset* donné.

Nous avons dans un premier temps analysé nos données avec les *genesets* « *hallmark* » qui correspondent à des états ou des processus biologiques bien définis quelque soient les modèles utilisés, obtenus par recoupement de différentes analyses (Liberzon *et al.*, 2015). La liste des *genesets* significativement enrichis est placée en ***Annexe 3***.

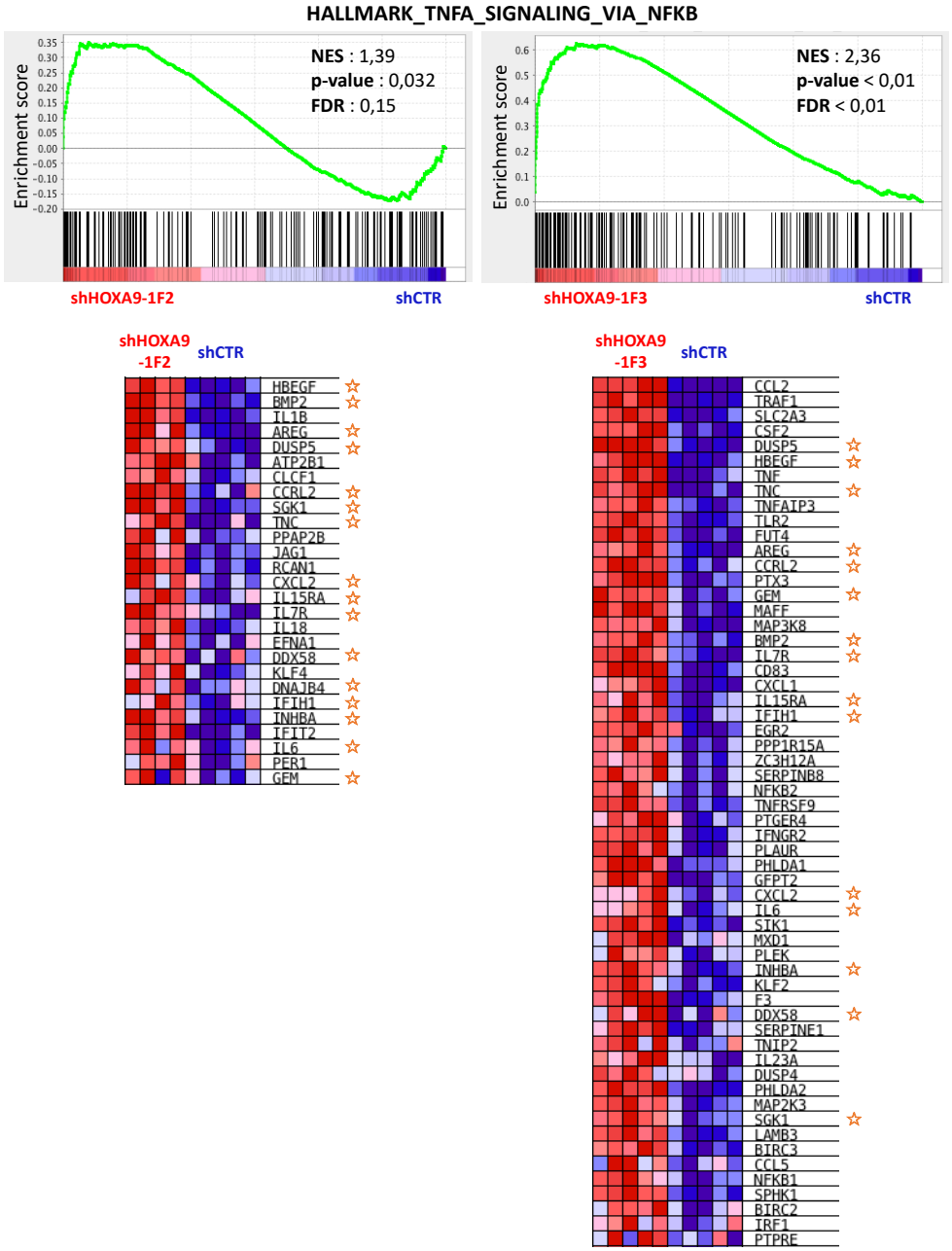


Figure 45 : **Enrichissement de gènes dérégulés après invalidation d'HOXA9 dans le *geneset* TNFA_SIGNALING_VIA_NFKB**. L'analyse réalisée avec le logiciel GSEA montre un enrichissement significatif en gènes présents dans ce *geneset* après invalidation avec les deux shRNAs ciblant HOXA9. ☆ : gènes retrouvés dans les deux analyses.

Nous avons retrouvé un enrichissement important (NES – *normalized enrichment score*) et significativement correct (p-value<0,05 et FDR<0,25) en gènes présents dans le *geneset* correspondant à l'activation de la voie du TNFα (Figure 45). L'analyse montre également que de nombreux gènes présents dans ce *geneset* et enrichis dans nos analyses sont retrouvés dans les analyses avec les 2 shRNA dirigés contre HOXA9 et sont modulés de façon identique avec les deux shRNAs utilisés.

Dans un second temps, nous avons analysé les *genesets* KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*). Cette base de données permet l'analyse de fonctions cellulaires, de voies de signalisation et de l'action de molécules (Ogata *et al.*, 1999).

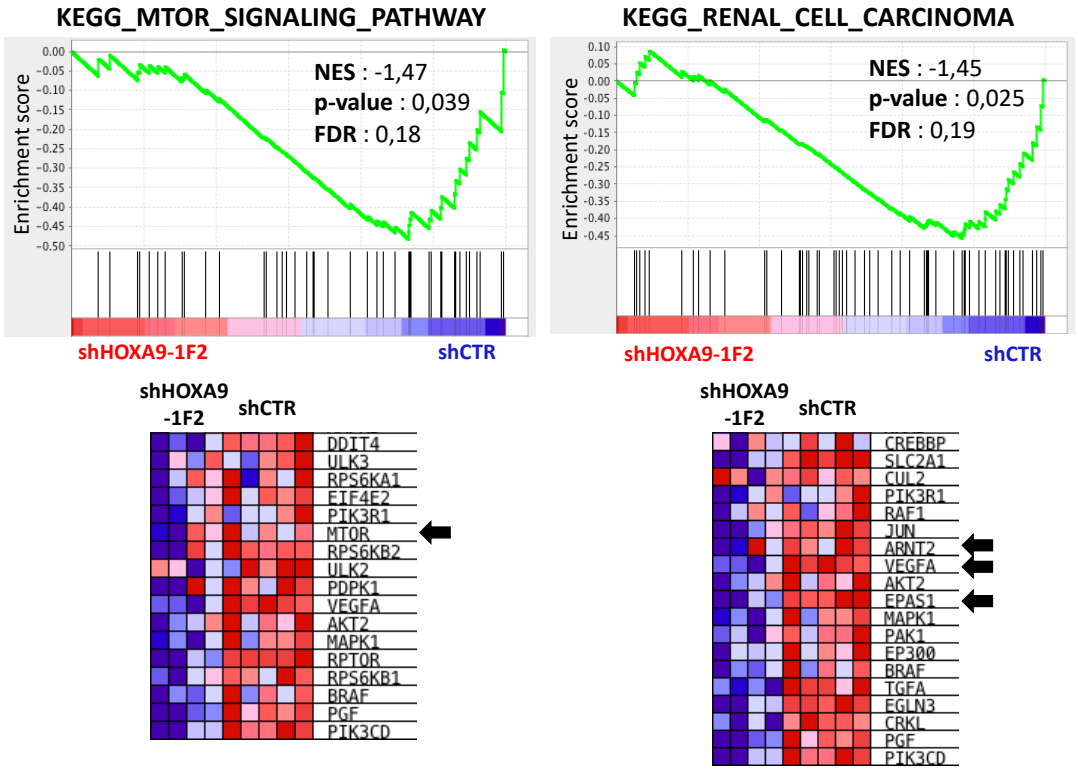


Figure 46 : **Enrichissement de gènes dérégulés après invalidation d'HOXA9 dans les *genesets* KEGG.** L'analyse réalisée avec le logiciel GSEA montre un enrichissement significatif négatif en gènes présents dans ces *genesets* dans les cellules exprimant le shHOXA9-1F2 en comparaison avec le shCTR.

De manière tout à fait intéressante, par l'analyse des *genesets* KEGG, nous avons retrouvé après invalidation d'HOXA9 par le shHOXA9-1F2 un enrichissement significatif négatif en gènes présents dans deux *genesets* liés au carcinome rénal : la voie de signalisation MTOR et le carcinome à cellules rénales (Figure 46). Ces gènes sont retrouvés enrichis dans la condition shCTR et sont donc sous-exprimés après invalidation d'HOXA9. Des gènes tels que *MTOR*, *VEGFA*, *EPAS1* (HIF2α), *ARNT2* dont le rôle dans le carcinome rénal est montré dans la littérature ont ainsi été retrouvés sous-exprimés suite

à l'invalidation d'HOXA9 par le shHOXA9-1F2 (Figure 46). La liste des *genesets* significativement enrichis est placée en ***Annexe 3***.

3.3. Validation par q-RT-PCR

Les dérégulations de l'expression de gènes observées après invalidation d'HOXA9 ont ensuite été confirmées par q-RT-PCR. L'expression de gènes de la voie du TNF et associés au RCC et certains gènes communément retrouvés dérégulés entre le shHOXA9-1F2 et le shHOXA9-1F3 a été analysée.

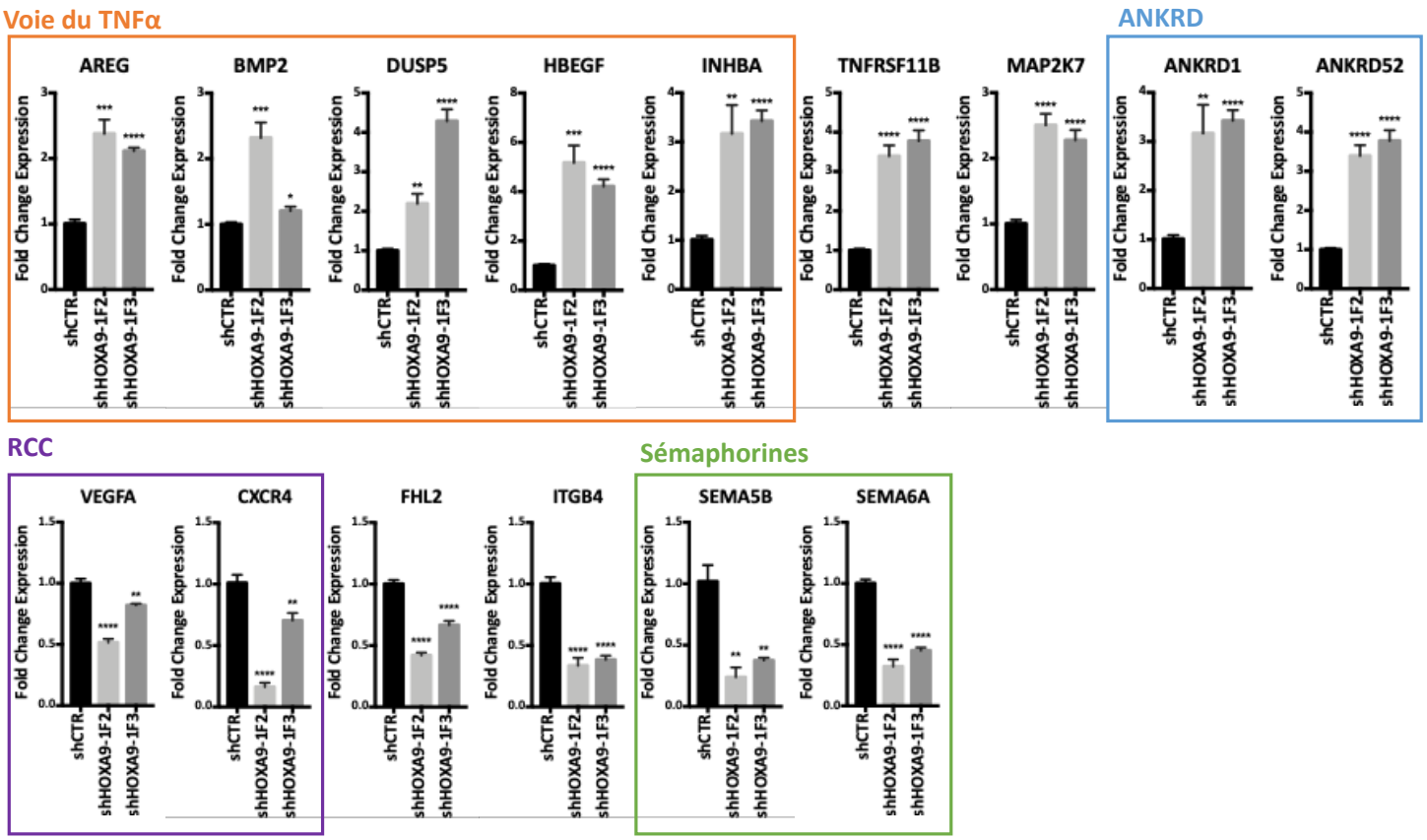


Figure 47 : **Validation de la modulation de l'expression des gènes communément dérégulés après invalidation d'HOXA9 dans la lignée 786-O.** L'expression est déterminée par q-RT-PCR et quantifiée relativement à l'expression dans les cellules exprimant le shCTR. n=5, moyenne +/- SEM, Student t-test non apparié (shHOXA9 vs shCTR), * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001, *** p<0,0001.

Nous avons validé par q-RT-PCR l'expression de différents gènes de la voie du TNFα, ainsi que de gènes communément dérégulés entre shHOXA9-1F2 et shHOXA9-1F3 et dont les fonctions sont décrites dans la littérature dans le cancer (Figure 47).
Parmi ces gènes, nous avons ainsi montré une augmentation après invalidation d'HOXA9 de l'expression de *AREG*, *BMP2*, *DUSP5*, *HBEGF*, *INHBA*, *TNFRSF11B*, *MAP2K7*, *ANKRD1* et *ANKRD52*. D'autres gènes associés directement au cancer du rein sont sous-exprimés

après invalidation d'HOXA9 comme *CXCR4* ou *VEGFA*. Des gènes de la famille des sémaphorines (Rehman and Tamagnone, 2013) comme *SEMA5B* et *SEMA6A* sont également sous-exprimés. Enfin, nous avons montré également la sous-expression de gènes comme *FHL2* ou *ITGB4*.

3.4. Évaluation de l'interaction directe d'HOXA9 avec le promoteur de BMP2

3.4.1. Analyse de la région promotrice du gène BMP2

Compte-tenu du rôle de BMP2 dans le carcinome rénal dans la régulation des cellules souches cancéreuses et l'initation de la formation de tumeurs (*Introduction - 1.9.3*) et du fait que l'invalidation d'HOXA9 entraîne une augmentation de son expression dans la lignée 786-O, nous avons évalué si la régulation par HOXA9 se faisait de manière directe ou indirecte. Pour cela, nous avons analysé la région promotrice du gène *BMP2* afin de rechercher des sites des sites riches en bases AT et potentiels sites de fixation d'HOXA9.

Une séquence de 1000 paires de bases en amont du site d'initiation de la transcription (*TSS – transcription start site*) a été analysée à l'aide de la base EPD (The Eukaryotic Promoter Database - https://epd.vital-it.ch/index.php).

Sur la base EPD, nous avons recherché les sites consensus décrits pour Hoxa9 murin décrits par Huang *et al.*, 2012 (Figure 22). Nous avons identifié 4 sites potentiels de liaison d'HOXA9 (Figure 48) à partir desquels 4 oligonucléotides ont été synthétisés. Ces oligonucléotides d'ADN sont présentés sur la Figure 48.

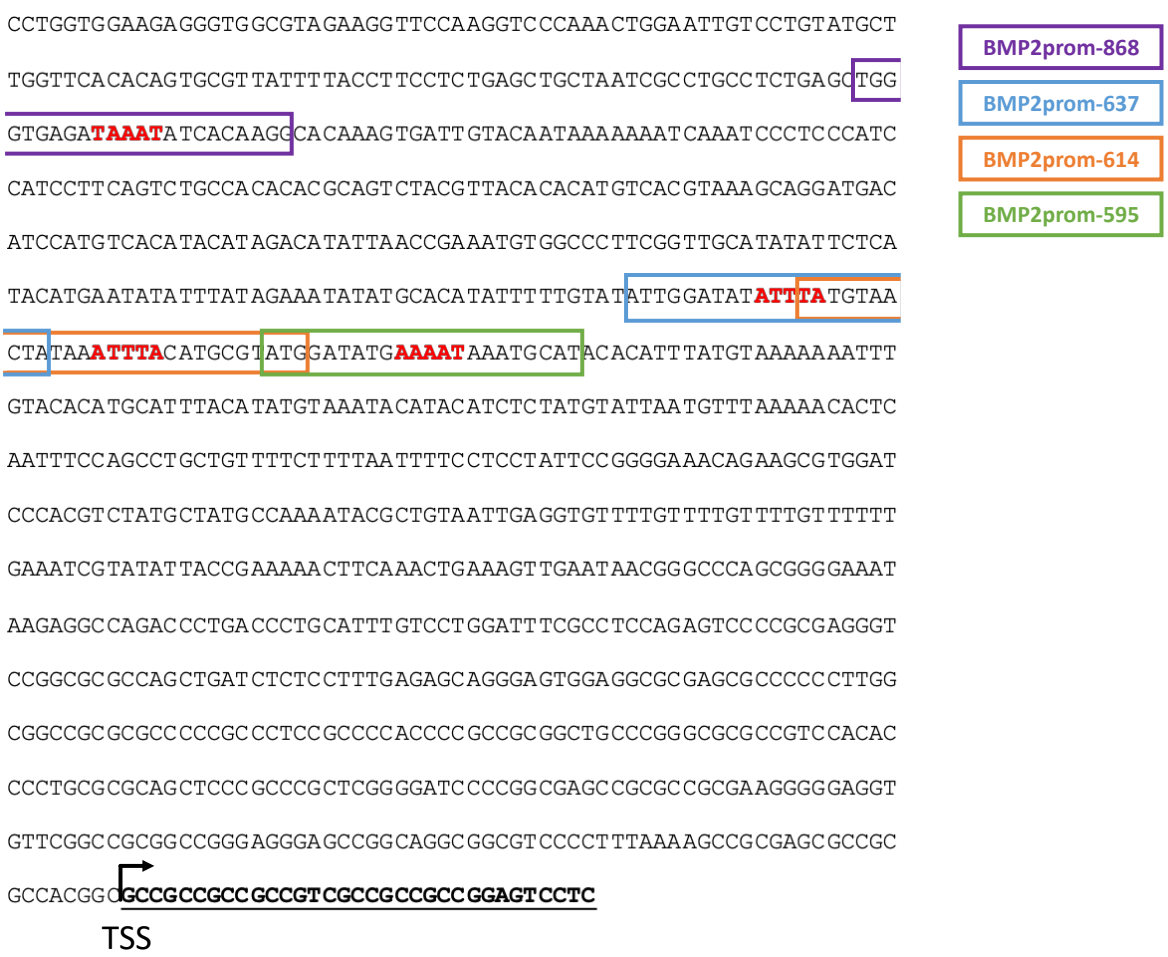


Figure 48 : **Analyse de la région promotrice du gène *BMP2*.** Les sites potentiels de fixation d'HOXA9 sont indiqués en rouge. Le début de la séquence transcrite est en gras.

3.4.2. Évaluation de la liaison d'HOXA9 sur la région promotrice de *BMP2*

A l'aide des 4 oligonucléotides contenant chacun un site potentiel de liaison d'HOXA9, nous avons réalisé un retard sur gel ou EMSA (*Electrophoretic Mobility Shift Assay*). Pour cela, les oligonucléotides radiomarqués ont été incubés avec la protéine HOXA9 synthétisée en lysat de réticulocytes. L'interaction entre l'oligonucléotide et HOXA9 est ensuite révélée après migration électrophorétique sur gel et exposition sur un écran d'autoradiographie. L'interaction est révélée par la présence d'une bande plus haute que l'oligonucléotide libre qui correspond au complexe ADN+HOXA9.

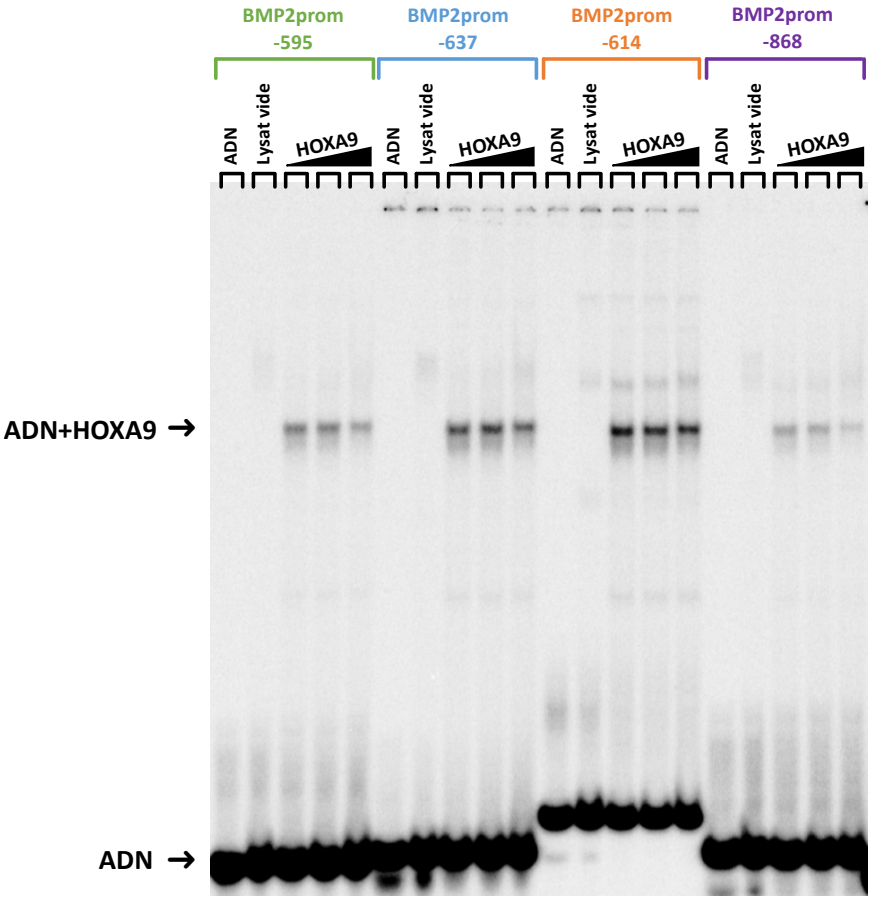


Figure 49 : **Évaluation de la liaison d'HOXA9 sur la séquence promotrice de *BMP2*.**
La liaison de la protéine HOXA9 exprimée en lysat de réticulocytes à des oligonucléotides radiomarqués contenant des sites potentiels de fixation a été évaluée par EMSA. Lysat vide : lysat de réticulocytes exprimé avec un plasmide vide. ADN : oligonucléotide radiomarqué seul.

Le retard sur gel ou EMSA (*Electrophoretic Mobility Shift Assay*) réalisé nous a permis de montrer qu'HOXA9 forme un complexe avec chacun des oligonucléotides contenant des sites potentiels de fixation et provenant de séquences retrouvées dans la région promotrice du gène *BMP2* (Figure 49). HOXA9 semble se fixer de façon plus forte à la séquence BMP2prom-614.

Pour aller plus loin, nous avons réalisé la même expérience en incubant la protéine HOXA9 exprimée en lysat de réticulocytes avec les différents oligonucléotides (séquences promotrices de *BMP2*) en présence de concentrations croissantes de DB818 et de DB1055, pour lesquels la capacité d'inhibition spécifique de la formation du complexe HOXA9/ADN a été validée avec un oligonucléotide contenant la séquence consensus de fixation d'HOXA9 (***Annexe 2***).

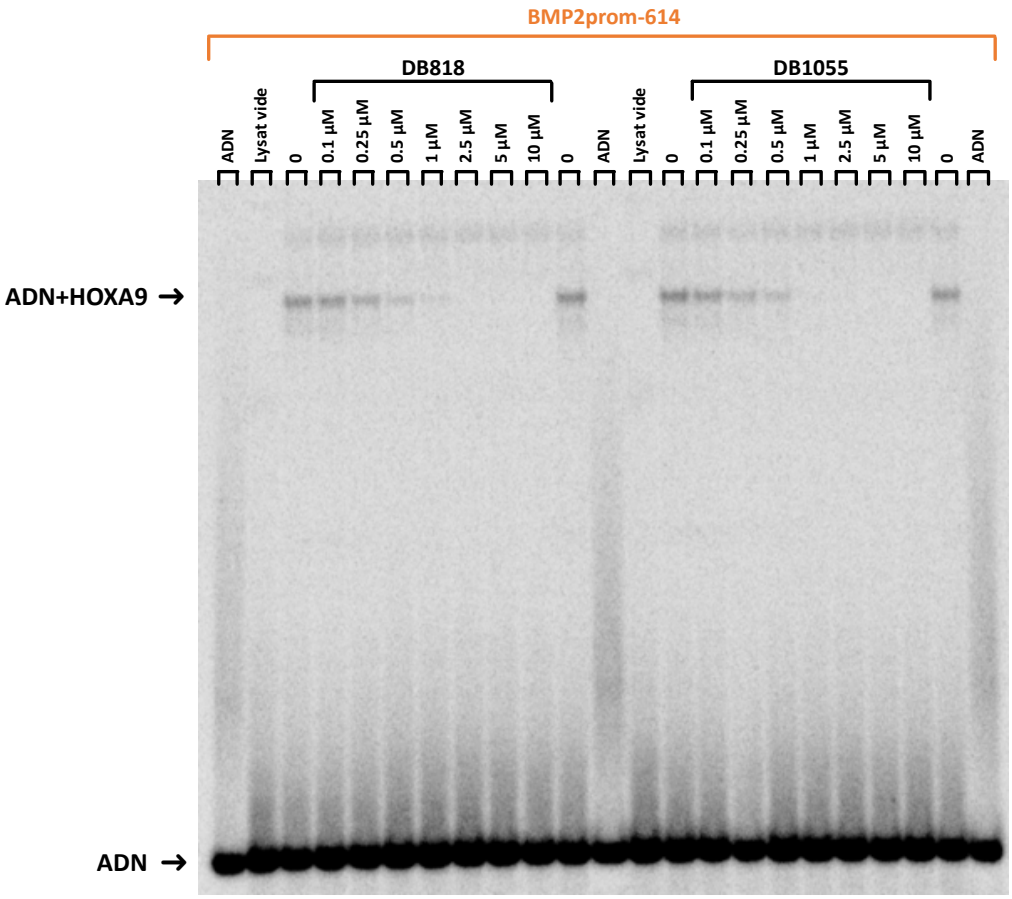


Figure 50 : **Évaluation de l'inhibition de la liaison d'HOXA9 sur la séquence promotrice de *BMP2* par les composés DB818 et DB1055**. L'inhibition par les composés DB818 et DB1055 de la liaison de la protéine HOXA9 exprimée en lysat de réticulocytes à des oligonucléotides radiomarqués contenant des sites potentiels de fixation a été évaluée par EMSA. Lysat vide : lysat de réticulocytes exprimé avec un plasmide vide. ADN : oligonucléotide radiomarqué seul.

Les deux composés DB818 et DB1055 sont capables d'inhiber la liaison à l'ADN d'HOXA9 sur la séquence BMP2prom-614 provenant de la région promotrice de *BMP2* à des concentrations très faibles (<1 µM) (Figure 50). Cette activité est comparable à celle obtenue avec une séquence contenant un site consensus de fixation d'HOXA9 ou HBS (*HOX-binding site*) (***Annexe 2***).

CONCLUSION PARTIE 3

L'analyse transcriptomique réalisée après invalidation d'HOXA9 par shRNA nous a permis de montrer qu'HOXA9 régule des gènes de la voie du TNFα. Dans ce modèle, l'invalidation se traduit par l'expression positive de gènes impliqués dans cette voie.

De plus, l'invalidation d'HOXA9 impacte spécifiquement des gènes impliqués dans la voie MTOR et dans le carcinome à cellules rénales (RCC) tels que *MTOR*, *VEGFA* ou encore *EPAS1* (HIF2α), ou encore l'expression de gènes de la famille des sémaphorines ou *ANKRD*.

Nous avons également pu montrer que l'invalidation d'HOXA9 entraîne l'augmentation de l'expression de *BMP2*. Il a par ailleurs été montré que l'inactivation de *BMP2* chez les patients atteints de RCC était un facteur de mauvais pronostic (Mitsui *et al.*, 2015). Pour ces deux raisons, nous nous sommes intéressés à la région promotrice de *BMP2* et nous avons montré qu'HOXA9 interagissait sur des sites potentiels de fixation dont il faudra par la suite valider l'activité régulatrice par analyse fine de la transactivation médiée par HOXA9 sur ce promoteur.

4. Effets cellulaires de l'invalidation d'HOXA9 et de son inhibition par les composés DB818 et DB1055

Afin d'évaluer les rôles fonctionnels d'HOXA9 dans les lignées 786-O et CAKI-2, nous avons ensuite étudié les effets cellulaires de l'invalidation d'HOXA9 mais aussi ceux des molécules inhibitrices de la liaison d'HOXA9 à l'ADN DB818 et DB1055.

4.1. Évaluation des effets cellulaires de l'invalidation d'HOXA9

4.1.1. Impact sur la survie cellulaire

Compte-tenu de l'expression d'HOXA9 dans nos lignées et pour évaluer son rôle dans la survie cellulaire, nous avons infecté les cellules pour l'expression des deux shHOXA9-1F3 et shHOXA9-1F2 et évalué leur devenir. A plusieurs temps post-infection lentivirale, la mort cellulaire dans les lignées 786-O et CAKI-2 a été évaluée par marquage des cellules apoptotiques avec de l'annexine V couplée à l'allophycocyanine (APC) et par incorporation d'iodure de propidium. Les cellules ont ensuite été analysées par cytométrie en flux.

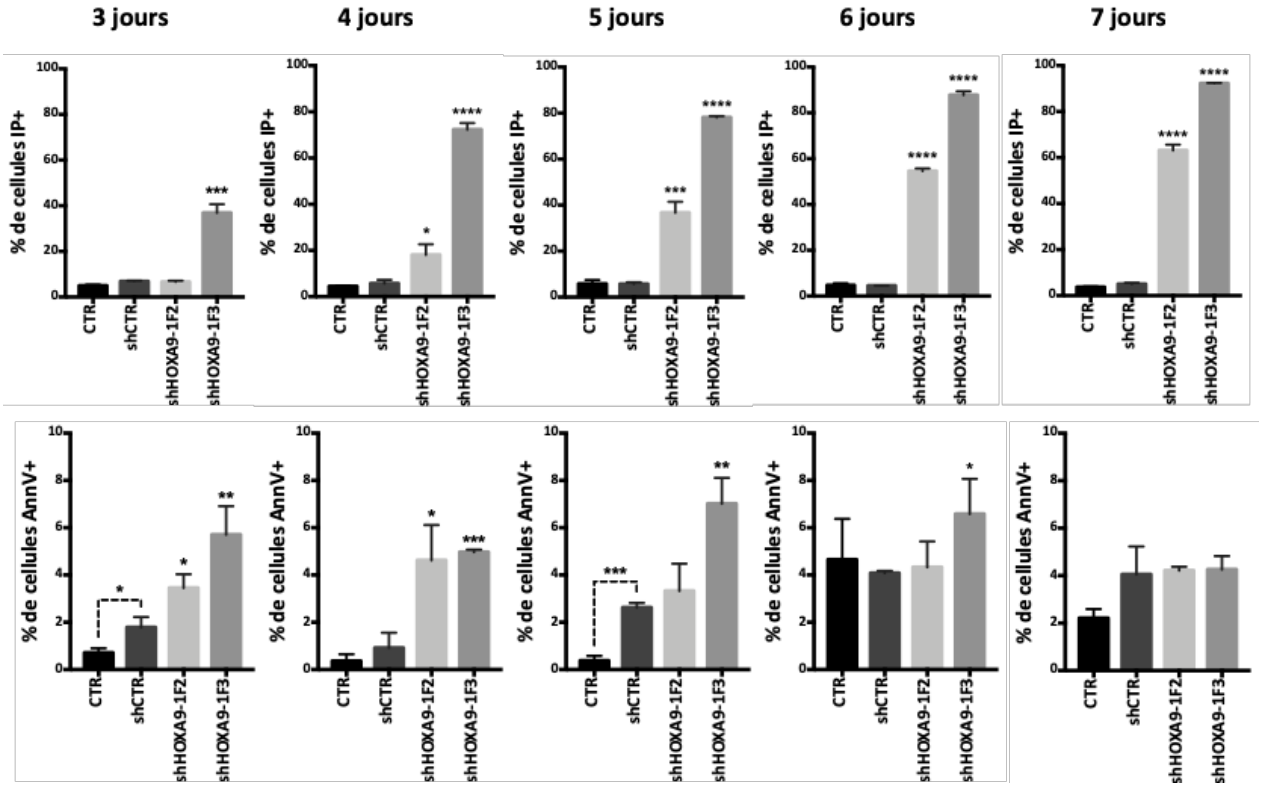


Figure 51 : **Analyse de la mort cellulaire dans la lignée 786-O après invalidation d'HOXA9**. Le panel du haut représente les cellules nécrotiques (IP+). Le panel du bas représente les cellules apoptotiques (AnnV+/IP-). n=3, moyenne +/- SEM, Student t-test non apparié (shHOXA9 vs shCTR, shCTR vs CTR), * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001, *** p<0,0001.

L'invalidation d'HOXA9 dans la lignée de ccRCC 786-O impacte fortement la survie cellulaire dès 72h avec une augmentation du pourcentage de cellules apoptotiques et de cellules nécrotiques (Figure 51). La mort des cellules se poursuit et à 7 jours post-infection lentivirale, il ne reste qu'environ 30% de cellules vivantes avec le shHOXA9-1F2 et moins de 10% de cellules vivantes avec le shHOXA9-1F3.

A 3 jours et 4 jours post-infection, comparativement aux cellules exprimant le shCTR, nous avons observé une augmentation du pourcentage de cellules apoptotiques dans les cellules exprimant les deux shRNA ciblant HOXA9 (Figure 51, panel du bas).

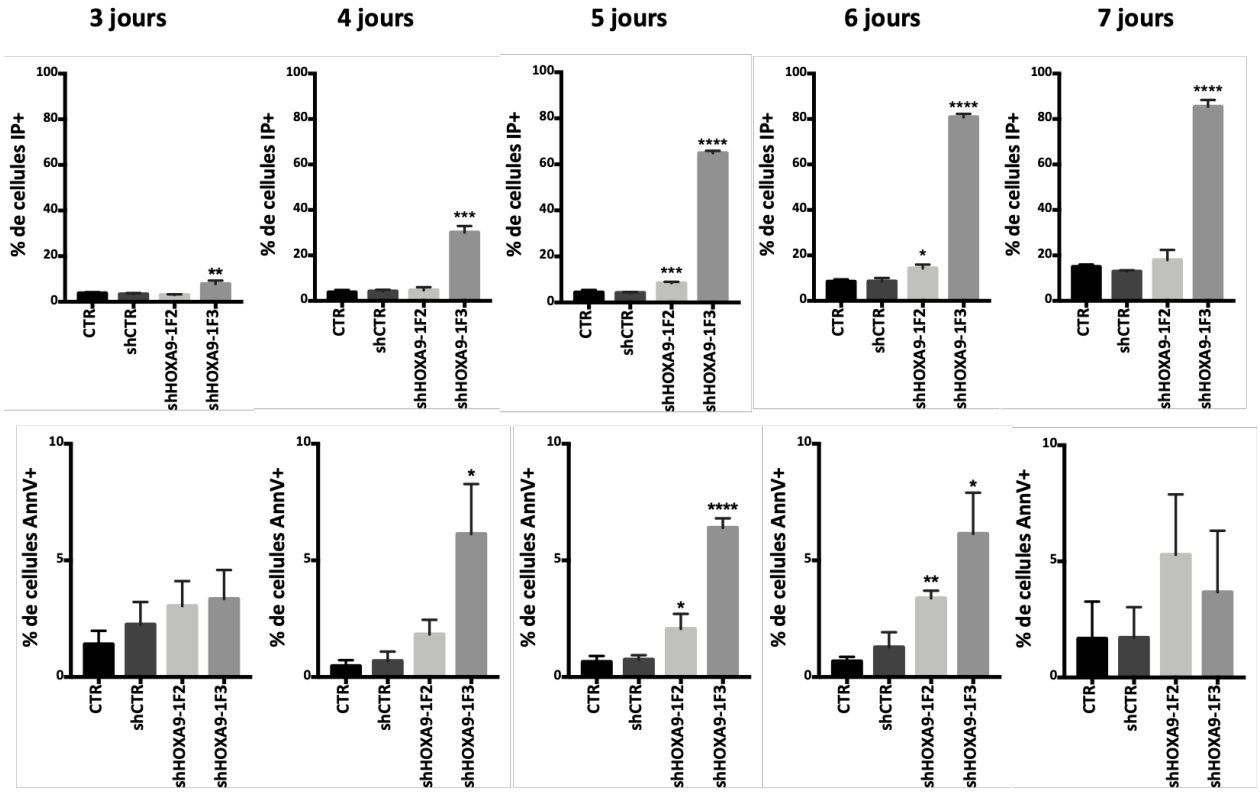


Figure 52 : **Analyse de la mort cellulaire dans la lignée CAKI-2 après invalidation d'HOXA9**. Le panel du haut représente les cellules nécrotiques (Iodure de propidium, IP+). Le panel du bas représente les cellules apoptotiques (Annexine V, AnnV+). n=3, moyenne +/- SEM, Student t-test non apparié (shHOXA9 vs shCTR), * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001, *** p<0,0001.

Dans la lignée CAKI-2, l'invalidation d'HOXA9 entraîne aussi la mort des cellules. Néanmoins, les cellules ne meurent pas aussi rapidement que dans la lignée 786-O. Dès 72h de transduction avec le shHOXA9-1F3, nous avons observé une augmentation significative du pourcentage de cellules nécrotiques qui augmente encore au cours du temps. Avec le shHOXA9-1F2, qui est moins efficace pour invalider l'expression d'HOXA9, nous avons observé une augmentation significative du pourcentage de cellules mortes retardée, qui débute à partir de 5 jours (Figure 52, panel du haut). Comme dans la lignée

786-O, l'invalidation d'HOXA9 entraîne une augmentation du pourcentage de cellules apoptotiques dès 4 jours (Figure 52, panel du bas).

4.1.2. Impact de l'invalidation d'HOXA9 sur la migration cellulaire

Dans un second temps, nous nous sommes intéressés au rôle d'HOXA9 dans le phénomène de migration cellulaire. La migration cellulaire est un processus physiologique indispensable généralement absent des cellules différenciées adultes mais que les cellules cancéreuses sont capables d'acquérir leur permettant de se déplacer au sein d'un tissu et ainsi leur conférant un potentiel métastatique.

Pour évaluer la migration, nous avons utilisé un système de chambre Transwell™ constitué d'une membrane avec des pores de 8 µm.

Afin d'induire le phénomène de migration *in vitro*, les cellules ont été affamées par incubation dans un milieu pauvre en sérum de veau fœtal (SVF) contenant nutriments et facteurs de croissance. Après une nuit de privation, les cellules ont été ensemencées pendant 24h dans le compartiment supérieur d'un insert Transwell™. Le compartiment inférieur contenant un milieu riche en SVF, les cellules qui en ont la capacité migrent à travers les pores de la membrane pour réadhérer sous la membrane. Après fixation et coloration des cellules, nous avons analysé le pourcentage de cellules capables de traverser la membrane après invalidation d'HOXA9 dans la lignée 786-O.

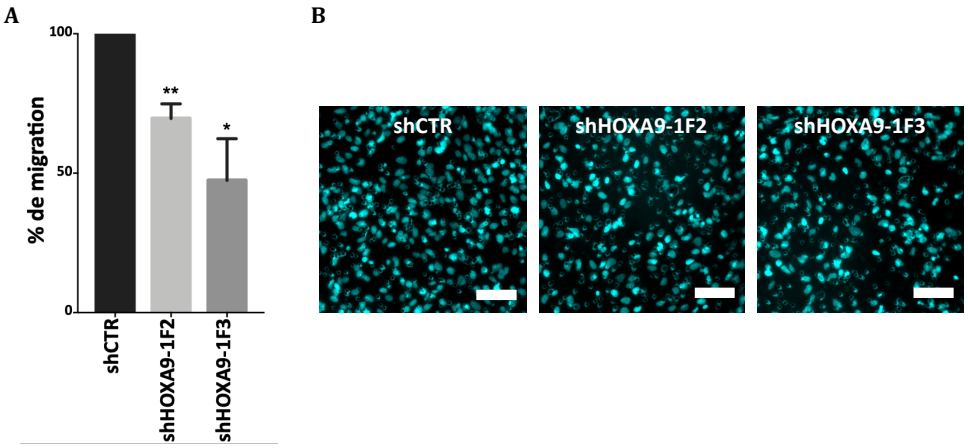


Figure 53 : **Analyse des capacités migratoires des cellules 786-O après invalidation d'HOXA9**. **A**. Pourcentages de migration après invalidation normalisés avec le shCTR. **B**. Images représentatives de la densité des cellules (échelle : 100 µm). 24h après infection lentivirale pour expression des deux shRNA ciblant HOXA9, les cellules sont ensemencées sur la membrane d'un insert Transwell™ avec des pores de 8 µm et fixées après 24h puis marquées au DAPI. n=3, moyenne +/- SEM, Student t-test non apparié (shHOXA9 vs shCTR), * p<0,05, ** p<0,01.

L'invalidation d'HOXA9 dans la lignée impacte la migration cellulaire en diminuant le nombre de cellules capables de traverser les pores de la membrane (Figure 53).

4.1.3. Impact de l'invalidation d'HOXA9 sur les cellules souches cancéreuses

Il existe plusieurs techniques d'étude des cellules souches cancéreuses (CSC) et de leur capacité d'initiation des tumeurs. *In vitro*, l'une d'elle est la formation de tumorosphères. En effet, les sous-populations possédant des caractéristiques de CSC sont capables de former des sphères, en conditions de culture sans ancrage et sous l'effet de facteurs de croissance spécifiques. Les cellules étant ensemencées en petite quantité, cette étude permet d'estimer le pourcentage de CSC au sein d'une population totale puisqu'on considère qu'une CSC est capable de donner une sphère dans ces conditions de culture.

D'après les données de la littérature, la lignée 786-O est la seule des deux lignées étudiées capables de former des tumorosphères (Micucci *et al.*, 2015). De plus, nous avons montré que l'expression de *BMP2* était augmentée après invalidation d'HOXA9 et les données de la littérature montrent que BMP2 est capable d'inhiber le potentiel tumorigène des cellules souches cancéreuses dans le carcinome rénal (Wang *et al.*, 2015).

Le test de formation de sphères étant un test permettant d'enrichir un échantillon en cellules souches cancéreuses, nous l'avons utilisé afin d'évaluer s'il existait un différentiel d'expression d'*HOXA9* entre la culture classique en 2 dimensions (2D) et la culture en sphères. Après 10 jours de culture, les ARN des sphères ont été extraits et l'expression d'*HOXA9* a été comparée avec celle d'une culture en 2D.

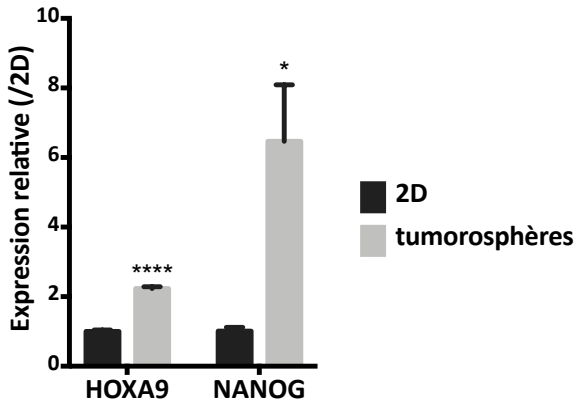


Figure 54 : **Expression d'HOXA9 dans des tumorosphères de 786-O**. L'expression d'HOXA9 et de NANOG dans les tumorosphères est normalisée avec l'expression en 2D. n=3, moyenne +/- SEM, Student t-test non apparié, * p<0,05, **** p<0,0001.

L'expression d'HOXA9 est deux fois plus importante lorsque les cellules sont enrichies en CSC par la formation de tumorosphères (Figure 54). L'enrichissement en cellules à caractère souche est lui confirmé par l'augmentation importante de l'expression de NANOG, un facteur de transcription à homéodomaine utilisé comme marqueur de cellules souches normales et de CSC (Figure 54) (Yu *et al.*, 2007).

Puis, pour déterminer si l'invalidation d'HOXA9 impacte les CSC dans le carcinome rénal, nous avons réalisé un test de formation de tumorosphères après invalidation d'HOXA9 dans la lignée 786-O. Après 10 jours de culture, nous avons analysé le nombre de sphères formées dans chaque condition.

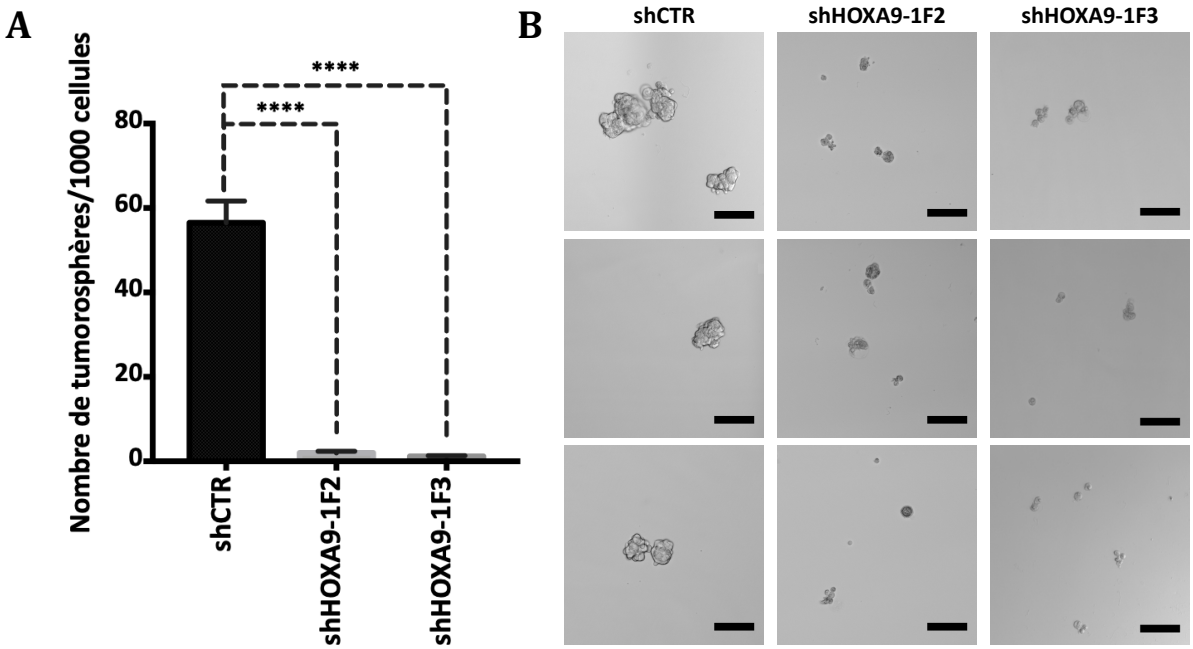


Figure 55 : **Capacité des cellules 786-O à former des sphères après invalidation d'HOXA9**. **A**. Nombre de tumorosphères (>50 µm de diamètre) formées pour 1000 cellules après invalidation d'HOXA9 et après 10 jours de culture. **B**. Images représentatives des différentes conditions (échelle : 100 µm). n=3, moyenne +/- SEM, Student t-test non apparié (shHOXA9 vs shCTR), **** p<0,0001.

Dans les conditions de culture spécifiques pour la formation de sphères, l'invalidation d'HOXA9 abolit totalement la formation de tumorosphères (Figure 55). Nous avons pu observer la formation d'environ 60 sphères pour 1000 cellules, ce qui correspond au pourcentage de cellules CD105-positives dans cette lignée.

4.2. Effets cellulaires du traitement par les composés DB818 et DB1055

4.2.1. Sensibilité des cellules aux composés DB818 et DB1055

Afin de connaître la sensibilité des deux lignées 786-O et CAKI-2 au traitement par les composés DB818 et DB1055 identifiés comme inhibiteurs de la liaison d'HOXA9 et de son activité transcriptionnelle (***Annexe 2***), nous les avons traitées pendant 72h afin de déterminer les concentrations inhibitrices médianes ou IC_{50}, qui représentent les concentrations pour lesquelles 50% des cellules sont viables comparativement aux cellules non traitées. Cette détermination est réalisée par test MTS.

Les deux lignées sont plus sensibles au DB818 qui inhibe *in vitro* la formation du complexe HOXA9/ADN plus efficacement que le DB1055 (***Annexe 2***). Les IC_{50} pour le DB818 calculées pour les deux lignées sont de 11,8 µM et de 15,1 µM, pour CAKI-2 et 786-O, respectivement (Figure 56). Elles sont de 48,8 µM et 35,4 µM pour le DB1055.

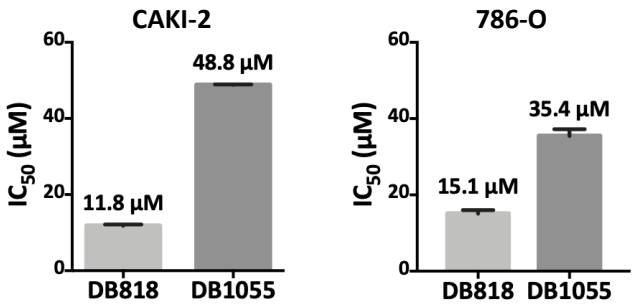


Figure 56 : **Sensibilité des lignées CAKI-2 et 786-O aux composés DB818 et DB1055.**
Les IC_{50} dans les deux lignées ont été déterminées à 72h de traitement par test MTS. n=3, moyenne +/- SEM.

4.2.2. Impact du traitement sur la survie cellulaire

Pour confirmer que le traitement avec les composés DB818 et DB1055 induit la mort des cellules, nous avons mesuré le pourcentage de cellules apoptotiques par marquage avec de l'annexine V couplée à l'allophycocyanine (APC) et le pourcentage de cellules nécrotiques par incorporation d'iodure de propidium, et ceci à différents temps de traitement à des concentrations proches des IC_{50} déterminées par test MTS. Les cellules ont ensuite été analysées par cytométrie en flux.

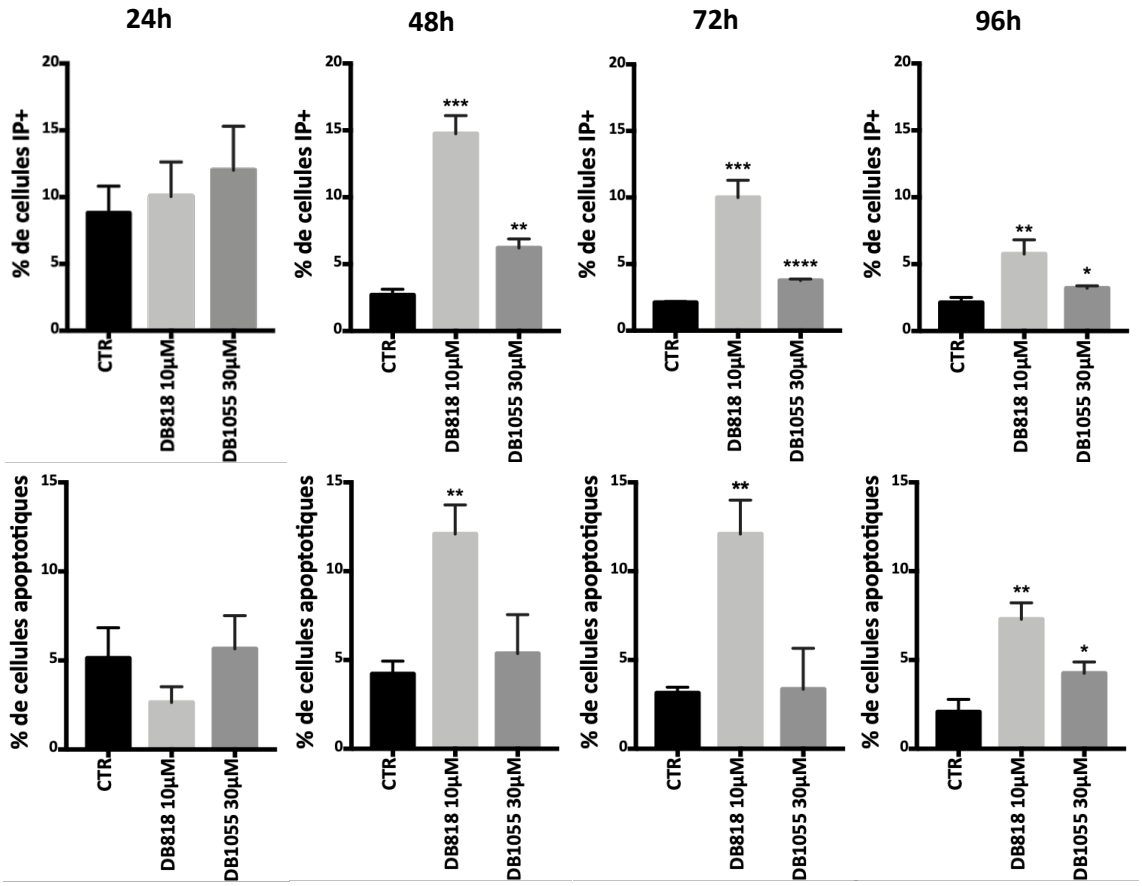


Figure 57 : **Analyse de la mort cellulaire dans la lignée 786-O après inhibition d'HOXA9**. Le panel du haut représente les cellules nécrotiques (IP+). Le panel du bas représente les cellules apoptotiques (AnnV+/IP-). n=3, moyenne +/- SEM, Student t-test non apparié (DB vs CTR), * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001, *** p<0,0001.

Le traitement avec les composés DB818 (10 µM) et DB1055 (30 µM) entraîne la mort des cellules de la lignée 786-O dès 48h avec une efficacité du DB818 supérieure à celle du DB1055, comme déjà montré par test MTS (Figure 57, panel du haut). Le DB818 est également plus efficace pour induire la mort par apoptose des cellules (Figure 57, panel du bas).

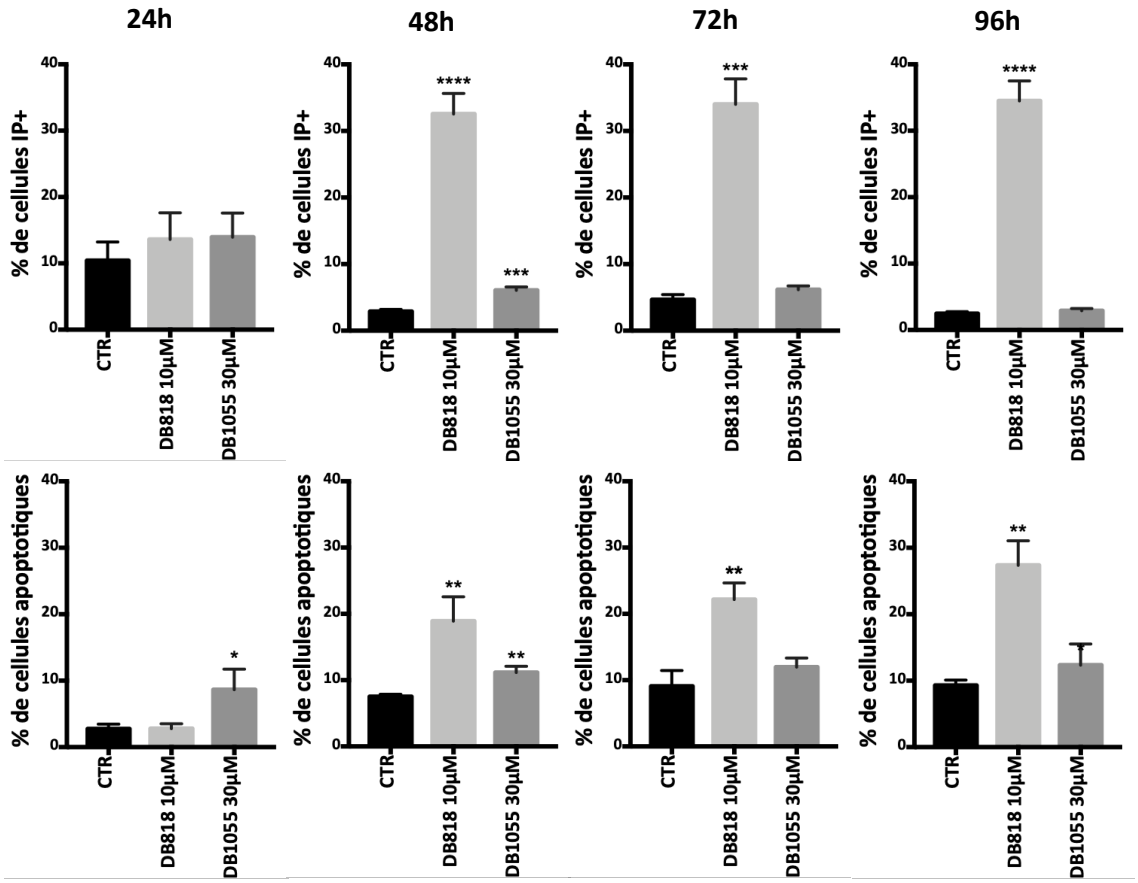


Figure 58 : **Analyse de la mort cellulaire dans la lignée CAKI-2 après inhibition d'HOXA9**. Le panel du haut représente les cellules nécrotiques (IP+). Le panel du bas représente les cellules apoptotiques (AnnV+/IP-). n=3, moyenne +/- SEM, Student t-test non apparié (DB vs CTR), * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001, *** p<0,0001.

Comme pour la lignée 786-O, le traitement par les composés DB818 et DB1055 induit la mort des cellules et ceci dès 48h de traitement (Figure 58, panel du haut). Le DB818 est là encore plus efficace que le DB1055 aux concentrations testées pour induire la mort des cellules. Les deux composés induisent une augmentation du pourcentage de cellules apoptotiques et ceci dès 24h pour le DB1055 (Figure 58, panel du bas).

4.2.3. Effet du traitement par les DB818 et DB1055 sur la migration cellulaire

L'invalidation d'HOXA9 impacte la migration des cellules de la lignée 786-O (Figure 53). Pour déterminer si l'inhibition par les composés DB818 et DB1055 impacte également la migration, nous avons utilisé des chambres Transwell™ de la même façon.

Après 16h de traitement, les cellules ont été ensemencées dans l'insert et laissées migrer pendant 24h avant d'être fixées et marquées au DAPI. Les cellules ayant traversé

la membrane ont ensuite été comptées. Les concentrations choisies sont des concentrations en deçà des IC_{50} afin de limiter la mort des cellules.

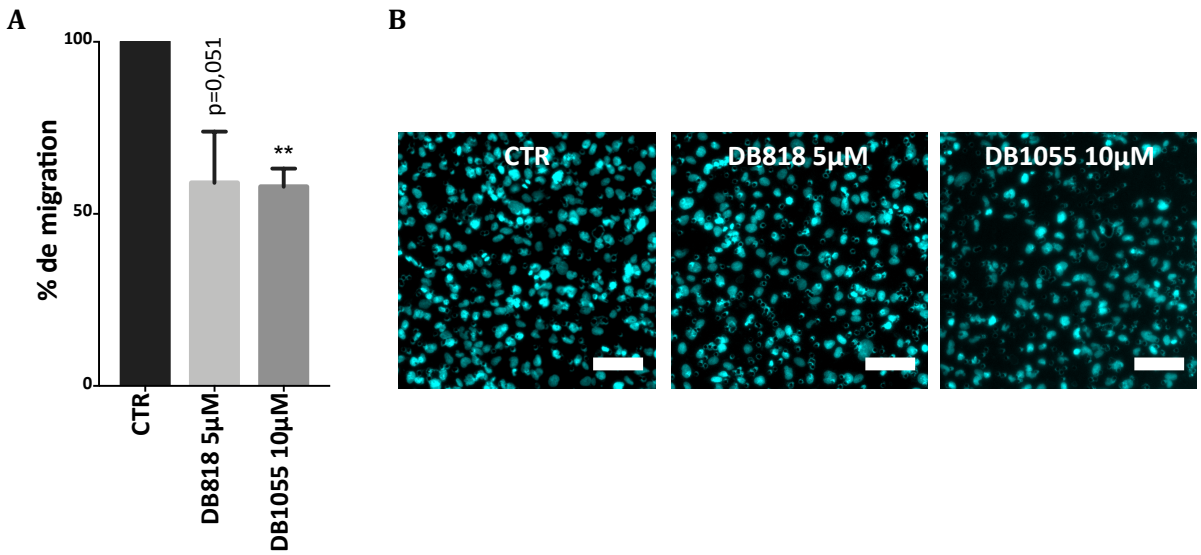


Figure 59 : **Analyse des capacités migratoires après inhibition d'HOXA9**.
A. Pourcentages de migration après inhibition d'HOXA9 normalisés par la condition non traitée (CTR). **B**. Images représentatives de la densité des cellules (échelle : 100 µm). 16h après traitement avec les DB818 (5 µM) et DB1055 (10 µM), les cellules sont ensemencées sur la membrane d'un insert Transwell™ avec des pores de 8 µm et fixées après 24h de migration puis marquées au DAPI. n=3, moyenne +/- SEM, Student t-test non apparié (DB vs CTR), ** p<0,01.

Tout comme son invalidation, l'inhibition d'HOXA9 par le DB1055 impacte la migration cellulaire (Figure 59). Pour le DB818, la diminution du pourcentage de migration tend vers la significativité (p=0,051).

CONCLUSION PARTIE 4

Nous avons analysé les effets cellulaires de l'invalidation d'HOXA9 sur les lignées 786-O et CAKI-2. Nous avons ainsi montré qu'HOXA9 est requis pour la survie cellulaire et que son invalidation entraîne la mort des cellules par apoptose. De plus, l'invalidation d'HOXA9 impacte la migration cellulaire, mécanisme développé par les cellules cancéreuses pour la progression tumorale.

Enfin, et compte-tenu du fait qu'invalider HOXA9 entraîne l'augmentation de l'expression de *BMP2* décrit dans les cellules souches cancéreuses (CSC) rénales, nous nous sommes intéressés à la capacité des cellules à former des sphères. Nous avons dans un premier temps montré que l'expression d'*HOXA9* est significativement augmentée dans les tumorosphères formées comparativement à la culture en 2 dimensions sur plastique. Puis, nous avons montré que l'invalidation abolissait totalement la formation de tumorosphères.

Nous avons ensuite analysé l'effet de l'inhibition par les molécules DB818 et DB1055 et montré que le traitement entraînait la mort des cellules, notamment par apoptose. L'inhibition d'HOXA9, tout comme son invalidation, impacte la migration cellulaire.

5. Effets de l'invalidation d'HOXA9 sur la tumorigénicité *in vivo*

Afin de déterminer le rôle d'HOXA9 *in vivo* dans les carcinomes rénaux, nous avons généré les lignées 786-OLuc et CAKI-2Luc par transduction lentivirale du gène de la luciférase dans les lignées 786-O et CAKI-2, permettant ainsi le suivi de la masse tumorale au cours du temps.

Nous avons choisi d'utiliser un modèle d'implantation orthotopique afin d'améliorer la croissance tumorale et de reproduire le micro-environnement du cancer du rein (Ruggeri *et al.*, 2014). Pour permettre l'implantation sans rejet par le système immunitaire murin, nous avons implanté les cellules à des souris immunodéficientes NOD.Cg-Prkdc^{scid} Il2rg^{tm1WjI}/SzJ ou NSG *(NOD scid gamma*). Ces souris présentent la mutation Prkdc^{scid} (*severe combined immunodeficiency*) empêchant la maturation des lymphocytes T et B, et une mutation du gène de la chaîne gamma du récepteur de l'IL-2 (Il2rg^{tm1Wj}) bloquant la signalisation de nombreuses cytokines et entraînant une déficience en cellules de l'immunité innée notamment (cellules NK, macrophages, cellules dendritiques). Il s'agit d'un des modèles murins les plus immunodéficients et par conséquent le plus utilisé en cancérologie (Shultz *et al.*, 2010).

Différents groupes de souris ont donc reçu les cellules invalidées ou non pour HOXA9 et le suivi de la croissance tumorale a été réalisé par imagerie de bioluminescence 10 minutes après injection du substrat de la luciférase, la D-luciférine (150 mg/kg). Pour les deux lignées 786-OLuc et CAKI-2Luc, nous avons évalué l'effet de l'invalidation d'HOXA9 sur la formation de tumeurs et la croissance tumorale.

5.1. Tumorigénicité de la lignée 786-O après invalidation d'HOXA9

5.1.1. Suivi de la tumorigénicité par imagerie de bioluminescence

Pour la lignée 786-OLuc, nous avons injecté les cellules invalidées ou non pour HOXA9 chirurgicalement au niveau du pôle inférieur du rein gauche de souris NSG. Brièvement, sous anesthésie et analgésie, le rein gauche est extériorisé de la cavité abdominale au niveau de la région dorsale gauche de la souris et les cellules injectées dans le parenchyme à 1 mm de la capsule rénale très lentement et délicatement à l'aide d'aiguilles à insuline. Après cautérisation en cas de saignement, la paroi abdominale est suturée et la peau des souris fermée à l'aide de clips. Les souris sont laissées dans leur

cage récupérer de la chirurgie. La première imagerie est réalisée le lendemain, permettant de confirmer la localisation des cellules et l'absence de fuite à l'injection.

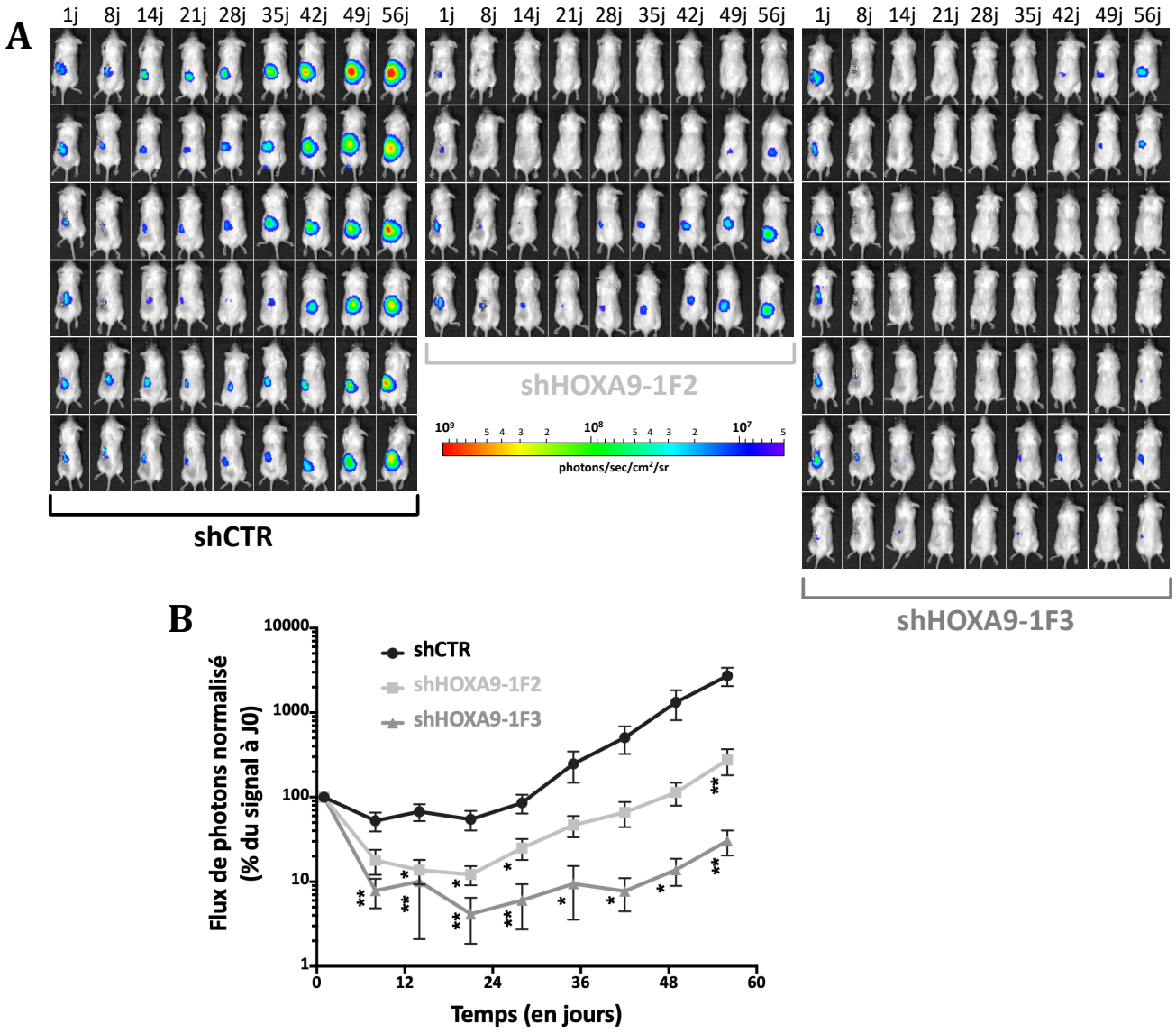


Figure 60 : **Suivi de la croissance tumorale de la lignée 786-OLuc après invalidation d'HOXA9 et implantation orthotopique rénale**. **A**. Images représentatives des signaux de luminescence mesurés au cours du temps. **B**. Quantification du flux de photons total normalisé par le signal du J0. n=5 à 7 souris/condition, moyenne +/- SEM, Student t-test non apparié (shHOXA9 vs shCTR), * p<0,05, ** p<0,01.

Dans la lignée 786-OLuc implantée orthotopiquement, l'invalidation d'HOXA9 entraîne une diminution de la croissance tumorale (Figure 60). En effet, les signaux des souris ayant reçu les cellules invalidées pour HOXA9 diminuent rapidement, en comparaison avec les cellules exprimant le shCTR qui restent stables et augmentent rapidement. La différence significative maximale est observée à 56 jours post-implantation des cellules.

5.1.2. Aspects macroscopiques et microscopiques

Au sacrifice 58 jours après implantation des cellules, nous avons récupéré les reins gauches des différentes souris et avons réalisé une analyse macroscopique suivie d'une analyse histologique par coloration HE pour déterminer s'il existait microscopiquement une tumeur.

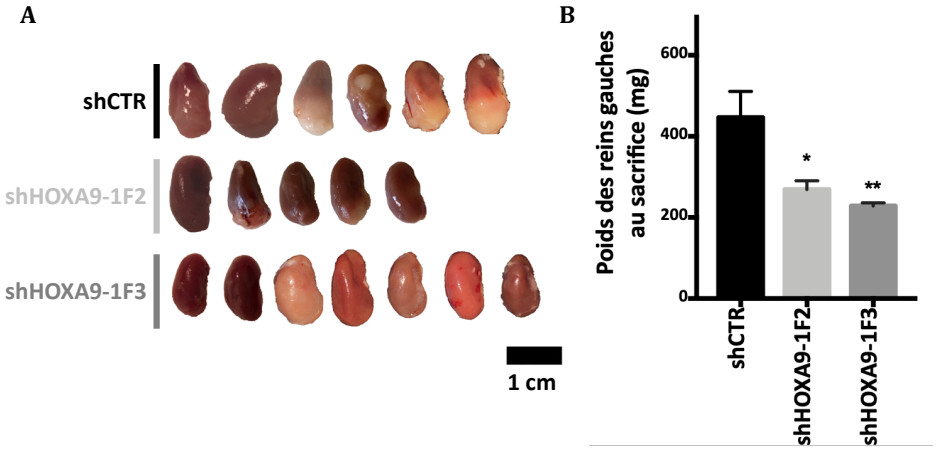


Figure 61 : **Tumorigénicité *in vivo* de la lignée 786-OLuc après invalidation d'HOXA9**. **A**. Aspects macroscopiques des reins gauches au sacrifice. **B**. Poids des reins gauches au sacrifice. n=5 à 7 souris/condition, moyenne +/- SEM, Student t-test non apparié (shHOXA9 vs shCTR), * p<0,05, ** p<0,01.

Avec la lignée 786-OLuc, l'invalidation d'HOXA9 empêche la formation d'une tumeur macroscopiquement distinguable (Figure 61A). Les tumeurs obtenues dans la condition shCTR sont des tumeurs solides de couleur claire, en accord avec les tumeurs de type carcinome rénal à cellules claires (ccRCC). L'invalidation d'HOXA9 entraîne une diminution du poids des reins au sacrifice qui en moyenne passe de 450 mg pour la condition shCTR à 270 mg pour la condition shHOXA9-1F2 et 230 mg pour la condition shHOXA9-1F3 (Figure 61B), soit le poids d'un rein normal pour des souris âgées d'environ 15 semaines.

Pour confirmer au niveau microscopique l'absence de tumeur, nous avons fixé les reins après sacrifice, réalisé des coupes puis des colorations HE (hématoxyline-éosine). Ainsi, avec le shCTR, nous avons observé des tumeurs d'aspect histologique caractéristique du ccRCC tandis que les cellules invalidées par shRNA contre l'ARNm d'*HOXA9* n'ont pas formé de tumeur (Figure 62). Par ailleurs, ici pour la condition shHOXA9-1F3, le point d'injection des cellules est bien visible et quelques cellules résiduelles tumorales sont présentes.

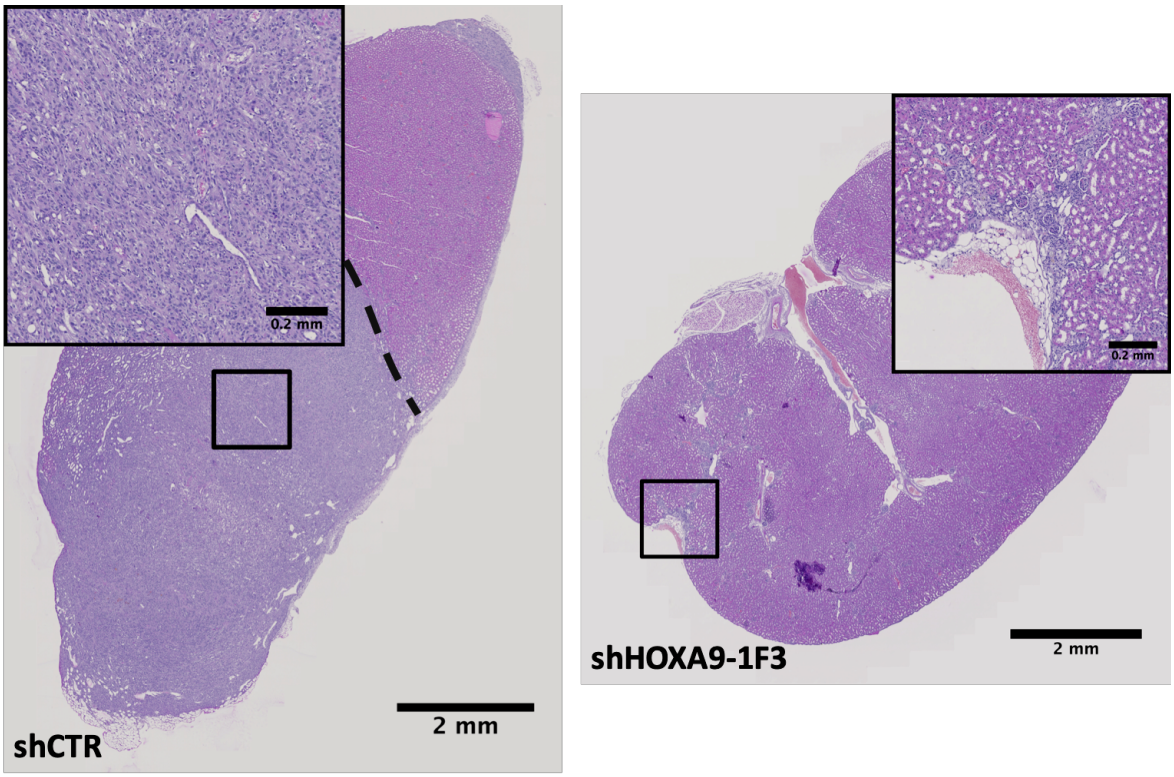


Figure 62 : **Images représentatives de l'histologie des reins 58 jours après implantation de cellules 786-OLuc invalidées (shHOXA9-1F3) ou non (shCTR) pour HOXA9**. Sur la coupe shCTR, le trait pointillé représente la limite entre tissu sain et tissu tumoral. Coloration Hématoxyline-Eosine. Les coupes complètes ont été numérisées à l'objectif x20.

5.2. Tumorigénicité de la lignée CAKI-2 après invalidation d'HOXA9

5.2.1. Suivi de la tumorigénicité par imagerie de bioluminescence

Pour la lignée CAKI-2Luc, nous avons injecté les cellules invalidées ou non pour HOXA9 à l'aide du shHOXA9-1F3 sous la capsule rénale et nous avons suivi la croissance tumorale par imagerie de bioluminescence. Comme précédemment, les mesures des signaux de luminescence ont été débutées le lendemain de la chirurgie.

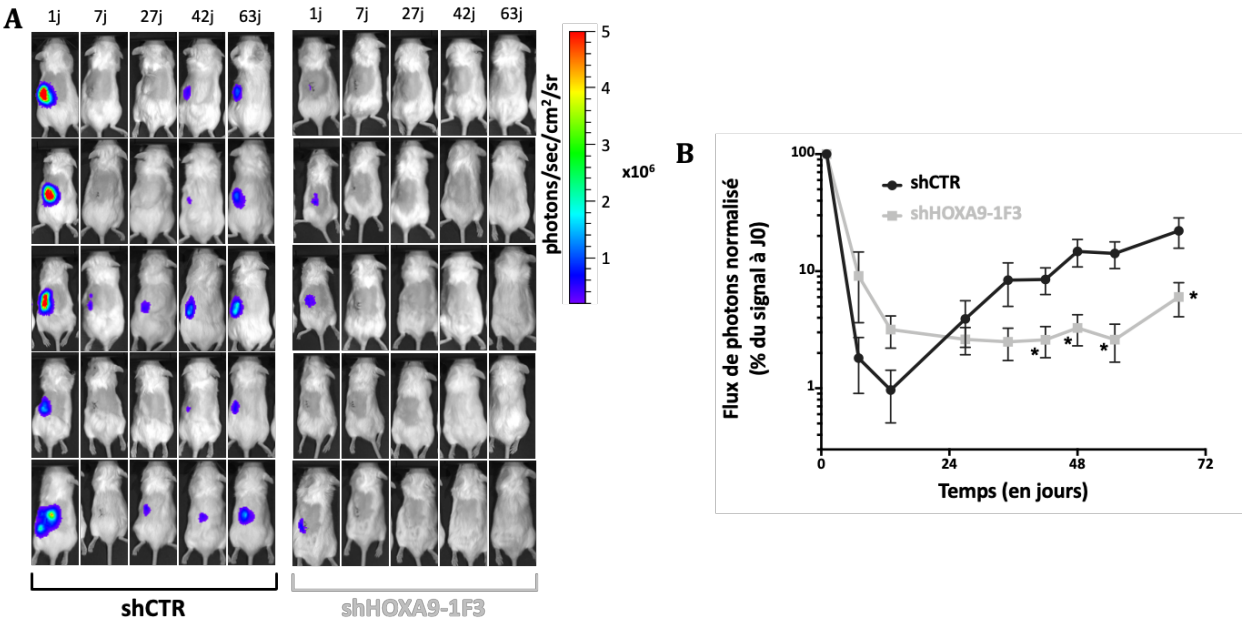


Figure 63 : **Suivi de la croissance tumorale de la lignée CAKI-2Luc après invalidation d'HOXA9 et implantation orthotopique rénale. A.** Images représentatives des signaux de luminescence mesurés au cours du temps. **B.** Quantification du flux de photons total normalisé par le signal du J0. n=5 souris/condition, moyenne +/- SEM, Student t-test non apparié (shHOXA9 vs shCTR), * p<0,05, ** p<0,01.

La lignée CAKI-2 est un modèle cellulaire qui prolifère moins rapidement que la lignée 786-O expliquant des résultats moins tranchés. Néanmoins, nous avons pu montrer que l'invalidation d'HOXA9 avec le shHOXA9-1F3 impacte significativement la croissance tumorale et ce dès 42 jours post-implantation (Figure 63).

5.2.2. Aspects macroscopiques et microscopiques

Au sacrifice 68 jours après implantation des cellules, nous avons récupéré les reins gauches des différentes souris et avons réalisé une analyse macroscopique suivie d'une analyse histologique par coloration HE (hématoxyline-éosine) pour déterminer s'il existait microscopiquement une formation tumorale.

Figure 64 : **Tumorigénicité *in vivo* de la lignée CAKI-2 après invalidation d'HOXA9. Aspects macroscopiques des reins gauches au sacrifice.**

Macroscopiquement, les reins ayant reçu les cellules invalidées pour HOXA9 à l'aide du shHOXA9-1F3 ne présentent pas de tumeur, contrairement aux reins ayant reçu les cellules exprimant le shCTR (Figure 64). Les tumeurs obtenues sont des tumeurs solides et kystiques, de taille importante.

Comme pour la lignée 786-O, nous avons confirmé ces résultats au niveau microscopique par fixation des reins après sacrifice, coupe et coloration HE (hématoxyline-éosine).

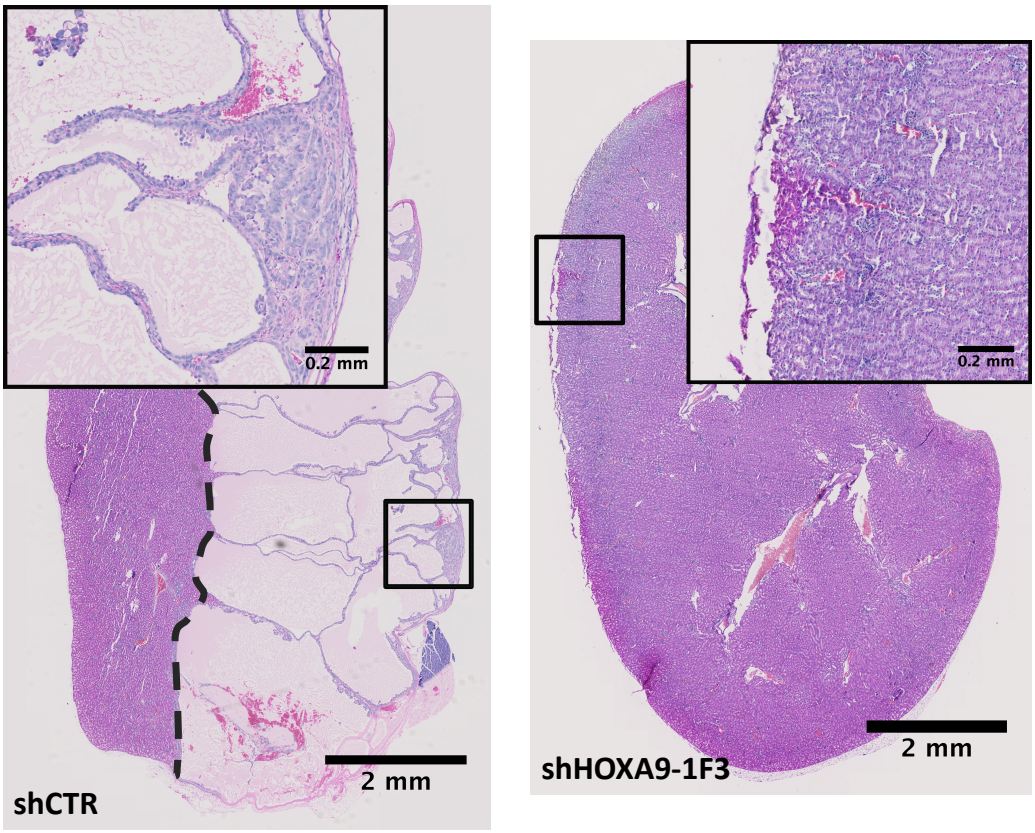


Figure 65 : **Images représentatives de l'histologie des reins 58 jours après implantation de cellules CAKI-2Luc invalidées (shHOXA9-1F3) ou non (shCTR) pour HOXA9**. Sur la coupe shCTR, le trait pointillé représente la limite entre tissu sain et tissu tumoral. Coloration Hématoxyline-Éosine. Les coupes complètes ont été numérisées à l'objectif x20.

Microscopiquement, il n'y a aucune trace de tumeur avec les cellules exprimant le shHOXA9-1F3. Avec les cellules exprimant le shCTR, nous avons observé des tumeurs volumineuses constituées de papilles délimitant des kystes liquidiens bordés de cellules tumorales (Figure 65) pouvant être caractéristiques du carcinome rénal papillaire.

CONCLUSION PARTIE 5

In vitro, nous avons montré qu'HOXA9 est requis pour la survie cellulaire de deux lignées cellulaires de carcinome à cellules rénales et qu'il pourrait être impliqué dans la régulation des cellules souches cancéreuses souvent caractérisées comme les cellules initiatrices de tumeurs. Pour ces raisons, nous avons évalué la capacité des cellules dans lesquelles l'expression d'HOXA9 a été diminuée par shRNA à former des tumeurs chez la souris lorsqu'elles sont implantées de façon orthotopique.

L'invalidation d'HOXA9 dans les deux modèles étudiés impacte la tumorigénicité comme démontré par le suivi de bioluminescence. Les analyses histologiques que nous avons réalisé sur les reins après sacrifice des souris confirment une absence complète de tumeur lorsqu'HOXA9 est invalidé par shRNA.

6. Impact de l'invalidation d'HOXA9 sur un modèle métastatique pulmonaire du carcinome rénal

Pour évaluer si le ciblage de l'interaction à l'ADN d'HOXA9 par les composés DB818 et DB1055 pourrait représenter à terme une option thérapeutique pertinente pour la prise en charge des patients au stade métastatique, nous sommes intéressés au rôle d'HOXA9 dans la formation de métastases pulmonaires, le plus fréquent site métastatique du ccRCC (Schlesinger-Raab *et al.*, 2008). Dans plusieurs types de cancer, de nombreuses études décrites dans la littérature montrent qu'il est possible de reproduire expérimentalement une formation métastatique pulmonaire par injection de cellules tumorales dans la circulation sanguine *in vivo*, notamment par injection intraveineuse dans la veine caudale.

Nous nous sommes basés sur les données de la littérature et sur le fait que la lignée 786-O est capable de former à long terme des tumeurs pulmonaires après injection intraveineuse et en particulier, certaines sous-populations de cette lignée (Vanharanta *et al.*, 2013).

6.1. Génération et caractérisation du modèle métastatique pulmonaire

Pour sélectionner ces sous-populations et générer un modèle cellulaire capable de former des métastases par colonisation pulmonaire rapidement, nous avons injecté par voie intraveineuse un faible nombre de cellules 786-OLuc (400.000 cellules) à des souris que nous avons sacrifiées après 5 mois.

Au sacrifice, les souris présentaient plusieurs tumeurs pulmonaires que nous avons récupérées et dissociées mécaniquement. Les cellules ont été remises en culture pendant quelques jours avant d'être sélectionnées sur leur résistance à la puromycine co-transduite avec le gène de la luciférase.

Dans un premier temps, nous avons comparé la capacité d'une population obtenue, appelée ici 786-OLucM1, à coloniser les poumons de souris, en comparaison avec la lignée parentale 786-OLuc. Pour cela, les cellules ont été injectées à une souris par voie intraveineuse et suivies par bioluminescence.

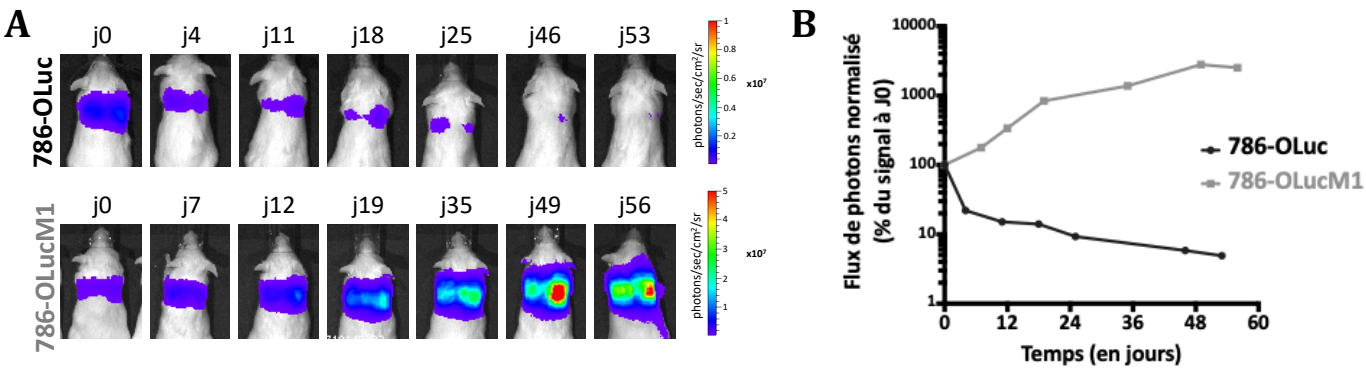


Figure 66 : **Comparaison des capacités de colonisation pulmonaire de la lignée parentale 786-OLuc et de sa population dérivée 786-OLucM1**. **A.** Images représentatives des signaux de luminescence mesurés au cours du temps. **B.** Quantification du flux de photons total normalisé par le signal du J0. n=1 souris.

Contrairement à la lignée parentale 786-OLuc, la population métastatique dérivée 786-OLucM1 est capable de coloniser les poumons des souris de façon rapide et croissante au cours du temps (Figure 66).

Nous avons confirmé ces résultats par l'analyse histologique des poumons au sacrifice.

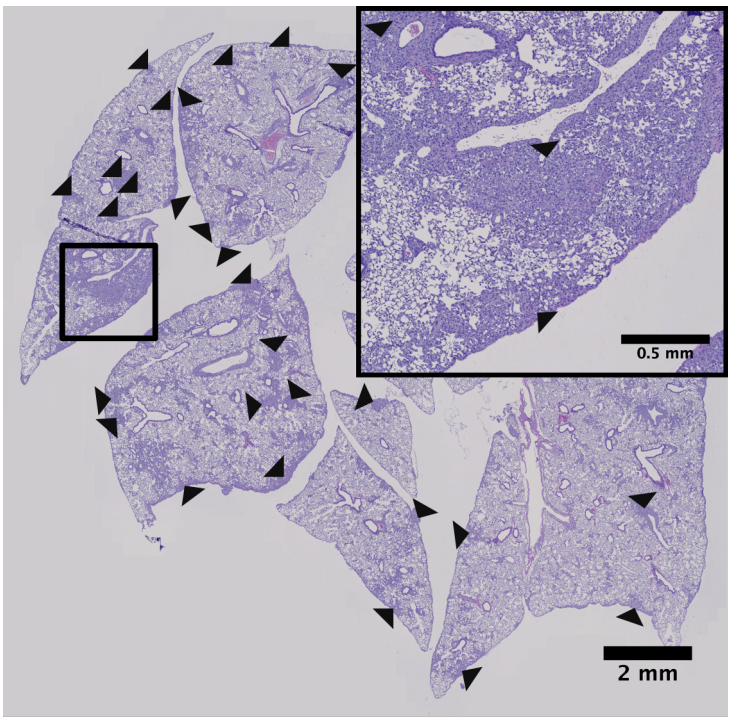


Figure 67 : **Histologie des poumons d'une souris après injection intraveineuse des cellules 786-OLucM1**. Les flèches désignent des tumeurs pulmonaires et des cellules disséminées. Coloration Hématoxyline-Éosine. Les coupes complètes ont été numérisées à l'objectif x20.

Microscopiquement, les poumons des souris injectées de cellules 786-OLucM1 présentent une colonisation importante et de très nombreuses tumeurs disséminées (Figure 67).

6.2. Expression d'HOXA9 dans la population métastatique générée

Dans un second temps, nous avons évalué sur la population dérivée 786-OLucM1 l'expression d'HOXA9 par q-RT-PCR en comparaison avec la lignée parentale 786-OLuc.

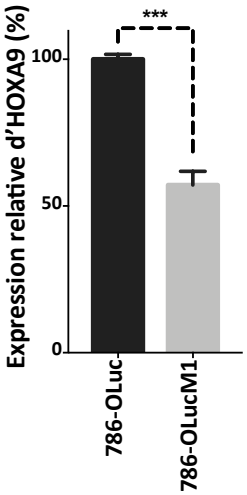


Figure 68 : **Expression d'*HOXA9* dans la population dérivée 786-OLucM1**.
L'expression d'*HOXA9* est calculée relativement à l'expression dans la lignée parentale 786-OLuc par q-RT-PCR. n=3, moyenne +/- SEM, Student t-test non apparié, *** p<0,001.

De manière inattendue, l'expression d'*HOXA9* est diminuée de moitié dans la population métastatique 786-OLucM1, comparativement à la lignée parentale (Figure 68).

6.3. Impact de l'invalidation d'HOXA9 sur les métastases pulmonaires du carcinome rénal

L'effet de l'invalidation d'HOXA9 sur la capacité du modèle métastatique généré à coloniser les poumons et former des métastases pulmonaires a été étudié. Pour cela, nous avons infecté les cellules 786-OLucM1 avec les lentivirus permettant l'expression des deux shRNAs ciblant HOXA9 et du shCTR, cellules que nous avons ensuite injectées par voie intraveineuse à des souris immunodéficientes. Le suivi de la localisation et de la formation de métastases pulmonaires a été réalisé par imagerie de bioluminescence.

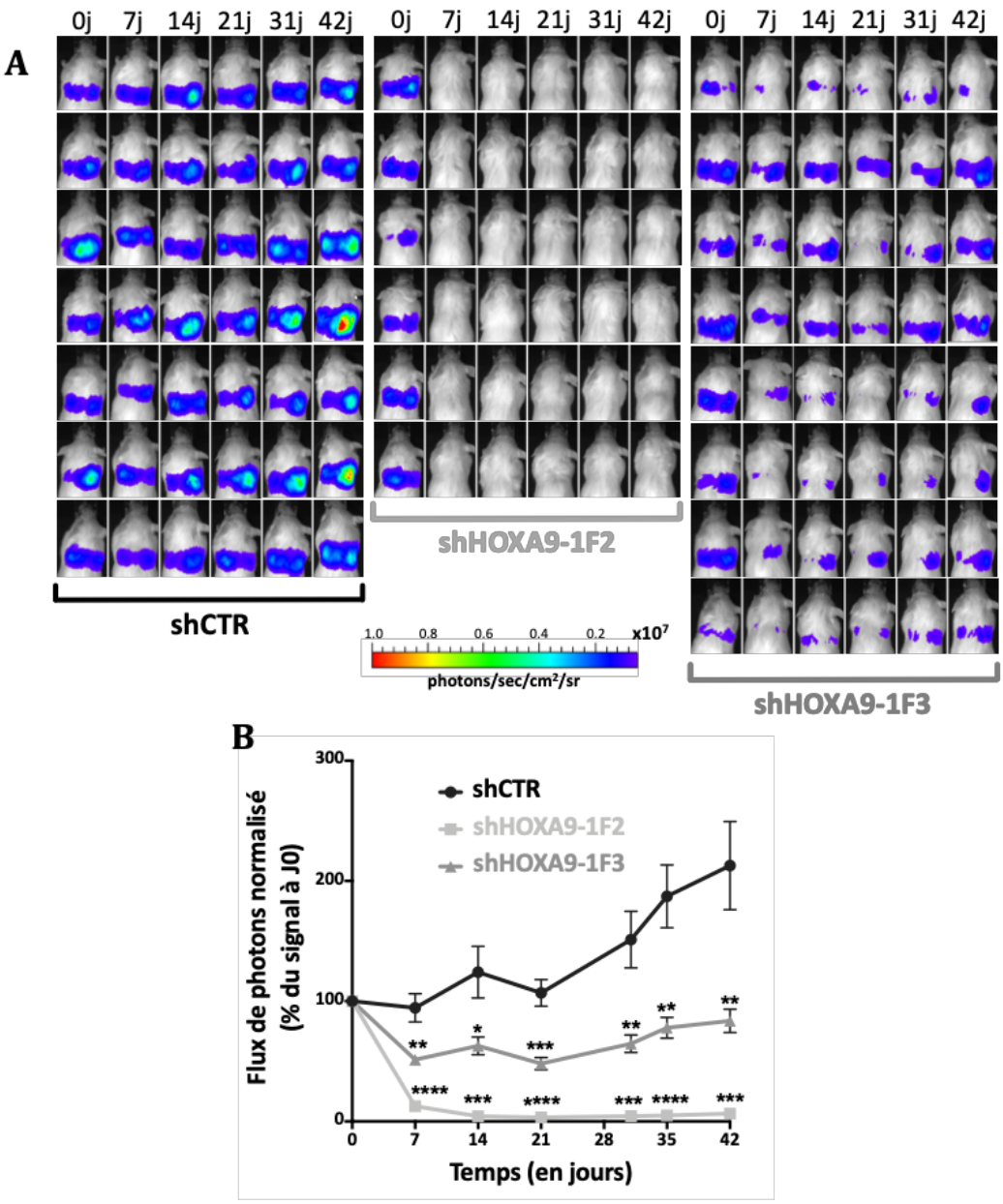


Figure 69 : **Impact de l'invalidation d'HOXA9 sur la colonisation pulmonaire et la formation de métastases pulmonaires**. **A**. Images représentatives des signaux de luminescence mesurés au cours du temps. Les images ne présentent que la zone pulmonaire, aucun autre territoire bioluminescent n'ayant été détecté. **B**. Quantification du flux de photons total normalisé par le signal du J0. n=6 à 8 souris, moyenne +/- SEM, Student t-test non apparié (shHOXA9 vs shCTR), * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0.001, **** p<0,0001.

L'invalidation d'HOXA9 diminue fortement la colonisation pulmonaire et la croissance cellulaire du modèle métastatique 786-OLucM1 (Figure 69). La diminution du signal observée est significative dès 7 jours avec les shHOXA9-1F2 et shHOXA9-1F3 et se maintient au cours du temps.

Pour confirmer ces résultats, nous avons analysé la bioluminescence émise par les poumons *ex vivo* après administration de luciférine aux souris 10 minutes avant leur sacrifice 53 jours après injection des cellules.

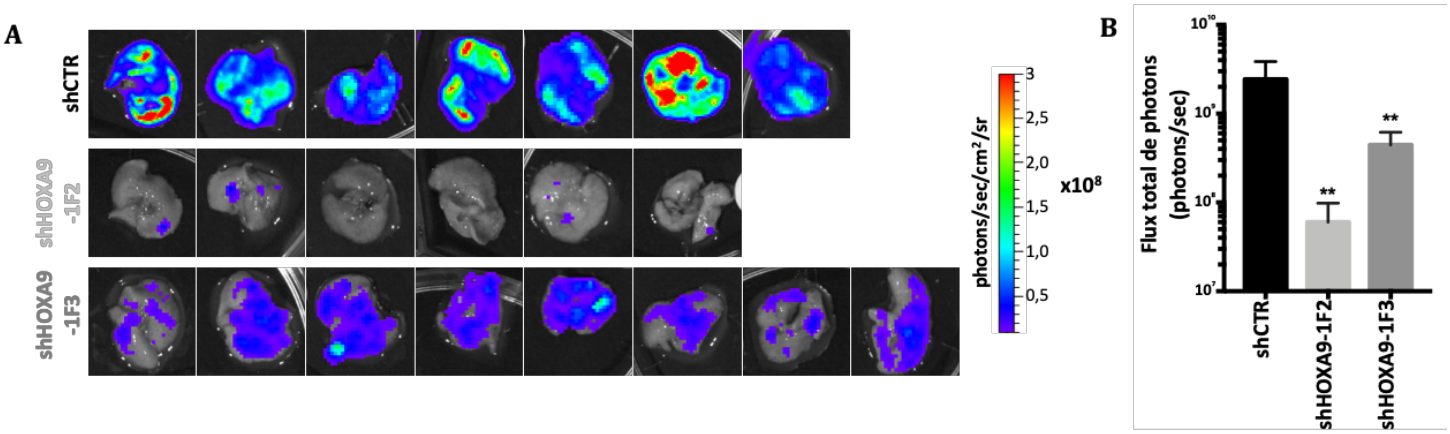


Figure 70 : **Bioluminescence émise par les poumons *ex vivo* après invalidation ou non d'HOXA9**. **A.** Images représentatives des signaux de luminescence mesurés au cours du temps. **B.** Quantification du flux de photons total normalisé. n=6 à 8 souris, moyenne +/- SEM, Student t-test non apparié (shHOXA9 vs shCTR), ** p<0,01.

Ex vivo, les poumons des souris injectées de cellules invalidées pour HOXA9 présentent des signaux de bioluminescence significativement réduits en comparaison aux souris ayant reçu les cellules exprimant le shCTR (Figure 70).

Enfin, nous avons confirmé également l'absence de tumeurs par analyse histologique des poumons des souris après coloration HE. Les poumons des souris ayant reçu les cellules exprimant le shCTR présentent des tumeurs pulmonaires en formation, disséminées dans tous les lobes pulmonaires, tandis qu'aucune tumeur pulmonaire n'a été visualisée dans les poumons des souris ayant reçu les cellules invalidées pour HOXA9 (Figure 71). Il est à noter qu'en accord avec les analyses par bioluminescence, quelques cellules résiduelles ont été retrouvées dans les poumons des souris ayant reçu les cellules exprimant le shHOXA9-1F3. Il s'agit probablement de cellules non infectées qu'il serait important de détecter par immunohistochimie avec un anticorps anti-GFP sur des coupes préparées.

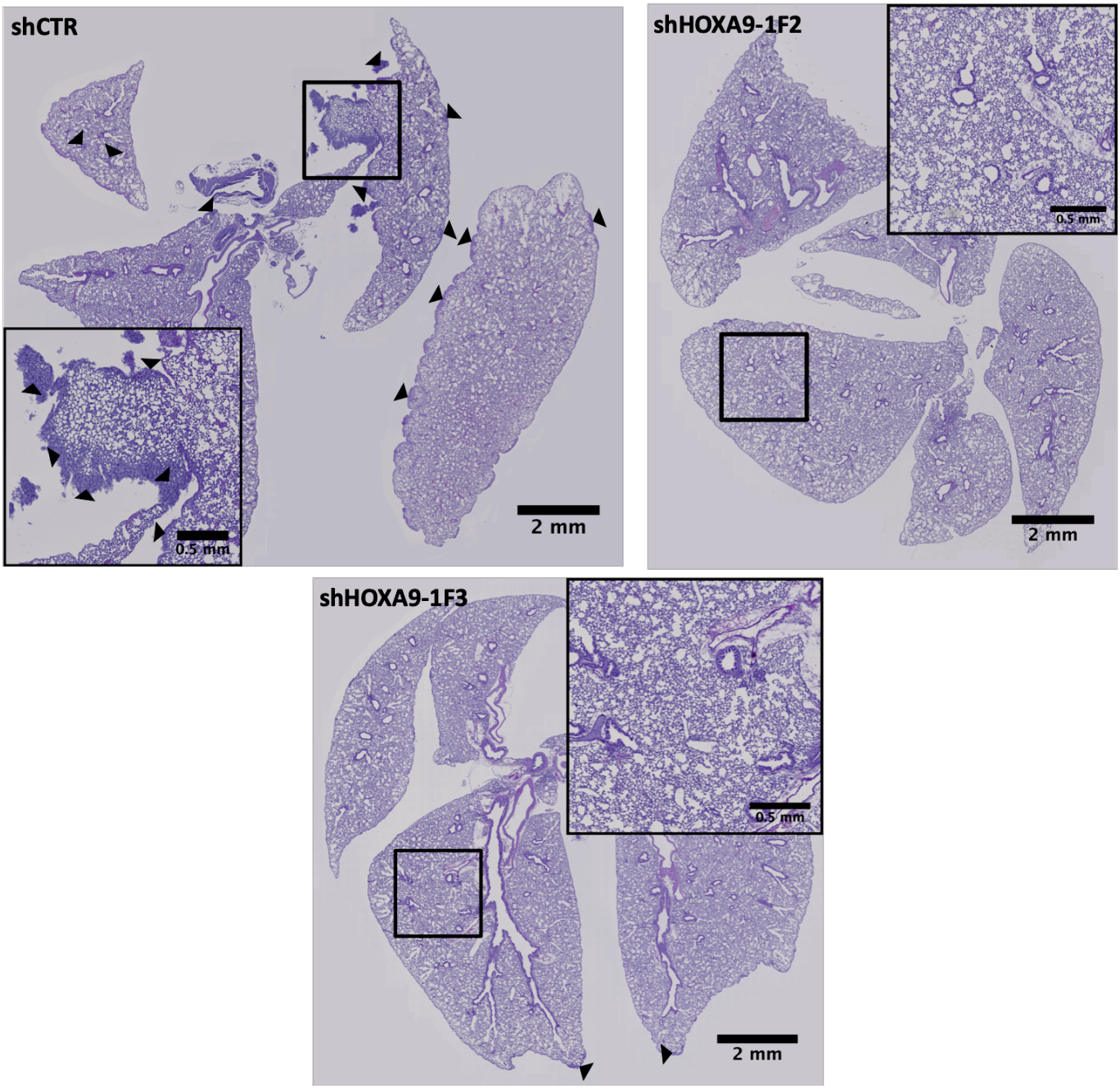


Figure 71 : **Images représentatives de l'histologie des poumons 53 jours après injection intraveineuse de cellules 786-OLucM1 invalidées (shHOXA9-1F2 et shHOXA9-1F3) ou non (shCTR) pour HOXA9**. Les flèches représentent les zones où des cellules tumorales ont été visualisées. Coloration Hématoxyline-Éosine. Les coupes complètes ont été numérisées à l'objectif x20.

6.4. Sensibilité aux composés DB818 et DB1055

Enfin, nous avons ensuite évalué la sensibilité par test MTS aux composés DB818 et DB1055 de la population 786-OLucM1 en comparaison à la lignée parentale. Les cellules au potentiel métastatique 786-OLucM1 qui expriment moins HOXA9 semblent

plus sensibles à l'inhibition d'HOXA9 par le DB1055 que la lignée parentale 786-OLuc (Figure 72).

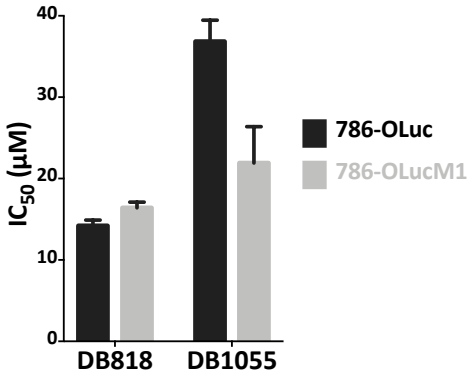


Figure 72 : **Sensibilité au DB818 et au DB1055 de la lignée parentale 786-OLuc et des cellules dérivées 786-OLucM1.** Les IC50 ont été déterminées par test MTS. n=2, moyenne +/- sd.

CONCLUSION PARTIE 6

Afin d'évaluer la potentialité du ciblage d'HOXA9 dans la prise en charge des patients présentant des métastases pulmonaires du carcinome rénal, nous avons généré un modèle de formation de tumeurs pulmonaires après injection intraveineuse de cellules 786-O. Ce modèle est capable, contrairement à la lignée parentale, de coloniser rapidement les poumons de souris après injection intraveineuse et de former en quelques semaines des tumeurs pulmonaires.

Nous avons mis en évidence que dans ce modèle de métastases pulmonaires, l'expression d'HOXA9 est diminuée et qu'il est requis pour la colonisation des poumons et la formation de tumeurs, en faisant une cible d'intérêt pour la prise en charge des patients.

Enfin, nous avons mis en évidence, en lien avec une expression d'HOXA9 réduite, que les cellules 786-OLucM1 sont plus sensibles aux composés DB818 et DB1055 que la lignée parentale.

7. Évaluation de la toxicité potentielle *in vivo* des composés DB818 et DB1055

Pour une potentielle utilisation en clinique, et compte-tenu du fait que les gènes *HOX* et particulièrement *HOXA9* sont exprimés dans plusieurs tissus normaux, nous avons réalisé une étude de la toxicité des composés DB818 et DB1055 *in vivo* par dosage de différents paramètres. Ces paramètres ont été évalués sur des souris C57Bl/6 après 3 administrations de DB818 et DB1055 à la dose de 30 mg/kg par voie intrapéritonéale, espacées chacune d'une journée sans traitement (Figure 73).

Pour analyser l'hématotoxicité, des numérations sanguines ont été réalisées à jours 8 et 15 (Figure 73). Pour la néphrotoxicité, des dosages de créatinine et d'urée plasmatique ont été réalisés à jour 8 (Figure 73). Enfin, pour la toxicité hépatique, des dosages des taux de transaminases (aspartate aminotransférase ASAT et alanine aminotransférase ALAT) ont été réalisés à jour 8 (Figure 73).

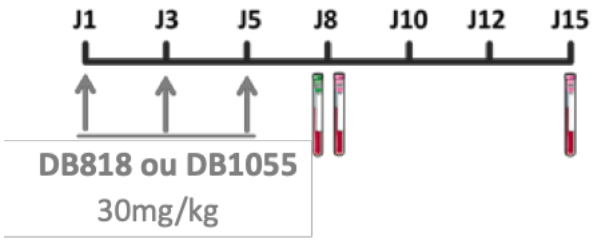


Figure 73 : **Schéma de traitement et d'analyse de la toxicité des DB818 et DB1055**.

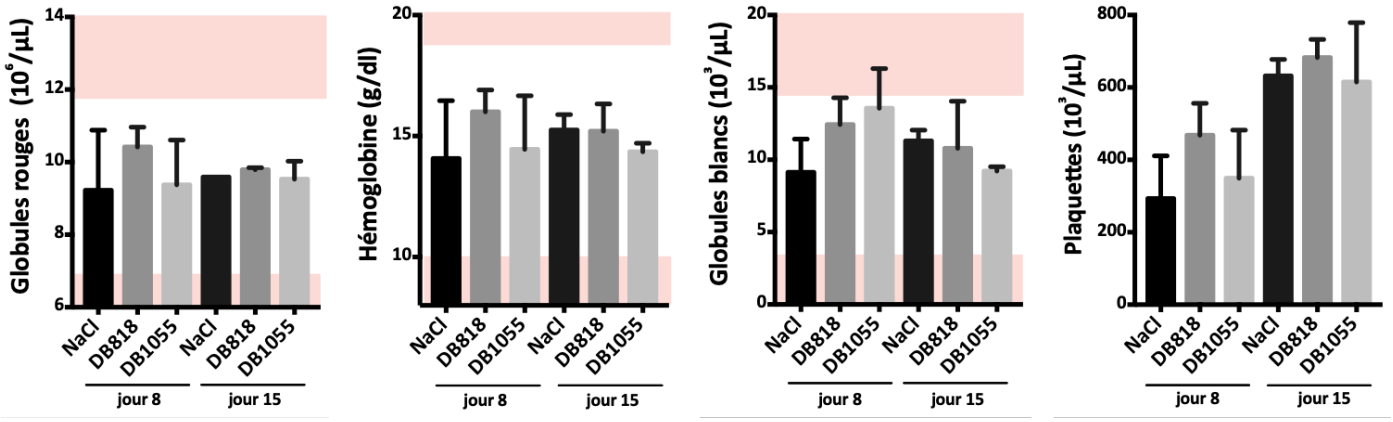


Figure 74 : **Numérations sanguines de souris C57Bl/6 après 3 administrations de DB818 et DB1055**. Les barres roses représentent les valeurs usuelles couramment admises pour les souris C57Bl/6. n=4 souris.

In vivo, le traitement par les composés DB818 et DB1055 à 30 mg/kg ne modifie pas la formule sanguine des souris (Figure 74). L'analyse une semaine après la fin du traitement, à jour 15, ne montre pas non plus de toxicité.

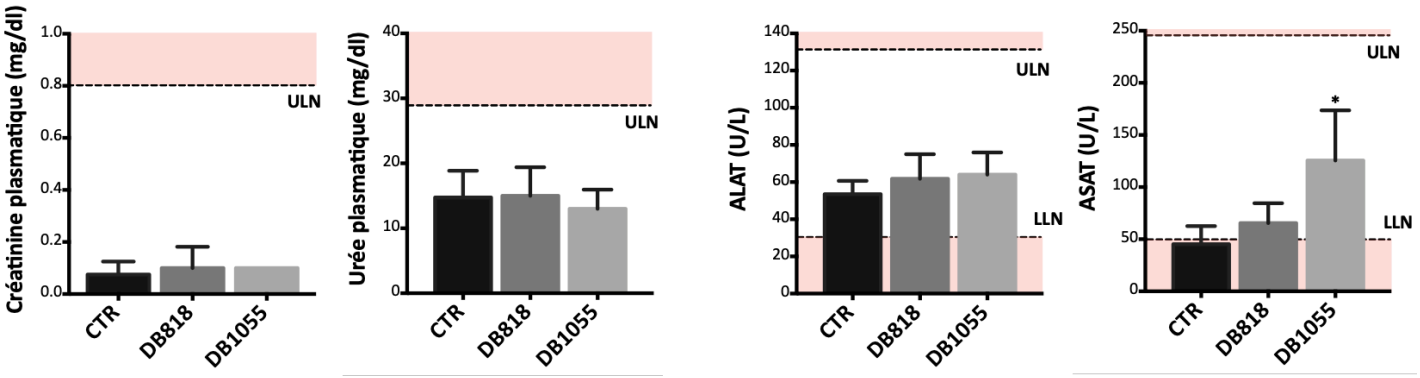


Figure 75 : **Fonctions rénale et hépatique de souris C57Bl/6 après 3 administrations**. Les mesures ont été réalisées à jour 8. n=4 souris, moyenne +/ SEM, Student t-test, * p<0,05. ULN : valeur normale supérieure, LLN : valeur normale inférieure

Le traitement n'impacte pas les fonctions rénales, noté par l'absence d'augmentation des taux de créatinine plasmatique et d'urée sanguine (Figure 75, panel de gauche). De même, aucune toxicité hépatique à type de cytolyse n'a été détectée avec des taux d'ASAT et ALAT qui restent dans les valeurs usuelles normales (Figure 75, panel de droite). L'ASAT est significativement augmentée après le traitement au DB1055, mais le taux reste dans les valeurs usuelles.

CONCLUSION PARTIE 7

Les anticancéreux présentant des toxicités importantes de tout type, nous avons évalué la toxicité induite *in vivo* par le traitement avec les composés DB818 et DB1055 de souris C57BL/6.

Que ce soit au niveau hématopoïétique, rénal ou hépatique, aucune toxicité n'a été observée après 3 administrations à la dose de 30 mg/kg, dose couramment utilisée et efficace dans le modèle des LAM. Ces mesures justifient la potentialité du ciblage d'HOXA9, sans que le traitement par les inhibiteurs ne semble impacter la fonction des organes adultes.

DISCUSSION & PERSPECTIVES

Le carcinome rénal est un cancer qui a fait l'objet d'un nombre important de découvertes thérapeutiques ayant permis de révolutionner les stratégies de prise en charge particulièrement chez les patients au stade métastatique. C'est par exemple le cas avec le développement des thérapies ciblant l'angiogenèse comme le sunitinib (Motzer *et al.*, 2007) ou des immunothérapies comme le nivolumab (Motzer *et al.*, 2015). Malgré cela, ces thérapies recommandées aujourd'hui présentent des taux de réponse qui ne dépassent pas les 30 à 40% avec des gains de survie modestes. Comme dans la plupart des cancers, l'évolution des connaissances permet d'imaginer de nouvelles cibles thérapeutiques exploitables pour la prise en charge des patients.

C'est dans cet objectif que s'est inscrit mon projet de thèse. Ainsi, il s'agissait d'évaluer le rôle du facteur de transcription HOXA9 et d'identifier si son inhibition par les composés DB818 et DB1055, composés préalablement identifiés comme inhibiteurs d'HOXA9, pourrait représenter une stratégie thérapeutique envisageable pour les patients atteints de carcinome rénal.

Les gènes *HOX* au cours de la vie du rein

Les facteurs de transcription HOX sont les « master » régulateurs du développement et de la mise en place de l'axe antéro-postérieur (Montavon and Soshnikova, 2014). Leur expression est régulée temporo-spatialement selon un patron d'expression bien défini dont dépend l'emplacement et le développement correct des organes. A l'âge adulte, quelques-unes de leurs fonctions ont été identifiées, notamment dans des organes à renouvellement constant comme le tissu endométrial ou le colon (Bhatlekar *et al.*, 2014; Du and Taylor, 2016).

Lors du développement du rein, certains gènes *HOX* jouent un rôle prépondérant. Un grand nombre d'entre eux sont exprimés au cours de la néphrogénèse (Patterson and Potter, 2004; Magella *et al.*, 2018) . Pour préciser leur rôle, de nombreuses études de pertes de fonctions ont été réalisées sur des modèles murins. Bien qu'un grand nombre d'entre eux soit exprimé au cours du développement du rein, seules les pertes des paralogues *Hox10* et *Hox11* impactent la formation de l'organe en aboutissant à la formation de structures normales mais présentant des infidélités de lignées, l'absence totale de reins, ou encore la formation de structures kystiques (Drake *et al.*, 2018; Magella *et al.*, 2018). Ici, la redondance fonctionnelle des gènes *HOX* est particulièrement présente puisque des mutations seules d'*Hoxa11* (Small and Potter, 1993) ou d'*Hoxd11* (Davis and Capecchi, 1994) aboutissent à la formation de reins normaux tandis que la mutation des deux aboutit à la formation de reins hypoplasiques (Patterson *et al.*, 2001) et la perte des

trois paralogues *Hox11* au blocage total de la formation des reins (Wellik *et al.*, 2002). Aucune étude n'a par ailleurs montré un rôle dans le développement du rein des seuls paralogues *HOX9*.

Dans le rein adulte, certains gènes *HOX* restent exprimés mais rien n'est connu quant à leur rôle fonctionnel dans la fonction ou le maintien de l'intégrité de cet organe. Plusieurs gènes peuvent être sous-exprimés ou sur-exprimés dans les cas de cancer. C'est le cas d'*HOXC11* qui est sur-exprimé et régule la prolifération cellulaire dans la lignée CAKI-2 (Liu *et al.*, 2015). *HOXA9*, lui, continue d'être exprimé par le rein normal adulte (Figure 24) et a fait l'objet d'études décrivant sa surexpression dans les tissus cancéreux et certaines lignées cellulaires en comparaison avec du tissu normal (Shears *et al.*, 2008).

A l'aide de la base de données TCGA (*The Cancer Genome Atlas*), nous avons ainsi identifié que l'expression d'*HOXA9* était modulée dans le carcinome à cellules rénales, avec un spectre d'expression plus large que dans le tissu rénal normal. Nous avons pu noter que son expression était globalement augmentée dans le carcinome rénal papillaire (pRCC) (Figure 32) mais diminuée en considérant l'ensemble des carcinomes rénaux à cellules claires (ccRCC) (Figure 37) en comparaison au tissu sain. Dans ce cas, HOXA9 peut-il représenter une bonne cible thérapeutique dans le ccRCC ? Tout d'abord, les données du TCGA montrent qu'*HOXA9* reste exprimé et que certains patients présentent des amplifications de la région d'HOXA9 en lien avec une expression augmentée (Figure 38), et ceci comme décrit dans la littérature (Kuroda *et al.*, 2010). De plus, nous avons montré à l'aide des données cliniques que les patients exprimant le plus *HOXA9* présentaient une survie diminuée justifiant son potentiel ciblage (Figure 39). De manière tout à fait intéressante, nous avons mis en évidence que la survie était significativement diminuée chez les patients exprimant le plus *HOXA9* de façon spécifique aux patients mutés pour le gène *VHL*. Dans le ccRCC, *HOXA9* n'est donc a priori pas impliqué dans le développement du cancer mais plutôt dans sa progression.

Dans le pRCC, nous avons mis en évidence qu'HOXA9 est surexprimé en lien avec des amplifications du chromosome 7 (Figure 33, 34) et notamment de la région du gène *MET*, retrouvées fréquemment dans ce type histologique (The Cancer Genome Atlas Research Network *et al.*, 2016). Des études confirment ces observations avec des amplifications fréquentes du bras court du chromosome 7 où se situe le locus du gène *HOXA9* (Jiang *et al.*, 1998).

D'autres mécanismes sont à l'origine de la régulation de l'expression d'*HOXA9*. Parmi eux, les effecteurs épigénétiques sont ceux les plus décrits et dérégulés dans le cancer. Dans le carcinome rénal, plusieurs hypothèses expliquant la dérégulation de

l'expression d'*HOXA9* et plus généralement des gènes *HOX* ont été décrites. C'est par exemple le cas du long ARN non codant HOTTIP, un régulateur connu de l'expression d'*HOXA9*, qui est surexprimé dans le carcinome à cellules rénales et régule la croissance cellulaire, la survie cellulaire ou la progression tumorale (Peng *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2018).

Des différences de niveaux de méthylation du promoteur d'*HOXA9* entre les différents types confirment également les différences d'expression que nous avons observées, avec des niveaux de méthylation globalement significativement diminués entre les tumeurs bénignes (oncocytomes) et les tumeurs malignes, et plus précisément significativement diminués dans le type papillaire en comparaison avec le type à cellules claires (Pires-Luís *et al.*, 2017).

Les gènes *HOX* sont des acteurs principaux de la morphogenèse rénale. Pour autant et bien qu'il soit exprimé, aucune étude n'a pour l'heure montré le rôle spécifique d'HOXA9 dans la fonction normale du rein adulte. Par ailleurs, sa dérégulation dans le carcinome rénal est clairement établie et repose sur des modifications épigénétiques responsables du contrôle de son expression. Nous avons de plus observé que l'expression d'HOXA9 dans le carcinome rénal à cellules claires est associé à une moindre survie chez les patients. L'utilisation d'échantillons tumoraux de patients nous permettrait de confirmer les résultats que nous avons obtenu par l'analyse de la base TCGA, notamment par détermination de l'expression d'*HOXA9* par PCR quantitative ou sur lames et la corrélation avec les données cliniques.

Invalider HOXA9 perturbe l'expression d'un panel important de gènes, entraîne la mort des cellules de RCC et abolit leur tumorigénicité : comment expliquer ces mécanismes ?

L'analyse transcriptomique suite à l'invalidation d'HOXA9 par ARN interférence a mis en évidence la dérégulation de l'expression de nombreux gènes (Figure 44). Par une analyse globale à l'aide du logiciel GSEA (*GeneSet Enrichment Analysis*), nous avons montré que les gènes dérégulés étaient associés à un *geneset* correspondant à l'activation de la voie du TNFα (Figure 45). Ces informations suggèrent le rôle répresseur d'HOXA9 de cette voie. L'expression du TNFα est par ailleurs augmentée seulement dans les cellules exprimant le shHOXA9-1F3, possédant une capacité d'invalidation plus importante que le shHOXA9-1F2. Les données de la littérature décrivent en revanche le TNFα comme étant un facteur de mauvais pronostic chez les patients atteints de carcinome rénal puisque son activation favoriserait la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) et ainsi la progression tumorale (Chuang *et al.*, 2008). Parmi les gènes dont l'expression était

modulée dans cette voie, certains ont des rôles oncogènes décrits, en contradiction avec nos données cellulaires sur les effets de l'invalidation d'HOXA9. C'est par exemple le cas de l'*heparin-binding EGF-like growth factor HBEGF* ou de l'*amphiregulin AREG*, tous deux des ligands du récepteur à l'EGF (Yotsumoto *et al.*, 2008; Zhou *et al.*, 2014; Xu *et al.*, 2016b; Wang *et al.*, 2017a).

En dehors de cette voie, nous avons observé la dérégulation d'un très grand nombre de gènes sans pouvoir identifier de voies ou fonctions spécifiques.

D'autres gènes particulièrement intéressants dans le contexte du carcinome rénal ont été mis en évidence par l'analyse transcriptomique. C'est le cas de *BMP2* (*bone morphogenetic protein 2*) que nous avons identifié comme exprimé plus fortement après invalidation d'HOXA9. BMP2 est une protéine de la famille du TGF-β (*transforming growth factor β*) dont le rôle principal consiste en la formation du tissu osseux au cours du développement et en la régénération osseuse (Rosen, 2009). Dans le carcinome rénal, il a été mis en évidence que *BMP2* était inactivé par des mécanismes épigénétiques et que cette inactivation corrélait avec un mauvais pronostic chez les patients (Mitsui *et al.*, 2015). De plus, une autre étude a montré le potentiel de BMP2 à impacter les cellules souches cancéreuses et leur capacité de formation de tumeur (Wang *et al.*, 2012). Notre analyse a montré, en accord avec ces résultats, qu'HOXA9 régule l'expression de *BMP2* et que l'invalidation d'HOXA9 est capable d'empêcher la formation de tumorosphères, une caractéristique des cellules souches (Figure 55) et surtout d'abolir la formation de tumeurs *in vivo* (Figures 61,64). Nous avons également montré que cette régulation semble être directe puisqu'HOXA9 est capable de se fixer sur des séquences spécifiques de la région promotrice de *BMP2* (Figure 49). La régulation de *BMP2* par les gènes *HOX* a également été décrite dans le développement et plus particulièrement lors de la morphogenèse des membres où, dans ce cas de figure, le gène *HOXA13* est capable de réguler directement l'expression de *Bmp2* (Knosp *et al.*, 2004).

En dehors de la voie du TNFα, nous avons pu mettre en évidence la diminution de l'expression du VEGFA (*vascular endothelial growth factor A*) (Figure 47). Le VEGFA, cible de la voie VHL/HIF, dérégulée dans de nombreux cas de carcinome rénal, intervient dans les phénomènes d'angiogenèse et est d'ores et déjà la cible de thérapies utilisées en clinique (Rini *et al.*, 2009). Par ailleurs, la diminution de l'expression du VEGFA impacte directement les cellules 786-O, suggérant des rôles intrinsèques au sein de la cellule tumorale, différents de ceux de l'angiogenèse, bien décrits et reconnus (Zeng *et al.*, 2016).

Enfin, en s'intéressant aux gènes dont l'expression est la plus modifiée après invalidation d'HOXA9, nous avons retrouvé des gènes appartenant à deux grandes

familles : les sémaphorines et la famille ANKRD (*Ankyrin repeat domain containing*) (Figure 47).

Les sémaphorines sont des protéines dont le rôle initialement décrit était de guider la formation des axones durant la formation du système nerveux central. Dans le cancer, de très nombreuses sémaphorines sont dérégulées avec tantôt des rôles pro-tumorigènes tantôt des rôles anti-tumorigènes et sont capables de réguler, par des voies de signalisation pas clairement définies après fixation sur une variété importante de récepteurs, des phénomènes tels que la migration ou l'invasion cellulaire, l'angiogenèse ou l'organogenèse (Rehman and Tamagnone, 2013). Notre étude a identifié que les expressions des gènes *SEMA5B*, *SEMA6A* étaient diminuées après invalidation d'HOXA9 (Figure 47). Différentes études se sont intéressées aux rôles de ces sémaphorines dans le cancer. Dans le carcinome rénal, *SEMA5B* est surexprimé et il a été montré que son invalidation par ARN interférence impactait la survie cellulaire (Stassar *et al.*, 2001; Hirota *et al.*, 2006). Le rôle pro-tumoral de SEMA6A a également été décrit dans le glioblastome (Zhao *et al.*, 2015), le mélanome (Loria *et al.*, 2014) ou encore le carcinome de la cavité orale (Lim *et al.*, 2017).

Concernant les protéines de la famille ANKRD, très peu d'études ont décrit leurs fonctions. Il a par ailleurs été montré qu'ANKRD1, un facteur de transcription, était épigénétiquement inactivé dans plusieurs modèles cellulaires de cancer et qu'il possédait un rôle suppresseur de tumeur (Jiménez *et al.*, 2017), notamment par la co-régulation transcriptionnelle de *TP53* (Kojic *et al.*, 2010) et la stabilisation de p53 par la liaison à MDM2 ainsi que la diminution de son expression (Jiménez *et al.*, 2017). De façon intéressante, dans notre analyse par puces à ADN, *ANKRD1* est parmi les gènes les plus régulés positivement après invalidation d'HOXA9 (Figure 47) et nous avons montré que cette invalidation entraînait l'apoptose des cellules (Figure 57 et 58), un mécanisme décrit pour Ankrd1 en lien avec la régulation de p53 dans les cardiomyocytes de souris (Shen *et al.*, 2015).

Enfin, notre analyse nous a également permis d'identifier *FHL2* comme gène régulé par HOXA9 dans le ccRCC. En effet, son invalidation et les effets cellulaires observés vont dans le sens des données de la littérature qui le décrivent comme oncogène dans le glioblastome (Sun et al., 2018a) ou le cancer cervical où la diminution de son expression impacte la voie AKT/mTOR, très décrite dans le carcinome rénal (Jin *et al.*, 2018).

Par analyse transcriptomique, nous avons ainsi mis en évidence qu'HOXA9 régulerait directement ou indirectement l'expression de différents gènes impliqués dans le cancer rénal. Pour disséquer les mécanismes de régulation, différentes stratégies pourront être mises en œuvre. Dans le cas de BMP2 et pour aller plus loin sur

l'identification de sa potentielle régulation directe par HOXA9, des tests d'activité luciférase avec les séquences de la région promotrice de *BMP2* pourront être réalisés ainsi que des expériences d'empreinte à la DNase I afin de déterminer les séquences exactes de fixation d'HOXA9.

Pour confirmer les résultats, l'expérience idéale pour l'identification des gènes cibles directs de facteurs de transcription est l'analyse globale par ChIP-sequencing. Ces expériences, rendues difficiles par l'absence d'anticorps anti-HOXA9 suffisamment spécifique pourraient alors être réalisés à l'aide de formes taguées d'HOXA9 dans le modèle du carcinome rénal, comme cela a été réalisé tout récemment (Sun *et al.*, 2018b). Ces expériences qui pourraient être réalisées de même sur des cellules rénales normales permettraient de comprendre à l'échelle globale et spécifiquement les régulations de l'expression des gènes impliquant HOXA9 dans le contexte du carcinome rénal.

Au niveau cellulaire, nous avons mis en évidence en accord avec les différentes régulations géniques qu'invalider HOXA9 impacte la mort cellulaire, la migration des cellules et la formation de sphères, capacité des cellules souches cancéreuses. Pour aller plus loin sur ce point, il serait intéressant de valider les effets spécifiques sur les cellules souches cancéreuses en triant de manière spécifique les sous-populations de CSC notamment par leur expression du CD105 par FACS et comparer l'expression d'HOXA9 et certaines de ses cibles décrites dans notre analyse transcriptomique dans les cellules CD105+ versus CD105-, de suivre après invalidation et inhibition d'HOXA9 leur devenir spécifiquement en termes de tumorigénicité, de différenciation adipocytaire et de formation de sphères.

Nous avons confirmé le rôle d'HOXA9 dans la régulation des CSC par l'observation qu'en absence d'HOXA9, les cellules ne sont plus capables de former des tumeurs après implantation orthotopique des cellules. Des études de restauration de la fonction d'HOXA9 dans un premier temps puis d'invalidation de BMP2 par shRNA ou siRNA dans les cellules invalidées pour l'expression d'HOXA9 termineront de confirmer le lien entre ces deux protéines dans le carcinome rénal.

In vivo, nous avons montré qu'HOXA9 est requis pour la survie, la colonisation et l'implantation d'un modèle métastatique pulmonaire dérivé de la lignée 786-O (Figure 69). Il serait intéressant de pouvoir déterminer dans ce modèle les implications géniques d'HOXA9 par invalidation et réalisation d'une analyse transcriptomique. Différentes études ont par ailleurs montré des modifications épigénétiques importantes dans le même type de modèles métastatiques (Vanharanta *et al.*, 2013). Ce modèle métastatique pourra également être utilisé pour déterminer l'importance d'HOXA9 dans la formation

de métastases osseuses ou cérébrales par injection intra-cardiaque des cellules. Par ailleurs, d'autres modèles de métastases osseuses ont également pu être obtenus par injection intra-tibiale de cellules 786-O (Xie *et al.*, 2012), technique d'injection réalisée au laboratoire pour l'implantation de cellules leucémiques, et pourraient ainsi être utilisés pour évaluer le rôle d'HOXA9 et son potentiel ciblage par les composés DB en cas de métastases osseuses.

Enfin, et compte tenu du rôle d'HOXA9 décrit dans d'autres modèles tumoraux sur la régulation du micro-environnement tumoral (Ko and Naora, 2014a) et de l'importance de ce micro-environnement dans le développement et la progression du ccRCC, le rôle d'HOXA9 pourra être évalué *in vivo*. Néanmoins, HOXA9 étant nécessaire à la formation de tumeurs *in vivo*, ces expériences nécessiteraient la mise en place d'un modèle d'inactivation inductible.

In vitro et *in vivo*, nous avons également montré dans la lignée CAKI-2 un rôle d'HOXA9 dans la survie cellulaire et dans la tumorigénicité de ce modèle de pRCC (Figures 58, 63, 64, 65). La réalisation d'une analyse transcriptomique après invalidation d'HOXA9 dans cette lignée pourra permettre d'identifier des gènes régulés directement et indirectement par HOXA9 pour décrypter les effets cellulaires et *in vivo* observés, en les comparant à ceux identifiés dans la lignée 786-O.

Nos expériences se sont basées sur l'étude d'une seule lignée des deux principaux types histologiques : 786-O, modèle de ccRCC et CAKI-2, modèle de pRCC.

La lignée 786-O est une lignée VHL^{mut} (Iliopoulos *et al.*, 1995). Notre analyse de la base TCGA a révélé qu'il existait une différence de survie entre les patients exprimant le plus HOXA9 et ceux l'exprimant le moins, et ceci spécifiquement pour les patients VHL^{mut}, comparativement aux patients non mutés. Pour déterminer s'il existe un sous-type qui pourrait bénéficier du ciblage d'HOXA9, des études complémentaires sur une lignée cellulaire de ccRCC VHL^{wt} comme la lignée SNU-333 pourraient ainsi être réalisées (Shin *et al.*, 2000).

La lignée CAKI-2, elle, présente des hauts niveaux de *MET*. Là également, notre étude de la base TCGA a révélé que les amplifications de *MET* étaient liées à la surexpression d'*HOXA9* dont la région se trouve également amplifiée puisque située sur un locus proche de celui de *MET*. Il serait alors intéressant dans le même objectif que pour le ccRCC d'évaluer l'expression et le rôle d'HOXA9 par invalidation sur une lignée mutée ou ne présentant pas de gains du chromosome 7. Ces études nous permettraient de préciser les patients pouvant bénéficier du ciblage d'HOXA9.

Inhiber spécifiquement la liaison à l'ADN d'HOXA9, une stratégie prometteuse ?

Les facteurs de transcription font l'objet de dérégulations majeures dans le cancer les plaçant au cœur de l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques pour la prise en charge des patients. Bien qu'ils aient longtemps été considérés comme inatteignables au plan thérapeutique, les facteurs de transcription sont aujourd'hui bien mieux définis et l'amélioration des connaissances sur leur fonctionnement permet d'imaginer de nouvelles stratégies de ciblage. L'ADN représente alors une cible intéressante pour atteindre les facteurs de transcription.

L'ADN est depuis des années la cible de la majorité des molécules utilisées en chimiothérapie conventionnelle pour tuer les cellules tumorales mais celles-ci ne présentent que très peu de spécificité de reconnaissance de l'ADN. Ces thérapies ne se reposant directement ou indirectement que sur le seul mécanisme de réplication active dans les cellules cancéreuses pour les éradiquer. Cette action s'est soldée et se solde encore aujourd'hui par des toxicités gravissimes potentiellement mortelles comme les cardiotoxicités aux anthracyclines (Chung and Youn, 2016) ou neurologiques avec les sels de platine (Soffietti *et al.*, 2014).

Pour ces raisons, le développement de molécules capables de cibler spécifiquement l'activité de facteurs de transcription représente une stratégie intéressante. L'approche de choix est le ciblage des interactions protéine-protéine mais cette approche ne peut pas être appliquée à tous les facteurs de transcription. Une autre approche est de cibler la fonction d'interaction à l'ADN soit au niveau protéique, soit directement au niveau de l'ADN (Lambert *et al.*, 2018).
Pour cela, les technologies modernes d'études biochimiques couplées aux nouvelles technologies de modélisation moléculaire et de chimie permettent de synthétiser des molécules de plus en plus spécifiques.

Ainsi, nous travaillons sur l'évaluation de petites molécules dérivées de la pentamidine synthétisées par l'équipe du Pr David W. Boykin, capables de cibler des séquences sur l'ADN riches en bases A et T (Liu *et al.*, 2011). Ces molécules ont depuis plusieurs années montré leur propension à entrer en compétition avec la liaison de facteurs de transcription. La preuve de concept de leur utilisation comme modulateurs transcriptionnels date de 2008 avec le DB293, capable d'inhiber la liaison des facteurs de transcription Pit-1 et Brn-3 (Peixoto *et al.*, 2008). Quelques années plus tard, le DB1255 a montré ses capacités de compétition avec la fixation du facteur de transcription ERG (Nhili *et al.*, 2013). Enfin, c'est tout récemment que ces molécules ont fait leur preuves en

pathologie humaine avec le DB2313, capable d'inhiber le facteur de transcription PU.1, et qui montre une activité anti-leucémique *in vitro* et *in vivo* (Antony-Debré *et al.*, 2017).

Depuis, au laboratoire, les travaux au laboratoire ont montré la capacité des composés DB818 et DB1055, identifiés comme inhibiteurs du facteur de transcription HOXA9, à restaurer la différenciation de cellules leucémiques humaines. Les travaux du Dr Mélanie Lambert ont permis de valider ces résultats *in vivo* dans le modèle des leucémies aiguës myéloïdes (LAM) et représentent un réel espoir pour la prise en charge des patients. Ces travaux montrent par ailleurs une forte similitude entre les effets cellulaires et moléculaires observés après inhibition d'HOXA9.

De plus, nous avons montré par tout un panel de techniques que les DB818 et DB1055 étaient parmi les plus efficaces des composés DB évalués pour inhiber l'activité d'HOXA9 et ceci de manière spécifique (***Annexe 2***).

Dans le carcinome rénal, les résultats de ce travail montrent que le traitement avec les DB818 et DB1055 induit les mêmes effets cellulaires que l'invalidation d'HOXA9 (Figures 58, 59, 60). La spécificité du ciblage d'HOXA9 dans ce modèle pourra alors être confirmée au niveau moléculaire par ChIP-sequencing à l'aide de formes taguées d'HOXA9 en analysant les régions du génome sur lesquels la fixation d'HOXA9 est inhibée en comparaison aux données obtenues après invalidation d'HOXA9.

A ce jour, nous n'avons pas pu évaluer l'efficacité du DB818 et du DB1055 *in vivo* sur nos modèles orthotopiques de carcinome rénal et sur le modèle de métastases pulmonaires. Il est bien entendu évident que cette évaluation sera indispensable pour aller plus loin dans cette étude. L'amélioration des connaissances sur les conditions d'administration de ces molécules sera également d'une grande aide pour leur utilisation *in vivo*. De plus, d'après les descriptions du rôle d'HOXA9 dans l'angiogenèse notamment dans les cellules endothéliales (Bandyopadhyay *et al.*, 2007) et de nos résultats montrant une diminution de l'expression du VEGFA par les cellules tumorales après invalidation d'HOXA9, des co-traitements pourraient renforcer l'effet des molécules antiangiogéniques telles que le sunitinib utilisées en clinique et représenter une stratégie efficace, qu'il conviendra d'évaluer *in vivo*.

Inhibition d'HOXA9 par les composés DB : vers le développement clinique ?

Par ce travail, nous avons montré qu'HOXA9 représentait une cible thérapeutique pertinente pour le traitement des patients atteints de carcinome rénal. Dans ce sens, les molécules DB818 et DB1055, inhibiteurs de la liaison d'HOXA9 à l'ADN, pour lesquels une efficacité marquée a été démontrée dans un modèle de LAM HOXA9-dépendant,

pourraient alors être proposées comme stratégie thérapeutique. Pour aller plus loin dans le développement de ces molécules, nous avons réalisé au laboratoire des études de leur toxicité.

Une inquiétude majeure à avoir sur l'utilisation de tels composés est une potentielle hématotoxicité du fait qu'HOXA9 est exprimé dans les CSH normales et impliqué dans leur auto-renouvellement. L'utilisation d'inhibiteurs pourrait ainsi directement impacter leur survie et induire des toxicités hématologiques potentiellement importantes. *In vitro*, nous avons montré jusqu'alors que la toxicité du DB818 et du DB1055 sur cellules souches hématopoïétiques CD34+ était très modérée, comparativement à des molécules très hématotoxiques telles que le sunitinib. *In vivo* et après 1 semaine de traitement, aucune modification de la formule sanguine n'a été observée chez des souris C57Bl/6 (Figure 74).

La seconde inquiétude dérive des observations de toxicité du DB289 lors des essais cliniques dans le traitement de la trypanosomiase africaine. En effet, certains patients ont présenté des toxicités rénales et hépatiques graves (Burri *et al.*, 2016; Pohlig *et al.*, 2016). En ce sens, nous avons étudié la toxicité après traitement par mesure de la créatinine, de l'urée plasmatique et des taux de transaminases hépatiques et n'avons pas observé d'augmentation de ces paramètres après une semaine de traitement avec le DB818, le DB1055 (Figure 75).

Enfin, et pour proposer une alternative utilisable par voie orale, j'ai pu évaluer au cours de ma thèse la toxicité comparée, la biodisponibilité et la bioconversion de la prodrogue du DB1055, le DB2290 synthétisée sur le modèle du DB289, prodrogue du DB75 (Thuita *et al.*, 2008). Cette molécule, qui n'est pas capable de se lier à l'ADN *in vitro* est aussi efficace que le DB1055 dans un modèle leucémique *in vivo*. Ces travaux ont fait l'objet de mon mémoire de DES Innovation Pharmaceutique et Recherche et de thèse de Docteur en Pharmacie (***Annexe 4***).

Pour ces raisons, et selon les résultats d'efficacité *in vivo* sur le modèle du carcinome rénal avec le DB818 et le DB1055, le DB2290 dont l'optimisation pour une utilisation par voie orale est en cours pourra également être testé en termes d'efficacité, et pourrait permettre à terme le ciblage d'HOXA9 par voie orale.

Compte-tenu que de plus en plus de données de la littérature lient HOXA9 au développement ou à la progression de différents cancers, les composés DB818 et DB1055 pourraient donc être aussi évalués dans d'autres modèles comme le myélome multiple (Chapman *et al.*, 2011), le cancer de l'ovaire (Ko *et al.*, 2012, 2014; Ko and Naora, 2014b), le cancer de la prostate (Malek *et al.*, 2017).

Le travail d'optimisation sur l'inhibition d'HOXA9 continue et de nouvelles molécules dérivées des DB818 et DB1055 sont en évaluation constante au laboratoire afin d'identifier des composés toujours plus efficaces et plus spécifiques.

MATERIEL ET METHODES

1. Composés étudiés

Les composés DB818 et DB1055 sont obtenus par collaboration avec l'équipe des Prs David Boykin et David Wilson de l'Université d'Atlanta (Géorgie, USA). Les composés sont solubilisés dans l'eau à la concentration finale de 10 mM, aliquotés et stockés à -20°C.

2. Analyse *in silico*

L'analyse *in silico* a été réalisée à l'aide de la base de données TCGA (*The Cancer Genome Atlas*). Les données d'expression d'*HOXA9* par RNA-seq, de CNV (*copy number variation*) et les données clinico-pathologiques ont été téléchargées sur le site du *National Cancer Institute - Genomic Data Commons* (https://portal.gdc.cancer.gov) et sur le site du Broad Institute (http://firebrowse.org). Deux bases ont été utilisées pour l'analyse : KIRC constituée de données de patients atteints de carcinome rénal à cellules claires et KIRP constituée de données de patients atteints de carcinome rénal papillaire.

Pour l'analyse de l'expression d'*HOXA9*, les données des échantillons normaux présents dans chaque base ont été utilisées en comparaison et des Z-scores calculés selon la formule (Expression$_{\text{échantillons}}$ – Moyenne$_{\text{échantillons normaux}}$)/(Standard Deviation$_{\text{échantillons normaux}}$). Pour les analyses de survie et d'association avec les données clinico-pathologiques, deux groupes ont été formés selon l'expression d'*HOXA9* : le groupe High représentant le tiers de patients exprimant le plus *HOXA9* et le groupe Low représentant le tiers de patients exprimant le moins *HOXA9*.

3. Biologie moléculaire

3.1. Système lentiviral

3.1.1. Plasmides

Pour la production du système lentiviral, différents plasmides d'ADN sont utilisés :

Nom	Origine/référence	Utilisation
pRRL shCTR	Addgene #19125	Transgènes shCTR, GFP
pRRL shHOXA9-1F2	Séquences shRNA de Faber *et al.*, 2009	Transgènes shHOXA9, GFP
pRRL shHOXA9-1F3		
pLenti CMV Puro LUC	Addgene #w168-1	Transgène Firefly Luciferase, gène de résistance à la puromycine
psPAX2	Addgene #12260	Empaquetage
pMD2.G	Addgene #12259	Enveloppe - VSVG

Tableau 9 : **Plasmides utilisés pour la production du système lentiviral.**

3.1.2. Amplification des plasmides par transformation bactérienne

Les bactéries *Escherichia coli Stbl3* cultivées à 37°C sous agitation en milieu LB liquide (Lysogeny Broth, Thermo Fisher, USA) sont rendues compétentes par la méthode au $CaCl_2$. Pour cela, au cours de la phase exponentielle de croissance (densité optique à 600nm entre 0,4 et 0,5), les bactéries sont centrifugées et resuspendues deux fois séquentiellement dans une solution glacée contenant $CaCl_2$ à 60mM, 15% glycérol et PIPES à 10mM (Sigma Aldrich, USA), pH 7 avant d'être placées 30min sur la glace, centrifugées à nouveau et resuspendues dans le milieu contenant le $CaCl_2$ avant d'être aliquotés puis conservés à -80°C.

La transformation est réalisée par choc thermique en présence de 300ng de plasmide à amplifier : 20min dans la glace, 90sec à 42°C puis 5min dans la glace. Les bactéries sont ensuite cultivées pendant 1h à 37°C dans du milieu riche SOC (Thermo Fisher, USA) pour permettre l'expression de la cassette de résistance (ampicilline pour tous les plasmides utilisés). 160 µL de cette solution sont ensuite étalés sur milieu LB Agar (Lysogeny Broth Agar, Thermo Fisher, USA) contenant 50 µg/ml d'ampicilline (Sigma Aldrich, USA) et incubés à 37°C sur la nuit.

Au matin, les clones isolés sont ensemencés dans 10 mL de milieu LB supplémenté avec 50 µg/ml d'ampicilline, cultivées sur la journée avant d'être amplifiés dans 200 mL du même milieu de culture pendant 14 heures.

3.1.3. Purification des plasmides

La purification des plasmides est réalisée en maxi-, midi- ou mini-prep selon le volume de culture bactérienne à l'aide des kits NucleoBond Plasmid DNA EF (Macherey-Nagel, USA) selon les recommandations du fournisseur.

3.1.4. Dosage et vérification des plasmides

La concentration des plasmides obtenus est déterminée par spectrophotométrie sur le Nanodrop 1000 (Thermo Fisher, USA). La taille des plasmides est vérifiée par migration électrophorétique sur gel d'agarose 1%. La séquence peut être vérifiée par séquencage par la société GATC Biotech (Allemagne).

3.1.5. Production des lentivirus

Les lentivirus produits sont des systèmes lentiviraux de 2ème génération et nécessite la co-transfection de 3 plasmides : transgène, empaquetage et enveloppe. Les systèmes utilisés sont dits *SIN* pour *self-inactivated virus*, empêchant la réplication après infection dans les cellules. Pour la production, la lignée HEK-293T/17 (ATCC CRL-11268™) est utilisée. 3 millions de cellules sont ensemencées, cultivées pendant une nuit dans du milieu DMEM contenant 10% de SVF avant d'être co-transfectées au matin par transfection chimique au $CaCl_2$ avec les 3 plasmides : 10µg de pRRL ou pLenti, 7,5µg de psPAX2 et 3,75µg de pMD2.G.

Après 4 à 6h de contact, le milieu contenant les plasmides est remplacé par du milieu DMEM frais. Les cellules sont alors cultivées à 37°C, 5% de CO_2 sous atmosphère saturée en humidité pendant 48h. Le surnageant contenant les lentivirus produits pendant ces 48h est récupéré, filtré sur unité de filtration Stericup avec membrane 0,45 µm (Merck Millipore, USA) puis centrifugé deux fois à ultra haute vitesse (19000g) pendant 90 minutes à 4°C. Le culot de lentivirus est resuspendu délicatement dans un volume adéquat de PBS/BSA 1% avant d'être aliquoté et conservé à -80°C avant utilisation.

3.1.6. Titration des lentivirus

Afin de normaliser les infections lentivirales sur les cellules d'intérêt, les lentivirus obtenus sont titrés par détermination de la quantité d'antigène p24 par test ELISA (HIV-1 p24 Antigen ELISA, RETROtek, Gentaur).

Néanmoins et puisque que la probabilité d'obtenir des particules virales ne contenant pas le transgène/shRNA n'est pas nulle, une deuxième méthode de titration, plus fonctionnelle, est réalisée grâce à l'expression de la GFP (co-exprimée avec chaque transgène/shRNA) après infection d'environ 100000 cellules HEK-293T en plaque 6 puits avec des quantités croissantes de lentivirus. Après 48h, les cellules sont fixées au formaldéhyde 4% (Sigma Aldrich, USA), lavées au PBS et analysées par cytométrie en flux (CyAn ADP, Beckman Coulter, USA). Le nombre de particules virales/µL dans la suspension de lentivirus est déterminé à l'aide du pourcentage de cellules GFP+.

3.2. Analyse de l'expression des gènes

3.2.1. Extraction et dosage d'ARN

L'extraction des ARN totaux est réalisée avec deux kits différents selon le nombre de cellules disponibles : Nucleospin RNA XS (<0,5 millions) ou Nucleospin RNA

(Macherey-Nagel, USA) selon les recommandations de chaque kit. L'élution est réalisée dans le volume recommandé par chaque kit. Le dosage est réalisé au Nanodrop 1000 (Thermo Fisher, USA) et les ARN sont conservés à -80°C.

3.2.2. Rétro-transcription

Les ARN totaux sont rétro-transcrits en ADN complémentaire (ADNc) afin d'être utilisés pour la PCR quantitative. Pour cela, 1µg (ou moins) d'ARN sont rétro-transcrits à l'aide du kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems, Thermo Fisher, USA). La rétro-transcription se déroule à l'aide d'amorces aléatoires. La rétro-transcription est réalisée selon le programme recommandé par le fournisseur sur le thermocycleur GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems, USA) : 10min à 25°C – 2h à 37°C – 5min à 85°C puis 4°C jusqu'à conservation à -20°C.

3.2.3. Analyse transcriptomique par puce à ADN

L'analyse transcriptomique a été réalisée sur la lignée 786-O en 4 à 5 réplicats indépendants pour chaque condition à 48h post-infection : shCTR, shHOXA9-AF2 et shHOXA9-1F3. Les ARN des cellules ont été extraits et dosés selon la méthode décrite au 3.2.1. La suite de l'expérience a été réalisée au sein de la plateforme de Génomique Fonctionnelle et Structure de l'Université de Lille (Dr Martin Figeac).

Le rendement et la qualité des ARNs totaux ont été évalués sur le bioanalyseur Agilent 2100 (Agilent Technologies, Massy, France). Des puces à ADN (039494_D_F_20150612, SurePrint G3 humain GE v2 8x60K Microarray, Agilent Technologies) ont été utilisées pour analyser l'expression des gènes. Le marquage, l'hybridation et la détection de l'ARNc ont été effectués conformément aux instructions du fournisseur (Agilent Technologies). Pour chaque puce, des ARNc marqués à la cyanine 3 ont été synthétisés avec le kit de marquage QuickAmp et ceci à partir de 50 ng d'ARN total. Un calibrateur interne est ajouté dans tous les tubes et utilisés comme contrôle positif des étapes de marquage et d'amplification. Les ARNc marqués ont été purifiés et 600 ng ont ensuite été hybridés sur les puces pendant 17h à 65°C. Après plusieurs étapes de lavage, les puces ont été scannées sur un scanner Agilent G2505C et les données extraites à l'aide du logiciel Agilent Feature Extraction © (FE version 10.7.3.1).

L'analyse statistique a été réalisée avec le logiciel Genespring par un t-test modéré avec correction de Benjamini-Hochberg. Le shCTR sert de contrôle pour les conditions shHOXA9. La valeur de p retenue pour la significativité est 0,05.

3.2.4. Analyse par le logiciel GSEA

L'analyse globale a été réalisée avec le logiciel GSEA (GeneSet Enrichment Analysis Desktop v3.0) afin de mettre en évidence les ensembles de gènes (*genesets*) impliqués dans des fonctions biologiques spécifiques. Pour cela, les données normalisées d'expressions des différentes conditions ont été comparées par le logiciel. Les *genesets* significativement enrichis ont été sélectionnés sur la base de leur p-value <0.05 et de leur valeur de FDR (*false discovery rate*) <0.25.

3.2.5. PCR quantitative

La PCR quantitative ou qPCR permet de réaliser une amplification par PCR (*polymerase chain reaction*) et de suivre par fluorescence la quantité de copies d'une cible générée, permettant de connaître la quantité de départ dans un échantillon par la détermination du cycle seuil (ou Ct). La qPCR est réalisée à l'aide de SYBR Green qui est un agent à la fois ligand du petit sillon et intercalant de l'ADN capable de fluorescer lorsqu'il est lié. Sa fluorescence suivie après chaque cycle de PCR est proportionnelle à la quantité d'ADN et augmente de façon exponentielle à chaque cycle.

Les amorces utilisées pour la détermination de l'expression des gènes sont établies à l'aide du logiciel Primer-BLAST (NCBI, https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/) et synthétisées à la demande par la société Eurogentec (Belgique). Pour chaque couple d'amorces (*Forward*/*Reverse*), l'efficacité est validée à l'aide de quantités croissantes d'ADNc et la spécificité est contrôlée par la détermination du Tm ou température de fusion de l'amplicon et le séquençage de ce dernier par la société GATC Biotech (Allemagne). Les couples d'amorces utilisées sont présentés dans le Tableau 10.

Le mélange réactionnel pour un puits est alors constitué de 10 µL de SYBR Green Master Mix 2X (Applied Biosystems, Thermo Fisher, USA) comprenant la Taq polymérase avec son tampon, le SYBR Green et les nucléotides, auxquels sont ajoutés 0,8 µL d'amorces à 5 µM (200 nM final), 5,2 µL d'eau sans nucléase et 4µL de cDNA à la concentration de 2,5 ng/µL (10 ng). La qPCR est réalisée en plaque spécifique 96 puits après scellement et centrifugation de la plaque sur l'appareil StepOnePlus Real-Time PCR (Applied Biosystems, Thermo Fisher, USA). Après 10 min à 95°C pour activer la Taq polymerase, 40 cycles sont réalisés selon le programme : 15 sec à 95°C – 1 min à 60°C.

Gène	Amorce *Forward* 5'-3'	Amorce *Reverse* 5'-3'
ANKRD1	GCAAAAATTAGCGCCCGAGA	ACGGGGTATCTCCTTCTCTGT
ANKRD52	GTCAACGAGGCCGACTGTAA	GGGTTCCGCTCTCCTGTAAG
AREG	TTGATACTCGGCTCAGGCCA	CTCCCGAGGACGGTTCACTA
BMP2	CGCAGCTTCCACCATGAAGAATC	AGGTGATAAACTCCTCCGTGGG
CXCR4	GCTGTTGGCTGAAAAGGTGG	ATCTGCCTCACTGACGTTGG
DUSP5	TCCTGAGTGTTGCGTGGATG	GGGCCACCCTGGTCATAAG
FHL2	AGACCTGCTTCATCTGCCAC	CCGTGGTGATGGGCTTTTTG
HBEGF	CATCGTGGGGCTTCTCATGT	CCAGCCGATTCCTTGAGCA
HOXA9	CCACGCTTGACACTCACACT	CAGTTGGCTGCTGGGTTATTG
INHBA	AAAGTCGGGGAGAACGGGTA	CTTCCTGGCTGTTCCTGACTC
ITGB4	TGGCCTTCAATGTCGTCTCC	GCCCAATAGGTCGGTTGTCA
MAP2K7	GACGTTCATCACCAACACGG	GTACAGCGCCTTCACAATCG
SEMA5B	GTGTGCAAGAATGACGTGGG	CCGCGATGCTGTTTACGTTG
SEMA6A	CATTCCAGTTCCCTCTTGCCC	ATCACTCCCTTCTTGTCTTGGTG
TBP	CTGGCCCATAGTGATCTTTGC	TCAATTCCTTGGGTTATCTTCACA
TNFRSF11B	GTGGAATAGATGTTACCCTGTGTG	TGCGTTTACTTTGGTGCCAG
VEGFA	ATCGAGACCCTGGTGGACAT	GATCCGCATAATCTGCATGGTG

Tableau 10 : **Liste des amorces utilisées pour la qPCR**

3.3. Analyse de l'expression protéique

3.3.1. Extraction des protéines

La lyse des cellules pour extraction des protéines est réalisée sur la glace à l'aide du tampon RIPA 1X (Cell Signaling Technology, USA) supplémenté par des inhibiteurs de protéase (Protease Cocktail Inhibitor, Roche, Merck, USA) et des inhibiteurs de phosphatases (Santa Cruz Biotechnology, USA). Après une lyse mécanique par 5-6 passages dans une seringue montée d'une aiguille 26G, les lysats sont centrifugés à 11000g pendant 15min à 4°C. Les surnageants contenant les protéines sont récupérés et conservés à -80°C.

3.3.2. Dosage des protéines

Le dosage des protéines est réalisé par méthode colorimétrique Bradford à l'aide du réactif Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad, USA). Conformément aux recommandations du fournisseur, après coloration les absorbances sont mesurées à 595nm. Les concentrations protéiques des échantillons sont déterminés à l'aide d'une gamme étalon d'albumine bovine (BSA, Sigma Aldrich, USA).

3.3.3. Western Blot

Le Western Blot est réalisé en conditions dénaturantes et réductrices. Pour cette raison, 30µg de protéines totales sont dénaturées pendant 5min à 95°C dans le tampon NuPAGE LDS Sample Buffer contenant un agent réducteur NuPAGE Sample Reducing Agent (Invitrogen, Thermo Fisher, USA). Les échantillons réduits et dénaturés sont ensuite déposés sur un gel d'acrylamide NuPAGE Novex Bis-Tris 4-12% (Invitrogen, Thermo Fisher, USA) et séparés par électrophorèse dans une cuve NuPAGE XCell pendant 1h à 200V en tampon NuPAGE MES avec SDS. Deux marqueurs moléculaires de taille sont utilisés : le SeeBlue Plus 2 coloré (Invitrogen, Thermo Fisher, USA) et le MagicMark visible en chimiluminescence (Invitrogen, Thermo Fisher, USA).

Après migration, les protéines sont transférées sur une membrane de nitrocellulose (iBlot Transfer Stack, Invitrogen, Thermo Fisher, USA) par transfert solide à l'aide de l'appareil iBlot en 7min, programme P0. Après 1h de saturation en TBS-Tween 0,1% (TBS-T) contenant 5% de lait, la membrane est incubée sur la nuit à 4°C avec l'anticorps primaire dilué dans du TBS-Tween contenant 3% de lait. Après 3 lavages de 5min avec du TBS-T, l'anticorps secondaire dilué est appliqué pendant 2h à température ambiance dans du TBS-T contenant 3% de lait avant d'être rincée à nouveau 3 fois 5min. La présence de l'anticorps secondaire, couplé à la péroxidase de raifort (HRP, horseradish peroxidase) est ensuite détectée par chimiluminescence à l'aide du réactif ECL Prime (GE Healthcare Life Sciences, USA) par l'appareil ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare Life Sciences, USA). La quantification est réalisée sur le logiciel ImageJ Fiji (NIH).

Anticorps	Poids moléculaire	Dilution	Espèce	Référence
HOXA9	37 kDa	1/1000e	lapin	Abcam #ab140631
HSC70	70 kDa	1/4000e	souris	Santa Cruz #sc-7298
anti-IgG souris HRP	-	1/5000e	cheval	CST #7076
anti-IgG lapin HRP	-	1/5000e	chèvre	CST #7074

Tableau 11 : **Liste des anticorps utilisés**

3.4. Interaction entre HOXA9 et l'ADN par retard sur gel

Le retard sur gel ou EMSA (*electrophoretic mobility shift assay*) est une technique permettant d'étudier l'interaction entre une protéine et des séquences spécifiques d'ADN.

Pour l'étude de l'interaction d'HOXA9 avec des séquences de la région promotrice de BMP2, 4 oligonucléotides et leurs complémentaires contenant des sites potentiels de reconnaissance par HOXA9 ont été utilisés :

(868) 5'-TGGGTGAGA**TAAAT**ATCACAAGG-3',

(637) 5'-ATTGGATAT**ATTTA**TGTAACTA-3',

(614) 5'-TATGTAACTA**TAAATTTA**CATGCGTATG-3',
(595) 5'-ATGGATATGAAAA**TAAAT**GCAT-3'.

Afin de les détecter, un brin de chaque couple d'oligonucléotide est marqué en 5' par la T4 polynucléotide kinase avec du [γ-^{32}P]dATP (Perkin Elmer, USA) avant d'être hybridé avec son brin complémentaire et purifié sur gel de polyacrylamide pour retirer l'excès de radioactivité.

La protéine HOXA9 est synthétisée en lysat de réticulocytes à l'aide d'un plasmide comportant la séquence d'ADN complémentaire codant HOXA9 pCDNA3-TyHOXA9 (TNT® Coupled Reticulocyte Lysate Systems, Promega, USA). Un plasmide vide est utilisé comme contrôle négatif.

2 µL de lysat de réticulocytes sont ensuite incubés avec les oligonucléotides double-brin radiomarqués 4°C pendant 20min dans un tampon spécifique (10mM Tris-HCl pH7,5, 50mM NaCl, 1mM EDTA, 1mM DTT, 6% glycérol, 10µg BSA). L'ADN libre et le complexe HOXA9/ADN sont ensuite séparés par migration sur gel de polyacrylamide non dénaturant 6% pendant 3h30 à 300V en tampon TBE 0,5X. La révélation est réalisée par impression du gel sur un écran d'autoradiographie qui est scanné à l'aide d'un phospho-imager (Pharos-PMI, Bio-Rad, USA).

Pour les expériences de compétition avec les composés DB, une étape supplémentaire d'incubation des molécules avec l'oligonucléotide marqué, en présence de 0,66µg de poly(dG-dC)$_2$ (Sigma Aldrich, USA) comme compétiteur non spécifique, est réalisée pendant 20min à température ambiante avant l'ajout du lysat de réticulocytes incubé comme précédemment pendant 30min à 4°C.

4. Biologie cellulaire

4.1. Culture cellulaire

Les lignées cellulaires utilisées (Tableau 12) sont cultivées dans du milieu de culture spécifique avec GlutaMAX™ (Gibco, Thermo Fisher, USA) supplémenté par 10% de sérum de veau fœtal (SVF) décomplémenté par la chaleur (Gibco, Thermo Fisher, USA) et par 100 U/ml de pénicilline et 100 µg/ml de streptomycine (Gibco, Thermo Fisher, USA), dans une étuve à 37°C, 5% de CO_2 et sous atmosphère saturée en humidité.

Toutes les cellules sont des cellules adhérentes cultivées en flasque de 175cm2. Pour être maintenues en phase exponentielle de croissance, les cellules sont divisées à subconfluence par décollement à la trypsine-EDTA 0,05% (Gibco, Thermo Fisher, USA),

centrifugation et réensemencement en milieu de culture complet. Pour les différentes expériences, les cellules sont comptées à l'aide de bleu trypan (Gibco, Thermo Fisher, USA) sur cellule de Nageotte.

Lignée	Type	Caractéristiques	Milieu de culture	Référence
786-O	carcinome rénal à cellules claires	*VHL*^{mut}	RPMI-1640, 10% SVF, 1% antibiotiques	ATCC CRL-1932
CAKI-2	carcinome rénal papillaire	MET^{high}, VHL$^{?}$	DMEM, 10%SVF, 1% antibiotiques	ATCC HTB-47
HEK-293T	cellules rénales embryonnaires	Antigène T de SV40	DMEM, 10%SVF, 1% antibiotiques	ATCC CRL-11268

Tableau 12 : **Lignées cellulaires utilisées**

4.2. Évaluation de la sensibilité aux molécules

La sensibilité est évaluée par détermination de la concentration inhibitrice médiane ou IC_{50} correspondant à la concentration à laquelle résulte 50% de survie cellulaire. Celle-ci est déterminée par test MTS. Le test MTS est un test colorimétrique qui repose sur la réduction d'une molécule complexe avec un groupement tétrazolium par les cellules viables en formazan. Ainsi, 1500 cellules ensemencées en plaque 96 puits sont traitées à différentes concentrations (gamme de 0,1 µM à 50 µM) pendant 72h dans un volume de 100 µL. Après 72h, la révélation est réalisée par l'ajout de 20 µL de réactif MTS (CellTiter 96 AQueous One Solution, Promega, USA). Après 2 à 3h d'incubation à 37°C, l'absorbance est mesurée à 492nm sur un spectrophotomètre lecteur de plaques (Spectramax, Molecular Devices, USA). La détermination de l'IC_{50} est réalisée sur le logiciel SoftMax Pro 7.0 (Molecular Devices, USA).

4.3. Infection lentivirale

Les infections lentivirales sont réalisées avec les cellules maintenues en suspension par agitation afin de permettre de concentrer le volume d'infection. Environ 1000ng d'équivalent p24 sont utilisés pour l'infection d'1 million de cellules, permettant l'infection avec MFI (mean fluorescence intensity) proche pour les différents vecteurs lentiviraux, dans 95-99% des cellules sur la base de l'expression de la GFP mesurée par cytométrie en flux. Les cellules sont incubées en présence des lentivirus pendant 4 à 6h avant d'être lavées et ensemencées en plaque ou flasque de culture.

4.4. Mort cellulaire

L'analyse de la mort cellulaire est réalisée par cytométrie en flux après infection lentivirale pour invalidation d'HOXA9 ou traitement par les composés DB. Après

conservation des surnageants de culture contenant les cellules mortes (décollées) et décollement des cellules vivantes (adhérées), les cellules sont lavées au PBS et resuspendues dans 100 µL de tampon de marquage pour Annexine V avant l'ajout de 2 µL d'Annexine V couplée à l'APC (allophycocyanine) (BD Pharmingen, USA) et incubation à température ambiante pendant 30min à l'abri de la lumière. 400 µL de tampon sont ajoutés et les cellules sont analysées sur le cytomètre LSR X20 Fortessa (BD Biosciences, USA). Après une première acquisition du marquage Annexine V seul, 1 µL d'iodure de propidium (1 mg/ml) pour marquer les cellules nécrotiques est ajouté au tube qui est réanalysé immédiatement après. Les données acquises sont analysées avec le logiciel FlowJo (FlowJo LLC, USA).

4.5. Analyse de la migration par test Transwell

La migration est analysée par la capacité des cellules à traverser les pores d'une membrane, en réponse à des signaux extracellulaires de chemoattraction. Pour la lignée 786-O, des inserts Transwell installés dans les puits d'une plaque 24 puits sont utilisés. Les pores utilisés sont des pores de 8 µm (Transwell, Corning, USA).

Pour évaluer le rôle d'HOXA9, les cellules sont infectées par les lentivirus permettant l'expression des shHOXA9 ou du shCTR, lavées 4 à 6h après avant d'être affamées dans un milieu pauvre en SVF (0,5% SVF) sur la nuit. Dans le cas du traitement par les composés, les cellules sont traitées pendant 16h (sur la nuit) dans un milieu pauvre en SVF. Dans les deux cas, au matin, les cellules sont comptées et ensemencées dans la partie haute de l'insert à hauteur de 25000 cellules dans un milieu pauvre en SVF, tandis que la partie basse de l'insert est remplie de milieu riche en SVF (10% SVF). Un gradient de SVF se créé entre la partie haute et la partie basse de l'insert et la migration des cellules est évaluée après 24h.

Pour cela, les cellules n'ayant pas migré sont retirées à l'aide de coton-tiges appliqués à l'intérieur des inserts tandis que la partie inférieure de la membrane où les cellules ayant migré vont adhérer est fixée au formaldéhyde 4%. Le noyau des cellules est ensuite marqué au DAPI (10 µg/ml, Sigma Aldrich, USA) en présence de 0,5% de TritonX-100 (Sigma-Aldrich, USA) afin de perméabiliser les cellules au DAPI. Plusieurs champs sont ensuite photographiés à l'aide d'un microscope à fluorescence DMi8 (Leica Biosystems, Allemagne) permettant de déterminer le nombre total de cellules ayant migré qui est rapporté au nombre de cellules ensemencées.

4.6. Capacité de formation de sphères

Le test de formation de sphères est un test en culture non adhérente qui permet sous l'induction de facteurs de croissances d'enrichir une population cellulaire en cellules souches cancéreuses.
Le support de culture non adhérent est obtenu par le traitement de plaques 24 puits de culture au poly(2-hydroethylmetacrylate) (polyHEMA, Sigma-Aldrich, USA). Le polyHEMA est dilué à la concentration de 5 mg/ml dans l'éthanol 95% et 200 µL de cette solution sont répartis dans les puits d'une plaque 24 puits, et la plaque est placée à 37°C jusqu'à évaporation totale de l'éthanol. Les plaques préparées sont conservées à 4°C avant leur utilisation, scellées et protégées de l'humidité.

Pour la formation des sphères, les cellules sont ensemencées dans les puits de ces plaques dans du milieu DMEM/F-12 1 :1 (Gibco, Thermo Fisher, USA) supplémenté avec du B27 1X (Gibco, Thermo Fisher, USA), de l'EGF (20 ng/ml, StemCell Technologies, USA) et du bFGF (20 ng/ml, Promokine).

1000 cellules/ml par puits sont ensemencées et incubées à l'étuve. Après 10 jours de culture, les sphères sont soit comptées au microscope DMi8 (Leica Biosystems, Allemagne) soit récupérées pour extraction des ARN en vue de la réalisation d'une qPCR.

5. Expérimentations animales

Toutes les expériences *in vivo* ont été réalisées au sein de l'Animalerie Haute Technologie de l'Université de Lille et en accord avec un protocole approuvé par le comité d'éthique pour l'expérimentation animale. Les souris utilisées pour la tumorigénicité ou la formation de métastases pulmonaires sont des souris immunodéficientes NOD.Cg-Prkdc^{scid}Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ ou NSG. Pour les analyses de toxicité, les souris utilisées sont des souris C57Bl/6J (Envigo, France).

Pour permettre le suivi des cellules et de la croissance tumorale, des modèles des lignées 786-O et CAKI-2 exprimant le gène de la luciférase ont été générées par transduction lentivirale et sélection à la puromycine à 5 µg/ml pendant 1 semaine.

5.1. Implantation orthotopique de cellules

L'implantation des cellules est réalisée chirurgicalement et orthotopiquement, soit sous la capsule rénale, soit par injection dans le parenchyme au niveau du pôle inférieur du rein. 24h après leur infection, les cellules exprimant alors les différents shRNA sont

implantées aux souris. Les injections sont réalisées sous poste de sécurité microbiologique, selon les bonnes pratiques chirurgicales.

L'analgésie des souris nécessaire à la procédure chirurgicale est obtenue par l'administration intrapéritonéale de buprénorphine (0,1 mg/kg). Les souris sont anesthésiées par un mélange air-isoflurane (5% en induction dans une cuve, 3% en entretien au masque), placées sur le ventre, légèrement tournées sur le côté droit. Après rasage des poils, détersion et désinfection, la peau est incisée au niveau du flanc gauche puis l'incision de la paroi abdominale permet de localiser le rein gauche qui est délicatement extériorisé au niveau du site de l'incision. Le rein est humidifié au sérum physiologique stérile et les cellules sont injectées à l'aide de seringues à insuline 29G (Myjector, Terumo) soit sous la capsule rénale (CAKI-2), soit à 1mm dans le parenchyme au pôle inférieur du rein (786-O).

Pour limiter le risque de fuites, les cellules sont suspendues dans un mélange de sérum physiologique et de 10% de Matrigel (Corning, USA). Après l'injection, l'aiguille est alors maintenue en place quelques instants afin que le Matrigel puisse se solidifier et maintenir les cellules en place.
Pour la lignée CAKI-2Luc, 0,5 millions de cellules sont injectées dans un volume de 10µL.
Pour la lignée 786-OLuc, 2 millions de cellules sont injectées dans un volume de 20µL.

Une fois l'implantation terminée, le rein est replacé dans la cavité abdominale qui est suturée à l'aide de fil résorbable (PDS-11, Ethicon). La peau est ensuite fermée à l'aide d'agrafes (Autoclip 7mm) qui sont retirées entre 10 et 14 jours post-chirurgie.

Le suivi par bioluminescence est débuté dès le lendemain de la chirurgie.

5.2. Formation de métastases pulmonaires

Pour la génération du modèle métastatique, 400'000 cellules 786-OLuc sont injectées par voie intraveineuse dans la veine caudale dans 100µL de sérum physiologique. Après suivi de l'implantation par imagerie de bioluminescence, les souris sont sacrifiées 4 à 5 mois post-injection des cellules et les poumons sont collectés. Les tumeurs formées sont disséquées indépendamment et dissociées mécaniquement sur un tamis de 70 µm (Falcon, BD Biosciences, USA) avant d'être lavées et réensemencées dans du milieu de culture. Après quelques jours, les cellules sont de nouveau lavées afin de retirer les débris de l'organe et les cellules mortes, puis du milieu frais de culture des cellules est ajouté. Après plusieurs jours, des cellules de morphologie épithéliale sont obtenues et sont sélectionnées par l'utilisation de puromycine (5 µg/ml) grâce à

l'expression d'un gène de résistance co-exprimé avec le gène de la luciférase. Les cellules obtenues sont ensuite maintenues en culture de la même façon que la lignée parentale 786-O sans sélection.

Les cellules 786-OM1 (M pour métastase) obtenues sont alors infectées pour l'expression des différents shRNA et 500'000 cellules de chaque condition sont injectées par voie intraveineuse dans la veine caudale dans 100 µL de sérum physiologique à d'autres lots de souris.

Le suivi de bioluminescence est alors débuté 2h après l'injection des cellules.

5.3. Suivi par imagerie de bioluminescence

Pour toutes les expériences, le suivi par imagerie de bioluminescence est réalisé de façon hebdomadaire. Pour cela, le substrat de la luciférase, la D-luciférine, est injecté aux souris par voie intrapéritonéale à la dose de 150 mg/kg (XenoLight D-luciferin, Perkin Elmer, USA). Les souris sont ensuite anesthésiées par un mélange oxygène-isoflurane (5% induction, 3% entretien) et les signaux de luminescence sont acquis très exactement 10min après l'injection de la luciférine par l'appareil IVIS XENOGEN 50 (Perkin Elmer, USA). Les acquisitions sont réalisées en mode exposition automatique pour toutes les souris. La quantification du signal de bioluminescence est ensuite réalisée avec le logiciel LivingImage 3.2 (Perkin Elmer, USA).

5.4. Analyse histologique des organes au sacrifice

Au sacrifice, les organes sont pesés, photographiés et fixés par immersion dans du formaldéhyde 4% pendant 24h avant d'être transférés dans l'éthanol 70% dans l'attente de leur déshydratation et inclusion au sein du plateau d'histologie de la Faculté de Médecine de Lille.

Des coupes de 5 µm d'épaisseur sont réalisées au microtome et déposées sur lames. Les coupes sont déparaffinées par immersion dans plusieurs bains séquentiels de xylène, réhydratées avant d'être colorées par hématoxyline et éosine. Après rinçage, les coupes sont déshydratées à l'aide de concentrations croissantes d'éthanol en terminant par plusieurs bains de xylène et montées entre lame et lamelle à l'aide du milieu de montage Pertex®.

Les coupes complètes sont numérisées et virtualisées grâce au scanner de lames AxioScan Z1 (Carl Zeiss Microscopy, Allemagne).

5.5. Évaluation de la toxicité des composés DB818 et DB1055

Le sang des souris traitées au DB818 et DB1055 pendant 1 semaine à raison de 3 administrations à la dose de 30 mg/kg est prélevé à jour 8 et jour 15 (Figure 73) par ponction submandibulaire et collecté en microtube EDTA ou hépariné (Microvette, Sarstedt, Allemagne). La numération sanguine est réalisée sur l'analyseur vétérinaire VetScan® HM5 le plus rapidement possible après le prélèvement. Pour la biochimie, la technologie de chimie sèche sur l'analyseur de biochimie vétérinaire IDEXX VetTest Chemistry Analyzer a été utilisée pour doser les paramètres suivants : créatinine, urée, ALAT, ASAT.

6. Analyses statistiques

Les analyses statistiques (à l'exception des analyses statistiques du transcriptome) ont été réalisés grâce au logiciel Prism 7 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) par test de Student non apparié, test de Mann-Whitney ou test du Log-rank (Mantel-Cox) pour les analyses de survie. La significativité statistique des tests réalisés est obtenue par une p-value<0.05.

BIBLIOGRAPHIE

Adamaki M, Lambrou GI, Athanasiadou A, Vlahopoulos S, Papavassiliou AG, Moschovi M. HOXA9 and MEIS1 gene overexpression in the diagnosis of childhood acute leukemias: Significant correlation with relapse and overall survival. Leuk Res. 2015;39(8):874–82.

Alberts B, Wilson JH, Hunt T. Biologie moléculaire de la cellule. 5ème éditi. Lavoisier, editor. 2011.

Alharbi R a, Pettengell R, Pandha HS, Morgan R. The role of HOX genes in normal hematopoiesis and acute leukemia. Leukemia. 2013 Apr;27(5):1000–8.

Alharbi RA, Pandha HS, Simpson GR, Pettengell R, Poterlowicz K, Thompson A, et al. Inhibition of HOX/PBX dimer formation leads to necroptosis in acute myeloid leukemia cells. Oncotarget. 2017;8(52):89566–79.

Amato RJ. Vaccine therapy for renal cell carcinoma. Rev Urol. 2003;5(2):65–71.

American Joint Commitee on Cancer. AJCC Cancer Staging Handbook. AJCC Cancer Staging Handbook. 2010.

Amin MB, Amin MB, Tamboli P, Javidan J, Stricker H, Venturina MDP, et al. Prognostic impact of histologic subtyping of adult renal epithelial neoplasms: An experience of 405 cases. Am J Surg Pathol. 2002;26(3):281–91.

Anaya J. OncoLnc: linking TCGA survival data to mRNAs, miRNAs, and lncRNAs. PeerJ Comput Sci. 2016;2:e67.

Ando H, Natsume A, Senga T, Watanabe R, Ito I, Ohno M, et al. Peptide-based inhibition of the HOXA9/PBX interaction retards the growth of human meningioma. Cancer Chemother Pharmacol. 2014;73(1):53–60.

Antony-Debré I, Paul A, Leite J, Mitchell K, Kim HM, Carvajal LA, et al. Pharmacological inhibition of the transcription factor PU.1 in leukemia. J Clin Invest. 2017;127(12):4297–313.

Aulehla A, Wehrle C, Brand-Saberi B, Kemler R, Gossler A, Kanzler B, et al. Wnt3a plays a major role in the segmentation clock controlling somitogenesis. Dev Cell. 2003;4(3):395–406.

Ayton PM, Cleary ML. Transformation of myeloid progenitors by MLL oncoproteins is dependent on Hoxa7 and Hoxa9. Genes Dev. 2003;17(18):2298–307.

Azzi S, Bruno S, Giron-Michel J, Clay D, Devocelle A, Croce M, et al. Differentiation Therapy: Targeting Human Renal Cancer Stem Cells with Interleukin 15. JNCI J Natl Cancer Inst. 2011;103(24):1884–98.

Bailly C, Dassonneville L, Carrasco C, Lucas D, Kumar A, Boykin DW, et al. Relationships between topoisomerase II inhibition, sequence-specificity and DNA binding mode of dicationic diphenylfuran derivatives. Anticancer Drug Des. 1999;14(1):47–60.

Bailly C, Tardy C, Wang L, Armitage B, Hopkins K, Kumar A, et al. Recognition of ATGA sequences by the unfused aromatic dication DB293 forming stacked dimers in the DNA minor groove. Biochemistry. 2001;40(33):9770–9.

Bakshi RP, Shapiro TA. DNA topoisomerases as targets for antiprotozoal therapy. Mini Rev Med Chem. 2003;3(6):597–608.

Bandyopadhyay S, Ashraf MZ, Daher P, Howe PH, DiCorleto PE. HOXA9 participates in the transcriptional activation of E-selectin in endothelial cells. Mol Cell Biol [Internet]. 2007 Jun [cited 2014 Nov 5];27(12):4207–16. Available from: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1900059&tool=pmcentrez&rendertype=abstract

Bansal D, Scholl C, Frohling S, McDowell E, Lee BH, Dohner K, et al. Cdx4 dysregulates Hox gene expression and generates acute myeloid leukemia alone and in cooperation with Meis1a in a murine model. Proc Natl Acad Sci. 2006;103(45):16924–9.

Bensalah K, Albiges L, Bernhard J-C, Bigot P, Bodin T, Boissier R, et al. CCAFU french national guidelines 2016-2018 on renal cancer [Recommandations en onco-urologie 2016-2018 du CCAFU : Cancer du rein]. Prog en Urol. 2016;27:S67–91.

Bensalah K, Leray E, Fergelot P, Rioux-Leclercq N, Tostain J, Guillé F, et al. Prognostic value of thrombocytosis in renal cell carcinoma. J Urol. 2006;175(3):859–63.

Berlato C, Khan MN, Schioppa T, Thompson R, Maniati E, Montfort A, et al. A CCR4 antagonist reverses the tumor-promoting microenvironment of renal cancer. J Clin Invest. 2017;127(3):801–13.

Bex A, Albiges L, Ljungberg B, Bensalah K, Dabestani S, Giles RH, et al. Updated European Association of Urology Guidelines Regarding Adjuvant Therapy for Renal Cell Carcinoma. Eur

Urol. 2017;71(5):719–22.
Bex A, Albiges L, Staehler M, Bensalah K, Giles RH, Dabestani S, et al. A Joint Statement from the European Association of Urology Renal Cell Cancer Guidelines Panel and the International Kidney Cancer Coalition: The Rejection of Ipilimumab and Nivolumab for Renal Cancer by the Committee for Medicinal Products for Human Use D. Eur Urol. 2018 Sep 20;
Bhan A, Mandal SS. LncRNA HOTAIR: A master regulator of chromatin dynamics and cancer. Biochim Biophys Acta - Rev Cancer. 2015;1856(1):151–64.
Bhatlekar S, Addya S, Salunek M, Orr CR, Surrey S, McKenzie S, et al. Identification of a Developmental Gene Expression Signature, Including HOX Genes, for the Normal Human Colonic Crypt Stem Cell Niche: Overexpression of the Signature Parallels Stem Cell Overpopulation During Colon Tumorigenesis. Stem Cells Dev. 2014;23(2):167–79.
Bhatlekar S, Viswanathan V, Fields JZ, Boman BM. Overexpression of HOXA4 and HOXA9 genes promotes self-renewal and contributes to colon cancer stem cell overpopulation. J Cell Physiol. 2018;233(2):727–35.
Bianchi M, Sun M, Jeldres C, Shariat SF, Trinh QD, Briganti A, et al. Distribution of metastatic sites in renal cell carcinoma: A population-based analysis. Ann Oncol. 2012;23(4):973–80.
Birchmeier C, Birchmeier W, Gherardi E, Vande Woude GF. Met, metastasis, motility and more. Nat Rev Mol Cell Biol. 2003;4(12):915–25.
Botti G, De Chiara A, Di Bonito M, Cerrone M, Malzone MG, Collina F, et al. Noncoding RNAs within the HOX gene network in tumor pathogenesis and progression. J Cell Physiol. 2018;
Bouteille B, Oukem O, Bisser S, Dumas M. Treatment perspectives for human African trypanosomiasis. Fundam Clin Pharmacol. 2003;17(2):171–81.
Boyer LA, Plath K, Zeitlinger J, Brambrink T, Medeiros LA, Lee TI, et al. Polycomb complexes repress developmental regulators in murine embryonic stem cells. Nature. 2006;441(7091):349–53.
Bridges CB. Current Maps of the Location of the Mutant Genes of Drosophila Melanogaster. Proc Natl Acad Sci. 1921;7(4):127–32.
Bruhl T, Urbich C, Aicher D, Acker-Palmer A, Zeiher AM, Dimmeler S. Homeobox A9 Transcriptionally Regulates the EphB4 Receptor to Modulate Endothelial Cell Migration and Tube Formation. Circ Res. 2004;94(6):743–51.
Burri C, Yeramian PD, Allen JL, Merolle A, Serge KK, Mpanya A, et al. Efficacy, Safety, and Dose of Pafuramidine, a New Oral Drug for Treatment of First Stage Sleeping Sickness, in a Phase 2a Clinical Study and Phase 2b Randomized Clinical Studies. PLoS Negl Trop Dis. 2016;10(2).
Bussolati B, Bruno S, Grange C, Ferrando U, Camussi G. Identification of a tumor-initiating stem cell population in human renal carcinomas. FASEB J. 2008;22(10):3696–705.
Calvo R, West J, Franklin W, Erickson P, Bemis L, Li E, et al. Altered HOX and WNT7A expression in human lung cancer. Proc Natl Acad Sci. 2000;97(23):12776–81.
Cao R, Wang L, Wang H, Xia L, Erdjument-Bromage H, Tempst P, et al. Role of histone H3 lysine 27 methylation in polycomb-group silencing. Science (80-). 2002;298(5595):1039–43.
Capitanio U, Becker F, Blute ML, Mulders P, Patard JJ, Russo P, et al. Lymph node dissection in renal cell carcinoma. Eur Urol. 2011;60(6):1212–20.
Capovilla M, Botas J. Functional dominance among Hox genes: repression dominates activation in the regulation of Dpp. Development. 1998;125(24):4949–57.
Carpten JD, Robbins CM, Villablanca A, Forsberg L, Presciuttini S, Bailey-Wilsons J, et al. HRPT2, encoding parafibromin, is mutated in hyperparathyroidism-jaw tumor syndrome. Nat Genet. 2002;32(4):676–80.
Carter NS, Berger BJ, Fairlamb AH. Uptake of diamidine drugs by the P2 nucleoside transporter in melarsen-sensitive and -resistant Trypanosoma brucei brucei. J Biol Chem. 1995;270(47):28153–7.
Chang CP, Brocchieri L, Shen WF, Largman C, Cleary ML. Pbx modulation of Hox homeodomain amino-terminal arms establishes different DNA-binding specificities across the Hox locus. Mol Cell Biol. 1996;16(4):1734–45.
Chapman M a, Lawrence MS, Keats JJ, Cibulskis K, Sougnez C, Schinzel AC, et al. Initial genome sequencing and analysis of multiple myeloma. Nature. 2011 Mar 24;471(7339):467–72.
Chen F, Capecchi MR. 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. 1999;96(January):541–6.
Chen W, Hill H, Christie A, Kim MS, Holloman E, Pavia-Jimenez A, et al. Targeting renal cell carcinoma with a HIF-2 antagonist. Nature. 2016;539(7627):112–7.
Cheng W, Liu J, Yoshida H, Rosen D, Naora H. Lineage infidelity of epithelial ovarian cancers is controlled by HOX genes that specify regional identity in the reproductive tract. Nat Med. 2005;11(5):531–7.
Cheng Y, Jutooru I, Chadalapaka G, Corton CJ, Safe S. The long non-coding RNA HOTTIP enhances pancreatic cancer cell proliferation, survival and migration. Oncotarget. 2015;6(13).
Cheville JC, Lohse CM, Zincke H, Weaver AL, Leibovich BC, Frank I, et al. Sarcomatoid Renal Cell Carcinoma: An Examination of Underlying Histologic Subtype and an Analysis of Associations with Patient Outcome. Am J Surg Pathol. 2004;28(4):435–41.
Cho H, Du X, Rizzi JP, Liberzon E, Chakraborty AA, Gao W, et al. On-target efficacy of a HIF-2α antagonist in preclinical kidney cancer models. Nature. 2016;539(7627):107–11.
Choueiri T, Agarwal N, Ho T, Pal SK, Seon B, Jivani M, et al. TRAXAR study: A randomized phase 2 trial of axitinib and TRC105 versus axitinib alone in patients with advanced or metastatic renal cell carcinoma (mRCC). Ann Oncol. 2016a;27.
Choueiri TK, Escudier B, Powles T, Tannir NM, Mainwaring PN, Rini BI, et al. Cabozantinib versus everolimus in advanced renal cell carcinoma (METEOR): final results from a randomised, open-label, phase 3 trial. Lancet Oncol. 2016b;17(7):917–27.
Choueiri TK, Hessel C, Halabi S, Sanford B, Michaelson MD, Hahn O, et al. Cabozantinib versus sunitinib as initial therapy for metastatic renal cell carcinoma of intermediate or poor risk (Alliance A031203 CABOSUN randomised trial): Progression-free survival by independent review and overall survival update. Eur J Cancer. 2018a;94:115–25.
Choueiri TK, Michaelson MD, Posadas EM, Sonpavde GP, McDermott DF, Nixon AB, et al. An Open Label Phase Ib Dose Escalation Study of TRC105 (Anti-Endoglin Antibody) with Axitinib in Patients with Metastatic Renal Cell Carcinoma. Oncologist. 2018b;:theoncologist.2018-0299.
Chow W-H. Rising Incidence of Renal Cell Cancer in the United States. Jama. 1999;281(17):1628.
Chuang M-J, Sun K-H, Tang S-J, Deng M-W, Wu Y-H, Sung J-S, et al. Tumor-derived tumor necrosis factor-alpha promotes progression and epithelial-mesenchymal transition in renal cell carcinoma cells. Cancer Sci. 2008;
Chung WB, Youn HJ. Pathophysiology and preventive strategies of anthracycline-induced cardiotoxicity. Korean J Intern Med. 2016;31(4):625–33.
Cillo C, Barba P, Freschi G, Bucciarelli G, Magli MC, Boncinelli E. HOX gene expression in normal and neoplastic human kidney. Int J Cancer. 1992;51(6):892–7.
Cohen AJ, Li FP, Berg S, Marchetto DJ, Tsai S, Jacobs SC, et al. Hereditary Renal-Cell Carcinoma Associated with a Chromosomal Translocation. N Engl J Med. 1979;301(11):592–5.
Collins CT, Hess JL. Deregulation of the HOXA9/MEIS1 axis in acute leukemia. Curr Opin Hematol. 2016a;23(4):354–61.
Collins CT, Hess JL. Role of HOXA9 in leukemia: dysregulation, cofactors and essential targets. Oncogene. 2016b;35(9):1090–8.
Corrao G, Scotti L, Bagnardi V, Sega R. Hypertension, antihypertensive therapy and renal-cell cancer: a meta-analysis. Curr Drug Saf. 2007;
Corrò C, Moch H. Biomarker discovery for renal cancer stem cells. J Pathol Clin Res. 2018;
Costa BM, Smith JS, Chen Y, Chen J, Phillips HS, Aldape KD, et al. Reversing HOXA9 oncogene activation by PI3K inhibition: Epigenetic mechanism and prognostic significance in human glioblastoma. Cancer Res. 2010;70(2):453–62.
Creighton CJ, Morgan M, Gunaratne PH, Wheeler DA, Gibbs RA, Gordon Robertson A, et al. Comprehensive molecular characterization of clear cell renal cell carcinoma. Nature. 2013 Jun 23;499(7456):43–9.
Creutzig U, Van Den Heuvel-Eibrink MM, Gibson B, Dworzak MN, Adachi S, De Bont E, et al. Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in children and adolescents: Recommendations from an international expert panel. Blood. 2012;120(16):3167–205.
Dagher J, Delahunt B, Rioux-Leclercq N, Egevad L, Coughlin G, Dunglison N, et al. Assessment of tumour associated necrosis provides prognostic information additional to WHO/ISUP

grading for clear cell renal cell carcinoma. Histopathology. 2018;
Dang C V. MYC on the path to cancer. Cell. 2012;149(1):22–35.
Daniels TR, Neacato II, Rodríguez JA, Pandha HS, Morgan R, Penichet ML. Disruption of HOX activity leads to cell death that can be enhanced by the interference of iron uptake in malignant B cells. Leukemia. 2010;24(9):1555–65.
Davis A, Capecchi M. Axial homeosis and appendicular skeleton defects in mice with a targeted disruption of hoxd-11. Development. 1994;120(8):2187–98.
Deckers IA, Van Den Brandt PA, Van Engeland M, Van Schooten FJ, Godschalk RW, Keszei AP, et al. Polymorphisms in genes of the renin-angiotensin-aldosterone system and renal cell cancer risk: Interplay with hypertension and intakes of sodium, potassium and fluid. Int J Cancer. 2015;136(5):1104–16.
Delahunt B, Cheville JC, Martignoni G, Humphrey PA, Magi-Galluzzi C, McKenney J, et al. The International Society of Urological Pathology (ISUP) grading system for renal cell carcinoma and other prognostic parameters. Am J Surg Pathol. 2013;37(10):1490–504.
Delahunt B, Sika-Paotonu D, Bethwaite PB, McCredie MRE, Martignoni G, Eble JN, et al. Fuhrman grading is not appropriate for chromophobe renal cell carcinoma. Am J Surg Pathol. 2007;31(6):957–60.
Delahunt B, Sika-Paotonu D, Bethwaite PB, William Jordan T, Magi-Galluzzi C, Zhou M, et al. Grading of clear cell renal cell carcinoma should be based on nucleolar prominence. Am J Surg Pathol. 2011;35(8):1134–9.
Dintilhac A, Bihan R, Guerrier D, Deschamps S, Pellerin I. A conserved non-homeodomain Hoxa9 isoform interacting with CBP is co-expressed with the “typical” Hoxa9 protein during embryogenesis. Gene Expr Patterns. 2004;4(2):215–22.
Döhner H, Estey EHE, Amadori S, Appelbaum FRFR, Büchner T, Burnett AK a. K, et al. Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet. Blood. 2010;115(3):453–74.
Dorrance AM, Liu S, Yuan W, Becknell B, Arnoczky KJ, Guimond M, et al. Mll partial tandem duplication induces aberrant Hox expression in vivo via specific epigenetic alterations. J Clin Invest. 2006;116(10):2707–16.
Drake KA, Adam M, Mahoney R, Potter SS. Disruption of Hox9,10,11 function results in cellular level lineage infidelity in the kidney. Sci Rep. 2018;8(1).
Dreyer C, Raymond E, Faivre S. La voie de signalisation PI3K/AKT/mTOR. Cancéro Dig. 2009;1(3):187.
Du H, Taylor HS. The role of hox genes in female reproductive tract development, adult function, and fertility. Cold Spring Harb Perspect Med. 2016;6(1).
Duboule D, Baron A, Mähl P, Galliot B. A new homeo-box is present in overlapping cosmid clones which define the mouse Hox-1 locus. EMBO J. 1986;5(8):1973–80.
Dubrulle J, McGrew MJ, Pourquié O. FGF signaling controls somite boundary position and regulates segmentation clock control of spatiotemporal Hox gene activation. Cell. 2001;106(2):219–32.
Dubrulle J, Pourquié O. fgf8 mRNA decay establishes a gradient that couples axial elongation to patterning in the vertebrate embryo. Nature. 2004;427(6973):419–22.
Duffy MJ, Synnott NC, McGowan PM, Crown J, O’Connor D, Gallagher WM. P53 as a target for the treatment of cancer. Cancer Treat Rev. 2014;40(10):1153–60.
Dupe V, Davenne M, Brocard J, Dolle P, Mark M, Dierich A, et al. In vivo functional analysis of the Hoxa-1 3’ retinoic acid response element (3’RARE). Development. 1997;124(2):399–410.
Ekici AB, Strissel PL, Oppelt PG, Renner SP, Brucker S, Beckmann MW, et al. HOXA10 and HOXA13 sequence variations in human female genital malformations including congenital absence of the uterus and vagina. Gene. 2013;518(2):267–72.
Ekker SC, Young KE, von Kessler DP, Beachy P a. Optimal DNA sequence recognition by the Ultrabithorax homeodomain of Drosophila. EMBO J. 1991;10(5):1179–86.
Escudier B, Bellmunt J, Négrier S, Bajetta E, Melichar B, Bracarda S, et al. Phase III trial of bevacizumab plus interferon alfa-2a in patients with metastatic renal cell carcinoma (AVOREN): Final analysis of overall survival. J Clin Oncol. 2010;28(13):2144–50.

Escudier B, Eisen T, Stadler WM, Szczylik C, Oudard S, Siebels M, et al. Sorafenib in Advanced Clear-Cell Renal-Cell Carcinoma. N Engl J Med. 2007a;356(2):125–34.

Escudier B, Pluzanska A, Koralewski P, Ravaud A, Bracarda S, Szczylik C, et al. Bevacizumab plus interferon alfa-2a for treatment of metastatic renal cell carcinoma: a randomised, double-blind phase III trial. Lancet. 2007b;370(9605):2103–11.

Escudier B, Szczylik C, Hutson TE, Demkow T, Staehler M, Rolland F, et al. Randomized phase II trial of first-line treatment with sorafenib versus interferon alfa-2a in patients with metastatic renal cell carcinoma. J Clin Oncol. 2009;27(8):1280–9.

Faber J, Krivtsov A V., Stubbs MC, Wright R, Davis TN, Van Heuvel-Eibrink M Den, et al. HOXA9 is required for survival in human MLL-rearranged acute leukemias. Blood. 2009;113(11):2375–85.

Falini B, Bolli N, Liso A, Martelli MP, Mannucci R, Pileri S, et al. Altered nucleophosmin transport in acute myeloid leukaemia with mutated NPM1: Molecular basis and clinical implications. Leukemia. 2009;23(10):1731–43.

Fogh J, Fogh JM, Orfeo T. One hundred and twenty seven cultured human tumor cell lines producing tumors in nude mice. J Natl Cancer Inst. 1977;59(1):221–6.

Forlani S. Acquisition of Hox codes during gastrulation and axial elongation in the mouse embryo. Development. 2003;130(16):3807–19.

Fu Z, Chen C, Zhou Q, Wang Y, Zhao Y, Zhao X, et al. LncRNA HOTTIP modulates cancer stem cell properties in human pancreatic cancer by regulating HOXA9. Cancer Lett. 2017;410:68–81.

Fuhrman S, Lasky L, C L. Prognostic significance of morphological parameters in renal cell carcinoma. Am J Surg Pathol. 1982;6(6):655–63.

Fujimoto S, Araki K, Chisaka O, Araki M, Takagi K, Yamamura KI. Analysis of the murine Hoxa-9 cDNA: An alternatively spliced transcript encodes a truncated protein lacking the homeodomain. Gene. 1998;209(1–2):77–85.

Gajula RP, Chettiar ST, Williams RD, Thiyagarajan S, Kato Y, Aziz K, et al. The Twist Box Domain Is Required for Twist1-induced Prostate Cancer Metastasis. Mol Cancer Res. 2013;11(11):1387–400.

Gassenmaier M, Chen D, Buchner A, Henkel L, Schiemann M, Mack B, et al. CXC chemokine receptor 4 is essential for maintenance of renal cell carcinoma-initiating cells and predicts metastasis. Stem Cells. 2013;31(8):1467–76.

Gati A, Kouidhi S, Marrakchi R, Gaaied A El, Kourda N, Derouiche A, et al. Obesity and renal cancer: Role of adipokines in the tumor-immune system conflict. Oncoimmunology. 2014;3(1).

Gearhart MD, Dickinson L, Ehley J, Melander C, Dervan PB, Wright PE, et al. Inhibition of DNA binding by human estrogen-related receptor 2 and estrogen receptor ?? with minor groove binding polyamides. Biochemistry. 2005;44(11):4196–203.

Gehring WJ, Qian YQ, Billeter M, Furukubo-Tokunaga K, Schier AF, Resendez-Perez D, et al. Homeodomain-DNA recognition. Cell. 1994;78(2):211–23.

Gendron RL, Paradis H, Hsieh-Li HM, Lee DW, Potter SS, Markoff E. Abnormal uterine stromal and glandular function associated with maternal reproductive defects in Hoxa-11 null mice. Biol Reprod. 1997;56(5):1097–105.

Gerlinger M, Rowan AJ, Horswell S, Larkin J, Endesfelder D, Gronroos E, et al. Intratumor Heterogeneity and Branched Evolution Revealed by Multiregion Sequencing. N Engl J Med. 2012;366(10):883–92.

Ghannam G, Takeda A, Camarata T, Moore MA, Viale A, Yaseen NR. The Oncogene Nup98-HOXA9 Induces Gene Transcription in Myeloid Cells. J Biol Chem. 2004;279(2):866–75.

Gilbert PM, Mouw JK, Unger MA, Lakins JN, Gbegnon MK, Clemmer VB, et al. HOXA9 regulates BRCA1 expression to modulate human breast tumor phenotype. J Clin Invest. 2010;120(5):1535–50.

Gilcrease MZ, Guzman-Paz M, Niehans G, Cherwitz D, McCarthy JB, Albores-Saavedra J. Correlation of CD44S expression in renal clear cell carcinomas with subsequent tumor progression or recurrence. Cancer. 1999;86(11):2320–6.

Gnarra JR, Tory K, Weng Y, Schmidt L, Wei MH, Li H, et al. Mutations of the VHL tumour suppressor gene in renal carcinoma. Nat Genet. 1994;7(1):85–90.

Golub TR, Slonim DK, Tamayo P, Huard C, Gaasenbeek M, Mesirov JP, et al. Molecular classification

of cancer: Class discovery and class prediction by gene expression monitoring. Science (80-). 1999;286(5439):531–527.

Gossage L, Eisen T, Maher ER. VHL, the story of a tumour suppressor gene. Nat Rev Cancer. 2015;15(1):55–64.

Grange C, Tapparo M, Collino F, Vitillo L, Damasco C, Deregibus MC, et al. Microvesicles released from human renal cancer stem cells stimulate angiogenesis and formation of lung premetastatic niche. Cancer Res. 2011;71(15):5346–56.

Grier DG, Thompson A, Kwasniewska A, McGonigle GJ, Halliday HL, Lappin TR. The pathophysiology of HOX genes and their role in cancer. J Pathol. 2005;205(2):154–71.

Groene J, Mansmann U, Meister R, Staub E, Roepcke S, Heinze M, et al. Transcriptional census of 36 microdissected colorectal cancers yields a gene signature to distinguish UICC II and III. Int J Cancer. 2006;119(8):1829–36.

Gudbjartsson T, Hardarson S, Petursdottir V, Thoroddsen A, Magnusson J, Einarsson G V. Histological subtyping and nuclear grading of renal cell carcinoma and their implications for survival: A retrospective nation-wide study of 629 patients. Eur Urol. 2005;48(4):593–600.

Gurumurthy M, Tan CH, Ng R, Zeiger L, Lau J, Lee J, et al. Nucleophosmin Interacts with HEXIM1 and Regulates RNA Polymerase II Transcription. J Mol Biol. 2008;378(2):302–17.

Hainsworth JD, Reeves JA, Mace JR, Crane EJ, Hamid O, Stille JR, et al. A Randomized, Open-Label Phase 2 Study of the CXCR4 Inhibitor LY2510924 in Combination with Sunitinib Versus Sunitinib Alone in Patients with Metastatic Renal Cell Carcinoma (RCC). Target Oncol. 2016;11(5):643–53.

Hakimi AA, Pham CG, Hsieh JJ. A clear picture of renal cell carcinoma. Nat Genet. 2013;45(8):849–50.

Hassawi M, Shestakova EA, Fournier M, Lebert-Ghali CÉ, Vaisson G, Frison H, et al. Hoxa9 collaborates with E2A-PBX1 in mouse B cell leukemia in association with Flt3 activation and decrease of B cell gene expression. Dev Dyn. 2014;243(1):145–58.

He M, Chen P, Arnovitz S, Li Y, Huang H, Neilly MB, et al. Two isoforms of HOXA9 function differently but work synergistically in human MLL-rearranged leukemia. Blood Cells, Mol Dis. 2012;49(2):102–6.

He S, Malik B, Borkin D, Miao H, Shukla S, Kempinska K, et al. Menin-MLL inhibitors block oncogenic transformation by MLL-fusion proteins in a fusion partner-independent manner. Leukemia. 2016;30(2):508–13.

Henry N, Sèbe P. Anatomie des reins et de la voie excrétrice supérieure. In: EMC - Néphrologie. Elsevier Masson SAS, Paris; 2008. p. 1–10.

Hirota E, Yan L, Tsunoda T, Ashida S, Fujime M, Shuin T, et al. Genome-wide gene expression profiles of clear cell renal cell carcinoma: Identification of molecular targets for treatment of renal cell carcinoma. IntJOncol. 2006 Oct 1;29(4):799–827.

Hsieh JJ, Purdue MP, Signoretti S, Swanton C, Albiges L, Schmidinger M, et al. Renal cell carcinoma. Nat Rev Dis Prim. 2017;3.

Hu YL, Passegué E, Fong S, Largman C, Lawrence HJ. Evidence that the Pim1 kinase gene is a direct target of HOXA9. Blood. 2007;109(11):4732–8.

Huang Y, Sitwala K, Bronstein J, Sanders D, Dandekar M, Collins C, et al. Identification and characterization of Hoxa9 binding sites in hematopoietic cells. Blood. 2012;119(2):388–98.

Hughson MD, Schmidt L, Zbar B, Daugherty S, Meloni AM, Silva FG, et al. Renal cell carcinoma of end-stage renal disease: a histopathologic and molecular genetic study. J Am Soc Nephrol. 1996;7(11):2461–8.

Hunt JD, Van Der Hel OL, McMillan GP, Boffetta P, Brennan P. Renal cell carcinoma in relation to cigarette smoking: Meta-analysis of 24 studies. Int J Cancer. 2005;114(1):101–8.

Hutson TE, Escudier B, Esteban E, Bjarnason GA, Lim HY, Pittman KB, et al. Randomized phase III trial of temsirolimus versus sorafenib as second-line therapy after sunitinib in patients with metastatic renal cell carcinoma. J Clin Oncol. 2014;32(8):760–7.

Hwang J-A, Lee B Bin, Kim Y, Hong S-H, Kim Y-H, Han J, et al. HOXA9 inhibits migration of lung cancer cells and its hypermethylation is associated with recurrence in non-small cell lung cancer. Mol Carcinog. 2014 May 9;(April):1–9.

Hwang SH, Kim KU, Kim JE, Kim HH, Lee MK, Lee CH, et al. Detection of HOXA9 gene methylation

in tumor tissues and induced sputum samples from primary lung cancer patients. Clin Chem Lab Med. 2011;49(4):699–704.
Iliopoulos O, Kibel A, Gray S, Kaelin WG. Tumour suppression by the human von hippel-lindau gene product. Nat Med. 1995;1(8):822–6.
Ingels A, Hew M, Algaba F, de Boer OJ, van Moorselaar RJA, Horenblas S, et al. Vimentin over-expression and carbonic anhydrase IX under-expression are independent predictors of recurrence, specific and overall survival in non-metastatic clear-cell renal carcinoma: a validation study. World J Urol. 2017;35(1):81–7.
Inoue D, Kitaura J, Togami K, Nishimura K, Enomoto Y, Uchida T, et al. Myelodysplastic syndromes are induced by histone methylation-altering ASXL1 mutations. J Clin Invest. 2013;123(11):4627–40.
Jiang F, Richter J, Schraml P, Bubendorf L, Gasser T, Sauter G, et al. Chromosomal imbalances in papillary renal cell carcinoma: Genetic differences between histological subtypes. Am J Pathol. 1998;153(5):1467–73.
Jiménez AP, Traum A, Boettger T, Hackstein H, Richter M, Dammann RH. The tumor suppressor RASSF1A induces the YAP1 target gene ANKRD1 that is epigenetically inactivated in human cancers and inhibits tumor growth. Oncotarget. 2017;1–16.
Jin X, Jiao X, Jiao J, Zhang T, Cui B. Increased expression of FHL2 promotes tumorigenesis in cervical cancer and is correlated with poor prognosis. Gene. 2018;669(107):99–106.
Ju T, Jin H, Ying R, Xie Q, Zhou C, Gao D. Overexpression of NAC1 confers drug resistance via HOXA9 in colorectal carcinoma cells. Mol Med Rep. 2017;16(3):3194–200.
Kachgal S, Mace KA, Boudreau NJ. The dual roles of homeobox genes in vascularization and wound healing. Cell Adhes Migr. 2012;6(6):457–70.
Kageyama Y, Sugiyama H, Ayame H, Iwai A, Fujii Y, Huang LE, et al. Suppression of VEGF transcription in renal cell carcinoma cells by pyrrole-imidazole hairpin polyamides targeting the hypoxia responsive element. Acta Oncol (Madr). 2006;45(3):317–24.
Kanai M, Hamada JI, Takada M, Asano T, Murakawa K, Takahashi Y, et al. Aberrant expressions of HOX genes in colorectal and hepatocellular carcinomas. Oncol Rep. 2010;23(3):843–51.
Kapitsinou PP, Haase VH. The VHL tumor suppressor and HIF: Insights from genetic studies in mice. Cell Death Differ. 2008;15(4):650–9.
Kasper LH, Brindle PK, Schnabel CA, Pritchard CEJ, Cleary ML, van Deursen JMA. CREB Binding Protein Interacts with Nucleoporin-Specific FG Repeats That Activate Transcription and Mediate NUP98-HOXA9 Oncogenicity. Mol Cell Biol. 1999;19(1):764–76.
Kaufman TC, Lewis R, Wakimoto B. Cytogenetic analysis of chromosome 3 in Drosophila melanogaster: The homoeotic gene complex in polytene chromosome interval 84A-B. Genetics. 1980;94(1):115–33.
Kawaciuk I, Hyrsl L, Dusek P, Jarolim L, Schmidt M, Kaliska V, et al. Influence of tumour-associated symptoms on the prognosis of patients with renal cell carcinoma. Scand J Urol Nephrol. 2008;42(5):406–11.
Kawagoe H, Humphries RK, Blair A, Sutherland HJ, Hogge DD. Expression of HOX genes, HOX cofactors, and MLL in phenotypically and functionally defined subpopulations of leukemic and normal human hematopoietic cells. Leukemia. 1999;
Keith B, Johnson RS, Simon MC. HIF1 α and HIF2 α: sibling rivalry in hypoxic tumour growth and progression. Nat Rev Cancer. 2012;12(1):9–22.
Khan SN, Jankowska AM, Mahfouz R, Dunbar AJ, Sugimoto Y, Hosono N, et al. Multiple mechanisms deregulate EZH2 and histone H3 lysine 27 epigenetic changes in myeloid malignancies. Leukemia. 2013;27(6):1301–9.
Kim C, Nielsen HC. Hoxa-5 in mouse developing lung: cell-specific expression and retinoic acid regulation. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2000;
Kim HL, Belldegrun AS, Freitas DG, Bui MHT, Han KR, Dorey FJ, et al. Paraneoplastic signs and symptoms of renal cell carcinoma: Implications for prognosis. J Urol. 2003;170(5):1742–6.
Kim HL, Han KR, Zisman A, Figlin RA, Belldegrun AS. Cachexia-like, symptoms predict a worse prognosis in localized T1 renal cell carcinoma. J Urol. 2004;171(5):1810–3.
Kirito K, Fox N, Kaushansky K. Thrombopoietin induces HOXA9 nuclear transport in immature hematopoietic cells: potential mechanism by which the hormone favorably affects

hematopoietic stem cells. Mol Cell Biol. 2004;24(15):6751–62.
Kmita M, Duboule D. Organizing axes in time and space; 25 years of colinear tinkering. Science (80-). 2003;301(5631):331–3.
Knosp WM, Scott V, Bächinger HP, Stadler HS. HOXA13 regulates the expression of bone morphogenetic proteins 2 and 7 to control distal limb morphogenesis. Development. 2004;131(18):4581–92.
Ko SY, Barengo N, Ladanyi A, Lee JS, Marini F, Lengyel E, et al. HOXA9 promotes ovarian cancer growth by stimulating cancer-associated fibroblasts. J Clin Invest. 2012;122(10):3603–17.
Ko SY, Ladanyi A, Lengyel E, Naora H. Expression of the homeobox gene HOXA9 in ovarian cancer induces peritoneal macrophages to acquire an M2 tumor-promoting phenotype. Am J Pathol. 2014;184(1):271–81.
Ko SY, Naora H. Adaptation of ovarian cancer cells to the peritoneal environment: Multiple mechanisms of the developmental patterning gene HOXA9. Cancer Cell Microenviron. 2014a Nov 13;1(6):e379.
Ko SY, Naora H. HOXA9 promotes homotypic and heterotypic cell interactions that facilitate ovarian cancer dissemination via its induction of P-cadherin. Mol Cancer. 2014b;13(1).
Kojic S, Nestorovic A, Rakicevic L, Belgrano A, Stankovic M, Divac A, et al. A novel role for cardiac ankyrin repeat protein Ankrd1/CARP as a co-activator of the p53 tumor suppressor protein. Arch Biochem Biophys. 2010;502(1):60–7.
De Koning HP. Uptake of pentamidine in Trypanosoma brucei brucei is mediated by three distinct transporters: implications for cross-resistance with arsenicals. Mol Pharmacol. 2001;59(3):586–92.
Kreso A, Dick JE. Evolution of the cancer stem cell model. Cell Stem Cell. 2014;14(3):275–91.
Krivtsov A V., Feng Z, Lemieux ME, Faber J, Vempati S, Sinha AU, et al. H3K79 Methylation Profiles Define Murine and Human MLL-AF4 Leukemias. Cancer Cell. 2008;14(5):355–68.
Kroeger N, Rampersaud EN, Patard JJ, Klatte T, Birkhäuser FD, Shariat SF, et al. Prognostic value of microvascular invasion in predicting the cancer specific survival and risk of metastatic disease in renal cell carcinoma: A multicenter investigation. J Urol. 2012;187(2):418–23.
Kroon E, Krosl J, Thorsteinsdottir U, Baban S, Buchberg AM, Sauvageau G. Hoxa9 transforms primary bone marrow cells through specific collaboration with Meis1a but not Pbx1b. EMBO J. 1998;17(13):3714–25.
Kuroda N, Tamura M, Shiotsu T, Nakamura S, Taguchi T, Tominaga A, et al. Chromosomal abnormalities of clear cell renal cell carcinoma: Frequent gain of chromosome 7. Pathol Int. 2010;60(1):9–13.
Lambert M, Jambon S, Depauw S, David-Cordonnier M-H. Targeting Transcription Factors for Cancer Treatment. Molecules. 2018;23(6):1479.
Lansiaux A, Tanious F, Mishal Z, Dassonneville L, Kumar A, Stephens CE, et al. Distribution of furamidine analogues in tumor cells: Targeting of the nucleus or mitochondria depending on the amidine substitution. Cancer Res. 2002;62(24):7219–29.
Lapidot T, Sirard C, Vormoor J, Murdoch B, Hoang T, Caceres-Cortes J, et al. A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. Nature. 1994;367(6464):645–8.
Lappin TRJ, Grier DG, Thompson A, Halliday HL. HOX genes: Seductive science, mysterious mechanisms. Ulster Med J. 2006;75(1):23–31.
LaRonde-LeBlanc N a, Wolberger C. Structure of HoxA9 and Pbx1 bound to DNA: Hox hexapeptide and DNA recognition anterior to posterior. Genes Dev. 2003;17(16):2060–72.
Latif F, Tory K, Gnarra J, Yao M, Duh FM, Orcutt M Lou, et al. Identification of the von Hippel-Lindau disease tumor suppressor gene. Science (80-). 1993;260(5112):1317–20.
Lawrence HJ, Helgason CD, Sauvageau G, Fong S, Izon DJ, Humphries RK, et al. Mice bearing a targeted interruption of the homeobox gene HOXA9 have defects in myeloid, erythroid, and lymphoid hematopoiesis. Blood. 1997;89(6):1922–30.
Lee CT, Katz J, Fearn PA, Russo P. Mode of presentation of renal cell carcinoma provides prognostic information. Urol Oncol. 2002;7(4):135–40.
Lee JS, Kim HS, Jung JJ, Park CS, Lee MC. Expression of vascular endothelial growth factor in renal cell carcinoma and the relation to angiogenesis and p53 protein expression. J Surg Oncol.

2001;77(October 2000):55–60.
Leroy X, Zerimech F, Zini L, Copin MC, Buisine MP, Gosselin B, et al. MUC1 expression is correlated with nuclear grade and tumor progression in pT1 renal clear cell carcinoma. Am J Clin Pathol. 2002a;118(1):47–51.
Leroy X, Zini L, Leteurtre E, Zerimech F, Porchet N, Aubert JP, et al. Morphologic subtyping of papillary renal cell carcinoma: Correlation with prognosis and differential expression of MUC1 between the two subtypes. Mod Pathol. 2002b;15(11):1126–30.
Lewis E. Pseudoallelism and gene evolution. Cold Spring Harb Symp Quant Biol. 1951;16:159–74.
Lewis E. A gene complex controlling segmentation in Drosophila. Nature. 1978;276:565–70.
Li Z, Huang H, Chen P, He M, Li Y, Arnovitz S, et al. MiR-196b directly targets both HOXA9/MEIS1 oncogenes and FAS tumour suppressor in MLL-rearranged leukaemia. Nat Commun. 2012;3.
Li Z, Zhang Z, Li Y, Arnovitz S, Chen P, Huang H, et al. PBX3 is an important cofactor of HOXA9 in leukemogenesis. Blood. 2013;121(8):1422–31.
Liberzon A, Birger C, Thorvaldsdóttir H, Ghandi M, Mesirov JP, Tamayo P. The Molecular Signatures Database Hallmark Gene Set Collection. Cell Syst. 2015;1(6):417–25.
Lillico R, Lawrence CK, Lakowski TM. Selective DOT1L, LSD1, and HDAC Class i Inhibitors Reduce HOXA9 Expression in MLL-AF9 Rearranged Leukemia Cells, but Dysregulate the Expression of Many Histone-Modifying Enzymes. J Proteome Res. 2018;17(8):2657–67.
Lim H-S, Kim CS, Kim J-S, Yu S-K, Go D-S, Lee SA, et al. Suppression of Oral Carcinoma Oncogenic Activity by microRNA-203 via Down-regulation of SEMA6A. Anticancer Res. 2017 Oct 1;37(10):5425–33.
Liu Y, Kumar A, Depauw S, Nhili R, David-Cordonnier MH, Lee MP, et al. Water-mediated binding of agents that target the DNA minor groove. J Am Chem Soc. 2011;133(26):10171–83.
Liu YJ, Zhu Y, Yuan HX, Zhang JP, Guo JM, Lin ZM. Overexpression of HOXC11 homeobox gene in clear cell renal cell carcinoma induces cellular proliferation and is associated with poor prognosis. Tumor Biol. 2015;36(4):2821–9.
Ljungberg B, Bensalah K, Vice-chair AB, Canfield S, Advocate RHGP, Hora M, et al. EAU Guidelines on Renal Cell Carcinoma [Internet]. 2016 [cited 2018 Sep 1]. Available from: http://uroweb.org/guideline/renal-cell-carcinoma/
Looyenga BD, Furge KA, Dykema KJ, Koeman J, Swiatek PJ, Giordano TJ, et al. Chromosomal amplification of leucine-rich repeat kinase-2 (LRRK2) is required for oncogenic MET signaling in papillary renal and thyroid carcinomas. Proc Natl Acad Sci. 2011;108(4):1439–44.
Loria R, Bon G, Perotti V, Gallo E, Bersani I, Baldassari P, et al. Sema6A and Mical1 control cell growth and survival of BRAF V600E human melanoma cells. Oncotarget. 2014;
Ma Y, Zhang Y, Mou X, Liu Z, Ru G, Li E. High level of homeobox A9 and PBX homeobox 3 expression in gastric cancer correlates with poor prognosis. Oncol Lett. 2017;
Magella B, Mahoney R, Adam M, Potter SS. Reduced Abd-B Hox function during kidney development results in lineage infidelity. Dev Biol. 2018;438(2):84–93.
Maisonneuve P, Agodoa L, Gellert R, Stewart JH, Buccianti G, Lowenfels AB, et al. Cancer in patients on dialysis for end-stage renal disease: An international collaborative study. Lancet. 1999;354(9173):93–9.
Malek R, Gajula RP, Williams RD, Nghiem B, Simons BW, Nugent K, et al. TWIST1-WDR5-hottip regulates Hoxa9 chromatin to facilitate prostate cancer metastasis. Cancer Res. 2017;77(12):3181–93.
Mancini V, Battaglia M, Ditonno P, Palazzo S, Lastilla G, Montironi R, et al. Current insights in renal cell cancer pathology. Urol Oncol. 2008;26(3):225–38.
Marini JC, Levene SD, Crothers DM, Englund PT. Bent helical structure in kinetoplast DNA. Proc Natl Acad Sci. 1982;79(24):7664–8.
Marshall FF. Obesity and Renal Cell Cancer - a Quantitative Review. J Urol. 2002;877.
Marshall H, Studer M, Pöpperl H, Aparicio S, Kuroiwa A, Brenner S, et al. A conserved retinoic acid response element required for early expression of the homeobox gene Hoxb-1. Nature. 1994;370(6490):567–71.
De Martino M, Klatte T, Seemann C, Waldert M, Haitel A, Schatzl G, et al. Validation of serum C-reactive protein (CRP) as an independent prognostic factor for disease-free survival in

patients with localised renal cell carcinoma (RCC). BJU Int. 2013;111(8).
Mathis AM, Holman JL, Sturk LM, Ismail MA, Boykin DW, Tidwell RR, et al. Accumulation and intracellular distribution of antitrypanosomal diamidine compounds DB75 and DB820 in African trypanosomes. Antimicrob Agents Chemother. 2006;50(6):2185–91.
McDermott DF, Regan MM, Clark JI, Flaherty LE, Weiss GR, Logan TF, et al. Randomized phase III trial of high-dose interleukin-2 versus subcutaneous interleukin-2 and interferon in patients with metastatic renal cell carcinoma. J Clin Oncol. 2005;23(1):133–41.
Mdachi RE, Thuita JK, Kagira JM, Ngotho JM, Murilla GA, Ndung'u JM, et al. Efficacy of the novel diamidine compound 2,5-Bis(4-amidinophenyl)-furan- bis-O-methlylamidoxime (pafuramidine, DB289) against Trypanosoma brucei rhodesiense infection in vervet monkeys after oral administration. Antimicrob Agents Chemother. 2009;53(3):953–7.
Medical Research Council Renal Cancer C. Interferon-alpha and survival in metastatic renal carcinoma: early results of a randomised controlled trial. Medical Research Council Renal Cancer Collaborators. Lancet. 1999;353(9146):14–7.
Méjean A, Ravaud A, Thezenas S, Colas S, Beauval J-B, Bensalah K, et al. Sunitinib Alone or after Nephrectomy in Metastatic Renal-Cell Carcinoma. N Engl J Med. 2018;379(5):417–27.
Mermel CH, Schumacher SE, Hill B, Meyerson ML, Beroukhim R, Getz G. GISTIC2.0 facilitates sensitive and confident localization of the targets of focal somatic copy-number alteration in human cancers. Genome Biol. 2011;12(4).
Meyer C, Kowarz E, Hofmann J, Renneville A, Zuna J, Trka J, et al. New insights to the MLL recombinome of acute leukemias. Leukemia. 2009;23(8):1490–9.
Meyer E, Pasquier D, Bernadou G, Calais G, Maroun P, Bossi A, et al. Stereotactic radiation therapy in the strategy of treatment of metastatic renal cell carcinoma: A study of the Getug group. Eur J Cancer. 2018;98:38–47.
Micucci C, Matacchione G, Valli D, Orciari S, Catalano A. HIF2α is involved in the expansion of CXCR4-positive cancer stem-like cells in renal cell carcinoma. Br J Cancer. 2015;113(8):1178–85.
Midgley I, Fitzpatrick K, Taylor LM, Houchen TL, Henderson SJ, Wright SJ, et al. 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. 2007;35(6):955–67.
Milne TA, Kim J, Wang GG, Stadler SC, Basrur V, Whitcomb SJ, et al. Multiple Interactions Recruit MLL1 and MLL1 Fusion Proteins to the HOXA9 Locus in Leukemogenesis. Mol Cell. 2010;38(6):853–63.
Mitsui Y, Hirata H, Arichi N, Hiraki M, Yasumoto H, Chang I, et al. Inactivation of bone morphogenetic protein 2 may predict clinical outcome and poor overall survival for renal cell carcinoma through epigenetic pathways. Oncotarget. 2015;6(11).
Moch H, Cubilla AL, Humphrey PA, Reuter VE, Ulbright TM. The 2016 WHO Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs—Part A: Renal, Penile, and Testicular Tumours. Eur Urol. 2016a;70(1):93–105.
Moch H, Gasser T, Amin MB, Torhorst J, Sauter G, Mihatsch MJ. Prognostic utility of the recently recommended histologic classification and revised TNM staging system of renal cell carcinoma: A swiss experience with 588 tumors. Cancer. 2000;89(3):604–14.
Moch H, Humphrey PA, Ulbright TM, Reuter VE. WHO Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs. Fourth edition. WHO I, editor. 2016b.
Montavon T, Soshnikova N. Hox gene regulation and timing in embryogenesis. Semin Cell Dev Biol. 2014 Oct;34C:76–84.
Morgan R, Boxall A, Harrington KJ, Simpson GR, Gillett C, Michael A, et al. Targeting the HOX/PBX dimer in breast cancer. Breast Cancer Res Treat. 2012;136(2):389–98.
Morgan R, Boxall A, Harrington KJ, Simpson GR, Michael A, Pandha HS. Targeting HOX transcription factors in prostate cancer. BMC Urol. 2014;14(1).
Morgan R, Pirard PM, Shears L, Sohal J, Pettengell R, Pandha HS. Antagonism of HOX/PBX dimer formation blocks the in vivo proliferation of melanoma. Cancer Res. 2007;67(12):5806–13.
Morgan R, Plowright L, Harrington KJ, Michael A, Pandha HS. Targeting HOX and PBX transcription

factors in ovarian cancer. BMC Cancer. 2010;
Motzer RJ, Escudier B, McDermott DF, George S, Hammers HJ, Srinivas S, et al. Nivolumab versus Everolimus in Advanced Renal-Cell Carcinoma. N Engl J Med. 2015;373(19):1803–13.
Motzer RJ, Escudier B, Oudard S, Hutson TE, Porta C, Bracarda S, et al. Phase 3 trial of everolimus for metastatic renal cell carcinoma: Final results and analysis of prognostic factors. Cancer. 2010;116(18):4256–65.
Motzer RJ, Escudier B, Tomczak P, Hutson TE, Michaelson MD, Negrier S, et al. Axitinib versus sorafenib as second-line treatment for advanced renal cell carcinoma: Overall survival analysis and updated results from a randomised phase 3 trial. Lancet Oncol. 2013a;14(6):552–62.
Motzer RJ, Hutson TE, Cella D, Reeves J, Hawkins R, Guo J, et al. Pazopanib versus Sunitinib in Metastatic Renal-Cell Carcinoma. N Engl J Med. 2013b;369(8):722–31.
Motzer RJ, Hutson TE, Tomczak P, Michaelson MD, Bukowski RM, Rixe O, et al. Sunitinib versus Interferon Alfa in Metastatic Renal-Cell Carcinoma. N Engl J Med. 2007;356(2):115–24.
Motzer RJ, Michaelson MD, Redman BG, Hudes GR, Wilding G, Figlin RA, et al. Activity of SU11248, a multitargeted inhibitor of vascular endothelial growth factor receptor and platelet-derived growth factor receptor, in patients with metastatic renal cell carcinoma. J Clin Oncol. 2006a;24(1):16–24.
Motzer RJ, Rini BI, Bukowski RM, Curti BD, George DJ, Hudes GR, et al. Sunitinib in patients with metastatic renal cell carcinoma. Jama. 2006b Jun 7;295(21):2516–24.
Motzer RJ, Tannir NM, McDermott DF, Arén Frontera O, Melichar B, Choueiri TK, et al. Nivolumab plus Ipilimumab versus Sunitinib in Advanced Renal-Cell Carcinoma. N Engl J Med. 2018;NEJMoa1712126.
Muragaki Y, Mundlos S, Upton J, Olsen BR. Altered growth and branching patterns in synpolydactyly caused by mutations in HOXD13. Science (80-). 1996;272(5261):548–51.
Nagel S, Venturini L, Marquez VE, Meyer C, Kaufmann M, Scherr M, et al. Polycomb repressor complex 2 regulates HOXA9 and HOXA10, activating ID2 in NK/T-cell lines. Mol Cancer. 2010;9.
Nakano K, Sakai N, Yamazaki Y, Watanabe H, Yamada N, Sezaki K, et al. Novel mutations of the HOXD13 gene in hand and foot malformations. Int Surg. 2007;92(5):287–95.
Neijts R, Amin S, Van Rooijen C, Tan S, Creyghton MP, De Laat W, et al. Polarized regulatory landscape and Wnt responsiveness underlie Hox activation in embryos. Genes Dev. 2016;30(17):1937–42.
Nelson CE, Morgan B a, Burke AC, Laufer E, DiMambro E, Murtaugh LC, et al. Analysis of Hox gene expression in the chick limb bud. Development. 1996;
Neuzillet Y, Tillou X, Mathieu R, Long JA, Gigante M, Paparel P, et al. Renal cell carcinoma (RCC) in patients with end-stage renal disease exhibits many favourable clinical, pathologic, and outcome features compared with RCC in the general population. Eur Urol. 2011;60(2):366–73.
Nhili R, Peixoto P, Depauw S, Flajollet S, Dezitter X, Munde MM, et al. Targeting the DNA-binding activity of the human ERG transcription factor using new heterocyclic dithiophene diamidines. Nucleic Acids Res. 2013;41(1):125–38.
Nickerson ML, Warren MB, Toro JR, Matrosova V, Glenn G, Turner ML, et al. Mutations in a novel gene lead to kidney tumors, lung wall defects, and benign tumors of the hair follicle in patients with the Birt-Hogg-Dubé syndrome. Cancer Cell. 2002;2(2):157–64.
Noordermeer D, Leleu M, Splinter E, Rougemont J, De Laat W, Duboule D. The dynamic architecture of Hox gene clusters. Science (80-). 2011;334(6053):222–5.
Novak RL, Harper DP, Caudell D, Slape C, Beachy SH, Aplan PD. Gene expression profiling and candidate gene resequencing identifies pathways and mutations important for malignant transformation caused by leukemogenic fusion genes. Exp Hematol. 2012;40(12):1016–27.
Nowell PC. The clonal evolution of tumor cell populations. Science (80-). 1976;194(4260):23–8.
Ogata H, Goto S, Sato K, Fujibuchi W, Bono H, Kanehisa M. KEGG: Kyoto encyclopedia of genes and genomes. Vol. 27, Nucleic Acids Research. 1999. p. 29–34.
Ooi A, Dykema K, Ansari A, Petillo D, Snider J, Kahnoski R, et al. CUL3 and NRF2 mutations confer an NRF2 activation phenotype in a sporadic form of papillary renal cell carcinoma. Cancer

Res. 2013;73(7):2044–51.
Packer a I, Crotty D a, Elwell V a, Wolgemuth DJ. Expression of the murine Hoxa4 gene requires both autoregulation and a conserved retinoic acid response element. Development. 1998;125(11):1991–8.
Palapattu GS, Kristo B, Rajfer J. Paraneoplastic syndromes in urologic malignancy: the many faces of renal cell carcinoma. Rev Urol. 2002;4(4):163–70.
Park SM, Choi EY, Bae M, Choi JK, Kim YJ. A long-range interactive DNA methylation marker panel for the promoters of HOXA9 and HOXA10 predicts survival in breast cancer patients. Clin Epigenetics. 2017;9(1).
Patard JJ, Kim HL, Lam JS, Dorey FJ, Pantuck AJ, Zisman A, et al. Use of the University of California Los Angeles integrated staging system to predict survival in renal cell carcinoma: An international multicenter study. J Clin Oncol. 2004;22(16):3316–22.
Patard JJ, Leray E, Rioux-Leclercq N, Cindolo L, Ficarra V, Zisman A, et al. Prognostic value of histologic subtypes in renal cell carcinoma: A multicenter experience. J Clin Oncol. 2005;23(12):2763–71.
Patard JJ, Leray E, Rodriguez A, Rioux-Leclercq N, Guillé F, Lobel B. Correlation between symptom graduation, tumor characteristics and survival in renal cell carcinoma. Eur Urol. 2003;44(2):226–32.
Patterson LT, Pembaur M, Potter SS. Hoxa11 and Hoxd11 regulate branching morphogenesis of the ureteric bud in the developing kidney. Development. 2001;128(11):2153–61.
Patterson LT, Potter SS. Atlas of Hox Gene Expression in the Developing Kidney. Dev Dyn. 2004;229(4):771–9.
Pavlovich CP, Schmidt LS. Searching for the hereditary causes of renal-cell carcinoma. Nat Rev Cancer. 2004;4(5):381–93.
Peixoto P, Liu Y, Depauw S, Hildebrand MP, Boykin DW, Bailly C, et al. 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. 2008;36(10):3341–53.
Peng F, Shi X, Meng Y, Dong B, Xu G, Hou T, et al. Long non-coding RNA HOTTIP is upregulated in renal cell carcinoma and regulates cell growth and apoptosis by epigenetically silencing of LATS2. Biomed Pharmacother. 2018;105:1133–40.
Phuoc NB, Ehara H, Gotoh T, Nakano M, Yokoi S, Deguchi T, et al. Immunohistochemical Analysis with Multiple Antibodies in Search of Prognostic Markers for Clear Cell Renal Cell Carcinoma. Urology. 2007;69(5):843–8.
Pichler M, Hutterer GC, Chromecki TF, Jesche J, Kampel-Kettner K, Rehak P, et al. Histologic tumor necrosis is an independent prognostic indicator for clear cell and papillary renal cell carcinoma. Am J Clin Pathol. 2012;137(2):283–9.
Pierorazio PM, Johnson MH, Ball MW, Gorin MA, Trock BJ, Chang P, et al. Five-year Analysis of a Multi-institutional Prospective Clinical Trial of Delayed Intervention and Surveillance for Small Renal Masses: The DISSRM Registry. Eur Urol. 2015;68(3):408–15.
Pignot G, Elie C, Conquy S, Vieillefond A, Flam T, Zerbib M, et al. Survival Analysis of 130 Patients with Papillary Renal Cell Carcinoma: Prognostic Utility of Type 1 and Type 2 Subclassification. Urology. 2007;69(2):230–5.
Pineault N, Helgason CD, Lawrence HJ, Humphries RK. Differential expression of Hox, Meis1, and Pbx1 genes in primitive cells throughout murine hematopoietic ontogeny. Exp Hematol. 2002 Jan;30(1):49–57.
Pires-Luís AS, Costa-Pinheiro P, Ferreira MJ, Antunes L, Lobo F, Oliveira J, et al. Identification of clear cell renal cell carcinoma and oncocytoma using a three-gene promoter methylation panel. J Transl Med. 2017;15(1).
Pohlig G, Bernhard SC, Blum J, Burri C, Mpanya A, Lubaki JPF, et al. Efficacy and Safety of Pafuramidine versus Pentamidine Maleate for Treatment of First Stage Sleeping Sickness in a Randomized, Comparator-Controlled, International Phase 3 Clinical Trial. PLoS Negl Trop Dis. 2016;10(2):1–17.
Pojo M, Gonçalves CS, Xavier-Magalhães A, Oliveira AI, Gonçalves T, Correia S, et al. A transcriptomic signature mediated by HOXA9 promotes human glioblastoma initiation, aggressiveness and resistance to temozolomide. Oncotarget. 2015;6(10):7657–74.

Prinos P, Joseph S, Oh K, Meyer BI, Gruss P, Lohnes D. Multiple pathways governing Cdx1 expression during murine development. Dev Biol. 2001;239(2):257–69.

Quéré R, Karlsson G, Hertwig F, Rissler M, Lindqvist B, Fioretos T, et al. Smad4 binds Hoxa9 in the cytoplasm and protects primitive hematopoietic cells against nuclear activation by Hoxa9 and leukemia transformation. Blood. 2011;117(22):5918–30.

Raines AM, Magella B, Adam M, Potter SS. Key pathways regulated by HoxA9,10,11/HoxD9,10,11 during limb development. BMC Dev Biol. 2015;15(1).

Reddy BSP, Sondhi SM, Lown JW. Synthetic DNA minor groove-binding drugs. Pharmacol Ther. 1999;84(1):1–111.

Rehman M, Tamagnone L. Semaphorins in cancer: Biological mechanisms and therapeutic approaches. Semin Cell Dev Biol. 2013;24(3):179–89.

Rhoads K, Arderiu G, Charboneau A, Hansen SL, Hoffman W, Boudreau N. A role for Hox A5 in regulating angiogenesis and vascular patterning. Lymphat Res Biol. 2005;3(4):240–52.

Ricketts CJ, De Cubas AA, Fan H, Smith CC, Lang M, Reznik E, et al. Comprehensive Molecular Characterization of Renal Cell Carcinoma. Cell Rep. 2018;23(1):313–326.e5.

Rini BI, Campbell SC, Escudier B. Renal cell carcinoma. Lancet. 2009;373(9669):1119–32.

Rini BI, Halabi S, Rosenberg JE, Stadler WM, Vaena DA, Archer L, et al. Phase III trial of bevacizumab plus interferon alfa versus interferon alfa monotherapy in patients with metastatic renal cell carcinoma: Final results of CALGB 90206. J Clin Oncol. 2010;28(13):2137–43.

Rini BI, Halabi S, Rosenberg JE, Stadler WM, Vaena DA, Ou SS, et al. Bevacizumab plus interferon alfa compared with interferon alfa monotherapy in patients with metastatic renal cell carcinoma: CALGB 90206. J Clin Oncol. 2008;26(33):5422–8.

Rinn JL, Kertesz M, Wang JK, Squazzo SL, Xu X, Brugmann SA, et al. Functional Demarcation of Active and Silent Chromatin Domains in Human HOX Loci by Noncoding RNAs. Cell. 2007;129(7):1311–23.

Rioux-Leclercq N, Karakiewicz PI, Trinh QD, Ficarra V, Cindolo L, De La Taille A, et al. Prognostic ability of simplified nuclear grading of renal cell carcinoma. Cancer. 2007;109(5):868–74.

De Rooij JDE, Hollink IHIM, Arentsen-Peters STCJM, Van Galen JF, Berna Beverloo H, Baruchel A, et al. NUP98/JARID1A is a novel recurrent abnormality in pediatric acute megakaryoblastic leukemia with a distinct HOX gene expression pattern. Leukemia. 2013;27(12):2280–8.

Rosen V. BMP2 signaling in bone development and repair. Cytokine and Growth Factor Reviews. 2009.

Ruby JG, Stark A, Johnston WK, Kellis M, Bartel DP, Lai EC. Evolution, biogenesis, expression, and target predictions of a substantially expanded set of Drosophila microRNAs. Genome Res. 2007;17(12):1850–64.

Ruggeri BA, Camp F, Miknyoczki S. Animal models of disease: Pre-clinical animal models of cancer and their applications and utility in drug discovery. Biochem Pharmacol. 2014;87(1):150–61.

Santoni M, Massari F, Amantini C, Nabissi M, Maines F, Burattini L, et al. Emerging role of tumor-associated macrophages as therapeutic targets in patients with metastatic renal cell carcinoma. Cancer Immunol Immunother. 2013;62(12):1757–68.

Sauvageau G, Lansdorp PM, Eaves CJ, Hogge DE, Dragowska WH, Reid DS, et al. Differential expression of homeobox genes in functionally distinct CD34+ subpopulations of human bone marrow cells. Proc Natl Acad Sci. 1994;91(25):12223–7.

Schlesinger-Raab A, Treiber U, Zaak D, Hölzel D, Engel J. Metastatic renal cell carcinoma: Results of a population-based study with 25 years follow-up. Eur J Cancer. 2008;44(16):2485–95.

Schmidt L, Duh FM, Chen F, Kishida T, Glenn G, Choyke P, et al. Germline and somatic mutations in the tyrosine kinase domain of the MET proto-oncogene in papillary renal carcinomas. Nat Genet. 1997;16(1):68–73.

Scosyrev E, Messing EM, Sylvester R, Campbell S, Van Poppel H. Renal function after nephron-sparing surgery versus radical nephrectomy: Results from EORTC randomized trial 30904. Eur Urol. 2014;65(2):372–7.

Şenbabaoğlu Y, Gejman RS, Winer AG, Liu M, Van Allen EM, de Velasco G, et al. Tumor immune microenvironment characterization in clear cell renal cell carcinoma identifies prognostic

and immunotherapeutically relevant messenger RNA signatures. Genome Biol. 2016;17(1).
Sengupta S, Lohse CM, Leibovich BC, Frank I, Thompson RH, Webster WS, et al. Histologic coagulative tumor necrosis as a prognostic indicator of renal cell carcinoma aggressiveness. Cancer. 2005;104(3):511–20.
Shackleton M, Quintana E, Fearon ER, Morrison SJ. Heterogeneity in Cancer: Cancer Stem Cells versus Clonal Evolution. Cell. 2009;138(5):822–9.
Shears L, Plowright L, Harrington K, Pandha HS, Morgan R. Disrupting the Interaction Between HOX and PBX Causes Necrotic and Apoptotic Cell Death in the Renal Cancer Lines CaKi-2 and 769-P. J Urol. 2008;180(5):2196–201.
Shen L, Chen C, Wei X, Li X, Luo G, Zhang J, et al. Overexpression of ankyrin repeat domain 1 enhances cardiomyocyte apoptosis by promoting p53 activation and mitochondrial dysfunction in rodents. Clin Sci. 2015;128(10):665–78.
Shen W-F, Hu Y-L, Uttarwar L, Passegue E, Largman C. MicroRNA-126 Regulates HOXA9 by Binding to the Homeobox. Mol Cell Biol. 2008;28(14):4609–19.
Shen W-F, Rozenfeld S, Kwong A, Kömüves LG, Lawrence HJ, Largman C. HOXA9 Forms Triple Complexes with PBX2 and MEIS1 in Myeloid Cells. Mol Cell Biol. 1999;19(4):3051–61.
Shen WF, Chang CP, Rozenfeld S, Sauvageau G, Humphries RK, Lu M, et al. Hox homeodomain proteins exhibit selective complex stabilities with Pbx DNA. Nucleic Acids Res. 1996;24(5):898–906.
Shen WF, Montgomery JC, Rozenfeld S, Moskow JJ, Lawrence HJ, Buchberg a M, et al. AbdB-like Hox proteins stabilize DNA binding by the Meis1 homeodomain proteins. Mol Cell Biol. 1997a;17(11):6448–58.
Shen WF, Rozenfeld S, Lawrence HJ, Largman C. The Abd-B-like Hox homeodomain proteins can be subdivided by the ability to form complexes with Ppbx1a on a novel DNA target. J Biol Chem. 1997b;272(13):8198–206.
Shin KH, Ku JL, Kim WH, Lee SE, Lee C, Kim SW, et al. Establishment and characterization of seven human renal cell carcinoma cell lines. BJU Int. 2000;85(1):130–7.
Shrewsberry A, Osunkoya A, Jiang K, Westby R, Canter D, Pattaras J, et al. Renal cell carcinoma in patients with end-stage renal disease has favorable overall prognosis. Clin Transplant. 2014;28(2):211–6.
Shultz LD, Saito Y, Najima Y, Tanaka S, Ochi T, Tomizawa M, et al. Generation of functional human T-cell subsets with HLA-restricted immune responses in HLA class I expressing NOD/SCID/IL2rγnull humanized mice. Proc Natl Acad Sci. 2010;107(29):13022–7.
Slattery M, Riley T, Liu P, Abe N, Gomez-Alcala P, Dror I, et al. Cofactor binding evokes latent differences in DNA binding specificity between hox proteins. Cell. 2011;147(6):1270–82.
Small KM, Potter SS. Homeotic transformations and limb defects in Hox A11 mutant mice. Genes Dev. 1993;7(12 A):2318–28.
Soffietti R, Trevisan E, Rudà R. Neurologic complications of chemotherapy and other newer and experimental approaches. Handb Clin Neurol. 2014;121:1200–18.
Speleman F, Cauwelier B, Dastugue N, Cools J, Verhasselt B, Poppe B, et al. 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. 2005;19(3):358–66.
Stassar MJJG, Devitt G, Brosius M, Rinnab L, Prang J, Schradin T, et al. Identification of human renal cell carcinoma associated genes by suppression subtractive hybridization. Br J Cancer. 2001;85(9):1372–82.
Steffens S, Janssen M, Roos FC, Becker F, Schumacher S, Seidel C, et al. Incidence and long-term prognosis of papillary compared to clear cell renal cell carcinoma - A multicentre study. Eur J Cancer. 2012;48(15):2347–52.
Sternberg CN, Davis ID, Mardiak J, Szczylik C, Lee E, Wagstaff J, et al. Pazopanib in locally advanced or metastatic renal cell carcinoma: Results of a randomized phase III trial. J Clin Oncol. 2010;28(6):1061–8.
Sun L, Yu S, Xu H, Zheng Y, Lin J, Wu M, et al. FHL2 interacts with EGFR to promote glioblastoma growth. Oncogene. 2018a;.
Sun M, Song C-X, Huang H, Frankenberger CA, Sankarasharma D, Gomes S, et al. HMGA2/TET1/HOXA9 signaling pathway regulates breast cancer growth and metastasis.

Proc Natl Acad Sci. 2013;110(24):9920–5.
Sun Y, Zhou B, Mao F, Xu J, Miao H, Zou Z, et al. HOXA9 Reprograms the Enhancer Landscape to Promote Leukemogenesis. Cancer Cell. 2018b;34(4):643–658.e5.
Tabaries S, Lapointe J, Besch T, Carter M, Woollard J, Tuggle CK, et al. Cdx Protein Interaction with Hoxa5 Regulatory Sequences Contributes to Hoxa5 Regional Expression along the Axial Skeleton. Mol Cell Biol. 2005;25(4):1389–401.
Takahashi Y, Hamada JI, Murakawa K, Takada M, Tada M, Nogami I, et al. 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. 2004;293(1):144–53.
Tannapfel A, Hahn HA, Katalinic A, Fietkau RJ, Kühn R, Wittekind CW. Prognostic value of ploidy and proliferation markers in renal cell carcinoma. Cancer. 1996;77(1):164–71.
Taylor HS, Arici A, Olive D, Igarashi P. HOXA10 is expressed in response to sex steroids at the time of implantation in the human endometrium. J Clin Invest. 1998;101(7):1379–84.
Taylor HS, Bagot C, Kardana A, Olive D, Arici A. HOX gene expression is altered in the endometrium of women with endometriosis. Hum Reprod. 1999a;14(5):1328–31.
Taylor HS, Igarashi P, Olive DL, Arici A. Sex steroids mediate HOXA11 expression in the human peri-implantation endometrium. J Clin Endocrinol Metab. 1999b;84(3):1129–35.
The Cancer Genome Atlas Research Network, Linehan WM, Spellman PT, Ricketts CJ, Creighton CJ, Fei SS, et al. Comprehensive Molecular Characterization of Papillary Renal-Cell Carcinoma. N Engl J Med. 2016;374(2):135–45.
de Thé H, Chen Z. Acute promyelocytic leukaemia: novel insights into the mechanisms of cure. Nat Rev Cancer. 2010;10(11):775–83.
Thorsteinsdottir U, Mamo A, Kroon E, Jerome L, Bijl J, Lawrence HJ, et al. Overexpression of the myeloid leukemia-associated Hoxa9 gene in bone marrow cells induces stem cell expansion. Blood. 2002;99(1):121–9.
Thuita JK, Karanja SM, Wenzler T, Mdachi RE, Ngotho JM, Kagira JM, et al. Efficacy of the diamidine DB75 and its prodrug DB289, against murine models of human African trypanosomiasis. Acta Trop. 2008;108(1):6–10.
Thuita JK, Wolf KK, Murilla GA, Bridges AS, Boykin DW, Mutuku JN, et al. Chemotherapy of Second Stage Human African Trypanosomiasis: Comparison between the Parenteral Diamidine DB829 and Its Oral Prodrug DB868 in Vervet Monkeys. PLoS Negl Trop Dis. 2015;9(2).
Tomlinson IPM, Alam NA, Rowan AJ, Barclay E, Jaeger EEM, Kelsell D, et al. Germline mutations in FH predispose to dominantly inherited uterine fibroids, skin leiomyomata and papillary renal cell cancer the multiple leiomyoma consortium. Nat Genet. 2002;30(4):406–10.
Tsai MC, Manor O, Wan Y, Mosammaparast N, Wang JK, Lan F, et al. Long noncoding RNA as modular scaffold of histone modification complexes. Science (80-). 2010;329(5992):689–93.
Uyeno LA, Newman-Keagle JA, Cheung I, Hunt TK, Young DM, Boudreau N. Hox D3 expression in normal and impaired wound healing. J Surg Res. 2001;100(1):46–56.
Vanharanta S, Shu W, Brenet F, Ari Hakimi A, Heguy A, Viale A, et al. Epigenetic expansion of VHL-HIF signal output drives multiorgan metastasis in renal cancer. Nat Med. 2013;19(1):50–6.
Vijapurkar U, Fischbach N, Shen W, Brandts C, Stokoe D, Lawrence HJ, et al. Protein Kinase C-Mediated Phosphorylation of the Leukemia-Associated HOXA9 Protein Impairs Its DNA Binding Ability and Induces Myeloid Differentiation. Mol Cell Biol. 2004;24(9):3827–37.
Volpe MA V., Archavachotikul K, Bhan I, Lessin MS, Nielsen HC. Association of bronchopulmonary sequestration with expression of the homeobox protein Hoxb-5. J Pediatr Surg. 2000;35(12):1817–9.
Voss MH, Bhatt RS, Plimack ER, Rini BI, Alter RS, Beck JT, et al. The DART study: Results from the dose-escalation and expansion cohorts evaluating the combination of dalantercept plus axitinib in advanced renal cell carcinoma. Clin Cancer Res. 2017;23(14):3557–65.
Walf-Vorderwülbecke V, Pearce K, Brooks T, Hubank M, Van Den Heuvel-Eibrink MM, Zwaan CM, et al. Targeting acute myeloid leukemia by drug-induced c-MYB degradation. Leukemia. 2018;32(4):882–9.
Wallace EM, Rizzi JP, Han G, Wehn PM, Cao Z, Du X, et al. A small-molecule antagonist of HIF2α is efficacious in preclinical models of renal cell carcinoma. Cancer Res. 2016;76(18):5491–500.

Wang CQ, Huang YW, Wang SW, Huang YL, Tsai CH, Zhao YM, et al. Amphiregulin enhances VEGF-A production in human chondrosarcoma cells and promotes angiogenesis by inhibiting miR-206 via FAK/c-Src/PKCδ pathway. Cancer Lett. 2017a;385:261–70.

Wang H, Wang L, Erdjument-Bromage H, Vidal M, Tempst P, Jones RS, et al. Role of histone H2A ubiquitination in Polycomb silencing. Nature. 2004;431(7010):873–8.

Wang KC, Yang YW, Liu B, Sanyal A, Corces-Zimmerman R, Chen Y, et al. A long noncoding RNA maintains active chromatin to coordinate homeotic gene expression. Nature. 2011;472(7341):120–6.

Wang L, Park P, La Marca F, Than KD, Lin CY. BMP-2 inhibits tumor-initiating ability in human renal cancer stem cells and induces bone formation. J Cancer Res Clin Oncol. 2015;141(6):1013–24.

Wang L, Park P, Zhang H, La Marca F, Claeson A, Than K, et al. BMP-2 inhibits tumor growth of human renal cell carcinoma and induces bone formation. Int J Cancer. 2012;131(8):1941–50.

Wang MZ, Saulter JY, Usuki E, Cheung Y, Hall M, Bridges AS, et al. CYP4F Enzymes Are the Major Enzymes in Human Liver Microsomes That Catalyze the O-Demethylation of the Antiparasitic Prodrug DB289 [2,5-Bis(4-amidinophenyl)furan-bis-O-methylamidoxime]. Drug Metab Dispos. 2006a;34(12):1985–94.

Wang N, Kim HG, Cotta C V., Wan M, Tang Y, Klug CA, et al. TGFβ/BMP inhibits the bone marrow transformation capability of Hoxa9 by repressing its DNA-binding ability. EMBO J. 2006b;25(7):1469–80.

Wang Q, Wu G, Zhang Z, Tang Q, Zheng W, Chen X, et al. Long non-coding RNA HOTTIP promotes renal cell carcinoma progression through the regulation of the miR-615/IGF-2 pathway. Int J Oncol. 2018;53:2278–88.

Wang X, Bu J, Liu X, Wang W, Mai W, Lv B, et al. miR-133b suppresses metastasis by targeting HOXA9 in human colorectal cancer. Oncotarget. 2017b;8(38).

Wang X, Solban N, Khanna P, Callea M, Song J, Alsop DC, et al. Inhibition of ALK1 signaling with dalantercept combined with VEGFR TKI leads to tumor stasis in renal cell carcinoma. Oncotarget. 2016;7(27):41857–69.

Watanabe Y, Saito M, Saito K, Matsumoto Y, Kanke Y, Onozawa H, et al. Upregulated HOXA9 expression is associated with lymph node metastasis in colorectal cancer. Oncol Lett. 2018;15(3):2756–62.

Weikert S, Boeing H, Pischon T, Weikert C, Olsen A, Tjonneland A, et al. Blood pressure and risk of renal cell carcinoma in the European prospective investigation into cancer and nutrition. Am J Epidemiol. 2008;167(4):438–46.

Weiss RH, Borowsky AD, Seligson D, Lin PY, Dillard-Telm L, Belldegrun AS, et al. p21 is a Prognostic Marker for Renal Cell Carcinoma: Implications for Novel Therapeutic Approaches. J Urol. 2007;177(1):63–9.

Wellik DM, Hawkes PJ, Capecchi MR. Hox11 paralogous genes are essential for metanephric kidney induction. Genes Dev. 2002;16(11):1423–32.

Williams RD, Elliott a Y, Stein N, Fraley EE. In vitro cultivation of human renal cell cancer. II. Characterization of cell lines. In Vitro. 1978;14(9):779–86.

Williams RD, Elliott AY, Stein N, Fraley EE. In vitro cultivation of human renal cell cancer - I. Establishment of cells in culture. In Vitro. 1976;12(9):623–7.

Wilson WD, Tanious FA, Mathis A, Tevis D, Hall JE, Boykin DW. Antiparasitic compounds that target DNA. Biochimie. 2008;90(7):999–1014.

Wong SFL, Agarwal V, Mansfield JH, Denans N, Schwartz MG, Prosser HM, et al. Independent regulation of vertebral number and vertebral identity by microRNA-196 paralogs. Proc Natl Acad Sci. 2015;112(35):E4884–93.

Xie C, Schwarz EM, Sampson ER, Dhillon RS, Li D, O'Keefe RJ, et al. Unique angiogenic and vasculogenic properties of renal cell carcinoma in a xenograft model of bone metastasis are associated with high levels of vegf-a and decreased ang-1 expression. J Orthop Res. 2012;30(2):325–33.

Xu J, Pham CG, Albanese SK, Dong Y, Oyama T, Lee CH, et al. Mechanistically distinct cancer-associated mTOR activation clusters predict sensitivity to rapamycin. J Clin Invest.

2016a;126(9):3526–40.
Xu Q, Chiao P, Sun Y. Amphiregulin in cancer: New insights for translational medicine. Trends in Cancer. 2016b;2(3):111–3.
Yan J, Chen YX, Desmond A, Silva A, Yang Y, Wang H, et al. Cdx4 and menin co-regulate Hoxa9 expression in hematopoietic cells. PLoS One. 2006;1(1).
Yang JC, Sherry RM, Steinberg SM, Topalian SL, Schwartzentruber DJ, Hwu P, et al. Randomized study of high-dose and low-dose interleukin-2 in patients with metastatic renal cancer. J Clin Oncol. 2003;21(16):3127–32.
Yang YC, Wang SW, Wu IC, Chang CC, Huang YL, Lee OK, et al. A tumorigenic homeobox (HOX) gene expressing human gastric cell line derived from putative gastric stem cell. Eur J Gastroenterol Hepatol. 2009;21(9):1016–23.
Yildiz E, Ayan S, Goze F, Gokce G, Gultekin EY. Relation of microvessel density with microvascular invasion, metastasis and prognosis in renal cell carcinoma. BJU Int. 2008;101(6):758–64.
Yokoyama A, Somervaille TCP, Smith KS, Rozenblatt-Rosen O, Meyerson M, Cleary ML. The menin tumor suppressor protein is an essential oncogenic cofactor for MLL-associated leukemogenesis. Cell. 2005;123(2):207–18.
Yotsumoto F, Yagi H, Suzuki SO, Oki E, Tsujioka H, Hachisuga T, et al. Validation of HB-EGF and amphiregulin as targets for human cancer therapy. Biochem Biophys Res Commun. 2008;365(3):555–61.
Yu J, Tian X, Chang J, Liu P, Zhang R. RUNX3 inhibits the proliferation and metastasis of gastric cancer through regulating miR-182/HOXA9. Biomed Pharmacother. 2017;96(110):782–91.
Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget J, Frane JL, Tian S, et al. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. Science (80-). 2007;318(5858):1917–20.
Yu SL, Lee DC, Sohn HA, Lee SY, Jeon HS, Lee JH, et al. Homeobox A9 directly targeted by miR-196b regulates aggressiveness through nuclear Factor-kappa B activity in non-small cell lung cancer cells. Mol Carcinog. 2016;55(12):1915–26.
Zarrabi K, Wu S. Current and Emerging Therapeutic Targets for Metastatic Renal Cell Carcinoma. Curr Oncol Rep. 2018;20(5).
Zeng FC, Zeng MQ, Huang L, Li YL, Gao BM, Chen JJ, et al. Downregulation of VEGFA inhibits proliferation, promotes apoptosis, and suppresses migration and invasion of renal clear cell carcinoma. Onco Targets Ther. 2016;9:2131–41.
Zhang Y, Morrone G, Zhang J, Chen X, Lu X, Ma L, et al. CUL-4A stimulates ubiquitylation and degradation of the HOXA9 homeodomain protein. EMBO J. 2003;22(22):6057–67.
Zhang Y, Sun B, Zhao X, Liu Z, Wang X, Yao X, et al. Clinical significances and prognostic value of cancer stem-like cells markers and vasculogenic mimicry in renal cell carcinoma. J Surg Oncol. 2013;108(6):414–9.
Zhang Z-F, Wang Y-J, Fan S-H, Du S-X, Li X-D, Wu D-M, et al. MicroRNA-182 downregulates Wnt/β-catenin signaling, inhibits proliferation, and promotes apoptosis in human osteosarcoma cells by targeting HOXA9. Oncotarget. 2017;8(60):101345–61.
Zhao J, Tang H, Zhao H, Che W, Zhang L, Liang P. SEMA6A is a prognostic biomarker in glioblastoma. Tumor Biol. 2015;
Zhou B, Li H, Xing C, Ye H, Feng J, Wu J, et al. Honokiol induces proteasomal degradation of AML1-ETO oncoprotein via increasing ubiquitin conjugase UbcH8 expression in leukemia. Biochem Pharmacol. 2017;128:12–25.
Zhou ZN, Sharma VP, Beaty BT, Roh-Johnson M, Peterson EA, Van Rooijen N, et al. Autocrine HBEGF expression promotes breast cancer intravasation, metastasis and macrophage-independent invasion in vivo. Oncogene. 2014;33(29):3784–93.
Zimmer C, Reinert KE, Luck G, Wähnert U, Löber G, Thrum H. Interaction of the oligopeptide antibiotics netropsin and distamycin a with nucleic acids. J Mol Biol. 1971;58(1):329–48.
Zuber J, Shi J, Wang E, Rappaport AR, Herrmann H, Sison EA, et al. RNAi screen identifies Brd4 as a therapeutic target in acute myeloid leukaemia. Nature. 2011;478(7370):524–8.

ANNEXES

Annexe 1

Targeting Transcription Factors for Cancer Treatment

Mélanie Lambert †, Samy Jambon †, Sabine Depauw and Marie-Hélène David-Cordonnier *

INSERM UMR-S1172-JPARC (Jean-Pierre Aubert Research Center), Lille University and Hospital Center (CHU-Lille), Institut pour la Recherche sur le Cancer de Lille (IRCL), Place de Verdun, F-59045 Lille, France

* Correspondence: marie-helene.david@inserm.fr; Tel.: +33-3-20-169-223

† These authors contributed equally to this work.

Abstract

Transcription factors are involved in a large number of human diseases such as cancers for which they account for about 20% of all oncogenes identified so far. For long time, with the exception of ligand-inducible nuclear receptors, transcription factors were considered as "undruggable" targets. Advances knowledge of these transcription factors, in terms of structure, function (expression, degradation, interaction with co-factors and other proteins) and the dynamics of their mode of binding to DNA has changed this postulate and paved the way for new therapies targeted against transcription factors. Here, we discuss various ways to target transcription factors in cancer models: by modulating their expression or degradation, by blocking protein/protein interactions, by targeting the transcription factor itself to prevent its DNA binding either through a binding pocket or at the DNA-interacting site, some of these inhibitors being currently used or evaluated for cancer treatment. Such different targeting of transcription factors by small molecules is facilitated by modern chemistry developing a wide variety of original molecules designed to specifically abort transcription factor and by an increased knowledge of their pathological implication through the use of new technologies in order to make it possible to improve therapeutic control of transcription factor oncogenic functions.

Keywords: transcription factor; inhibitors; oncogenes; DNA binding; protein/DNA interaction; protein/protein interaction

1. Introduction

More than 2500 human proteins associated with different biological processes such as DNA replication, DNA repair, chromosome condensation or DNA unwinding and of course DNA transcription, are thought to bind to chromatin. A very large proportion of these DNA-interacting proteins (~1500) are presumed to act as transcription factors. Transcription factors are proteinsthat bind DNA helix at specific regulatory sequences in orderto activate or inhibit transcription through a transactivation or trans-repression domain. In all living organisms, the ranscription process leads to the expression of ribonucleic acids (mRNA, rRNA, tRNA, lnc-RNA, MiR…) in a fine and spatiotemporally controlled manner and is activated by external or inernal stimuli through a complex signaling network. The transcription factors are organized in different families reflecting homologies in their DNA-binding domains and, consequently, DNA-binding sequences [1,2]. They could be classified in 71 different families with some of them having a larger number of members than the others, such as zing-finger C2H2 (>600 members), homeobox (>200 members) and HLH (>80 members) families that represent >50% of the total number of transcription factors [3]. There is more and more implication of transcription factors in human pathologies in the literature. Indeed, in 2009, Vaquerizas et al. identified 164 transcription factors (~12%) as directly implicated in 277 diseases [3]. A more recent evaluation results in the implication of a larger number of transcription factors in human diseases. For instance, by crossing the list of 1571 known and candidate oncogenic proteins from the Network of Cancer Genes NCG5.0 (http://ncg.kcl.ac.uk/statistics.php) [4] with the list of the 1988 human transcription factors and regulators [5], a list of 294 oncogenic transcription factors and regulators is found (Table 1), corresponding to ~19% of all known oncogenes.

Table 1. List of the 294 known or candidate oncogenic transcription factors and regulators [1].

ABL1	CEBPA	ERCC3	HIST1H2BE	MDM4	PAX7	SMARCA4	TFPT
AFF1	CHD1	ERCC6	HIST1H2BG	MED12	PAX8	SMARCB1	THRAP3
AFF3	CHD2	ERF	HLF	MEF2B	PBX1	SMARCD1	TLX1
AFF4	CHD4	ERG	HMGA1	MEF2C	PEG3	SMARCE1	TLX3
APC	CHD5	ESPL1	HMGA2	MEN1	PER1	SMURF2	TNFAIP3
AR	CHD7	ESR1	HOXA11	MITF	PHF3	SOX2	TP53
ARID1A	CIC	ETS1	HOXA13	MKL1	PHF6	SOX5	TRIM24
ARID1B	CIITA	ETV1	HOXA7	MLLT1	PHOX2B	SOX9	TRIM33
ARID3B	CNOT3	ETV4	HOXA9	MLLT10	PLAG1	SRCAP	TRIP11
ARID5B	CREB1	ETV5	HOXC11	MLLT3	PML	SS18L1	TRPS1
ARNT	CREB3L1	ETV6	HOXC13	MLLT6	PMS1	SSB	TRRAP
ARNT2	CREBBP	EWSR1	HOXD11	MYB	PNN	SSX1	TSC22D1
ASB15	CRTC1	EYA4	HOXD13	MYBL1	POU2AF1	SSX2	TSHZ3
ASXL1	CSDE1	EZH2	ID3	MYC	POU2F2	SSX4	VHL
ATF1	CTCF	FEV	IRF2	MYCN	POU5F1	STAT3	WHSC1
ATF7IP	CTNNB1	FLI1	IRF4	MYOD1	PPARG	STAT4	WHSC1L1
ATM	DACH1	FOXA1	IRF6	NCOA1	PRDM1	STAT5B	WT1
ATRX	DACH2	FOXE1	IRF8	NCOA2	PRDM16	STAT6	WWP1
BAZ2B	DAXX	FOXL2	IRX6	NCOA4	PRDM9	SUFU	WWTR1
BCL11A	DDB2	FOXP1	JUN	NCOR1	PRRX1	SUZ12	XBP1
BCL11B	DDIT3	FOXQ1	KHDRBS2	NCOR2	PSIP1	TAF1	XPC
BCL3	DDX5	FUBP1	KHSRP	NEUROG2	RARA	TAF15	ZBTB16
BCL6	DEK	FUS	KLF2	NFE2L2	RB1	TAL1	ZBTB20
BCLAF1	DIP2C	FXR1	KLF4	NFE2L3	RBM15	TAL2	ZFP36L1
BCOR	DNMT1	GATA1	KLF5	NFIB	RBMX	TBX18	ZFX
BRCA1	DNMT3A	GATA2	KLF6	NFKB2	REL	TBX22	ZHX2
BRCA2	DOT1L	GATA3	LDB1	NFKBIA	RUNX1	TBX3	ZIC3
BRD7	EED	GLI3	LMO1	NONO	RUNX1T1	TCEA1	ZIM2
BRD8	EGR2	GTF2I	LMO2	NOTCH2	RXRA	TCEB1	ZNF208
BRIP1	ELAVL2	HDAC9	LMX1A	NOTCH3	SALL3	TCERG1	ZNF226
BRPF3	ELF3	HEY1	LYL1	NPM1	SATB2	TCF12	ZNF331
BTG1	ELF4	HIST1H1B	LZTR1	NR3C2	SETBP1	TCF3	ZNF384
BTG2	ELK4	HIST1H1C	MAF	NR4A3	SFPQ	TCF7L2	ZNF469
CBFA2T3	ELL	HIST1H1D	MAFA	NSD1	SIN3A	TFAP2D	ZNF595
CBFB	EP300	HIST1H1E	MAFB	OLIG2	SMAD2	TFDP1	ZNF638
CDX2	EPC1	HIST1H2BC	MAML1	PAX3	SMAD4	TFE3	
CDX4	ERCC2	HIST1H2BD	MAX	PAX5	SMARCA1	TFEB	

[1] This list is obtained by crossing data from the known and candidate cancer genes lists (http://ncg.kcl.ac.uk/statistics.php) with the list of known human transcription factors [5]).

Besides house-keeping transcription factors, some other transcription factors, as many other class of proteins, are spatially, temporally and sequentially expressed in tissues during development, cell renewal or differentiation processes; and any modification of their expression may result in master deregulation of cell integrity or organism homeostasis leading to pathologies. This is the case for neurodegenerative pathologies [6,7,8,9,10], diabetes or cardiac diseases [11,12,13] and cancers [13,14,15,16,17,18,19,20,21] with either direct implication of transcription factors/repressors or epigenetic modifications of the physical accessibility of specific genomic regions occurring after genetic alterations. Besides some transcription factors are clearly associated with oncogenic addiction [22], only a small number are currently targeted in clinic. Indeed, transcription factors were for a long time considered as 'undruggable' targets [23]. A better knowledge of their precise functions (expression, degradation pathway, protein/protein interaction) and the dynamic of their mode of binding has changed this postulate and opened new possibilities to affect transcription factors as therapeutic targets for cancer treatment. Among the different opportunities to indirectly or directly target a transcription factor are:

- Their inhibition (or activation) at the expression level,
- Their inhibition through physical degradation,
- Their inhibition (or activation) at the protein/protein interaction level,

- Their inhibition (or activation) through the binding of a ligand-based molecule in an activation/inhibition pocket,
- Their inhibition (or activation) at the protein/DNA binding level.

All those approaches are developed in the following sections.

2. Targeting Transcription Factor at the Expression Level

The expression of a transcription factor of interest, like all other cellular proteins, is itself transcriptionally controlled by transcription activators or repressors (other transcription factors or itself in a positive or negative retro-control) and by epigenetic DNA or histone writers/readers/erasers.

Epigenetic writers modify the DNA or histones by adding for instance methyl, acetyl, ubiquine, SUMO or phosphate groups. Among them are histone methyltransferases that methylate lysine or arginine residues (protein lysine methyltransferases (PKMTs) and protein arginine methyltransferases (PRMTs)), histone acetyltransferases (HATs) that transfer an acetyl group from the acetyl-CoA co-factor to lysine residues on histone tails, the E1/3 unbiquitin ligases and DNA methyltransferases (DNMTs).

Epigenetic readers recognize the epigenetic marks and lead to activation or repression of the transcription process. Among them are bromodomain-containing proteins (BCPs) such as BRD4, and ARID1A.

Epigenic erasers remove epigenic marks added on DNA or histones by the writers. Among them are histones demethylases such as the lysine-specific demethylase 1 (LSD1) and Jumonji C domain-containing demethylases (JMJD), histone deacetylases (HDACs), deubiquitinating enzymes (DUBs) and histone phosphatases. DNA methylation erasers are for instance the gene silencing family of ten-eleven translocation proteins (TETs), catalyzing the conversion of 5-methyl-cytosine to 5-hydroxymethyl-cytosine, or the activation-induced cytidine deaminase (AID).

2.1. Example of HOXA Cluster Expression Controlled by MLL Complex

Such control of transcription factor expression in cancer treatment is particularly well illustrated in the model of HOXA cluster of transcription factors which is aberrantly expressed under the control of the MLL complex in the context of leukemia. Indeed, MLL proteins are mutated or fused to multiple partners in all mixed-lineage leukemia corresponding to ~5% of acute myeloid leukemia (AML) and ~20% of acute lymphoblastic leukemia, leading to the positive control of HOXA5-10 proteins [24]. Oncogenic MLL fusions or mutated proteins interact with different co-factors associated in the “MLL complex”, most of them associated with epigenetic control. Among them are HDAC [25,26], DOT1L [27,28,29], BRD4 [30], Menin [31,32], LEDGF [31,33], WDR5 [34], KDM4C (JMJD2C) and PRMT1 [35] (Figure 1). Many of them are targeted for cancer treatments (for review: Steinhilber 2017) [36].

This is the case of HDAC inhibitors such as valproic acid, vorinostat (suberoylanilide hydroxamic acid, SAHA, Zolinza®), the cinnamic hydroxamic acid analogue panobinostat (LBH589, Farydak®) or belinostat (PXD101, Beleodaq®) (Figure 1) that entered into clinical trials in AML [37,38,39,40] and were approved in other leukemia or hematological diseases such as vorinostat for the treatment of cutaneous T cell lymphoma (CTCL), panobinostat against multiple myeloma or belinostat to treat peripheral T-cell lymphoma [41]. However, those marketed HDAC inhibitors are not selective to one or another of the HDAC isoenzymes, leading to major epigenetic disorders associated with off targets deregulations.

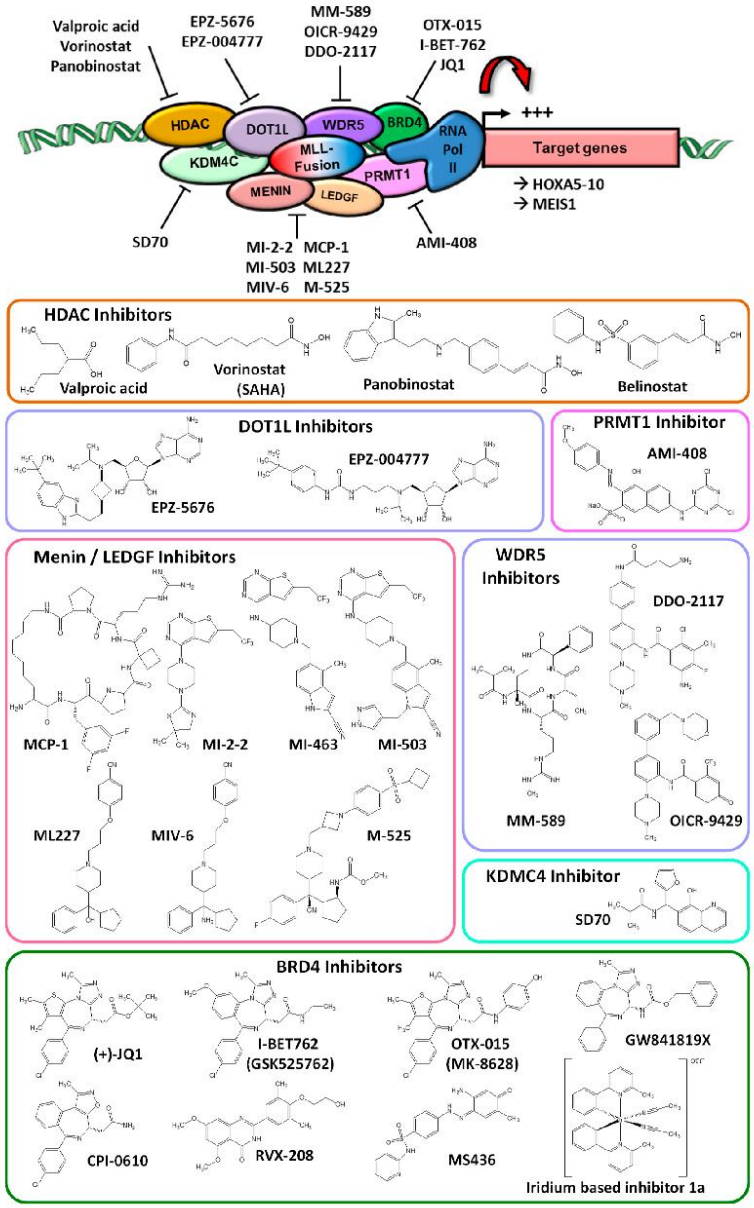


Figure 1. Targeting the MLL complex at the epigenetic level controls the expression of the HOXA cluster of transcription factors. Top of the figure: scheme of proteins associated with the fused-MLL complex highlighting the ones targeted by the different inhibitors indicated below.

For DOT1L histone methyltransferase (HMT), its aberrant recruitment at MLL complex occurs through the interaction with MLL fusion partners AF9 [42] AF4 [28] AF6 [30], AF10 [43] or ENL [44]. DOT1L could be inhibited using ligand competitors, such as EPZ-5676 (pinometostat) and EPZ004777 (Figure 1), that occupies the S-adenosyl-methionine (SAM) binding pocket of DOT1L, resulting in conformational changes that abolish HMT function. The cyclo-butyl derivative EPZ-5676 is more efficient than the parental compound EPZ004777 on DOT1L inhibition (Ki of 0.08 nM for EPZ-5676 vs. Ki of 0.3 nM for EPZ004777) [45,46]. Consequently, EPZ-5676 was chosen as a first-in-class HMT inhibitor and entered clinical trials in relapsed/refractory AML associated with MLL rearrangements. EPZ-5676 and EPZ004777 subsequently interfere with leukemic process leading to cell death and differentiation [47,48,49,50] and also recently evidence other therapeutic opportunities such as the induction of osteoclast differentiation [51].

Menin/LEDGF inhibitors (Figure 1) are another therapeutic option to interfere with pathologic MLL function that control HOXA transcription factors expression. Among them are:
- The macrocyclic peptidomimetic MCP-1 [52],
- The thienopyrimidine MI-2-2 [53] and its derivatives MI-463/503 [54] with MI-2-2 being poorly stable and could not be used in vivo rather than MI-463 and MI-503 (a derivative of MI-463 by the addition of a single methylpyrazole) which both interact with menin at nanomolar range, are more metabolically stable and exert strong cellular and in vivo activity, MI-503 being the most efficient one with deeper contacts with the menin pocket [54],
- The hydroxymethylpiperidines ML227, MIV-6 and cyclopentylphenylpiperidine derivative M-525 [55,56,57] that mimic the interacting MLL peptide and may be used together with DOT1L inhibitors to restore differentiation in MLL-rearranged

leukemias [58]. ML227 presents poor metabolic stability as well as off target activities that limited its developement and an IC50 for interation to menin of 390 nM [56]. MIV-6 differs from ML227 by an amine group that substitute to the hydroxyl group of ML227 and is more stable but with similar range of IC50 for menin (185 nM) whereas M-525 is much more efficient on menin interaction with IC50 of 3.3 nM and is 30-fold more potent in cellular activities with a hiogh specificity on mixed lineage leukemia cell models such as MV4;11 [57]. Inhibitors of BRD4 also showed efficiency to target mutated MLL functional complex, based on their interaction to control gene expression [59,60] and to collaborate with DOT1L [61]. This is the case for the thienodiazepine (+)-JQ1, I-BET762 (GSK525762), OTX015, GW841819X, CPI-0610 and RVX-208 that are developed by different companies and entered into clinical trials in various hematological malignancies and solid tumors while other compounds such as, MS436 or the iridium based inhibitor 1a (Figure 1) are in developmental stages (for reviews Huang 2016; Liu 2017; Kharenko 2017) [62,63,64]. Moreover, it is worth noting that both BRD4 and DOT1L inhibitors could synergistically inhibit proliferation of MLL-rearranged leukemic cells [61].

Recently, inhibitors of WDR5/MLL interaction were also developed such as the macrocyclic MM-589 compound [65,66] or DDO-2117 and OICR-9429 [67,68], as well as AMI-408 [69] and SD70 [70] that respectively inhibits the H4R3 methyltransferase PRMT1 and jumonji domain-containing H3K9 demethylase KDMC4, two proteins associated with oncogenic MLL complex as well described for MLL-GAS7 translocation [35].

Altogether, the different protein partners of MLL and their inhibitors summarized in Figure 1 encompass the therapeutic opportunities to control HOXA5-10 transcription factor at the expression level through deregulated-MLL complex. But HOXA9 transcription factor expression may also be controlled by other epigenetic modifiers such as (i) inhibitors of the epigenetic eraser H3K4 demethylase LSD1/KDM1A [71,72] like GSK2879552 [73] and ORY-1001 [74,75] that induce leukemic cell differentiation and are currently in clinical trials; (ii) inhibitors of the H3K9 methyltransferase G9A/KMT1C (UNC0648) [76] or inhibitors of the H3K27 methyltransferase EZH2 (GSK126, UNC1999, CPI-1205, EPZ005687, EPZ-6438/tazemetostat) [77,78,79,80,81,82] as two well described epigenetic writers associated with leukemia.

2.2. Example of MYC Transcription Factors Expression Control at the Epigenetic Level

Another well-studied oncogene transcription factor family which expression could be epigenetically modulated for therapeutic approaches is MYC gene family. Multiple cancer and hematological diseases are associated with c-MYC transcription factor deregulations such as gene amplification, translocations, promoter polymorphism or mutations [83]. For instance, c-MYC gene translocations with immunoglobulin genes, such as t(8;14), t(8;22) or t(2;8), are associated with Burkitt lymphoma, diffuse large B-cell lymphoma, plasmablastic lymphoma, mantle cell lymphoma and in the evolution of pre-malignant MGUS cells into multiple myeloma [84,85]. Translocation may result in the juxtaposition of enhancer sequence to the minimal promoter of c-MYC gene to control c-MYC expression. C-MYC over-expression is also associated with self-renewal of leukemic stem cells, in relation to the hematopoietic stem cell niche [86]. Despite long term knowledge of its oncogenic activity, c-Myc is not yet directly targeted. Only indirect negative control of its expression was developed with inhibitors of BRD4 such as JQ1 or I-BET762 (Figure 1). Indeed, JQ1 displaced BRD4 from c-Myc promoter [87]. Treatment with JQ1 is also associated with cell differentiation as proved by an increase in the macrophage differentiation marker CD74 [88]. HDAC inhibitors such as vorinostat could also control c-MYC gene expression, as shown in T-cell acute lymphoblastic leukemia in vivo models [89,90]. JQ1 could also be used in combination with HDAC inhibitors to repress c-MYC promoter activity [91]. Such epigenetic control is also observed by targeting CDK7 with R-roscovitine (seliciclib, CYC202), S-CR8 or the covalent inhibitor THZ1 (Figure 2) controlling N-Myc gene expression [92,93,94], another Myc family member associated with cancer [95].

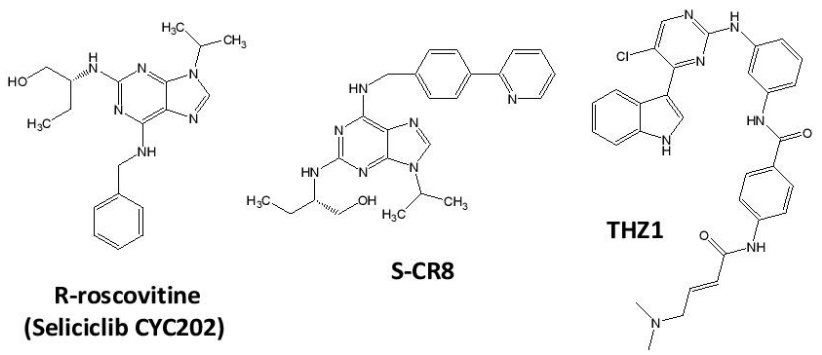


Figure 2. CDK7 inhibitors for targeting MYC transcription factor promoter at the epigenetic level.

3. Targeting Transcription Factor at the Protein Degradation Level

Direct transcription factor degradation is another therapeutic option. Strategies leading to the decrease of already expressed transcription factor by the ubiquitin-proteasome or sumoylation processes with compounds such as bortezomib (Velcade®) is already well illustrated in the literature and would not be further explored in this review [96,97,98,99,100]. Proteasome degradation is also implicated in therapeutic process consequently to the chemically-induced disruption of protein/protein interaction as described in Section 4 of the present manuscript and reviews [26]. Besides, some original approaches were more recently depicted such as the induction of Myb transcription factor degradation using mebendazole (Vermox®) (Figure

3), commonly used to treat a number of parasitic worm infestations [101], or that of the AML1-ETO (RUNX1-ETO) chimeric transcription factor by the natural phenolic compound honokiol (Figure 3) extracted from Magnolia spp. [102], both protein targets known to be implicated in acute myeloid leukemia (Figure 3). BI-3802 (Figure 3) inhibits the binding of the BTB domain of BCL6 to co-repressors such as NCOR1 but not the dimerization of the BTB of BCL6 as presented for other inhibitors in Section 4, resulting in functional BCL6 homodimers. However, BI-3802/BCL6-BCL6 trimer complex formation results in subsequent ubiquitinylation and degradation of the BCL6 repressor, leading to an anti-proliferative activity in diffuse large B cell lymphoma and induced expression of BCL6-repressed genes such as ATM, DUSP5 and IRF4, a transcription factor associated with B cell maturation [103]. However, more original aspects are coming from synthesis of ligands coupled to peptides to link specifically targeted transcription factors to proteins associated with degradation. This is the case of hybrids molecules called SNIPERs for Specific and Nongenetic IAP-dependent Protein Erasers such as MV1 compound associated with a peptide derived from MALM1 inhibitory peptide previously developed to inhibit NOTCH1. MV1-linker peptide (Figure 3) stabilizes NOTCH1 transcription factor to the E3 ubiquitin ligase inhibitor of apoptosis protein (IAP) [104]. This is also the case of PROTACs (for PROteolysis TArgeting Chimeric molecules) such as Cpd 8 [105] that associates Smad3 pocket ligand with HIF1 recognition motif of the von Hippel–Lindau (VHL) E3 ubiquitin ligase [106] or CM11 Homo-PROTAC dimer that induced VHL dimerization and sub-sequent self-degradation [107] (Figure 3).

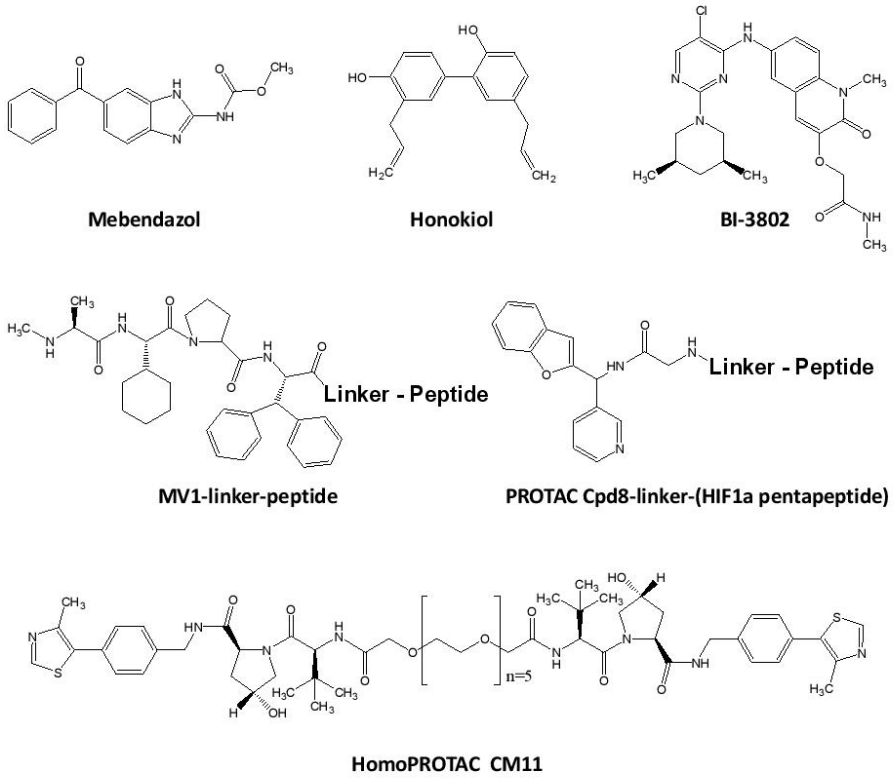


Figure 3. Small compounds (Top) or drug-linker peptides (Middle and Bottom) inducing degradation of oncogenic transcription factors.

4. Targeting Transcription Factor at the Protein/Protein Interaction Level

Inhibiting transcription factor interaction with other proteins is another approach associated with protein sequestration, stabilization or degradation depending on the nature of the interacting proteins or the context. The partner can be the transcription factor itself forming homo-dimers (STAT, BCL6), another transcription factor (RUNX1/CBFβ, MYC/MAX) from the basal transcription machinery, co-factor/co-activator/mediator or repressor (Nrf2/Keap1), chaperones implicated in nuclear translocation or proteins sequestrating the transcription factor in cytoplasm often associated with degradation process (p53/mdm2). The protein/protein interaction (PPI) inhibitors (PPIi) belong to three classes of molecules: small compounds, peptidomimetics or stapled helix peptides. The following part gives an overview of the different families of molecules targeting different functions of PPI with some examples of targeted transcription factors from different DNA binding sub-families.

The tumor suppressor transcription factor p53 was the first transcription factor inhibited at the PPI level. The p53 protein binds DNA as a tetramer to control the expression of its target genes among which are PUMA and p21. In cancer, p53 is mutated and/or maintained in the cytoplasmic compartment through interaction with the Murine Double Minute 2 (mdm2) protein, a protein that is over-expressed in around 50% of all cancers [108]. The p53/mdm2 PPI leads to p53 ubiquitinylation by E3 ubiquitin ligase and subsequent proteasomal degradation [109]. The p53/mdm2 PPI is one of the most studied PPI with many PPIi developed for their binding to MDM2 in the p53-binding triad pocket consisting of the three hydrophobic amino acids Phe19, Trp23 (interaction with Leu53 of mdm2) and Leu26. The first compound that entered clinical trial is the chiral (−) Nutlin-3 (Figure 4A) that presents a bromophenyl ring deeply hooked in Leu26 pocket and an ethyl-ether arm interacting with the Phe19 pocket while its imidazoline backbone localizes at position usually taken by the p53 alpha helix from its mdm2-

binding domain. Many other p53/mdm2 PPIi (Figure 4A) were then developed with more or less different drug/mdm2 contacts (for recent reviews, Lemos 2016; Nayak 2017; Wang 2017) [110,111,112]. This is the case of spiro-oxindoles derivatives MI-63, MI-219 or MI-773/SAR405838 that target Phe19 and Leu26 pockets [113,114,115], the pyrrolidine analogue RG7388 which interacts with Phe19, Trp23, Leu26 and His96 [116], piperidinones such as AM-8553 that make contacts with Phe19, Trp23 and Leu26 [117]. Other p53/mdm2 inhibitors are AMG232, as an orally bioavailable derivative of AM-8553 for clinical use [118], the morpholinone AM-8735 [119], or the spiroindolinone RO8994 [120]. CGM097, MK-8242 and DIMP53-1 are other p53/mdmd2 inhibitors also inhibiting the interaction of p53 with mdmx, hdm2 and/or hdmx [121,122]. In parallel with synthetic compounds, peptidomimetics and peptide staples were also designed and evaluated as p53 inhibitors [123,124,125,126] but their development for clinical used is less advanced than that of synthetic drugs.

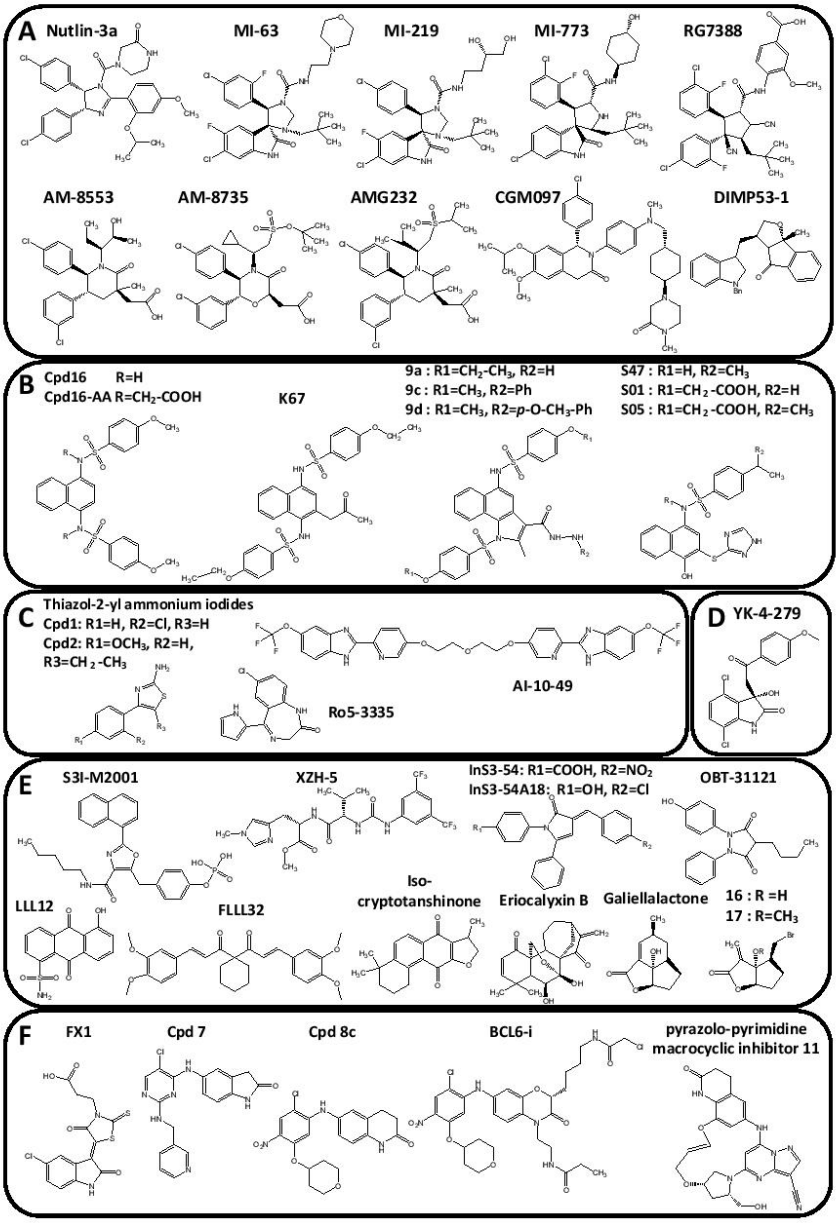


Figure 4. Targeting transcription factor at the protein/protein interaction level. (A) p53/mdm2 PPIi; (B) Keap1/Nrf2 PPIi; (C) RUNX1/CBFβ PPIi; (D) Ets transcription factors/RNA helicase A PPIi; (E) STAT3 PPIi; (F) BCL6 PPIi.

The nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) presents a CNC basic DNA binding domain and is an another example of transcription factor which activity is regulated upon cytoplasmic sequestration and an oncogenic target [127]. Nrf2 regulates the expression of genes associated with oxidative stress, drug efflux pumps and drug metabolizing enzymes (such as NQO1, HMOX, MRP1 and GST isoenzymes), resulting in an inhibition of apoptosis as well as radio- and chemo-resistance [128]. Nrf2 is indeed maintained in the cytoplasm through interaction with dimers of the sensor of oxidative stress Kelch-like ECH-associated protein 1 (Keap1) [129] through DIDLG and ETGE amino acids of Nrf2, two peptide sequences separated by a lysine-rich motif. Keap1 interacts as a monomer with Nrf2 on the high affinity binding motif ETGE leading to the “open” conformation. The interaction as a dimer of Keap1 with both the high affinity (ETGE) and the low affinity (DIDLG) binding motives of Nrf2 results in the “closed” conformation of Keap1/Nrf2 complex which is ubiquitinylated on the intermediate

lysine-rich motif by ubiquitin ligase Cullin3, leading to subsequent Nrf2 protein degradation by the proteasome [130]. PPIi were identified to inhibit Keap1/Nrf2 complex formation, based on this Keap1/Nrf2 PPI interface. High-throughput screening and fragment-based drug discovery identified structures from which several PPIi were synthesized and evaluated. This is the case of Cpd16 and its more active derivatives Cpd16-AA and the acetonyl-naphtalene and ethoxy-derivative K67 [131,132] (Figure 4B). K67 is of particular interest in this series due to, first, a better selectivity index for direct binding to Nrf2 rather than to phospho-p62 protein, another protein interacting with Keap1, and, second, to its inhibitory activity on cell proliferation and on resistance to cisplatin and sorafenib from comparison to Cpd16 [132]. Also deriving from Cpd16 were developed benzo[g]indoles 1 and its N-substituted hydrazides 9b, 9c and 9e [133] and the hydronaphthoquinones S01, S05 and S47 [134] (Figure 4B). In particular, the addition of a unique benzo[g]indole skeleton in compounds 1, 9b, 9c and 9e series induces a 5- to 10-fold decrease of Nrf2/Keap1 PPI inhibitory constant Ki and 10-fold increase of the compound metabolic stability as evidenced using human liver microsomes, compound 9e being the most stable compound [133]. The hydronaphthoquinones S01, S05 and S47 activities were not compared to Cpd16 activity but were evaluated using cellular and in vivo experiments, showing that both S01 and S05 induce nuclear translocation of Nrf-2 and quickly activate the expression of target genes such as the heme oxygenase-1 and the NADPH-quinone oxidoreductase 1, reduces LPS-induced pro-inflammatory cytokines such as TNF-α, IL1β and IL-6 and LPS-induced cell death in mice, suggesting that they could be used in cancer chemoprevention [134]. Besides small inhibitory compounds, Ac-LDPETGEFL-OH peptide and c[GQLDPETGEFL] cyclic peptide were developed and evaluated for their ability to bind to Keap1 and induce the expression of Nrf2-controled genes [135]. Those Nrf2 inhibitors would have applications in cancer but also in other diseases associated with oxidative and inflammatory stress such as diabetes, Parkinson and Alzheimer diseases or cardiomyopathies.

RUNX1 belongs to the Runt DNA-binding domain family of transcription factor. RUNX1 binding to its co-factor CBFβ (Figure 4C) could be inhibited by 4-(2'-Chlorophenyl)-thiazol-2-yl- and 5-Ethyl-4-(4'-methoxyphenyl)-thiazol-2-yl ammonium iodides [136], the benzodiazepine Ro5-3335 [137] and the bivalent trifluoromethoxy-benzimidazole-pyridine compound AI-10-49 [138], as evidenced using FRET and ELISA-based assays. Of interest, Ro5-3335 and AI-10-49 are much more efficient than the thiazol-2-yl ammonium iodides on RUNX1/CBFβ binding inhibition and where further evaluated on AML cell lines.

Both adult AML and pediatric acute lymphocytic leukemia (ALL) models could be associated with fused CBFβ or RUNX1 proteins, such as CBFβ-MYH11 (inv(16) AMLs), RUNX1-ETO or TEL-RUNX1 fusion. Human acute leukemia cell lines bearing such translocation are much more sensitive to AI-10-49 than non-CBFβ or non-RUNX1 translocated cell lines. AI-10-49 is of particular interest for treatment of (inv16) AML as it inhibits RUNX1 binding to CSF1R, RUNX3 and CEBPa promoter targets and also strongly increases mice survival in CBFβ-MYH11 murine leukemia cell models by reducing leukemia burden.

In the Ets-family, the interaction of EWS-FLI1, EWS-ERG and EWS-ETV1 fusion transcription factors (generated after chromosome translocation and associated with Ewing sarcomas) with the RNA helicase A is inhibited by the (S)-enantiomer of YK-4-279 (Figure 4D) [139,140]. YK-4-279 has anti-oncogenic activities evidenced in different cellular and animal models in which it induces cell apoptosis and reduces tumor size from Ewing sarcoma xenografts [140,141], leukemia [142] and neuroblastoma [143]. But also in prostate models due to inhibition of ERG and ETV1, YK-4-279 results in a decrease of the expression of the ERG-target genes PLAU, PLAT and ADAM10 and ETV1-target gene MMP13 [144] associated with in vivo anti-tumor activities [145]. YK-4-279 was granted as an orphan drug in Ewing sarcomas by the US Food and Drug Administration (FDA) under the name Efdispro® for EWS-FLI1 Disrupting Protein. However, since YK-4-279 is highly hydrophobic and poorly bioavailable in mice (2–15%), a prodrug or adequate formulation might be necessary to increase its bioavailability.

For the signal transducer and activator of transcription (STAT) family of transcription factors, homo- or heterodimers could be targeted to treat cancer. STAT3, STAT1 and STAT5 are the main targeted STAT transcription factors. For instance, STAT3 is active as a tyrosine-phosphorylated protein interacting with the Src homology 2 (SH2) domain of STAT3 to form homodimers. Besides inhibition of phosphorylation by JAK tyrosine kinase as JAK/STAT signaling inhibitors, another targeting approach is the inhibition of SH2-domain interaction with P-Tyr at the PPI level. The oxazole-based peptidomimetic S3I-M2001 (Figure 4E) mimics and binds the SH2 domain of STAT3 to disrupt active STAT3 homodimers and STAT1/STAT3 heterodimers [146]. XZH-5 and analogues are other examples of small compounds designed to recognize the SH2 domain of STAT3 to inhibit its phosphorylation and subsequently induce cell death in hepatocellular carcinoma and breast cancer cells [147,148]. This is also the case of LLL12 and the FLLL32 curcumin derivatives [149,150] evaluated in hepatocellular carcinoma, or OPB-31121 or OBP-51602 exerting potent anticancer activities in tumor xenografts. Based on their activites at nM range for inhibition of STAT3 dimers, OPB-31121 and OBP-51602 are some of the most promising ones andentered clinical trials in advanced leukemias, myelodysplastic syndromes, multiple myeloma or advanced solid tumors such as hepatocellular carcinoma [151] (Figure 4E). Isocryptotanshinone (ICTS, Figure 4E) was also found to interact with the SH2 domain of STAT3 (but only at IC50 ≈ 5 μM) and to subsequently induce apoptosis and autophagy in A549 adenocarcinoma lung model [152]. Aminotetrazole, benzo-[b]-thiophene dioxide, dibenzylidenecyclohexanone derivatives and naphthalene-5,8-dione-1-sulfonamide (Figure 4E) were also developed to be selective of the SH2 domain of STAT3 over STAT1 [153,154,155,156]. By contrast, eriocalyxin B (Figure 4E) inhibits STAT3 through a covalent binding to Cys712, that is closed to the SH2 domain of STAT3, as evidenced using LC-MS/MS, in order to block STAT3 phosphorylation and cell apoptosis of lung and breast cancer cells [157]. Galiellalactone, a natural fungal metabolite isolated from the ascomycetes, and its derivatives 16 and 17 (Figure 4E) also interact with STAT3 in order to inhibit its DNA binding and are effective in prostatic and breast cancer cell models [158,159,160]. Galiellalactone was only moderately active on STAT3-mediated luciferase activity with IC50 ≈ 5 μM and on cell growth with cytotoxic activities IC50 ≈ 10–20 μM against human breast cancer cell lines. This activity is moderatly increased

using the halogen-substituted [3.3] bicyclic lactone derivative 16 with an IC50 ≈ 10 µM and the angular alkoxy-substituted analogue 17 with an IC50 ≈ 6 µM on the same cancer cell models. Despite relatively poor cellular activities, an orally available prodrug of galiellalactone (GPA512) was developed and showed interesting preclinical evaluations in DU145 prostate cancer xenograft model [161]. All together, this large production of STAT transcription factors inhibitors is in agreement with the growing implication of this transcription factor family in cancer. However, first clinical trials of STAT3-targeting drugs have not yet met success but further development of active drugs is important in the litterature and might offer new opportunities for cancer treatment in the future.
The basic helix–loop–helix leucine zipper transcription factors are another large family of transcription factors. Interaction of the two bHLH transcription factors MYC and MAX is another well described PPI model to be targeted in cancer. Many structures and strategies to target the interaction domain of those long crossed α-helices are already well depicted in recent reviews (NY2267, Mycro1 and Mycro2, 10058-F4 and 10074-G5…), and would not be further described here [162,163,164].

BCL6 is a zinc-finger transcription factor overexpressed, translocated or mutated in several lymphomas among which diffuse large B-cell (DLBCL) and follicular (FL) lymphomas [165,166] and in glioma [167]. BCL6 proteins homodimerize through their BTB/POZ PPI domains to form a specific binding pocket in order to be associated with BCOR (B-cells) and NCOR (neuronal cells) cofactors. From the first defined decoy peptide mimicking the SMRT peptide that interacts with BCL6 and inhibits BCL6/SMRT PPI [168], other peptidomimetics were developed with interesting cellular activities and in vivo anti-lymphoma potencies as L-BPI or PR-BPI [169], F1324 [170] or the cyclo-ClYYCV [171]. F1324 is a promising peptidomimetic based on a dissociation constant KD of 0.57 nM [170]. In parallel, synthetic inhibitors were also developed as the indolin derivatives 79-6 and FX1 [172] and the diphenylamine derivative 7 [173] with increasing affinity as exemplify by KD measurement of 129 µM, 7 µM and 78 nM, respectively (Figure 4F). The tetrahydroquinolinone 8c [174] and the pyrazolo-pyrimidine macrocyclic inhibitor 11 [175] are other BCL-6 PPIi that present strong affinity for BCL6 homodimers (Figure 4F). More recently, the covalent BCL6 inhibitor BCL6-i (Figure 4F) was synthesized as a chloracetamide derivative of compound 8c to covalently bond Cys53 of the BCL6-BTB domain, resulting in irreversible inhibition of BCL6 function [176].

Besides these transcription factors which are well studied for PPIi, many others are already, or envisaged to be, targeted by peptidomimetics or synthetic inhibitors for cancer treatment (androgen receptor/TIF2, HIF1α/p300-CBP, HOX/PBX, YAP/TEAD) [112,177,178,179,180].
However, a transcription factor acting as a monomer or having no known heterodimer or co-factor, cannot be targeted at PPI level. Another option is to directly block its protein/DNA interface occurring though interaction with a pocket within the transcription factor (ligand pocket or a pocket formed in the DNA-binding domain) or through the interaction with the DNA binding sequences to compete for transcription factor DNA binding activity. Both options are presented below.

5. Targeting Transcription Factor through a Binding Pocket

5.1. Targeting a Ligand-Binding Pocket

The easiest and oldest approach for inhibiting transcription factors through a binding pocket is the development of ligand-derived drugs, taking advantages of an already identified ligand-binding pocket to develop structural derivatives of the natural ligands. This is the case for steroid and hormonal receptors. Some of them are already targeted in cancer treatment for the property of a drug, deriving from their ligand structure, to modulate their DNA binding properties. This is particularly well depicted for the direct binding of all-trans-retinoid acid (ATRA, Figure 5A) to PML-RARα oncogenic fusion transcription factor expressed following t(15;17)(q22;q12) translocation which is responsible for acute promyelocytic leukaemia (APL) [181]. ATRA binds to the retinoid ligand pocket of RARα and subsequently induces the dissociation of bound co-repressors. All this leads to PML-RARα degradation to restore binding of the wild-type RARα transcription factor to its DNA binding sequence in order to regulate physiological differentiation process within the leukemic cells, as a first-in-class differentiation approach in cancer therapy [182,183,184].

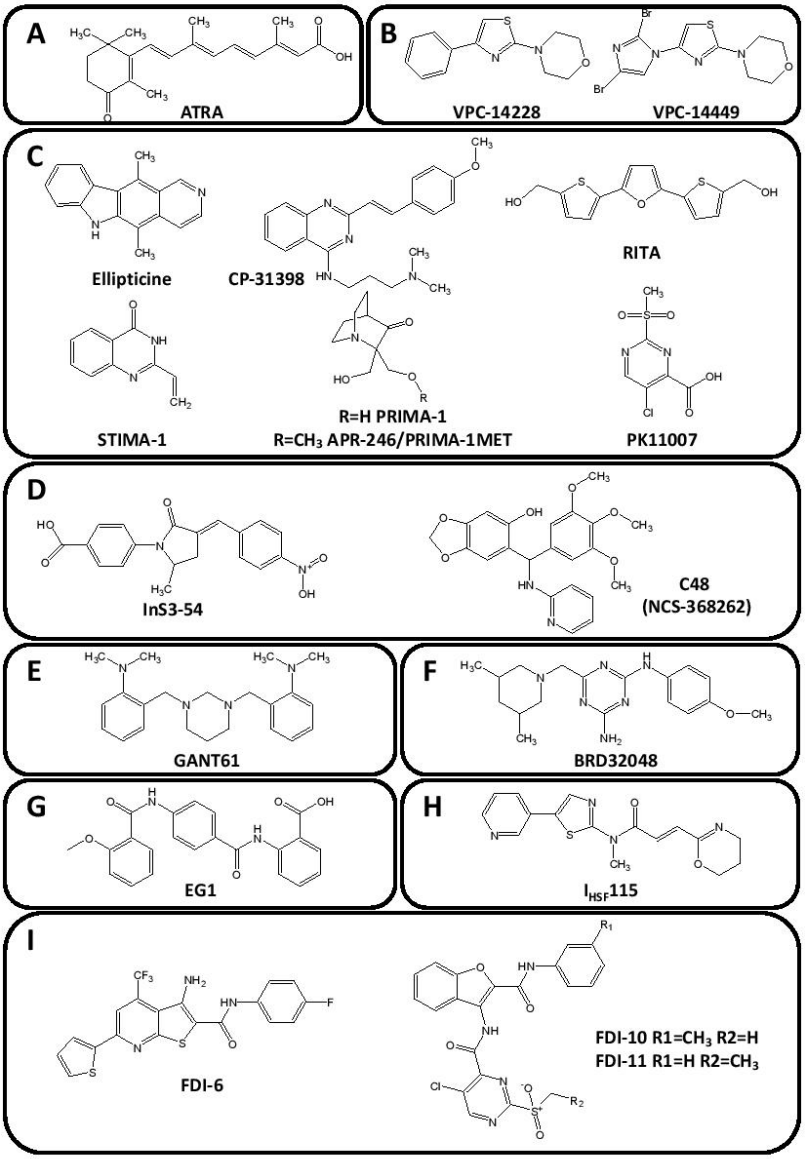


Figure 5. Direct targeting of transcription factors. (A) PML-RARα; (B) Androgen receptor; (C) p53. (D) STAT3; (E) GLI1/2; (F) ETV1; (G) PAX2; (H) HSF1; (I) FOXM1.

5.2. Targeting a Pocket in the DNA-Binding Domain

However, most oncogenic transcription factors do not have natural ligand binding pocket and alternative approaches need to be developed by taking opportunities for instance of the DNA binding dynamic which may reveal potential structural pockets that might be used to select and/or design good fitting structures. This is for example achieved using the morpholine derivatives VPC-14428 and VPC-14449 (Figure 5B), two compounds specifically designed to bind a pocket of the androgen receptor (AR) DNA binding domain, a new drug-target site proposed as an alternative to the androgen binding pocket [185]. VPC-14428 and VPC-14449 induce AR inhibition by blocking its DNA binding propensity and its subsequent transcriptional activity of both AR full-length and splice variant forms (lacking the ligand binding domain) [186].

Besides protein/protein interaction inhibition, the anti-oncogene transcription factor p53 could also be targeted by direct binding. Several drugs were identified as p53 interacting compounds, either on the wild-type or the mutated p53 proteins (Figure 5C). This is the case of ellipticine binding to wild-type p53 (WT-p53) resulting in an increase in its nuclear localization and subsequent p21 promoter transactivation, as well as to the oncogenic mutated p53 (mut-p53) present in multiple cancers and hemopathies [187,188,189] to restore its normal conformation and activity [190]. Mut-p53 reactivation to restore normal p53 function is also obtained upon treatment with CP-31398, Reactivation of p53 and Induction of Tumor Cell Apoptosis (RITA), STIMA-1 or PRIMA-1 as reversible or covalent binders of mut-p53 (Figure 5) [191,192]. For instance, PRIMA-1 has potent anti-tumor activity in mut-p53 positive pancreatic cancer cells PANC1 and BxPC3 and enhances chemosensitivity toward various chemotherapeutic drugs (cisplatin, gemcitabine or doxorubicin) [193]. PRIMA-1 derivatives were also developed such as APR-246/PRIMA-1Met which induces apoptosis in mut-p53 expressing small cell lung carcinoma [194] and synergizes with other therapeutic approaches such as alkylating drugs, PARP or kinases inhibitors [195,196,197]. More recently, the 2-sulfonylpyrimidines PK11007 was identified as a new p53 inhibitor through stabilization of p53 via thiol alkylation of two surface-exposed cysteines. PK11007 bonding does not alter p53 DNA binding activity and induces the

reactivation of p21 and PUMA proteins expression and other genes associated with cell death and apoptosis as evidenced using RNAseq on breast cancer triple-negative cells [198,199].

Another example is the targeting of STAT (signal transducer and activator of transcription) transcription factor family members by the 4-[(3E)-3-[(4-nitrophenyl)-methylidene]-2-oxo-5-phenylpyrrol-1-yl] benzoic acid (InS3-54, Figure 5D). Indeed, InS3-54 directly blocks the interaction between STAT3 and its target DNA sequence as evidenced using EMSA but does not affect STAT1/DNA binding. InS3-54 interacts non-covalently with STAT3 DNA binding domain, without affecting STAT3 homodimerization and phosphorylation [200]. However, binding affinity and STAT3/DNA binding inhibition were only obtained at high concentrations (IC50 ≈ 30 µM) Consequently, InS3-54 treatment of human breast and lung cancer cell lines results in apoptosis but also in reduced cell migration and invasion, in correlation with reduced expression of the STAT3 downstream target MMP-9. InS3-54 also inhibits STAT3 binding to cyclinD1 (CCND1) promoters in ChIP experiments and reduces tumor growth and metastasis [201]. Similar observations were made with InS3-54A18 derivative that inhibits STAT-3 controlled genes expressed upon IL-6 stimulation such as survivin gene [201]. By contrast, STAT3 homo-dimerization could be inhibited by irreversible bonding of C48 (NSC-368262, Figure 5D) to Cys468 residue of STAT3 within the DNA binding domain, leading to direct inhibition of DNA interaction. C48 also inhibits the DNA binding activity of STAT3/STAT1 heterodimer but not STAT1 homo-dimer [202]. This activity on different protein complexes (for instance here STAT3/STAT1 and STAT3/STAT3) may be a disadvantage if one complex is not associated with the oncogenenic process but to physiological processes, or an advantage if all complexes are associated with the oncogenic pathways (for instance in the case of an overlapping of transcription factor activities).

Another STAT family member, STAT5, is also inhibited through direct interaction of an aptamer peptide mimicking its DNA binding-domain at the dimer interface that links the DNA helix. This binding results in the inhibition of the protein/DNA complex formation and inhibits subsequent target gene expression such as cyclinD1 and proliferation in prostate (PC3) and breast (A431) tumor models [203] as well as in chronic myeloid leukemia (K562) models [204].
Other compounds were developed to target transcription factors, but it is not yet clear whether they directly inhibit the transcription factor or whether they affect some unclear or yet unknown protein/protein interactions. Among them is GANT61 (2'-[[dihydro-2-(4-pyridinyl)-1,3(2H,4H)-pyrimidinediyl]-bis(methylene)]-bis[N,N-dimethylbenzenamine, Figure 5E) targeting GLI1 by interaction with the zinc finger 2 and 3 of GLI1 and GLI2 DNA binding domain but not on other zinc finger family members [205]. GANT61 inhibits GLI1/2-controlled luciferase expression at high doses (IC50 ≈ 10 µM), abolishes GLI1-regulated genes [206] and subsequent megakaryocytic differentiation [207]. GANT61 also induces apoptosis in many cancer and leukemia models such as gastric cancer [208], Ewing sarcoma [209], biliary tract cancer [210], lung cancer [211], breast cancer [212,213], prostate carcinoma [214,215] and adult T-cell leukemia or acute myeloid leukemia [216,217]. GANT61 induces autophagy in pancreatic ductal adenocarcinoma cells and prevents cellular migration in osteosarcoma metastasis [218] and ovarian and breast cancer invasion [212,219]. GANT61 also sensitizes cancer cells to radiation in prostate cancer model [220], to alkylating drugs such as temozolomide in glioma cells [221] or cisplatin in large cell neuroendocrine carcinoma of the lung [222] and to FLT-3 kinase inhibitor in acute myeloid leukemia [217].

BRD32048 (Figure 5F) is another tri-cyclic compound that targets the DNA binding domain of a transcription factor. Indeed BRD32048 directly binds ETV1, a member of the ETS transcription factor family translocated in prostate cancer and Ewing sarcoma, and inhibits its transcriptional activity on MMP1 promoter. In agreement with MMP1 reduced expression, BRD32048 inhibition of ETV1 reduces cancer cell invasion and proliferation in both LNCaP (prostatic) and 501mel (melanoma) ETV1-dependent cell lines, but not in PC3 as an ETV1-independent prostatic cell line [223].

More recently, virtual screening of compounds that could interact with Pax2 DNA binding domain found candidates from which was obtained EG1 (Figure 5G). EG1 binds the pared domain of Pax2, resulting in an inhibition of Pax2/DNA binding and subsequent target genes expression control, as well as reduced cell survival in renal cell (RCC11) and ovarian (SKOV-3) carcinoma models [224]. Similar approach was used to target the heat-shock transcription factor HSF1 and identified compound IHSF1115 (Figure 5H) for its binding in a putative pocket of the HSF1 DNA binding domain. However, IHSF1115 does not abolish HSF1 binding to the DNA but inhibits its hetero-dimerization with ATF1 [225]. Very recently, the FOXM1/DNA binding surface was analyzed by molecular dynamic simulations and identified a binding pocket [226] that is recognized by FDI-6 (NCGC00099374) (Figure 5I) which was previously identified, together with FDI-10 and FDI-11 compounds (Figure 5I), as able to destabilize FOXM1/DNA binding, downregulate the expression and block FOXM1 occupancy on the promoter of CDKN3, AURKA and NEK2 FOXM1-controlled genes [227,228]. Altogether, direct targeting of transcription factor DNA binding through the interaction with the DNA binding domain itself is an emerging approach with promising results and an approach that would certainly need to be further developed in the future.

6. Targeting Transcription Factor at the Protein/DNA Interaction Level

DNA is by itself an anti-cancer target for conventional therapies still used since the advent of anti-cancer chemotherapies near 70 years ago from the first use of 6-mercaptopurine as a first DNA alkylating drug to treat leukemia and lymphoma in clinic. After alkylating drugs, non-covalent drugs such as DNA intercalators or major/minor groove DNA ligands were developed. In the 80's, the idea of targeting DNA at specific sequences emerged, leading to the development of many sequence-specific DNA binding compounds in order to develop a "targeted chemotherapy" against DNA. Such strategy is based on the consequences of sequence-specific targeting of the DNA to interfere with DNA binding proteins such as transcription factors associated with oncogenic processes leading to proliferation or differentiation blockade, as evidenced

above in the introduction section showing that ~15% of the list of the 1988 defined transcription factors are oncogenic proteins (Table 1).
Drug interaction with DNA could occur through different mode of binding to the DNA helix: alkylation leading to covalent bonding, intercalation between adjacent base pairs, binding to the major or minor grooves of the DNA helix. Examples of each of those sub-families of DNA interacting drugs are presented below.

6.1. DNA Alkylating Drugs for Transcription Factor DNA Binding Modulation

The first DNA alkylating drugs identified to interfere with transcription factor/DNA recognition was pluramycin [229] (Figure 6). Pluramycin is a guanine alkylating drug that forms a covalent bond with the N7 atom orientated in the major groove of the DNA helix preferentially at 5′-CGT and 5′-CGG sequences, resulting in a strong DNA unwinding and bending by an angle of 180° [230] that, when located in the close vicinity of the pluramycin alkylation site, facilitates the binding of the TATA-box binding protein (TBP) to the TATA-box of gene promoters within the TFIID basal transcription factor complex. TBP is indeed a general marker of cell proliferation and is often over-expressed in cancer cells relatively to non-cancerous cells and is associated with poor prognosis. TBP binding to pluramycin-alkylated TATA-box containing oligonucleotide has much better affinity than to unalkylated TATA-box containing oligonucleotide. As a consequence, pluramycin traps the TBP protein to its consensus binding site to form a TBP-DNA-pluramycin ternary complex [231]. Moreover, TBP binding to TATA-box results in a distorted DNA that facilitates pluramycin alkylation (Henderson 1996). This trapping of TBP by pluramycin contrasts with the effect of the pluramycin derivative hedamycin (Figure 6) that inhibits TBP/DNA binding [232]. Hedamycin is another potent inhibitor of TBP transcription factor DNA binding [233] but also seems to interact with NF-E2/AP-1 motif even if their transcrioption factor DNA inhibitory effect was not evidenced [234].

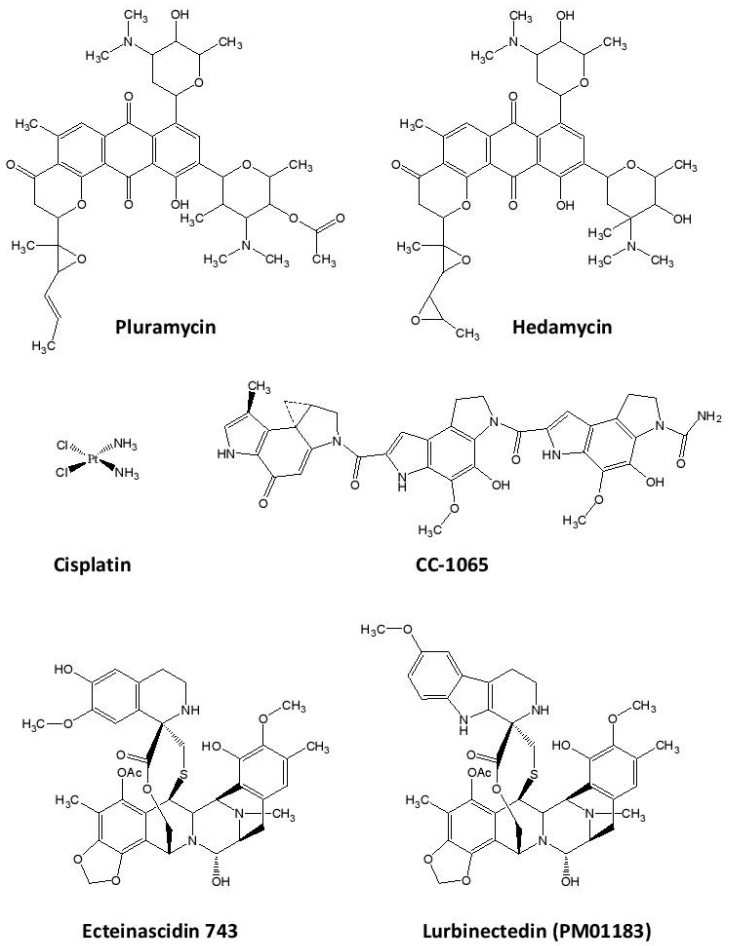


Figure 6. DNA alkylating drugs as inhibitors of transcription factors/DNA binding.

The second well known DNA-alkylating drug family that interferes with transcription factor/DNA binding is that of the platinated agents. Indeed, cisplatin (cis-diaminedichloridoplatinum(II), Figure 6), discovered more than 50 years ago and used in clinic since 40 years is a bis-alkylating drug that leads to intra- or inter-strand DNA crosslinks or to monovalent DNA adducts. Both cisplatin adducts result from covalent bonding to the N7 position of guanines in the major groove with preferential sequences for 5′-GpG intra-strand cross-links resulting in a DNA bending of 55–78° toward the major groove that destabilizes the Watson-Crick base pairing resulting in local denaturation of the DNA helix [235,236] that could span up to 7 bp for some intra-strand crosslinks [237]. Consequently, cisplatin/DNA adducts trap HMG proteins through the insertion of the Phe37 residue of the HMG DNA binding domain (HMG-box) in the bent area formed upon the two vicinal platinated guanines with the 5′-GpG dinucleotide that perfectly fits with the L-shaped structure of the HMG-box and reduces the “cost” of DNA bending

for HMG-box [238] but also through interaction of Lys7 residue with cytosine residue in close vicinity of the cisplatin adduct on guanines [239]. Cellular experiments highlight that both the oncogenic HMG-B1 and HMGB-B2 [240] participate in platinated-agent-induced cytotoxicity [241]. This platinated distorted DNA is also a good substrate for other proteins, such as HMG-B4 [242] and other transcription factors containing HMG-boxes such as SRY, LEF-1 or TOX4 [243,244,245] that are associated with cancer stemness [246], and targets for cancer treatment [247]. TBP also shows preferred binding to platinated DNA relatively to unmodified DNA with a 175-fold increase in the binding affinity and a decrease of >30-fold of the TBP/DNA dissociation constant [248]. Sp1 and Sp3 transcription factor binding to their cognate sequence is also increased upon cisplatin treatment of the DNA as evidenced using gel shift assays [249]. By contrast, platinated adducts on κB consensus DNA binding sites distort DNA helix and consequently inhibit NFκB transcription factor binding to κB-DNA [250]. Similarly, DNA platination abolishes p53 and p73 binding to DNA on p21 and MDM2 promoter sequences [251,252]. Beside platinated compounds, other metal-associated molecules may also perturb transcription factor/DNA binding, as for chromium-derivatives that inhibit p300/CBP protein binding to DNA [253] as well as CTCF and AP1 binding to their consensus binding sequences on the DNA as recently evidenced in hexavalent chromium-derivatives treated cells [254].

CC-1065 (Figure 6) is an antibiotic minor groove alkylating drug in pre-clinical development that bonds to the N-3 position of guanines to bend the DNA helix and that interferes with transcription factor/DNA binding: CC-1065 inhibits TBP/DNA interaction [233] but facilitates the binding of SP1 transcription factor to DNA [231,255].

The tetrahydroquinoline alkaloid ecteinascidin-743 (ET743, Trabectedin, Yondelis®) is another minor groove alkylating drug that interferes with transcription factor binding to DNA. ET743 (Figure 6) reacts with the exocyclic amino group of guanine to form a DNA adduct orientated toward the minor groove which increases the size of the major groove on the opposite strand, in a sequence-dependent manner [256,257,258]. As a consequence, ET743 modifies DNA conformation and inhibits several transcription factors DNA binding like TBP, E2F and NF-Y, resulting in the inhibition of the expression of the multi-drugs exclusion pump MDR1, associated with chemoresistance [259,260]. ET743 also induces the displacement of HMGA protein from the ATM promoter [261]. ET743 also inhibits FUS-CHOP transcription factor binding to the promoters of different genes among CHOP, pentraxin 3 and fibronectin 1 to restore adipogenic differentiation in myxoid liposarcoma, a cancer against which ET743 entered into phase I/II clinical trials [262,263,264,265]. Moreover, ET743 and its derivative lurbinectedin (PM01183) inhibit the DNA binding activity of the fusion transcription factor EWS-FLI1 responsible for pediatric Ewing sarcomas. This inhibition results in a change in EWS-FLI1 nuclear and nucleolar distribution as well as a decrease in the promoter activity of NR0B1as, an EWS-FLI1 controlled gene, but also the expression of other key controlled genes such as EZH2, ID2 or KMO [266,267]. More recently, ET743 also alters DNA binding of another fused transcription factor protein: EWS-WT1 that originates from t(11;22)(p13;q12) and is responsible for desmoplastic small round cell tumors. Indeed, EWS-WT1 interaction with EGFR promoter is reduced upon ET743 treatment in JN-DSRCT-1 cells as evidenced using ChIP experiments [268].

All of these examples rely on potent or potential anti-cancer drugs that seem to possess two key mechanisms of action: DNA alkylation and transcription factor/DNA binding modulation. The consequences of DNA alkylation are, first and foremost, the induction of a maximum of DNA damages leading to cell death in cancer cells or any other cycling cells, as treated cells do not have time to correctly repair a multitude of simple DNA damages (adducts) and thus accumulate poorly manageable DNA damages such as double strand breaks. Alteration of transcription factor activities may appear marginal from comparison with the impact of DNA alkylation process. However, this additional function against a transcription factor which would be associated with tumor development (as presented above for ET743 on EWS-FLI1) may lead to a better therapeutic index because of different consequences between treated cancerous and normal tissues.

6.2. DNA Intercalating Drugs for Transcription Factor DNA Binding Modulation

The intercalation process of aromatic chromophores between two consecutive base pairs of the DNA induces specific DNA constraints to the DNA helix, associating an increase in the DNA length from 3.4 Å to around 6.8 Å, and an unwinding of the DNA helicity associated with increased DNA constraints [269]. For instance, the anthracycline derivative daunorubicin unwinds the DNA by an angle of 15° [270], ethidium bromide by 17° or 26° depending on DNA sequences [271,272] and actinomycin D induces a 28° rotation [273]. Both DNA elongation and unwinding may by themselves affect usual deep contacts of a transcription factor with DNA. The alteration is moreover reinforced by the presence of portions of the molecule that may protrude of one and/or the other side of the "stairs" formed by the successive base pairs of the DNA. This is particularly important for large compounds that intercalate in the perpendicular orientation and for which portions of the molecule partially fill the major and/or the minor grooves of the DNA helix, thus limiting access to DNA of amino acid residues of the transcription factors DNA binding domains. Moreover, some intercalating drugs may have two intercalating domains that are positioned between two series of adjacent base pairs. Due to the length and rigidity of the molecule linker portion that associates with the two intercalation motifs, bis-intercalation may also distort the DNA axis toward the major or the minor groove as do alkylating drugs. For instance, the peptide antibiotic echinomycin (NSC-13502, Figure 7) unwinds the DNA helix by an angle of 48° together with a DNA bending [274]. At last, DNA structure modulation upon drug binding is also impacted by the natural DNA breathing associated with the formation of Hoogsteen base pairing in which the purine bases flips from the anti to the syn orientation, and with a change in the number (two at maximum) and distances of the hydrogen bonds between AT and GC base pairs thus reducing the minor groove width from around 10.5 to 8.5 Å [275]. This was recently well demonstrated using NMR and molecular dynamics on echinomycin binding to DNA [276]. In terms of transcription factor inhibition, echinomycin was identified as a HIF1α and HIF1β/DNA binding inhibitor as evidenced using EMSA, luciferase activity and ChIP experiments on HIF-1 response elements (HRE) of the vascular endothelial growth factor promoter (VEGF,

associated with tumor vascularization) [277]. Echinomycin also induces HIF1/DNA binding inhibition to control REDD1 [278], endothelin-2 [279], GLUT3 [280], GLUT1, BCL2 and NOTCH1 in leukemic cells [281] as well as the human growth hormone promoter [282]. Consequently, it inhibits cell proliferation [281] and induces apoptotic cell death [283]. The echinomycin biosynthetic precursor triostin A and its derivatives are also potent inhibitors of HIF1 effective on hypoxia model and induce cell death in MCF7 cancer model [284].

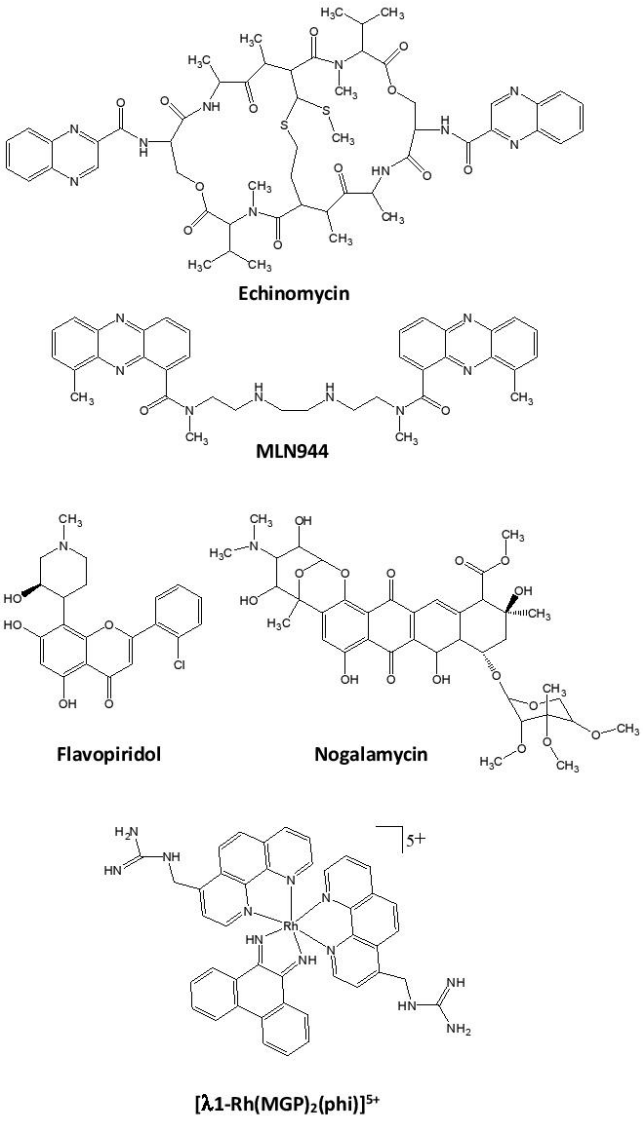


Figure 7. DNA intercalating drugs as inhibitors of transcription factors/DNA binding.

MLN944 (XR5944, Figure 7) is a bis(phenazine-1-carboxamide) compound, another bis-intercalator that binds to DNA through its two phenazine rings intercalating (arrows) in the 5′-AT-GC-AT-3′ palindromic sequence and the amino-carboxamide linker lying along the major groove of the 5′-GC-3′ portion of DNA to induce a right-handed twist of the DNA helix with unwinding of 48°. As a consequence, MLN944 inhibits c-JUN/DNA binding on the AP-1 5′-aTGAGTCA-3′ sequence [285] but also the estrogen receptor alpha ERα/DNA binding on the palindromic estrogen response element (ERE) 5′-AGGTCAnnnTGACCT-3′ [286,287].

Mono-intercalating drugs may also block transcription factor/DNA binding as demonstrated with flavopiridol (alvocidib, Figure 7). Besides its activity of cyclin-dependent kinases (CDKs) inhibitor, flavopiridol interacts with DNA with strong affinity and inhibits STAT3/DNA binding [288]. Flavopiridol lowers STAT3-directed transcription on STAT3-driven promoters in luciferase assays and also down-regulate the expression of STAT3 controlled genes such as MCL1 [289]. Because STAT3 is commonly overexpressed in AML, flavopiridol remains of particular interest against this hematological disorder [290]. Some metallo-intercalators associating ruthenium or platinum atom to stabilize rings in a planar configuration were also evidenced as inhibitors of protein/DNA binding like for example, [Ru(phen)2(dppz)]2+ against the interaction of PUrine-rich box-1 (PU.1)/SFFV Proviral Integration Site-1 (SPI1), an ETS-family member transcription factor, to its minimal cognate ETS-family-

core binding site 5'-GGAA/T-3' [291], or ethaRAPTA against the DNA repair protein BRCA1 also associated with transcription control [292].

As another example, the anthracycline nogalamycin (Figure 7) inhibits EGR1 and AP1 through intercalation between G/C-base pairs in a perpendicular manner, presenting part of the molecule in both grooves [293,294]. The intercalation is associated with a 35° helical twist [295] that facilitates the inhibition of TBP binding on the TATA-box in close vicinity of a GC-rich site that nogalamycin binds and bends. However, as an anthracycline, nogalamycine is also a topoisomerase inhibitor and therefore its anti-tumor activity may also be exerted through a general DNA topoisomerase inhibition process.

Finally, several metal-coupled compounds intercalate in the DNA helix with some sequence selectivity due to major groove contacts to selectively inhibit transcription factor DNA binding, as demonstrated with the lambda-1-Rh(4-guanidylmethyl-1,10-phenanthroline)2 (9,10-phenanthrene- quinone diimine)5+(Lambda-1-Rh(MGP)2phi5+ (Figure 7) that binds specifically the AP-1 recognition element 5'-CATATG-3' in the major groove through its guanidinium moiety that bonds DNA toward the major groove with a 70° unwinding of the DNA helix. As a consequence, lambda-1-Rh(MGP)2phi5+ inhibits AP-1 transcription factor binding to DNA, even if only at sub-micromolar concentrations [296].

As for alkylating drugs associated with the modulation of transcription factor activites presenting double mode of activities, the intercalation of molecules between stacked bases of the DNA helix have per se cellular consequences that are associated with anti-cancer activities and induce death of cycling cells that are responsible for the drugs toxicity in treated patients and some limitation of their use in the course of cancer treatment. It could be direct effect on the replication machinery or through DNA topoisomerase inhibition. The intercalating drugs described above for modulating transcription factor/DNA binding, but nogalamycin, are not topoisomerases inhibitors (Echinomycine, MLN944, flavopiridol) or not known as such but may have alternative mode of action typical of DNA intercalation (as for instance on DNA polymerases) or is also cyclin-dependant kinases inhibitor (flavopiridol). Multiple mode of action make difficult to address the anti-tumor activity of a compound to one or another of its target.

6.3. Major Groove DNA Binding Drugs for Transcription Factor DNA Binding Modulation

Based on the asymmetry of the DNA helix, the left and right side of the helix are not equal: a shallow-wide major groove and a deep-narrow minor groove are formed and represent two different opportunities to bind the DNA helix along the axis. The major groove has a bigger size (11.6 Å) and is a good template for protein binding through the helices from different families of DNA binding domains but a poor one for small molecular weight compounds that better fit in the minor groove (6.0 Å). Therefore, transcription factor inhibitors that may target the DNA major groove in a sequence-selective manner might easily compete for transcription factor binding to their cognate sequences.

The size of the major groove is compatible with that of another strand of DNA making contacts with, Hoogsteen bases and therefore forming triple-stranded DNA helix [297,298]. The additional DNA sequences called triplex-forming oligonucleotides (TFOs) would consequently interfere with transcription factor DNA binding as already discussed in several reviews and will not be further presented here [299], we will focus on the few number of small compounds that interact with the major groove. Among them are essentially metal-coupled compounds that associate chromium, ruthenium, platinum ions in a polycyclic structure (Figure 8). For instance, [Cr(salen)(H2O)2]+ is able to disrupt SP1 and TFIID DNA binding through its interaction with the major groove [300] and the ruthenium complex [Rh(1,10-phenanthroline)2(9,10-phenanthrenequinone diimine)]3+([Rh(phen)2(phi)], Figure 8) inhibits RNA transcription in vitro [301]. In a similar manner, some platinum complexes such as the square planar pyrene-coupled platinum(II) complex [Pt(CˆNˆN)(C≡N-L)]+ (where L = 4-(3,5-diisopropylphenylethynyl)pyrene, Figure 8) binds into the major groove of the DNA and blocks the cAMP response element binding protein (CREB) binding to its response element CRE as evidenced by EMSA [302]. Such inhibition could only be reached at high concentrations with IC50 ≈ 40 µM in order to inhibit CREB binding to CRE-containing DNA but is however specific as demonstrated with other transcription factors (JUN/FOS, NFκB) which interaction with their respective cognate sequences could not at all be disrupted at the highest evaluated concentration of drug (80 µM) [303]. Such high concentration of drug required for abolishing CREB/CRE binding might strongly compromise their use in clinic.

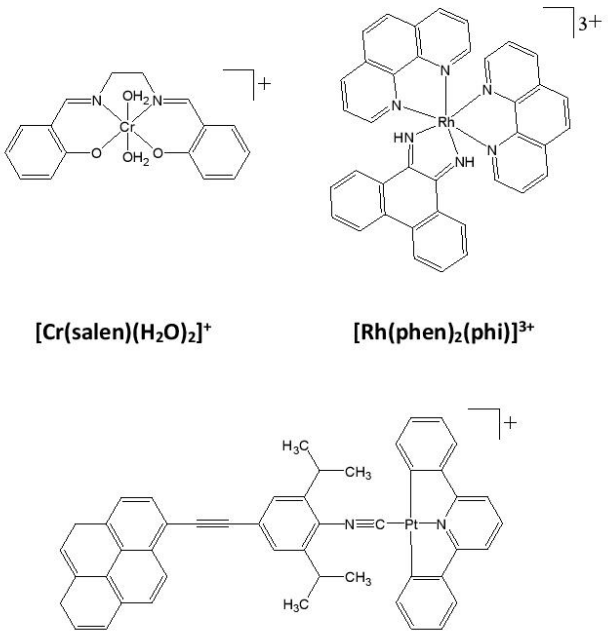


Figure 8. Major groove DNA binding drugs as inhibitors of transcription factors/DNA binding.

6.4. Minor Groove DNA Binding Drugs for Transcription Factor DNA Binding Modulation

Only a few number of low molecular weight groove binders interacts with the DNA major groove, where most of the proteins bind; the vast majority of molecules have easier propensities to fit in the DNA minor groove due to higher number of van der Waals contacts in this narrower groove, relatively to the major groove.

The first family of minor groove DNA binding compounds known since ~40 years to inhibit transcription factors/DNA binding is the one including netropsin, distamycin and Hoescht 33258 (Figure 9) containing a succession of 3 to 4 rings, organized as a crescent to fit intimately with the natural curvature of the minor groove over 3–4 bp, and positive charges at both extremities which make direct or water-mediated contacts with the DNA. All three compounds recognize stretches of AT-rich base pairs in the minor groove of the DNA helix in a relatively unspecific manner [304,305].

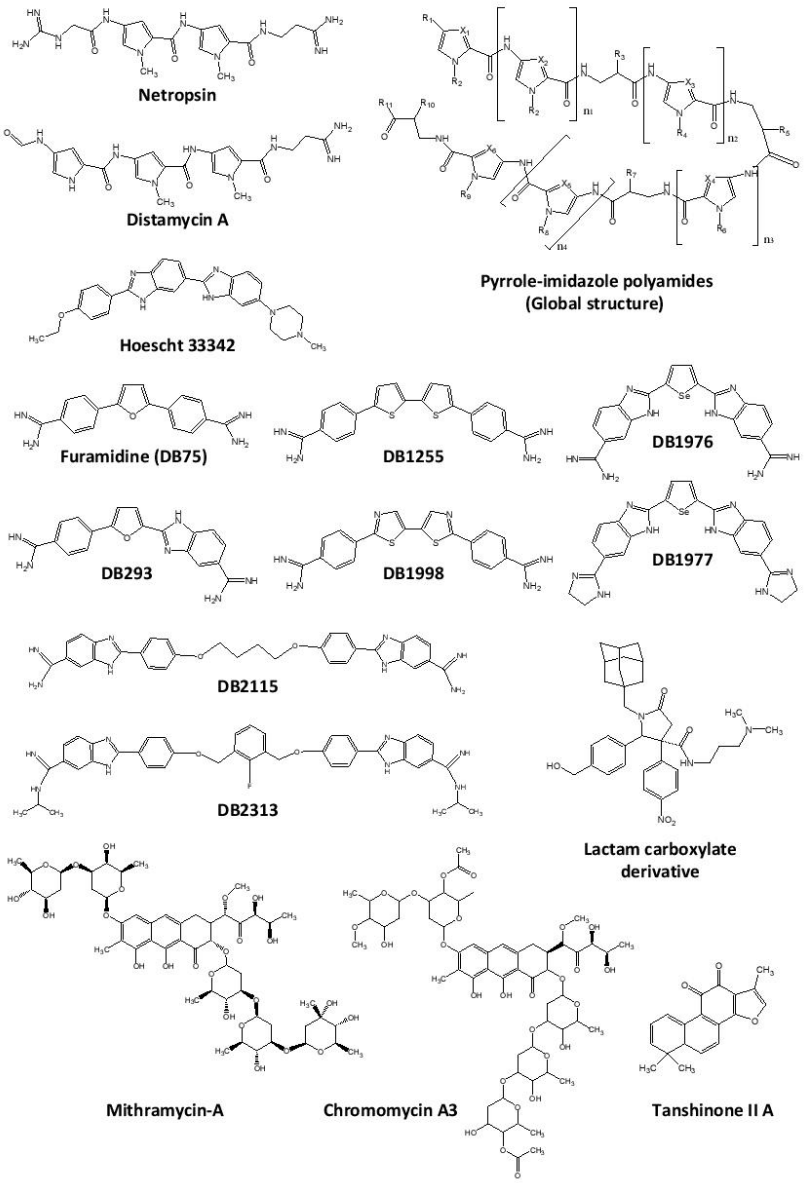


Figure 9. Minor groove DNA binding drugs as inhibitors of transcription factors/DNA binding.

Netropsin binds as a monomer in the minor groove of 3–4 successive A or T bases and inhibits AT-rich binding transcription factors such as TBP and its co-factor TFIIA [233] or HMGA1 that failed to interact with the NOS2 promoter [306].
Distamycin A binds as a monomer in the minor groove of four successive A-T base pairs such as on 5'-ATTA-3' sequence. But distamycin A also binds as a dimer on 5'-AAGTT-3' sites, for instance [307]. The dimeric binding of distamycin A occurs in a cooperative binding mode on many AT-rich sequences with some exception such as alternative succession of A or T bases as observed in 5'-ATAT-3' site which is recognized as dimer in an anti-cooperative manner. Dimer of distamycin A fitted in the minor groove results in an increase of the size of the minor groove associated with a decrease of the size of the major groove on the opposite side, as well as a large bending of the DNA axis toward the major groove [303]. As a consequence of these different modes of binding, distamycin A inhibits DNA interaction of different transcription factors such as OTF-1 and NFE-1 [308], OCT-1 [309], TBP [233], the Epstein-Barr virus nuclear antigen 1 [310], E2F1 [311], NFκB, HMGA1 [312,313] and PU.1/SPI1 [314].

Hoechst 33342 is a bisbenzimidazole derivative that binds to AT-rich DNA minor grooves as a momoner, as a dimer, and probably also as a tetramer. However, Hoechst 33342 also intercalates in GC-rich sites at higher Hoechst 33342 concentration [315]. Consequently, Hoechst 33342 inhibits the interaction of TBP to the TATA-box, of ELK-1/SRF complex to the serum response element (SRE) [316] and of GFI-1 to an AT-rich site on the survivin promoter [317]. Microgonotropens (FMGTs) are Hoechst derivatives that also inhibit transcription factor DNA binding such as E2F1 binding on the dihydrofolate reductase promoter [318] or the ELK-1/SRF complex binding to the SRE sequence present on c-Fos promoter [319].
Destabilization of transcription factor/DNA complexes by netropsin, distamycinA and Hoechst 33342 was not enough selective to one precise transcription factor or transcription factor family. But due to their interesting DNA binding properties, those three compounds were the first building blocks used to develop other sequence-selective minor groove DNA binders designed to increase the size and/or the specificity of the interacting DNA sequences and therefore to increase the specificity

of the inhibitory effect of those drugs on transcription factor/DNA inhibition. Two main series were developed: "polyamides" using a succession of several well-defined building blocks and "heterocyclic diamidines" using a fewer number of building blocks but presenting a bigger variety of structures.

Pyrrole-imidazole polyamides (see global structure in Figure 9) was the first developed approach and is based on the successive addition of a few number of well-defined building blocks, each being more or less specific for a defined base pair. For instance, imidazole-pyrrole successive rings are proposed to bind to 5'-GC-3' while pyrrole-imidazole would rather interact with 5'-CG-3' steps and pyrrole-hydroxypyrrole and hydroxypyrrole-pyrrole successions would recognize 5'-AT-3' and 5'-TA-3' base pairs, respectively. Additional building blocks include for instance γ-turn, β-alanine, α-methoxy-β-alanine, methyl-hydroxypyrrole or N-methylpyrazole, α- or β-hydroxyl-γ-aminobutyric acids and imidazopyridine (for reviews see Dervan 2005; Kawamoto 2018) [320,321]. Such diversity of molecules offers a large variety of transcription factor/DNA binding inhibitors for anti-tumor activities [322]. Exemples are presented in Table 2.

Transcription Factor Family	Transcription Factor Target	Tumor Model	References
AT-rich binder	TBP	-	[323]
	LEF-1	Colon	[324]
Hormone/Steroid receptor	estrogen receptor	Breast	[325]
	androgen receptor	Prostate	[326,327]
	glucocorticoid receptor	-	[327,328]
B-Zip	GCN-4	-	[328,329]
	AP-1	-	[330–332]
ETS-domain	ETS-1	-	[333,334]
	EVI1	Leukemia	[335]
	ELK-1	Breast	[336]
	PU.1/SPI1	-	[337]
Zn-Finger	TFIIIA	-	[338,339]
	Zif268	-	[340]
Others	NF-Y	Lung	[341–345]
	NFκB	Lung, Osteosarcoma	[346,347]
	HIF1	Kidney, Glioblastoma, Multiple myeloma	[348–351]
	c-MYC	Osteosarcoma, Burkitt's lymphoma	[352,353]
	OCT1	Prostate	[354]
	RUNX	Acute myeloid leukemia	[355]
	E2F1	Chronic myeloid leukemia	[355]

Table 2. Examples of polyamides targeting oncogenic transcription factors.

Most of those polyamides strongly interact with the DNA with binding affinities often at nM range but however often require concentrations at µM range to interfere with transcription factors binding to their cognate sequences, when there are not impeded for further development due to poor cell penetration due to the size of those big molecules.

The second series of molecules used to develop inhibitors of transcription factor/DNA binding are heterocyclic diamidines deriving from both distamycin and pentamidine. Transcription factor inhibition for cancer treatment was not the first goal in the development of this series of compounds, but anti-parasitic and anti-microbial activities, such as against Trypanosoma cruzi, Leishmania amazonensis or Pneumocystis carinii among others infectious diseases [356]. It is against those pathologies that the diphenyl-furan-diamidine DB75 (Furamidine, Figure 9) and its pro-drug DB289 (para-furamidine) were developed [357].

DB75 binds as a monomer in the minor groove at stretches of four AT base pairs. Changing one of the two phenyl rings of DB75 by a benzimidazole moiety modifies the sequence-specificity and mode of binding: such DB293 molecule (Figure 9) now also binds as head-to-tail stacked dimers in the minor groove of 5'-ATGA sequence, leading to an increase in the size of minor groove [358] and was found to inhibit PIT-1 and BRN-3 transcription factors, two POU-family transcription factors [359]. If DB293 compete for PIT-1 and BRN-3 binding to their cognate sequences, IRF-1 transcription factor that also binds to a consensus site containing both an ATGA and an AT-rich site was not inhibited by DB293. Such difference was associated with the binding of DB293 as a dimer on the 5'-ATGA-3' portion on the cognate sequence of PIT-1 and BRN-3 but as a monomer on the AT-rich portion of the IRF-1 consensus site as demonstrated using DNase1-footprinting experiments. Surface plasmon resonance (SPR) confirmed sequence specificity, 2:1 drug:DNA stoichiometry and evidenced a strong cooperative dimer binding on PIT-1 and BRN-3 cognate sites but evidenced non-cooperative monomer binding on IRF-1 binding site, in agreement with AT-rich, but not 5'-ATGA-3', recognition in the context of IRF-1 DNA binding site.

The second compound from this series that was identified as a transcription factor inhibitor is the tetracyclic symmetrical diamidinophenyl-dithiophene DB1255 on the ETS transcription factor family member ERG (Figure 9). ERG is an oncogene that is over-expressed or translocated in cancer: ERG is indeed fused to TMPRSS2 promoter region in >50% of prostate cancer [360], to EWS in 10–15% of Ewing sarcoma [361] and to FUS/TLS or ELF4 in different subtypes of leukemia [362,363] and overexpressed in leukemia where it is associated with poor prognosis [364]. DB1255 inhibits ERG/DNA binding in ELISA-derived protein/DNA binding inhibition assays (EPDBi) and EMSA, associated with the interaction of DB1255 with the 3'-end portion of the ERG cognate sequence as identified using DNase I footprinting [365]. Indeed, DB1255 recognizes at nM range the 5'-AAGTT-3' site that is present in the ERG binding site 5'-GGAAGT-3' when followed by an additional T base (underlined, ETS-family common cognate site, in bold ERG cognate sequence). Such specificity for the addition of a thymine 3' to the ERG cognate sequence may presumably limit their inhibition efficiency on ERG protein binding to all potential ERG cognate

sequence (with a cytosine, an adenine or a guanine steigth at the 3'-end) but this offers the opportunity to modulate ERG inhibition to some ERG-driven genes, assuming that the crucial ERG-driven genes associated with cancer development are well characterize and are controlled through a ERG cognate sequence followed by a thymine in its 3'-end. DB1255 binds as a dimer in the DNA groove as evidenced using circular dichroism and SPR [366]. Modification of the global planarity of DB1255 by changing dithiophenes in difuran (DB914) or diselenophene (DB1282) rings enlarged the thickness of the molecule over the natural width of the minor groove of the DNA helix and thus abolished the DNA binding properties of such derivatives and subsequently their transcription factor inhibitory effect. Similar results were obtained when the longitudinal axis angle measured from one amidine to the other was closer or wider as such modifications was assumed to prevent proper deep binding of both two amidines groups with the minor groove of the DNA. This is achieved by changing the dithiophenes in DB1255 into a difuran (DB914), diselonephene (DB1282) or changing diphenyl in DB1255 to dibenzimidazole rings (DB1974/DB1975). Modification of dithiophene in DB1255 to dithiazole rings in DB1998 derivative (Figure 9) was the only modification in this series that did not abolish the inhibitory affect on ERG/DNA binding, but this inhibition was less efficient than using DB1255 (IC50 ≈ 1 μM) which was preferred for cellular investigations. At the cellular level, DB1255 altered ERG-controlled transcription on artificial promoter and on osteopontin promoter, an ERG-driven promoter associated with prostate cancer [367]. Finally, both DB1976, DB1977, DB2115 and DB2313 (Figure 9) evidenced PU.1/SPI1 DNA binding inhibition at 2.5–5 μM range through interaction with a DNA interaction affinity around 1–10 nM on the ERG-binding site present in the λB motif of the murine Igλ2-4 enhancer that was used as a model sequence [368,369]. PU.1 is another ETS family member, sharing with ERG the common ETS-minimal binding site 5'-GGA(A/T)-3' but having strong preference for an AT-rich track 5' to the minimal ETS binding site [370]. PU.1 is well described as an oncogene in erythroid leukemia [371] but its oncogenic role in the genesis and prognosis of acute myeloid leukemia is still controversial since the decrease of PU.1 expression as well as heterozygous deletion in patients induces AML [372,373,374]. However, decrease in PU.1 expression was associated with a decrease in AML cell proliferation and DB2313 evidenced cellular anti-proliferative activity in a human AML cell model with IC50 ≈ 20 μM. Moreover, DB2313-treated cells inoculated in mice result in a decrease in the leukemia burden compared to the one induced by untreated AML cells [369].

Other classes of molecules also bind to the minor groove and interfere with transcription factor/DNA binding. Among metal-containing DNA binders, several platinum-acridine conjugates proved to be potent minor groove binding agents together with DNA alkylation process on the N3 reactive position of adenines such as PT-ACRAMTU [PtCl(en)(ACRAMTU)](NO3)2, en = ethane-1,2-diamine, where ACRAMTU = 1-[2-(acridin-9-ylamino)ethyl]-1,3-dimethylthiourea] that evidenced TBP/DNA binding inhibition activity [375]. The lactam carboxamide derivative (Figure 9), was identified as a competitor for DNA interaction of the homeobox protein HOXA13 (IC50 of 6.5 μM), a transcription factor family that is up to know poorly targeted at the DNA binding level by DNA ligands [376]. The natural phytoestrogen tanshinone IIA (Figure 9) is an AT-rich site minor groove DNA binding compounds [377] that efficiently inhibits in vitro binding of AP-1 complex to DNA [378]. Tanshinone IIA inhibits the AP-1-driven COX2 expression in H22 cells treated at 10–25 μM concentrations [379]. Tanshinone IIA also interferes with RNA polymerase II associated with altered p53 responses and induction of apoptosis [380].
Today most developed compounds for transcription factor/DNA binding inhibition are mithramycins (MTMs). Indeed, even if their specificity for DNA sequences and their affinity to those sequences are not the best one from all minor groove binding compounds presented here, those compound and derivatives entered clinical trials. MTMs represent a family of natural antibiotics isolated from different Streptomyces species such as MTM-A (Figure 9) or synthetic derivatives MTM-SK, MTM-SDK [381] and DIG-MSK [382]. MTMs bind as dimers in the minor groove of GC-rich DNA sites [383,384].
MTMs were first as a protein/DNA inhibitor of the SP1/3 family of transcription factors [382,385] to control the expression of many genes as presented in Table 3.

Type of Protein	Gene Promoter	Tumor Model	References
Transcription factors	c-MYC	Cervix carcinoma	[386]
	FoxM1	Liver	[387]
	KLF5	Breast	[388,389]
	SNAI1	Salivary adenoid cystic carcinoma	[390]
	SP1		
Regulators of cell proliferation	CDKN1A	Liver	[391]
	Survivin	Colon	[392]
	Ki-67	-	[393]
	CRABP1	Ovary	[394]
Tumor suppressors	KCNMA1	Ovary	[394]
	p73	Lung	[395]
Apoptotic genes	XIAP	Ovary	[394]
	BAK1	Liver	[396]
Secreted factors	Collagen-alpha 1	-	[397]
	Tissue factor	-	[397]
	MUC2	Colon	[398]
	TGFBI	Lung, Breast	[399]
	ECRG4	Leukemia	[400]
Membrane associated proteins (receptors, transporters)	Androgen receptor	Prostate	[401]
	ABCG2	Lung	[402]
	FZD1	-	[403]
Metabolic enzymes	Dihydrofolate reductase	Breast	[404]
	Carbonic anhydrase IX	-	[405]
Cell differentiation	MSI2	Lung	[406]
Cell movement	KIF2C kinesin	Colon	[407]

Table 3. Examples of mithramycins deregulated genes that occurs upon inhibition of SP1 transcription factor.

Mithramycin was also evidenced as an inhibitor of the EWS-FLI1 fusion transcription factor activity but without evidencing if it comes directly from inhibition of EWS-FLI1/DNA binding or indirectly from inhibition of SP1/DNA binding [266]. Conversely, NMR evidenced a ternary complex of MTM/DNA/FLI1, where FLI1 binds in the major groove on 5'-GGAA-3' sites and MTM binds in the minor groove, either in close vicinity or on the FLI-1 binding site [408].

Because it controls genes associated with many pathways as evidenced above, the cellular consequences of MTMs treatment are also diverse and correspond to various ways to target the different hallmarks of cancer as defined by Hanahan and Weinberg [409]: anti-proliferative effect control of transcription, induction of apoptosis, control of metabolism and anti-angiogenic activity. MTMs entered into clinical trials against solid tumors or leukemias. For instance, it entered into a phase II trial in testicular tumors and showed interesting activity against embryonal carcinoma sub-type (Kennedy 1995) and more recently against refractory Ewing sarcoma [410].

Finally, chromomycin A3 (Figure 9) is another antibiotic associated with transcription factor/DNA binding inhibition. This G/C-specific minor groove binding compound inhibits EGR1, AP1, ELK-1 and, to a lesser extent, TBP [233,316].

7. Conclusions

Cancer is a consequence of multiple deregulated processes first defined as the "Hallmarks of Cancer" by Hanahan and Weinberg two decades ago, implicating six main processes, now revised more recently to ten different processes [409,411]. Because all cancer varies in tissue origin, genetic alterations or evolution, some authors proposed specific deregulations associated with those hallmarks for a defined cancer subtype as for leukemias, colon, head and neck and prostate cancers or glioblastoma [412,413,414,415,416,417]. Many transcription factors are associated with multiple of these hallmarks of cancers and are therefore defined as oncogenes (see Table 1). Among them are NFκB, P53, MYC, HIF-1, STATs, GLI1, ERG, RUNX1, FOXO, HOXs and NRF2 [418,419,420,421,422,423,424,425,426,427], all transcription factors against which inhibitors are developed as presented along this manuscript. For a long time, transcription factors (other than nuclear receptors for which derivatives of natural ligands have be developped) were considered as undruggable targets and indirect strategies were developed in parallel to their association to cancer processes such as the epigenetic control of their expression. Knowing more precisely the mechanism of action of each transcription factor in interaction with its cognate DNA sequence or protein partners opened new opportunities to develop therapeutic approaches such as protein/protein interaction inhibitors, sequence-specific DNA ligands and more recently pocket-binding ligands evaluated in the dynamic of transcription factor/DNA or protein interaction.

Among the various strategies presented in this review (change in transcription factor expression level, stabilization/degradation modification, modulation of transcription factor/protein or transcription factor/DNA interactions or direct binding to transcription factor), all present advantages and disadvantages that are moreover to see in light of the nature and function of each transcription factor.

About the nature of the target transcription factor, the reactivation of mutated p53 is an interesting model to highlight how the complexity of cancer biology interferes with drug discovery. Indeed, mut-p53 cannot be considered as a unique entity since many different point mutations (single or multiple) affect this transcription factor function leading to cancer. As a matter of fact, hotspot and minor mutations could occur in the DNA binding domain of mut-p53 protein affecting only its conformation (for instance R175H, G245, R249S and G215D) or together with p53 interaction with DNA (such as R248Q,

R273H, R248W, R273C and R282W) [428]. Mut-p53 reactivating drugs such as CP-31398, RITA, STIMA-1 or PRIMA-1 differently interact with the different mut-p53 proteins: CP-31398 stabilizes and changes the conformation of R273H but also R249S mut-p53 proteins; RITA-1 is active on R273H, R175H, R248W and R280K mut-p53 whereas PRIMA-1 and STIMA-1 binds only to R273H and R175H mutants [429]. Consequently, the use of such reactivating drugs would be deeply dependent on a fine characterization of p53 mutation for each patient and so would be a nice model for potential personalized medicine.

Furthermore, transcription factors activate or repress wide repertories of downstream target genes which differ depending on cancerous or normal cell type. Identifying an oncogenic signature from normal function repertories of genes driven by this transcription factor is not always easy due to some redundancy and the difficulty to establish the threshold of expression associated with the oncogenic process.

Moreover, for DNA ligands, DNA recognition context is important as illustrated with DB1255. Indeed, DB1255 recognizes only the ERG binding site 5'-GGAAGT-3' followed by an additional T base (underlined, ETS-family common cognate site, in bold ERG cognate sequence), corresponding statistically to ¼ of the total of ERG cognate sequence on the genome. Such specificity may be limitated (considering that only a potion of ERG-driven genes could be deregulated) or may offer the opportunity to modulate more precisely ERG-driven genes assuming that they are associated with the oncogenic process. Identifying such set of deregulated genes depending not only from the presence of an ERG cognate sequence but also of the surrounding bases through bioinformatics tools would be helpful for future development of such type of compound.

In a general manner, a better knowledge of the precise modalities of transcription factor/DNA or co-factor binding would take benefit of global analysis using high throughout analysis and next-generation sequencing (transcriptome, RNase-seq, ChIP-seq, DNase-Seq, ATAC-seq, SELEX-seq and ChIA-Pet, methylome and exosome analyses, etc.) of these transcription factors and of their different co-factors in the context of each tumor cell type, particularly from comparison with normal cell context and would be helpful for future design of transcription factor inhibitors.

Futhermore, transcription factors could interact with some epigenetic modifiers and their cooperation regulates gene expression pathways that are responsible for the cellular oncogenic phenotype [430]. A better knowledge of the setting up distorsion of transcription factors and the epigenome installed in diseases will offer hope to develop new opportunities. With this goal, we can notice the important clinical use of epigenetic therapies, either alone or in combinaison therapies for cancer treatment [431].

Moreover, the development of specific transcription factor inhibitors against cancer would have to take into account compensation phenomena between different transcription factors that may be very close to each other in the same family.

Finally, the dynamics of transcription factor/DNA or co-factor interaction process have to be further elucidated to open new opportunities to develop inhibitors that would block transcription factor 3D orientation in an active or an inactive structure.

Altogether, if the inhibition of transcription factor to treat cancer is already a part of the current anti-tumor pharmacopoeia, it would surely be improved in the future and opened to other pathologies such as genetic or inflammatory diseases, diabetes, Parkinson and Alzheimer diseases.

Funding

This research was funded by the Ligue contre le Cancer-Septentrion (Comité du Nord, Comité du Pas-de-Calais), the Association Laurette Fugain (ALF-2016/05), the Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC-SFI20111203669), the FEDER-Région Nord-Pas-de-Calais, the SIRIC ONCOLille (Axis-1 Tumor Dormancy) and the Institut pour la Recherche sur le Cancer de Lille (IRCL).

Acknowledgments

M.-H.D.-C. is grateful to the Ligue contre le Cancer-Septentrion (Comité du Nord, Comité du Pas-de-Calais), the Association Laurette Fugain (ALF-2016/05), the Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC-SFI20111203669), the FEDER-Région Nord-Pas-de-Calais, the SIRIC ONCOLille (Axis-1 Tumor Dormancy) and the Institut pour la Recherche sur le Cancer de Lille (IRCL) for grants. M.L. thanks the University of Lille, the French Research Ministry and the Société Française d'Hématologie (SFH) for PhD fellowship. S.J. thanks the ARC for Ph.D. fellowship.

Conflicts of Interest

The authors declare no conflict of interest.

References

1. Badis, G.; Berger, M.F.; Philippakis, A.A.; Talukder, S.; Gehrke, A.R.; Jaeger, S.A.; Chan, E.T.; Metzler, G.; Vedenko, A.; Chen, X.; et al. Diversity and complexity in DNA recognition by transcription factors. Science 2009, 324, 1720–1723. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
2. Bernstein, D.A. Identification of Small Molecules That Disrupt SSB-Protein Interactions Using a High-Throughput Screen. Methods Mol. Biol. 2012, 922, 183–191. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
3. Vaquerizas, J.M.; Kummerfeld, S.K.; Teichmann, S.A.; Luscombe, N.M. A census of human transcription factors: Function, expression and evolution. Nat. Rev. Genet. 2009, 10, 252–263. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
4. An, O.; Dall'Olio, G.M.; Mourikis, T.P.; Ciccarelli, F.D. NCG 5.0: Updates of a manually curated repository of cancer genes and associated properties from cancer mutational screenings. Nucleic Acids Res. 2016, 44, D992–D999. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
5. Ravasi, T.; Suzuki, H.; Cannistraci, C.V.; Katayama, S.; Bajic, V.B.; Tan, K.; Akalin, A.; Schmeier, S.; Kanamori-Katayama, M.; Bertin, N.; et al. An Atlas of Combinatorial Transcriptional Regulation in Mouse and Man. Cell 2010, 140, 744–752. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
6. Srinivasan, M.; Lahiri, D.K. Significance of NF-κB as a pivotal therapeutic target in the neurodegenerative pathologies of Alzheimer's disease and multiple sclerosis. Expert Opin. Ther. Targets 2015, 19, 471–487. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]

7. Tiwari, P.C.; Pal, R. The potential role of neuroinflammation and transcription factors in Parkinson disease. Dialogues Clin. Neurosci. 2017, 19, 71–80. [Google Scholar] [PubMed]
8. Gomez-Pastor, R.; Burchfiel, E.T.; Thiele, D.J. Regulation of heat shock transcription factors and their roles in physiology and disease. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2017. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
9. Hwang, J.Y.; Zukin, R.S. REST, a master transcriptional regulator in neurodegenerative disease. Curr. Opin. Neurobiol. 2018, 48, 193–200. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
10. Dinkova-Kostova, A.T.; Kostov, R.V.; Kazantsev, A.G. The role of Nrf2 signaling in counteracting neurodegenerative diseases. FEBS J. 2018. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
11. Polvani, S.; Tarocchi, M.; Tempesti, S.; Bencini, L.; Galli, A. Peroxisome proliferator activated receptors at the crossroad of obesity, diabetes, and pancreatic cancer. World J. Gastroenterol. 2016, 22, 2441–2459. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
12. Lilly, A.J.; Lacaud, G.; Kouskoff, V. SOXF transcription factors in cardiovascular development. Semin. Cell Dev. Biol. 2016. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
13. Link, W.; Fernandez-Marcos, P.J. FOXO transcription factors at the interface of metabolism and cancer. Int. J. Cancer 2017, 141, 2379–2391. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
14. Schito, L.; Semenza, G.L. Hypoxia-Inducible Factors: Master Regulators of Cancer Progression. Trends Cancer 2016, 2, 758–770. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
15. Sur, I.; Taipale, J. The role of enhancers in cancer. Nat. Rev. Cancer 2016, 16, 483–493. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
16. Chen, K.S.; Lim, J.W.C.; Richards, L.J.; Bunt, J. The convergent roles of the nuclear factor I transcription factors in development and cancer. Cancer Lett. 2017, 410, 124–138. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
17. Poole, C.J.; van Riggelen, J. MYC—Master regulator of the cancer epigenome and transcriptome. Genes 2017, 8, 142. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
18. Sizemore, G.M.; Pitarresi, J.R.; Balakrishnan, S.; Ostrowski, M.C. The ETS family of oncogenic transcription factors in solid tumours. Nat. Rev. Cancer 2017, 17, 337–351. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
19. Ko, J.Y.; Oh, S.; Yoo, K.H. Functional Enhancers as Master Regulators of Tissue-Specific Gene Regulation and Cancer Development. Mol. Cells 2017, 40, 169–177. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
20. Fischer, M. Census and evaluation of p53 target genes. Oncogene 2017, 36, 3943–3956. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
21. Pires, B.R.B.; Silva, R.C.M.C.; Ferreira, G.M.; Abdelhay, E. NF-kappaB: Two sides of the same coin. Genes 2018, 9, 24. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
22. Bradner, J.E.; Hnisz, D.; Young, R.A. Transcriptional Addiction in Cancer. Cell 2017, 168, 629–643. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
23. Yan, C.; Higgins, P.J. Drugging the undruggable: Transcription therapy for cancer. Biochim. Biophys. Acta Rev. Cancer 2013, 1835, 76–85. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
24. Kawagoe, H.; Humphries, R.K.; Blair, A.; Sutherland, H.J.; Hogge, D.D. Expression of HOX genes, HOX cofactors, and MLL in phenotypically and functionally defined subpopulations of leukemic and normal human hematopoietic cells. Leukemia 1999, 13, 687–698. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
25. Ahmad, K.; Katryniok, C.; Scholz, B.; Merkens, J.; Löscher, D.; Marschalek, R.; Steinhilber, D. Inhibition of class I HDACs abrogates the dominant effect of MLL-AF4 by activation of wild-type MLL. Oncogenesis 2014, 3. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
26. Matthews, G.M.; Mehdipour, P.; Cluse, L.A.; Falkenberg, K.J.; Wang, E.; Roth, M.; Santoro, F.; Vidacs, E.; Stanley, K.; House, C.M.; et al. Functional-genetic dissection of HDAC dependencies in mouse lymphoid and myeloid malignancies. Blood 2015, 126, 2392–2403. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
27. Nguyen, A.T.; Taranova, O.; He, J.; Zhang, Y. DOT1L, the H3K79 methyltransferase, is required for MLL-AF9—Mediated leukemogenesis. Blood 2011, 117, 6912–6922. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
28. Okuda, H.; Stanojevic, B.; Kanai, A.; Kawamura, T.; Takahashi, S.; Matsui, H.; Takaori-Kondo, A.; Yokoyama, A. Cooperative gene activation by AF4 and DOT1L drives MLL-rearranged leukemia. J. Clin. Investig. 2017, 127, 1918–1931. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
29. Wood, K.; Tellier, M.; Murphy, S. DOT1L and H3K79 Methylation in Transcription and Genomic Stability. Biomolecules 2018, 8, 11. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
30. Deshpande, A.J.; Chen, L.; Fazio, M.; Sinha, A.U.; Bernt, K.M.; Banka, D.; Dias, S.; Chang, J.; Olhava, E.J.; Daigle, S.R.; et al. Leukemic transformation by the MLL-AF6 fusion oncogene requires the H3K79 methyltransferase Dot1l. Blood 2013, 121, 2533–2541. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
31. Yokoyama, A.; Cleary, M.L. Menin Critically Links MLL Proteins with LEDGF on Cancer-Associated Target Genes. Cancer Cell 2008, 14, 36–46. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
32. Thiel, A.T.; Huang, J.; Lei, M.; Hua, X. Menin as a hub controlling mixed lineage leukemia. BioEssays 2012, 34, 771–780. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
33. El Ashkar, S.; Schwaller, J.; Pieters, T.; Goossens, S.; Demeulemeester, J.; Christ, F.; Van Belle, S.; Juge, S.; Boeckx, N.; Engelman, A.; et al. LEDGF/p75 is dispensable for hematopoiesis but essential for MLL-rearranged leukemogenesis. Blood 2018, 131, 95–107. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
34. Ge, Z.; Song, E.J.; Kawasawa, Y.I.; Li, J.; Dovat, S.; Song, C.; Ge, Z.; Song, E.J.; Kawasawa, Y.I.; Li, J.; et al. WDR5 high expression and its effect on tumorigenesis in leukemia. Oncotarget 2016, 7, 37740–37754. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
35. Cheung, N.; Fung, T.K.; Zeisig, B.B.; Holmes, K.; Rane, J.K.; Mowen, K.A.; Finn, M.G.; Lenhard, B.; Chan, L.C.; So, C.W.E. Targeting Aberrant Epigenetic Networks Mediated by PRMT1 and KDM4C in Acute Myeloid Leukemia. Cancer Cell 2016, 29, 32–48. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
36. Steinhilber, D.; Marschalek, R. How to effectively treat acute leukemia patients bearing MLL-rearrangements? Biochem. Pharmacol. 2018, 147, 183–190. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
37. Fredly, H.; Gjertsen, B.T.; Bruserud, Ø. Histone deacetylase inhibition in the treatment of acute myeloid leukemia: The effects of valproic acid on leukemic cells, and the clinical and experimental evidence for combining valproic acid with other antileukemic agents. Clin. Epigenet. 2013, 5. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
38. Garcia-Manero, G.; Yang, H.; Bueso-Ramos, C.; Ferrajoli, A.; Cortes, J.; Wierda, W.G.; Faderl, S.; Koller, C.; Morris, G.; Rosner, G.; et al. Phase 1 study of the histone deacetylase inhibitor vorinostat (suberoylanilide hydroxamic acid [SAHA]) in patients with advanced leukemias and myelodysplastic syndromes. Blood 2008, 111, 1060–1066. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
39. Morabito, F.; Voso, M.T.; Hohaus, S.; Gentile, M.; Vigna, E.; Recchia, A.G.; Iovino, L.; Benedetti, E.; Lo-Coco, F.; Galimberti, S. Panobinostat for the treatment of acute myelogenous leukemia. Expert Opin. Investig. Drugs 2016, 25, 1117–1131. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]

40. Kirschbaum, M.H.; Foon, K.A.; Frankel, P.; Ruel, C.; Pulone, B.; Tuscano, J.M.; Newman, E.M. A phase 2 study of belinostat (PXD101) in patients with relapsed or refractory acute myeloid leukemia or patients over the age of 60 with newly diagnosed acute myeloid leukemia: A California Cancer Consortium Study. Leuk. Lymphoma 2014, 55, 2301–2304. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
41. Mihăilă, R.G. From a better understanding of the mechanisms of action of histone deacetylases inhibitors to the progress of the treatment of malignant lymphomas and plasma cell myeloma. Recent Pat. Anticancer Drug Discov. 2017, 12. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
42. Zhang, W.; Xia, X.; Reisenauer, M.R.; Hemenway, C.S.; Kone, B.C. Dot1a-AF9 complex mediates histone H3 Lys-79 hypermethylation and repression of ENaCα in an aldosterone-sensitive manner. J. Biol. Chem. 2006, 281, 18059–18068. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
43. Okada, Y.; Jiang, Q.; Lemieux, M.; Jeannotte, L.; Su, L.; Zhang, Y. Leukaemic transformation by CALM-AF10 involves upregulation of Hoxa5 by hDOT1L. Nat. Cell Biol. 2006, 8, 1017–1024. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
44. Mueller, D.; Bach, C.; Zeisig, D.; Garcia-Cuellar, M.P.; Monroe, S.; Sreekumar, A.; Zhou, R.; Nesvizhskii, A.; Chinnaiyan, A.; Hess, J.L.; et al. A role for the MLL fusion partner ENL in transcriptional elongation and chromatin modification. Blood 2007, 110, 4445–4454. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
45. Basavapathruni, A.; Jin, L.; Daigle, S.R.; Majer, C.R.A.; Therkelsen, C.A.; Wigle, T.J.; Kuntz, K.W.; Chesworth, R.; Pollock, R.M.; Scott, M.P.; et al. Conformational Adaptation Drives Potent, Selective and Durable Inhibition of the Human Protein Methyltransferase DOT1L. Chem. Biol. Drug Des. 2012, 80, 971–980. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
46. Yu, W.; Chory, E.J.; Wernimont, A.K.; Tempel, W.; Scopton, A.; Federation, A.; Marineau, J.J.; Qi, J.; Barsyte-Lovejoy, D.; Yi, J.; et al. Catalytic site remodelling of the DOT1L methyltransferase by selective inhibitors. Nat. Commun. 2012, 3. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
47. 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.; et al. Selective Killing of Mixed Lineage Leukemia Cells by a Potent Small-Molecule DOT1L Inhibitor. Cancer Cell 2011, 20, 53–65. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
48. Daigle, S.R.; Olhava, E.J.; Therkelsen, C.A.; Basavapathruni, A.; Jin, L.; Boriack-Sjodin, P.A.; Allain, C.J.; Klaus, C.R.; Raimondi, A.; Scott, M.P.; et al. Potent inhibition of DOT1L as treatment of MLL-fusion leukemia. Blood 2013, 122, 1017–1025. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
49. 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.; et al. Abrogation of MLL-AF10 and CALM-AF10-mediated transformation through genetic inactivation or pharmacological inhibition of the H3K79 methyltransferase Dot1l. Leukemia 2013, 27, 813–822. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
50. Rau, R.E.; Rodriguez, B.; Luo, M.; Jeong, M.; Rosen, A.; Rogers, J.H.; Campbell, C.T.; Daigle, S.R.; Deng, L.; Song, Y.; et al. DOT1L as a therapeutic target for the treatment of DNMT3A-mutant acute myeloid leukemia. Blood 2016, 128. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
51. Gao, Y.; Ge, W. The histone methyltransferase DOT1L inhibits osteoclastogenesis and protects against osteoporosis article. Cell Death Dis. 2018, 9. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
52. Zhou, H.-B.; Liu, L.; Huang, J.; Bernard, D.; Karatas, H.; Navarro, A.; Lei, M.; Wang, S. Structure-based Design of High-Affinity Macrocyclic Peptidomimetics to Block the Menin-MLL1 Protein-Protein Interaction. J. Med. Chem. 2013, 56, 1113–1123. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
53. Shi, A.; Murai, M.J.; He, S.; Lund, G.; Hartley, T.; Purohit, T.; Reddy, G.; Chruszcz, M.; Grembecka, J.; Cierpicki, T. Structural insights into inhibition of the bivalent menin-MLL interaction by small molecules in leukemia. Blood 2012, 120, 4461–4469. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
54. Borkin, D.; He, S.; Miao, H.; Kempinska, K.; Pollock, J.; Chase, J.; Purohit, T.; Malik, B.; Zhao, T.; Wang, J.; et al. Pharmacologic inhibition of the menin-MLL interaction blocks progression of MLL leukemia in vivo. Cancer Cell 2015, 27, 589–602. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
55. He, S.; Senter, T.J.; Pollock, J.; Han, C.; Upadhyay, S.K.; Purohit, T.; Gogliotti, R.D.; Lindsley, C.W.; Cierpicki, T.; Stauffer, S.R.; et al. High-affinity small-molecule inhibitors of the menin-mixed lineage leukemia (MLL) interaction closely mimic a natural protein-protein interaction. J. Med. Chem. 2014, 57, 1543–1556. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
56. Senter, T.; Gogliotti, R.D.; Han, C.; Locuson, C.W.; Morrison, R.; Daniels, J.S.; Cierpicki, T.; Grembecka, J.; Lindsley, C.W.; Stauffer, S.R. Progress towards small molecule menin-mixed lineage leukemia (MLL) interaction inhibitors with in vivo utility. Bioorgan. Med. Chem. Lett. 2015, 25, 2720–2725. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
57. Xu, S.; Aguilar, A.; Xu, T.; Zheng, K.; Huang, L.; Stuckey, J.; Chinnaswamy, K.; Bernard, D.; Fernández-Salas, E.; Liu, L.; et al. Design of the First-in-Class, Highly Potent Irreversible Inhibitor Targeting the Menin-MLL Protein–Protein Interaction. Angew. Chem. Int. Ed. 2018, 57, 1601–1605. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
58. Dafflon, C.; Craig, V.J.; Méreau, H.; Gräsel, J.; Schacher Engstler, B.; Hoffman, G.; Nigsch, F.; Gaulis, S.; Barys, L.; Ito, M.; et al. Complementary activities of DOT1L and Menin inhibitors in MLL-rearranged leukemia. Leukemia 2017, 31, 1269–1277. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
59. Flajollet, S.; Rachez, C.; Ploton, M.; Schulz, C.; Gallais, R.; Métivier, R.; Pawlak, M.; Leray, A.; Issulahi, A.A.; Héliot, L.; et al. The Elongation Complex Components BRD4 and MLLT3/AF9 Are Transcriptional Coactivators of Nuclear Retinoid Receptors. PLoS ONE 2013, 8, e64880. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
60. Carretta, M.; Brouwers-Vos, A.Z.; Bosman, M.; Horton, S.J.; Martens, J.H.A.; Vellenga, E.; Schuringa, J.J. BRD3/4 inhibition and FLT3-ligand deprivation target pathways that are essential for the survival of human MLL-AF9+ leukemic cells. PLoS ONE 2017, 12, e189102. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
61. Gilan, O.; Lam, E.Y.N.; Becher, I.; Lugo, D.; Cannizzaro, E.; Joberty, G.; Ward, A.; Wiese, M.; Fong, C.Y.; Ftouni, S.; et al. Functional interdependence of BRD4 and DOT1L in MLL leukemia. Nat. Struct. Mol. Biol. 2016, 23, 673–681. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
62. Huang, W.; Zheng, X.; Yang, Y.; Wang, X.; Shen, Z. An Overview on Small Molecule Inhibitors of BRD4. Mini Rev. Med. Chem. 2016, 16, 1403–1414. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
63. Liu, Z.; Wang, P.; Chen, H.; Wold, E.A.; Tian, B.; Brasier, A.R.; Zhou, J. Drug Discovery Targeting Bromodomain-Containing Protein 4. J. Med. Chem. 2017, 60, 4533–4558. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
64. Kharenko, O.A.; Hansen, H.C. Novel approaches to targeting BRD4. Drug Discov. Today Technol. 2017, 24, 19–24. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
65. Karatas, H.; Townsend, E.C.; Cao, F.; Chen, Y.; Bernard, D.; Liu, L.; Lei, M.; Dou, Y.; Wang, S. High-affinity, small-molecule peptidomimetic inhibitors of mll1/wdr5 protein-protein interaction. J. Am. Chem. Soc. 2013, 135, 669–682. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
66. Karatas, H.; Li, Y.; Liu, L.; Ji, J.; Lee, S.; Chen, Y.; Yang, J.; Huang, L.; Bernard, D.; Xu, J.; et al. Discovery of a Highly Potent, Cell-Permeable Macrocyclic Peptidomimetic (MM-589) Targeting the WD Repeat Domain 5 Protein (WDR5)-Mixed Lineage Leukemia (MLL) Protein-Protein Interaction. J. Med. Chem. 2017, 60, 4818–4839. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]

67. Li, D.D.; Chen, W.L.; Wang, Z.H.; Xie, Y.Y.; Xu, X.L.; Jiang, Z.Y.; Zhang, X.J.; You, Q.D.; Guo, X.K. High-affinity small molecular blockers of mixed lineage leukemia 1 (MLL1)-WDR5 interaction inhibit MLL1 complex H3K4 methyltransferase activity. Eur. J. Med. Chem. 2016, 124, 480–489. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
68. Chen, W.-L.; Li, D.-D.; Wang, Z.-H.; Xu, X.-L.; Zhang, X.-J.; Jiang, Z.-Y.; Guo, X.-K.; You, Q.-D. Design, synthesis, and initial evaluation of affinity-based small molecular probe for detection of WDR5. Bioorg. Chem. 2018, 76. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
69. Dillon, M.B.C.; Bachovchin, D.A.; Brown, S.J.; Finn, M.G.; Rosen, H.; Cravatt, B.F.; Mowen, K.A. Novel inhibitors for PRMT1 discovered by high-throughput screening using activity-based fluorescence polarization. ACS Chem. Biol. 2012, 7, 1198–1204. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
70. Jin, C.; Yang, L.; Xie, M.; Lin, C.; Merkurjev, D.; Yang, J.C.; Tanasa, B.; Oh, S.; Zhang, J.; Ohgi, K.A.; et al. Chem-seq permits identification of genomic targets of drugs against androgen receptor regulation selected by functional phenotypic screens. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2014, 111, 9235–9240. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
71. Sprüssel, A.; Schulte, J.H.; Weber, S.; Necke, M.; Händschke, K.; Thor, T.; Pajtler, K.W.; Schramm, A.; König, K.; Diehl, L.; et al. Lysine-specific demethylase 1 restricts hematopoietic progenitor proliferation and is essential for terminal differentiation. Leukemia 2012, 26, 2039–2051. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
72. Yang, L.; Liu, L.; Gao, H.; Pinnamaneni, J.P.; Sanagasetti, D.; Singh, V.P.; Wang, K.; Mathison, M.; Zhang, Q.; Chen, F.; et al. The stem cell factor SALL4 is an essential transcriptional regulator in mixed lineage leukemia-rearranged leukemogenesis. J. Hematol. Oncol. 2017, 10, 159. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
73. Goossens, S.; Peirs, S.; Van Loocke, W.; Wang, J.; Takawy, M.; Matthijssens, F.; Sonderegger, S.E.; Haigh, K.; Nguyen, T.; Vandamme, N.; et al. Oncogenic ZEB2 activation drives sensitivity toward KDM1A inhibition in T-cell acute lymphoblastic leukemia. Blood 2017, 129, 981–990. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
74. Maes, T.; Mascaró, C.; Tirapu, I.; Estiarte, A.; Ciceri, F.; Lunardi, S.; Guibourt, N.; Perdones, A.; Lufino, M.M.P.; Somervaille, T.C.P.; et al. ORY-1001, a Potent and Selective Covalent KDM1A Inhibitor, for the Treatment of Acute Leukemia. Cancer Cell 2018, 33, 495–511. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
75. Bose, P.; Konopleva, M.Y. ORY-1001: Overcoming the Differentiation Block in AML. Cancer Cell 2018, 33, 342–343. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
76. Lehnertz, B.; Pabst, C.; Su, L.; Miller, M.; Liu, F.; Yi, L.; Zhang, R.; Krosl, J.; Yung, E.; Kirschner, J.; et al. The methyltransferase G9a regulates HoxA9-dependent transcription in AML. Genes Dev. 2014, 28, 317–327. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
77. Knutson, S.K.; Wigle, T.J.; Warholic, N.M.; Sneeringer, C.J.; Allain, C.J.; Klaus, C.R.; Sacks, J.D.; Raimondi, A.; Majer, C.R.; Song, J.; et al. A selective inhibitor of EZH2 blocks H3K27 methylation and kills mutant lymphoma cells. Nat. Chem. Biol. 2012, 8, 890–896. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
78. Xu, B.; On, D.M.; Ma, A.; Parton, T.; Konze, K.D.; Pattenden, S.G.; Allison, D.F.; Cai, L.; Rockowitz, S.; Liu, S.; et al. Selective inhibition of EZH2 and EZH1 enzymatic activity by a small molecule suppresses MLL- rearranged leukemia. Blood 2015, 125, 346–357. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
79. Vaswani, R.G.; Gehling, V.S.; Dakin, L.A.; Cook, A.S.; Nasveschuk, C.G.; Duplessis, M.; Iyer, P.; Balasubramanian, S.; Zhao, F.; Good, A.C.; et al. Identification of (R)-N-((4-Methoxy-6-methyl-2-oxo-1,2-dihydropyridin-3-yl)methyl)-2-methyl-1-(1-(1-(2,2,2-trifluoroethyl)piperidin-4-yl)ethyl)-1H-indole-3-carboxamide (CPI-1205), a Potent and Selective Inhibitor of Histone Methyltransferase EZH2, Suitabl. J. Med. Chem. 2016, 59, 9928–9941. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
80. Brach, D.; Johnston-Blackwell, D.; Drew, A.; Lingaraj, T.; Motwani, V.; Warholic, N.M.; Feldman, I.; Plescia, C.; Smith, J.J.; Copeland, R.A.; et al. EZH2 inhibition by tazemetostat results in altered dependency on B-cell activation signaling in DLBCL. Mol. Cancer Ther. 2017, 16, 2586–2597. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
81. Göllner, S.; Oellerich, T.; Agrawal-Singh, S.; Schenk, T.; Klein, H.-U.; Rohde, C.; Pabst, C.; Sauer, T.; Lerdrup, M.; Tavor, S.; et al. Loss of the histone methyltransferase EZH2 induces resistance to multiple drugs in acute myeloid leukemia. Nat. Med. 2016, 23, 69–78. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
82. Gulati, N.; Béguelin, W.; Giulino-Roth, L. Enhancer of zeste homolog 2 (EZH2) inhibitors. Leuk. Lymphoma 2018, 1–12. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
83. Trop-Steinberg, S.; Azar, Y. Is Myc an Important Biomarker? Myc Expression in Immune Disorders and Cancer. Am. J. Med. Sci. 2018, 355, 67–75. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
84. Taub, R.; Kirsch, I.; Morton, C.; Lenoir, G.; Swan, D.; Tronick, S.; Aaronson, S.; Leder, P. Translocation of the c-myc gene into the immunoglobulin heavy chain locus in human Burkitt lymphoma and murine plasmacytoma cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1982, 79, 7837–7841. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
85. Chesi, M.; Bergsagel, P.L. Molecular pathogenesis of multiple myeloma: Basic and clinical updates. Int. J. Hematol. 2013, 97, 313–323. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
86. Wilson, A.; Murphy, M.J.; Oskarsson, T.; Kaloulis, K.; Bettess, M.D.; Oser, G.M.; Pasche, A.-C.; Knabenhans, C.; Macdonald, H.R.; Trumpp, A. c-Myc controls the balance between hematopoietic stem cell self-renewal and differentiation. Genes Dev. 2004, 18, 2747–2763. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
87. Fowler, T.; Ghatak, P.; Price, D.H.; Conaway, R.; Conaway, J.; Chiang, C.M.; Bradner, J.E.; Shilatifard, A.; Roy, A.L. Regulation of MYC expression and differential JQ1 sensitivity in cancer cells. PLoS ONE 2014, 9, e87003. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
88. Zuber, J.; Shi, J.; Wang, E.; Rappaport, A.R.; Herrmann, H.; Sison, E.A.; Magoon, D.; Qi, J.; Blatt, K.; Wunderlich, M.; et al. RNAi screen identifies Brd4 as a therapeutic target in acute myeloid leukaemia. Nature 2011, 478, 524–528. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
89. Loosveld, M.; Castellano, R.; Gon, S.; Goubard, A.; Crouzet, T.; Pouyet, L.; Prebet, T.; Vey, N.; Nadel, B.; Collette, Y.; et al. Therapeutic Targeting of c-Myc in T-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia (T-ALL). Oncotarget 2014, 5, 3168–3172. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
90. Nebbioso, A.; Carafa, V.; Conte, M.; Tambaro, F.P.; Ciro, A.; Martens, J.; Nees, M.; Benedetti, R.; Pallavicini, I.; Minucci, S.; et al. C-Myc modulation and acetylation is a key HDAC inhibitor target in cancer. Clin. Cancer Res. 2016, 23, 2542–2555. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
91. Mazur, P.K.; Herner, A.; Mello, S.S.; Wirth, M.; Hausmann, S.; Sánchez-Rivera, F.J.; Lofgren, S.M.; Kuschma, T.; Hahn, S.A.; Vangala, D.; et al. Combined inhibition of BET family proteins and histone deacetylases as a potential epigenetics-based therapy for pancreatic ductal adenocarcinoma. Nat. Med. 2015, 21, 1163–1171. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
92. Delehouzé, C.; Godl, K.; Loaëc, N.; Bruyère, C.; Desban, N.; Oumata, N.; Galons, H.; Roumeliotis, T.I.; Giannopoulou, E.G.; Grenet, J.; et al. CDK/CK1 inhibitors roscovitine and CR8 downregulate amplified MYCN in neuroblastoma cells. Oncogene 2014, 33, 5675–5687. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]

93. Chipumuro, E.; Marco, E.; Christensen, C.L.; Kwiatkowski, N.; Zhang, T.; Hatheway, C.M.; Abraham, B.J.; Sharma, B.; Yeung, C.; Altabef, A.; et al. CDK7 inhibition suppresses super-enhancer-linked oncogenic transcription in MYCN-driven cancer. Cell 2014, 159, 1126–1139. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
94. Christensen, C.L.; Kwiatkowski, N.; Abraham, B.J.; Carretero, J.; Al-Shahrour, F.; Zhang, T.; Chipumuro, E.; Herter-Sprie, G.S.; Akbay, E.A.; Altabef, A.; et al. Targeting Transcriptional Addictions in Small Cell Lung Cancer with a Covalent CDK7 Inhibitor. Cancer Cell 2014, 26, 909–922. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
95. Rickman, D.S.; Schulte, J.H.; Eilers, M. The expanding world of N-MYC-driven tumors. Cancer Discov. 2018, 8, 150–164. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
96. Desterro, J.M.; Rodriguez, M.S.; Hay, R.T. Regulation of transcription factors by protein degradation. Cell. Mol. Life Sci. 2000, 57, 1207–1219. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
97. Nakagawa, K.; Yokosawa, H. Degradation of transcription factor IRF-1 by the ubiquitin–proteasome pathway. Eur. J. Biochem. 2000, 267, 1680–1686. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
98. Muratani, M.; Tansey, W.P. How the ubiquitin-proteasome system controls transcription. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2003, 4, 192–201. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
99. Leung, A.; Geng, F.; Daulny, A.; Collins, G.; Guzzardo, P.; Tansey, W.P. Transcriptional control and the ubiquitin-proteasome system. Ernst Scher. Found. Symp. Proc. 2008, 75–97. [Google Scholar] [CrossRef]
100. Liu, J.; Shen, J.X.; Wen, X.F.; Guo, Y.X.; Zhang, G.J. Targeting Notch degradation system provides promise for breast cancer therapeutics. Crit. Rev. Oncol. Hematol. 2016, 104, 21–29. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
101. Walf-Vorderwülbecke, V.; Pearce, K.; Brooks, T.; Hubank, M.; van den Heuvel-Eibrink, M.M.; Zwaan, C.M.; Adams, S.; Edwards, D.; Bartram, J.; Samarasinghe, S.; et al. Targeting acute myeloid leukemia by drug-induced c-MYB degradation. Leukemia 2018, 32, 882–889. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
102. Zhou, B.; Li, H.; Xing, C.; Ye, H.; Feng, J.; Wu, J.; Lu, Z.; Fang, J.; Gao, S. Honokiol induces proteasomal degradation of AML1-ETO oncoprotein via increasing ubiquitin conjugase UbcH8 expression in leukemia. Biochem. Pharmacol. 2017, 128, 12–25. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
103. Kerres, N.; Steurer, S.; Schlager, S.; Bader, G.; Berger, H.; Caligiuri, M.; Dank, C.; Engen, J.R.; Ettmayer, P.; Fischerauer, B.; et al. Chemically Induced Degradation of the Oncogenic Transcription Factor BCL6. Cell Rep. 2017, 20, 2860–2875. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
104. Ohoka, N.; Misawa, T.; Kurihara, M.; Demizu, Y.; Naito, M. Development of a peptide-based inducer of protein degradation targeting NOTCH1. Bioorgan. Med. Chem. Lett. 2017, 27, 4985–4988. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
105. Wang, X.; Feng, S.; Fan, J.; Li, X.; Wen, Q.; Luo, N. New strategy for renal fibrosis: Targeting Smad3 proteins for ubiquitination and degradation. Biochem. Pharmacol. 2016, 116, 200–209. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
106. Galdeano, C.; Gadd, M.S.; Soares, P.; Scaffidi, S.; Van Molle, I.; Birced, I.; Hewitt, S.; Dias, D.M.; Ciulli, A. Structure-guided design and optimization of small molecules targeting the protein-protein interaction between the von hippel-lindau (VHL) E3 ubiquitin ligase and the hypoxia inducible factor (HIF) alpha subunit with in vitro nanomolar affinities. J. Med. Chem. 2014, 57, 8657–8663. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
107. Maniaci, C.; Hughes, S.J.; Testa, A.; Chen, W.; Lamont, D.J.; Rocha, S.; Alessi, D.R.; Romeo, R.; Ciulli, A. Homo-PROTACs: Bivalent small-molecule dimerizers of the VHL E3 ubiquitin ligase to induce self-degradation. Nat. Commun. 2017, 8, 830. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
108. Rayburn, E.; Zhang, R.; He, J.; Wang, H. MDM2 and human malignancies: Expression, clinical pathology, prognostic markers, and implications for chemotherapy. Curr. Cancer Drug Targets 2005, 5, 27–41. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
109. Zhou, B.P.; Liao, Y.; Xia, W.; Zou, Y.; Spohn, B.; Hung, M.C. HER-2/neu induces p53 ubiquitination via Akt-mediated MDM2 phosphorylation. Nat. Cell Biol. 2001, 3, 973–982. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
110. Lemos, A.; Leão, M.; Soares, J.; Palmeira, A.; Pinto, M.; Saraiva, L.; Sousa, M.E. Medicinal Chemistry Strategies to Disrupt the p53–MDM2/MDMX Interaction. Med. Res. Rev. 2016, 36, 789–844. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
111. Nayak, S.K.; Khatik, G.L.; Narang, R.; Monga, V.; Chopra, H.K. p53-Mdm2 interaction inhibitors as novel nongenotoxic anticancer agents. Curr. Cancer Drug Targets 2017, 17. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
112. Wang, S.; Zhao, Y.; Aguilar, A.; Bernard, D.; Yang, C.Y. Targeting the MDM2-p53 protein-protein interaction for new cancer therapy: Progress and challenges. Cold Spring Harb. Perspect. Med. 2017, 7, a026245. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
113. Wang, S.; Sun, W.; Zhao, Y.; McEachern, D.; Meaux, I.; Barrière, C.; Stuckey, J.A.; Meagher, J.L.; Bai, L.; Liu, L.; et al. SAR405838: An optimized inhibitor of MDM2-p53 interaction that induces complete and durable tumor regression. Cancer Res. 2014, 74, 5855–5865. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
114. Lu, J.; McEachern, D.; Li, S.; Ellis, M.J.; Wang, S. Reactivation of p53 by MDM2 Inhibitor MI-77301 for the Treatment of Endocrine-Resistant Breast Cancer. Mol. Cancer Ther. 2016, 15, 2887–2893. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
115. Gupta, A.K.; Bharadwaj, M.; Kumar, A.; Mehrotra, R. Spiro-oxindoles as a Promising Class of Small Molecule Inhibitors of p53–MDM2 Interaction Useful in Targeted Cancer Therapy. Top. Curr. Chem. 2017, 375. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
116. Ding, Q.; Zhang, Z.; Liu, J.J.; Jiang, N.; Zhang, J.; Ross, T.M.; Chu, X.J.; Bartkovitz, D.; Podlaski, F.; Janson, C.; et al. Discovery of RG7388, a potent and selective p53-MDM2 inhibitor in clinical development. J. Med. Chem. 2013, 56, 5979–5983. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
117. Bernard, D.; Zhao, Y.; Wang, S. AM-8553: A novel MDM2 inhibitor with a promising outlook for potential clinical development. J. Med. Chem. 2012, 55, 4934–4935. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
118. Rew, Y.; Sun, D. Discovery of a small molecule MDM2 inhibitor (AMG 232) for treating cancer. J. Med. Chem. 2014, 57, 6332–6341. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
119. Gonzalez, A.Z.; Eksterowicz, J.; Bartberger, M.D.; Beck, H.P.; Canon, J.; Chen, A.; Chow, D.; Duquette, J.; Fox, B.M.; Fu, J.; et al. Selective and potent morpholinone inhibitors of the MDM2-p53 protein-protein interaction. J. Med. Chem. 2014, 57, 2472–2488. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
120. Zhang, Z.; Ding, Q.; Liu, J.J.; Zhang, J.; Jiang, N.; Chu, X.J.; Bartkovitz, D.; Luk, K.C.; Janson, C.; Tovar, C.; et al. Discovery of potent and selective spiroindolinone MDM2 inhibitor, RO8994, for cancer therapy. Bioorgan. Med. Chem. 2014, 22, 4001–4009. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
121. Dos-Santos, O.; Lagarde, P.; Pérot, G.; Chibon, F.; Ratet, N.; Flamand, O.; Debussche, L. Human Dedifferentiated Liposarcomas Growth Inhibition by SAR299155, a Potent and Selective Disruptor of the MDM2-p53 Interaction. Eur. J. Cancer 2012, 48, S245–S246. [Google Scholar] [CrossRef]
122. Soares, J.; Espadinha, M.; Raimundo, L.; Ramos, H.; Gomes, A.S.; Gomes, S.; Loureiro, J.B.; Inga, A.; Reis, F.; Gomes, C.; et al. DIMP53-1: A novel small-molecule dual inhibitor of p53-MDM2/X interactions with multifunctional p53-dependent anticancer properties. Mol. Oncol. 2017, 11, 612–627. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]

123. Pazgier, M.; Liu, M.; Zou, G.; Yuan, W.; Li, C.; Li, C.; Li, J.; Monbo, J.; Zella, D.; Tarasov, S.G.; et al. Structural basis for high-affinity peptide inhibition of p53 interactions with MDM2 and MDMX. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2009, 106, 4665–4670. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
124. Lao, B.B.; Drew, K.; Guarracino, D.A.; Brewer, T.F.; Heindel, D.W.; Bonneau, R.; Arora, P.S. Rational design of topographical helix mimics as potent inhibitors of protein-protein interactions. J. Am. Chem. Soc. 2014, 136, 7877–7888. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
125. Wójcik, P.; Berlicki, Ł. Peptide-based inhibitors of protein-protein interactions. Bioorgan. Med. Chem. Lett. 2016, 26, 707–713. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
126. Wallbrecher, R.; Chène, P.; Ruetz, S.; Stachyra, T.; Vorherr, T.; Brock, R. A critical assessment of the synthesis and biological activity of p53/human double minute 2-stapled peptide inhibitors. Br. J. Pharmacol. 2017, 174, 2613–2622. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
127. Sajadimajd, S.; Khazaei, M. Oxidative Stress and Cancer: The role of Nrf2. Curr. Cancer Drug Targets 2017, 17. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
128. Leinonen, H.M.; Kansanen, E.; Pölönen, P.; Heinäniemi, M.; Levonen, A.L. Role of the keap1-Nrf2 pathway in cancer. Adv. Cancer Res. 2014, 122, 281–320. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
129. Watai, Y.; Kobayashi, A.; Nagase, H.; Mizukami, M.; Mcevoy, J.; Singer, J.D.; Itoh, K.; Yamamoto, M. Subcellular localization and cytoplasmic complex status of endogenous Keap1. Genes Cells 2007, 12, 1163–1178. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
130. Baird, L.; Lleres, D.; Swift, S.; Dinkova-Kostova, A.T. Regulatory flexibility in the Nrf2-mediated stress response is conferred by conformational cycling of the Keap1-Nrf2 protein complex. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2013, 110, 15259–15264. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
131. Jiang, Z.Y.; Lu, M.C.; Xu, L.L.; Yang, T.T.; Xi, M.Y.; Xu, X.L.; Guo, X.K.; Zhang, X.J.; You, Q.D.; Sun, H.P. Discovery of potent Keap1-Nrf2 protein-protein interaction inhibitor based on molecular binding determinants analysis. J. Med. Chem. 2014, 57, 2736–2745. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
132. Yasuda, D.; Nakajima, M.; Yuasa, A.; Obata, R.; Takahashi, K.; Ohe, T.; Ichimura, Y.; Komatsu, M.; Yamamoto, M.; Imamura, R.; et al. Synthesis of Keap1-phosphorylated p62 and Keap1-Nrf2 protein-protein interaction inhibitors and their inhibitory activity. Bioorgan. Med. Chem. Lett. 2016, 26, 5956–5959. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
133. Yasuda, D.; Yuasa, A.; Obata, R.; Nakajima, M.; Takahashi, K.; Ohe, T.; Ichimura, Y.; Komatsu, M.; Yamamoto, M.; Imamura, R.; et al. Discovery of benzo[g]indoles as a novel class of non-covalent Keap1-Nrf2 protein-protein interaction inhibitor. Bioorg. Med. Chem. Lett. 2017, 27, 5006–5009. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
134. Meng, N.; Tang, H.; Zhang, H.; Jiang, C.; Su, L.; Min, X.; Zhang, W.; Zhang, H.; Miao, Z.; Zhang, W.; et al. Fragment-growing guided design of Keap1-Nrf2 protein-protein interaction inhibitors for targeting myocarditis. Free Radic. Biol. Med. 2018, 117, 228–237. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
135. Lu, M.C.; Jiao, Q.; Liu, T.; Tan, S.J.; Zhou, H.S.; You, Q.D.; Jiang, Z.Y. Discovery of a head-to-tail cyclic peptide as the Keap1-Nrf2 protein-protein interaction inhibitor with high cell potency. Eur. J. Med. Chem. 2018, 143, 1578–1589. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
136. Gorczynski, M.J.; Grembecka, J.; Zhou, Y.; Kong, Y.; Roudaia, L.; Douvas, M.G.; Newman, M.; Bielnicka, I.; Baber, G.; Corpora, T.; et al. Allosteric Inhibition of the Protein-Protein Interaction between the Leukemia-Associated Proteins Runx1 and CBFβ. Chem. Biol. 2007, 14, 1186–1197. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
137. Cunningham, L.; Finckbeiner, S.; Hyde, R.K.; Southall, N.; Marugan, J.; Yedavalli, V.R.K.; Dehdashti, S.J.; Reinhold, W.C.; Alemu, L.; Zhao, L.; et al. Identification of benzodiazepine Ro5-3335 as an inhibitor of CBF leukemia through quantitative high throughput screen against RUNX1-CBF interaction. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2012, 109, 14592–14597. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
138. Illendula, A.; Pulikkan, J.A.; Zong, H.; Grembecka, J.; Xue, L.; Sen, S.; Zhou, Y.; Boulton, A.; Kuntimaddi, A.; Gao, Y.; et al. A small-molecule inhibitor of the aberrant transcription factor CBFβ-SMMHC delays leukemia in mice. Science 2015, 347, 779–784. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
139. Erkizan, H.V.; Kong, Y.; Merchant, M.; Schlottmann, S.; Barber-Rotenberg, J.S.; Yuan, L.; Abaan, O.D.; Chou, T.H.; Dakshanamurthy, S.; Brown, M.L.; et al. A small molecule blocking oncogenic protein EWS-FLI1 interaction with RNA helicase A inhibits growth of Ewing's sarcoma. Nat. Med. 2009, 15, 750–756. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
140. Hong, S.-H.; Youbi, S.E.; Hong, S.P.; Kallakury, B.; Monroe, P.; Erkizan, H.V.; Barber-Rotenberg, J.S.; Houghton, P.; Üren, A.; Toretsky, J.A. Pharmacokinetic modeling optimizes inhibition of the "undruggable" EWS-FLI1 transcription factor in Ewing Sarcoma. Oncotarget 2014, 5, 338–350. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
141. 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.; et al. Single enantiomer of YK-4-279 demonstrates specificity in targeting the oncogene EWS-FLI1. Oncotarget 2012, 3, 172–182. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
142. Minas, T.Z.; Han, J.; Javaheri, T.; Hong, S.-H.; Schlederer, M.; Saygideger-Kont, Y.; Celik, H.; Mueller, K.M.; Temel, I.; Ozdemirli, M.; et al. YK-4-279 effectively antagonizes EWS-FLI1 induced leukemia in a transgenic mouse model. Oncotarget 2015, 6, 37678–37694. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
143. Sun, W.; Rojas, Y.; Wang, H.; Yu, Y.; Wang, Y.; Chen, Z.; Rajapakshe, K.; Xu, X.; Huang, W.; Agarwal, S.; et al. EWS-FLI1 and RNA helicase A interaction inhibitor YK-4-279 inhibits growth of neuroblastoma. Oncotarget 2017, 8, 94780–94792. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
144. Rahim, S.; Beauchamp, E.M.; Kong, Y.; Brown, M.L.; Toretsky, J.A.; Üren, A. YK-4-279 inhibits ERG and ETV1 mediated prostate cancer cell invasion. PLoS ONE 2011, 6, e19343. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
145. Winters, B.; Brown, L.; Coleman, I.; Nguyen, H.; Minas, T.Z.; Kollath, L.; Vasioukhin, V.; Nelson, P.; Corey, E.; Üren, A.; et al. Inhibition of ERG Activity in Patient-derived Prostate Cancer Xenografts by YK-4-279. Anticancer Res. 2017, 37, 3385–3396. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
146. Siddiquee, K.A.Z.; Gunning, P.T.; Glen, M.; Katt, W.P.; Zhang, S.; Schroeck, C.; Sebti, S.M.; Jove, R.; Hamilton, A.D.; Turkson, J. An oxazole-based small-molecule Stat3 inhibitor modulates Stat3 stability and processing and induces antitumor cell effects. ACS Chem. Biol. 2007, 2, 787–798. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
147. Liu, Y.; Liu, A.; Xu, Z.; Yu, W.; Wang, H.; Li, C.; Lin, J. XZH-5 inhibits STAT3 phosphorylation and causes apoptosis in human hepatocellular carcinoma cells. Apoptosis 2011, 16, 502–510. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
148. Daka, P.; Liu, A.; Karunaratne, C.; Csatary, E.; Williams, C.; Xiao, H.; Lin, J.; Xu, Z.; Page, R.C.; Wang, H. Design, synthesis and evaluation of XZH-5 analogues as STAT3 inhibitors. Bioorgan. Med. Chem. 2015, 23, 1348–1355. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
149. Fossey, S.L.; Bear, M.D.; Lin, J.; Li, C.; Schwartz, E.B.; Li, P.K.; Fuchs, J.R.; Fenger, J.; Kisseberth, W.C.; London, C.A. The novel curcumin analog FLLL32 decreases STAT3 DNA binding activity and expression, and induces apoptosis in osteosarcoma cell lines. BMC Cancer 2011, 11, 112. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
150. Zuo, M.; Li, C.; Lin, J.; Javle, M. LLL12, a novel small inhibitor targeting STAT3 for hepatocellular carcinoma therapy. Oncotarget 2015, 6, 10940–10949. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]

151. Brambilla, L.; Genini, D.; Laurini, E.; Merulla, J.; Perez, L.; Fermeglia, M.; Carbone, G.M.; Pricl, S.; Catapano, C.V. Hitting the right spot: Mechanism of action of OPB-31121, a novel and potent inhibitor of the Signal Transducer and Activator of Transcription 3 (STAT3). Mol. Oncol. 2015, 9, 1194–1206. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
152. Guo, S.; Luo, W.; Liu, L.; Pang, X.; Zhu, H.; Liu, A.; Lu, J.; Ma, D.L.; Leung, C.H.; Wang, Y.; et al. Isocryptotanshinone, a STAT3 inhibitor, induces apoptosis and pro-death autophagy in A549 lung cancer cells. J. Drug Target. 2016, 24, 934–942. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
153. Pallandre, J.R.; Borg, C.; Rognan, D.; Boibessot, T.; Luzet, V.; Yesylevskyy, S.; Ramseyer, C.; Pudlo, M. Novel aminotetrazole derivatives as selective STAT3 non-peptide inhibitors. Eur. J. Med. Chem. 2015, 103, 163–174. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
154. Ji, P.; Xu, X.; Ma, S.; Fan, J.; Zhou, Q.; Mao, X.; Qiao, C. Novel 2-Carbonylbenzo[b]thiophene 1,1-Dioxide Derivatives as Potent Inhibitors of STAT3 Signaling Pathway. ACS Med. Chem. Lett. 2015, 6, 1010–1014. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
155. Ji, P.; Yuan, C.; Ma, S.; Fan, J.; Fu, W.; Qiao, C. 4-Carbonyl-2,6-dibenzylidenecyclohexanone derivatives as small molecule inhibitors of STAT3 signaling pathway. Bioorgan. Med. Chem. 2016, 24, 6174–6182. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
156. Zhang, W.; Ma, T.; Li, S.; Yang, Y.; Guo, J.; Yu, W.; Kong, L. Antagonizing STAT3 activation with benzo[b]thiophene 1, 1-dioxide based small molecules. Eur. J. Med. Chem. 2017, 125, 538–550. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
157. Yu, X.; He, L.; Cao, P.; Yu, Q. Eriocalyxin B inhibits STAT3 signaling by covalently targeting STAT3 and blocking phosphorylation and activation of STAT3. PLoS ONE 2015, 10, e128406. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
158. Don-Doncow, N.; Escobar, Z.; Johansson, M.; Kjellström, S.; Garcia, V.; Munoz, E.; Sterner, O.; Bjartell, A.; Hellsten, R. Galiellalactone is a direct inhibitor of the transcription factor STAT3 in prostate cancer cells. J. Biol. Chem. 2014, 289, 15969–15978. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
159. Canesin, G.; Evans-Axelsson, S.; Hellsten, R.; Sterner, O.; Krzyzanowska, A.; Andersson, T.; Bjartell, A. The STAT3 Inhibitor Galiellalactone Effectively Reduces Tumor Growth and Metastatic Spread in an Orthotopic Xenograft Mouse Model of Prostate Cancer. Eur. Urol. 2016, 69, 400–404. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
160. Kim, H.S.; Kim, T.; Ko, H.; Lee, J.; Kim, Y.S.; Suh, Y.G. Identification of galiellalactone-based novel STAT3-selective inhibitors with cytotoxic activities against triple-negative breast cancer cell lines. Bioorgan. Med. Chem. 2017, 25, 5032–5040. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
161. Escobar, Z.; Bjartell, A.; Canesin, G.; Evans-Axelsson, S.; Sterner, O.; Hellsten, R.; Johansson, M.H. Preclinical Characterization of 3β-(N-Acetyl l-cysteine methyl ester)-2aβ,3-dihydrogaliellalactone (GPA512), a Prodrug of a Direct STAT3 Inhibitor for the Treatment of Prostate Cancer. J. Med. Chem. 2016, 59, 4551–4562. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
162. Fletcher, S.; Prochownik, E.V. Small-molecule inhibitors of the Myc oncoprotein. Biochim. Biophys. Acta 2015, 1849, 525–543. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
163. Whitfield, J.R.; Beaulieu, M.-E.; Soucek, L. Strategies to Inhibit Myc and Their Clinical Applicability. Front. Cell Dev. Biol. 2017, 5, 10. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
164. Bouhlel, M.A.; Lambert, M.; David-Cordonnier, M.-H. Targeting transcription factor binding to DNA by competition using DNA binders as an approach for controlling gene expression. Curr. Top. Med. Chem. 2015, 15, 1323–1358. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
165. Kerckaert, J.P.; Deweindt, C.; Tilly, H.; Quief, S.; Lecocq, G.; Bastard, C. LAZ3, a novel zinc-finger encoding gene, is disrupted by recurring chromosome 3q27 translocations in human lymphomas. Nat. Genet. 1993, 5, 66–70. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
166. Schmitz, R.; Wright, G.W.; Huang, D.W.; Johnson, C.A.; Phelan, J.D.; Wang, J.Q.; Roulland, S.; Kasbekar, M.; Young, R.M.; Shaffer, A.L.; et al. Genetics and Pathogenesis of Diffuse Large B-Cell Lymphoma. N. Engl. J. Med. 2018, 378, 1396–1407. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
167. Xu, L.; Chen, Y.; Dutra-Clarke, M.; Mayakonda, A.; Hazawa, M.; Savinoff, S.E.; Doan, N.; Said, J.W.; Yong, W.H.; Watkins, A.; et al. BCL6 promotes glioma and serves as a therapeutic target. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2017, 114, 3981–3986. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
168. Polo, J.M.; Dell'Oso, T.; Ranuncolo, S.M.; Cerchietti, L.; Beck, D.; Da Silva, G.F.; Prive, G.G.; Licht, J.D.; Melnick, A. Specific peptide interference reveals BCL6 transcriptional and oncogenic mechanisms in B-cell lymphoma cells. Nat. Med. 2004, 10, 1329–1335. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
169. Cerchietti, L.C.; Yang, S.N.; Shaknovich, R.; Hatzi, K.; Polo, J.M.; Chadburn, A.; Dowdy, S.F.; Melnick, A. A peptomimetic inhibitor of BCL6 with potent antilymphoma effects in vitro and in vivo. Blood 2009, 113, 3397–3405. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
170. Sakamoto, K.; Sogabe, S.; Kamada, Y.; Sakai, N.; Asano, K.; Yoshimatsu, M.; Ida, K.; Imaeda, Y.; Sakamoto, J. ichi Discovery of high-affinity BCL6-binding peptide and its structure-activity relationship. Biochem. Biophys. Res. Commun. 2017, 482, 310–316. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
171. Osher, E.L.; Castillo, F.; Elumalai, N.; Waring, M.J.; Pairaudeau, G.; Tavassoli, A. A genetically selected cyclic peptide inhibitor of BCL6 homodimerization. Bioorgan. Med. Chem. 2018. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
172. Cardenas, M.G.; Yu, W.; Beguelin, W.; Teater, M.R.; Geng, H.; Goldstein, R.L.; Oswald, E.; Hatzi, K.; Yang, S.-N.; Cohen, J.; et al. Rationally designed BCL6 inhibitors target activated B cell diffuse large B cell lymphoma. J. Clin. Investig. 2016, 126, 3351–3362. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
173. Kamada, Y.; Sakai, N.; Sogabe, S.; Ida, K.; Oki, H.; Sakamoto, K.; Lane, W.; Snell, G.; Iida, M.; Imaeda, Y.; et al. Discovery of a B-Cell Lymphoma 6 Protein-Protein Interaction Inhibitor by a Biophysics-Driven Fragment-Based Approach. J. Med. Chem. 2017, 60, 4358–4368. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
174. Yasui, T.; Yamamoto, T.; Sakai, N.; Asano, K.; Takai, T.; Yoshitomi, Y.; Davis, M.; Takagi, T.; Sakamoto, K.; Sogabe, S.; et al. Discovery of a novel B-cell lymphoma 6 (BCL6)–corepressor interaction inhibitor by utilizing structure-based drug design. Bioorgan. Med. Chem. 2017, 25, 4876–4886. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
175. McCoull, W.; Abrams, R.D.; Anderson, E.; Blades, K.; Barton, P.; Box, M.; Burgess, J.; Byth, K.; Cao, Q.; Chuaqui, C.; et al. Discovery of Pyrazolo[1,5-a]pyrimidine B-Cell Lymphoma 6 (BCL6) Binders and Optimization to High Affinity Macrocyclic Inhibitors. J. Med. Chem. 2017, 60, 4386–4402. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
176. Sameshima, T.; Yamamoto, T.; Sano, O.; Sogabe, S.; Igaki, S.; Sakamoto, K.; Ida, K.; Gotou, M.; Imaeda, Y.; Sakamoto, J.; et al. Discovery of an Irreversible and Cell-Active BCL6 Inhibitor Selectively Targeting Cys53 Located at the Protein-Protein Interaction Interface. Biochemistry 2018, 57, 1369–1379. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
177. Fancher, A.T.; Hua, Y.; Camarco, D.P.; Close, D.A.; Strock, C.J.; Johnston, P.A. Reconfiguring the AR-TIF2 Protein–Protein Interaction HCS Assay in Prostate Cancer Cells and Characterizing the Hits from a LOPAC Screen. Assay Drug Dev. Technol. 2016, 14, 453–477. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
178. Viziteu, E.; Grandmougin, C.; Goldschmidt, H.; Seckinger, A.; Hose, D.; Klein, B.; Moreaux, J. Chetomin, targeting HIF-1α/p300 complex, exhibits antitumour activity in multiple myeloma. Br. J. Cancer 2016, 114, 519–523. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]

179. Morgan, R.; El-Tanani, M.; Hunter, K.D.; Harrington, K.J.; Pandha, H.S. Targeting HOX/PBX dimers in cancer. Oncotarget 2015, 8, 32322–32331. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
180. Gibault, F.; Bailly, F.; Corvaisier, M.; Coevoet, M.; Huet, G.; Melnyk, P.; Cotelle, P. Molecular Features of the YAP Inhibitor Verteporfin: Synthesis of Hexasubstituted Dipyrrins as Potential Inhibitors of YAP/TAZ, the Downstream Effectors of the Hippo Pathway. ChemMedChem 2017, 12, 954–961. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
181. De Thé, H.; Chomienne, C.; Lanotte, M.; Degos, L.; Dejean, A. The t(15;17) translocation of acute promyelocytic leukaemia fuses the retinoic acid receptor α gene to a novel transcribed locus. Nature 1990, 347, 558–561. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
182. Yoshida, H.; Kitamura, K.; Tanaka, K.; Omura, S.; Miyazaki, T.; Hachiya, T.; Ohno, R.; Naoe, T. Accelerated degradation of PML-retinoic acid receptor alpha (PML-RARA) oncoprotein by all-trans-retinoic acid in acute promyelocytic leukemia: Possible role of the proteasome pathway. Cancer Res. 1996, 56, 2945–2948. [Google Scholar] [PubMed]
183. Tang, H.; Chen, F.; Tan, Q.; Tan, S.; Liu, L.; Zhang, F. Regulation of CD11b transcription by decreasing PRC2 and increased acH4 level during ATRA-induced HL-60 differentiation. Acta Biochim. Biophys. Sin. 2009, 41, 588–593. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
184. Grimwade, D.; Mistry, A.R.; Solomon, E.; Guidez, F. Acute promyelocytic leukemia: A paradigm for differentiation therapy. Cancer Treat. Res. 2010, 145, 219–235. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
185. Li, H.; Ban, F.; Dalal, K.; Leblanc, E.; Frewin, K.; Ma, D.; Adomat, H.; Rennie, P.S.; Cherkasov, A. Discovery of small-molecule inhibitors selectively targeting the DNA-binding domain of the human androgen receptor. J. Med. Chem. 2014, 57, 6458–6467. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
186. Dalal, K.; Roshan-Moniri, M.; Sharma, A.; Li, H.; Ban, F.; Hessein, M.; Hsing, M.; Singh, K.; LeBlanc, E.; Dehm, S.; et al. Selectively targeting the DNA-binding domain of the androgen receptor as a prospective therapy for prostate cancer. J. Biol. Chem. 2014, 289, 26417–26429. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
187. Poulain, S.; Roumier, C.; Bertrand, E.; Renneville, A.; Caillault-Venet, A.; Doye, E.; Geffroy, S.; Sebda, S.; Nibourel, O.; Nudel, M.; et al. TP53 Mutation and Its Prognostic Significance in Waldenstrom's Macroglobulinemia. Clin. Cancer Res. 2017, 23, 6325–6335. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
188. Duffy, M.J.; Synnott, N.C.; Crown, J. Mutant p53 as a target for cancer treatment. Eur. J. Cancer 2017, 83, 258–265. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
189. Duffy, M.J.; Synnott, N.C.; Crown, J. Mutant p53 in breast cancer: Potential as a therapeutic target and biomarker. Breast Cancer Res. Treat. 2018, 170, 213–219. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
190. Xu, G.W.; Mawji, I.A.; Macrae, C.J.; Koch, C.A.; Datti, A.; Wrana, J.L.; Dennis, J.W.; Schimmer, A.D. A high-content chemical screen identifies ellipticine as a modulator of p53 nuclear localization. Apoptosis 2008, 13, 413–422. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
191. Zache, N.; Lambert, J.M.R.; Rökaeus, N.; Shen, J.; Hainaut, P.; Bergman, J.; Wiman, K.G.; Bykov, V.J.N. Mutant p53 targeting by the low molecular weight compound STIMA-1. Mol. Oncol. 2008, 2, 70–80. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
192. Lambert, J.M.R.; Gorzov, P.; Veprintsev, D.B.; Söderqvist, M.; Segerbäck, D.; Bergman, J.; Fersht, A.R.; Hainaut, P.; Wiman, K.G.; Bykov, V.J.N. PRIMA-1 Reactivates Mutant p53 by Covalent Binding to the Core Domain. Cancer Cell 2009, 15, 376–388. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
193. Izetti, P.; Hautefeuille, A.; Abujamra, A.L.; De Farias, C.B.; Giacomazzi, J.; Alemar, B.; Lenz, G.; Roesler, R.; Schwartsmann, G.; Osvaldt, A.B.; et al. PRIMA-1, a mutant p53 reactivator, induces apoptosis and enhances chemotherapeutic cytotoxicity in pancreatic cancer cell lines. Investig. New Drugs 2014, 32, 783–794. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
194. Zandi, R.; Selivanova, G.; Christensen, C.L.; Gerds, T.A.; Willumsen, B.M.; Poulsen, H.S. PRIMA-1Met/APR-246 induces apoptosis and tumor growth delay in small cell lung cancer expressing mutant p53. Clin. Cancer Res. 2011, 17, 2830–2841. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
195. Fransson, Å.; Glaessgen, D.; Alfredsson, J.; Wiman, K.G.; Bajalica-Lagercrantz, S.; Mohell, N. Strong synergy with APR-246 and DNA-damaging drugs in primary cancer cells from patients with TP53 mutant High-Grade Serous ovarian cancer. J. Ovarian Res. 2016, 9, 27. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
196. Deben, C.; Lardon, F.; Wouters, A.; Op de Beeck, K.; Van den Bossche, J.; Jacobs, J.; Van Der Steen, N.; Peeters, M.; Rolfo, C.; Deschoolmeester, V.; et al. APR-246 (PRIMA-1MET) strongly synergizes with AZD2281 (olaparib) induced PARP inhibition to induce apoptosis in non-small cell lung cancer cell lines. Cancer Lett. 2016, 375, 313–322. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
197. Krayem, M.; Journe, F.; Wiedig, M.; Morandini, R.; Najem, A.; Salès, F.; Van Kempen, L.C.; Sibille, C.; Awada, A.; Marine, J.C.; et al. P53 Reactivation by PRIMA-1Met(APR-246) sensitisesV600E/KBRAF melanoma to vemurafenib. Eur. J. Cancer 2016, 55, 98–110. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
198. Bauer, M.R.; Joerger, A.C.; Fersht, A.R. 2-Sulfonylpyrimidines: Mild alkylating agents with anticancer activity toward p53-compromised cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2016, 113, E5271–E5280. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
199. Synnott, N.C.; Murray, A.; McGowan, P.M.; Kiely, M.; Kiely, P.A.; O'Donovan, N.; O'Connor, D.P.; Gallagher, W.M.; Crown, J.; Duffy, M.J. Mutant p53: A novel target for the treatment of patients with triple-negative breast cancer? Int. J. Cancer 2017, 140, 234–246. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
200. Huang, W.; Dong, Z.; Wang, F.; Peng, H.; Liu, J.Y.; Zhang, J.T. A small molecule compound targeting STAT3 DNA-binding domain inhibits cancer cell proliferation, migration, and invasion. ACS Chem. Biol. 2014, 9, 1188–1196. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
201. Huang, W.; Dong, Z.; Chen, Y.; Wang, F.; Wang, C.J.; Peng, H.; He, Y.; Hangoc, G.; Pollok, K.; Sandusky, G.; et al. Small-molecule inhibitors targeting the DNA-binding domain of STAT3 suppress tumor growth, metastasis and STAT3 target gene expression in vivo. Oncogene 2015, 35, 783–792. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
202. Buettner, R.; Corzano, R.; Rashid, R.; Lin, J.; Senthil, M.; Hedvat, M.; Schroeder, A.; Mao, A.; Herrmann, A.; Yim, J.; et al. Alkylation of cysteine 468 in stat3 defines a novel site for therapeutic development. ACS Chem. Biol. 2011, 6, 432–443. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
203. Weber, A.; Borghouts, C.; Brendel, C.; Moriggl, R.; Delis, N.; Brill, B.; Vafaizadeh, V.; Groner, B. The inhibition of Stat5 by a peptide aptamer ligand specific for the DNA binding domain prevents target gene transactivation and the growth of breast and prostate tumor cells. Pharmaceuticals 2013, 6, 960–987. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
204. Weber, A.; Borghouts, C.; Brendel, C.; Moriggl, R.; Delis, N.; Brill, B.; Vafaizadeh, V.; Groner, B. Stat5 exerts distinct, vital functions in the cytoplasm and nucleus of Bcr-Abl+K562 and Jak2(V617F)+HEL leukemia cells. Cancers 2015, 7, 503–537. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
205. Agyeman, A.; Jha, B.K.; Mazumdar, T.; Houghton, J.A. Mode and specificity of binding of the small molecule GANT61 to GLI determines inhibition of GLI-DNA binding. Oncotarget 2014, 5, 4492–4503. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
206. Shahi, M.H.; Holt, R.; Rebhun, R.B. Blocking signaling at the level of GLI regulates downstream gene expression and inhibits proliferation of canine osteosarcoma cells. PLoS ONE 2014, 9, e96593. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]

207. Ghezali, L.; Liagre, B.; Limami, Y.; Beneytout, J.L.; Leger, D.Y. Sonic hedgehog activation is implicated in diosgenin-induced megakaryocytic differentiation of human erythroleukemia cells. PLoS ONE 2014, 9, e95016. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
208. Yan, R.; Peng, X.; Yuan, X.; Huang, D.; Chen, J.; Lu, Q.; Lv, N.; Luo, S. Suppression of growth and migration by blocking the Hedgehog signaling pathway in gastric cancer cells. Cell. Oncol. 2013, 36, 421–435. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
209. Matsumoto, T.; Tabata, K.; Suzuki, T. The GANT61, a GLI Inhibitor, Induces Caspase-Independent Apoptosis of SK-N-LO Cells. Biol. Pharm. Bull. 2014, 37, 633–641. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
210. Kiesslich, T.; Mayr, C.; Wachter, J.; Bach, D.; Fuereder, J.; Wagner, A.; Alinger, B.; Pichler, M.; Di Fazio, P.; Ocker, M.; et al. Activated hedgehog pathway is a potential target for pharmacological intervention in biliary tract cancer. Mol. Cell. Biochem. 2014, 396, 257–268. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
211. Huang, L.; Walter, V.; Hayes, D.N.; Onaitis, M. Hedgehog-GLI signaling inhibition suppresses tumor growth in squamous lung cancer. Clin. Cancer Res. 2014, 20, 1566–1575. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
212. Oladapo, H.O.; Tarpley, M.; Sauer, S.J.; Addo, K.A.; Ingram, S.M.; Strepay, D.; Ehe, B.K.; Chdid, L.; Trinkler, M.; Roques, J.R.; et al. Pharmacological targeting of GLI1 inhibits proliferation, tumor emboli formation and in vivo tumor growth of inflammatory breast cancer cells. Cancer Lett. 2017, 411, 136–149. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
213. Kurebayashi, J.; Koike, Y.; Ohta, Y.; Saitoh, W.; Yamashita, T.; Kanomata, N.; Moriya, T. Anti-cancer stem cell activity of a hedgehog inhibitor GANT61 in estrogen receptor-positive breast cancer cells. Cancer Sci. 2017, 108, 918–930. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
214. Yang, H.; Hu, L.; Liu, Z.; Qin, Y.; Li, R.; Zhang, G.; Zhao, B.; Bi, C.; Lei, Y.; Bai, Y. Inhibition of Gli1-mediated prostate cancer cell proliferation by inhibiting the mTOR/S6K1 signaling pathway. Oncol. Lett. 2017, 14, 7970–7976. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
215. Tong, W.; Qiu, L.; Qi, M.; Liu, J.; Hu, K.; Lin, W.; Huang, Y.; Fu, J. GANT-61 and GDC-0449 induce apoptosis of prostate cancer stem cells through a GLI-dependent mechanism. J. Cell. Biochem. 2018, 119, 3641–3652. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
216. Takahashi, R.; Yamagishi, M.; Nakano, K.; Yamochi, T.; Yamochi, T.; Fujikawa, D.; Nakashima, M.; Tanaka, Y.; Uchimaru, K.; Utsunomiya, A.; et al. Epigenetic deregulation of Ellis Van Creveld confers robust Hedgehog signaling in adult T-cell leukemia. Cancer Sci. 2014, 105, 1160–1169. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
217. Latuske, E.-M.; Stamm, H.; Klokow, M.; Vohwinkel, G.; Muschhammer, J.; Bokemeyer, C.; Jücker, M.; Kebenko, M.; Fiedler, W.; Wellbrock, J. Combined inhibition of GLI and FLT3 signaling leads to effective anti-leukemic effects in human acute myeloid leukemia. Oncotarget 2017, 8, 29187–29201. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
218. Nagao-Kitamoto, H.; Nagata, M.; Nagano, S.; Kitamoto, S.; Ishidou, Y.; Yamamoto, T.; Nakamura, S.; Tsuru, A.; Abematsu, M.; Fujimoto, Y.; et al. GLI2 is a novel therapeutic target for metastasis of osteosarcoma. Int. J. Cancer 2015, 136, 1276–1284. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
219. Chen, Q.; Xu, R.; Zeng, C.; Lu, Q.; Huang, D.; Shi, C.; Zhang, W.; Deng, L.; Yan, R.; Rao, H.; et al. Down-regulation of Gli transcription factor leads to the inhibition of migration and invasion of ovarian cancer cells via integrin β4-mediated FAK signaling. PLoS ONE 2014, 9, e88386. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
220. Gonnissen, A.; Isebaert, S.; McKee, C.M.; Dok, R.; Haustermans, K.; Muschel, R.J. The hedgehog inhibitor GANT61 sensitizes prostate cancer cells to ionizing radiation both in vitro and in vivo. Oncotarget 2016, 7, 84286–84298. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
221. Li, J.; Cai, J.; Zhao, S.; Yao, K.; Sun, Y.; Li, Y.; Chen, L.; Li, R.; Zhai, X.; Zhang, J.; et al. GANT61, a GLI inhibitor, sensitizes glioma cells to the temozolomide treatment. J. Exp. Clin. Cancer Res. 2016, 35, 184. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
222. Ishiwata, T.; Iwasawa, S.; Ebata, T.; Fan, M.; Tada, Y.; Tatsumi, K.; Takiguchi, Y. Inhibition of Gli leads to antitumor growth and enhancement of cisplatin-induced cytotoxicity in large cell neuroendocrine carcinoma of the lung. Oncol. Rep. 2018, 39, 1148–1154. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
223. Pop, M.S.; Stransky, N.; Garvie, C.W.; Theurillat, J.-P.; Hartman, E.C.; Lewis, T.A.; Zhong, C.; Culyba, E.K.; Lin, F.; Daniels, D.S.; et al. A Small Molecule That Binds and Inhibits the ETV1 Transcription Factor Oncoprotein. Mol. Cancer Ther. 2014, 13, 1492–1502. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
224. Grimley, E.; Liao, C.; Ranghini, E.J.; Nikolovska-Coleska, Z.; Dressler, G.R. Inhibition of Pax2 Transcription Activation with a Small Molecule that Targets the DNA Binding Domain. ACS Chem. Biol. 2017, 12, 724–734. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
225. Vilaboa, N.; Boré, A.; Martin-Saavedra, F.; Bayford, M.; Winfield, N.; Firth-Clark, S.; Kirton, S.B.; Voellmy, R. New inhibitor targeting human transcription factor HSF1: Effects on the heat shock response and tumor cell survival. Nucleic Acids Res. 2017, 45, 5797–5817. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
226. Tabatabaei-Dakhili, S.A.; Aguayo-Ortiz, R.; Domínguez, L.; Velázquez-Martínez, C.A. Untying the knot of transcription factor druggability: Molecular modeling study of FOXM1 inhibitors. J. Mol. Graph. Model. 2018, 80, 197–210. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
227. Gormally, M.V.; Dexheimer, T.S.; Marsico, G.; Sanders, D.A.; Lowe, C.; Matak-Vinkoviä, D.; Michael, S.; Jadhav, A.; Rai, G.; Maloney, D.J.; et al. Suppression of the FOXM1 transcriptional programme via novel small molecule inhibition. Nat. Commun. 2014, 5. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
228. Marsico, G.; Gormally, M.V. Small molecule inhibition of FOXM1: How to bring a novel compound into genomic context. Genom. Data 2015, 3, 19–23. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
229. Tanaka, N. Inhibition of transcription by Pluramycin and Bleomycin. J. Antibiot. 1970, 23, 523–530. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
230. Kim, J.L.; Nikolov, D.B.; Burley, S.K. Co-crystal structure of TBP recognizing the minor groove of a TATA element. Nature 1993, 365, 520–527. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
231. Sun, D.; Hurley, L.H. TBP binding to the TATA box induces a specific downstream unwinding site that is targeted by pluramycin. Chem. Biol. 1995, 2, 457–469. [Google Scholar] [CrossRef]
232. Hansen, M.; Yun, S.; Hurley, L. Hedamycin intercalates the DNA helix and, through carbohydrate-mediated recognition in the minor groove, directs N7-alkylation of guanine in the major groove in a sequence-specific manner. Chem. Biol. 1995, 2, 229–240. [Google Scholar] [CrossRef]
233. Chiang, S.Y.; Welch, J.; Beerman, T.A.; Rauscher, F.J. Effects of Minor Groove Binding Drugs on the Interaction of TATA Box Binding Protein and TFIIA with DNA. Biochemistry 1994, 33, 7033–7040. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
234. Cairns, M.J.; Murray, V. Detection of protein-DNA interactions at β-globin gene cluster in intact human cells utilizing hedamycin as DNA-damaging agent. DNA Cell Biol. 1998, 17, 325–333. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
235. Malinge, J.M.; Pérez, C.; Leng, M. Base sequence-independent distorsions induced by interstrand cross-links in cis-diamminedichloroplatinum (II)-modified DNA. Nucleic Acids Res. 1994, 22, 3834–3839. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
236. Bellon, S.F.; Coleman, J.H.; Lippard, S.J. DNA Unwinding Produced by Site-Specific Intrastrand Cross-Links of the Antitumor Drug cis-Diamminedichloroplatinum (II). Biochemistry 1991, 30, 8026–8035. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
237. Kasparkova, J.; Marini, V.; Bursova, V.; Brabec, V. Biophysical studies on the stability of DNA intrastrand cross-links of transplatin. Biophys. J. 2008, 95, 4361–4371. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]

238. Privalov, P.L.; Dragan, A.I.; Crane-Robinson, C.; Breslauer, K.J.; Remeta, D.P.; Minetti, C.A.S.A. What Drives Proteins into the Major or Minor Grooves of DNA? J. Mol. Biol. 2007, 365, 1–9. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
239. Nguyen, T.H.; Rossetti, G.; Arnesano, F.; Ippoliti, E.; Natile, G.; Carloni, P. Molecular recognition of platinated DNA from chromosomal HMGB1. J. Chem. Theory Comput. 2014, 10, 3578–3584. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
240. Sharma, A.; Ray, R.; Rajeswari, M.R. Overexpression of high mobility group (HMG) B1 and B2 proteins directly correlates with the progression of squamous cell carcinoma in skin. Cancer Investig. 2008, 26, 843–851. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
241. Sharma, A.; Ramanjaneyulu, A.; Ray, R.; Rajeswari, M.R. Involvement of High Mobility Group B Proteins in Cisplatin-Induced Cytotoxicity in Squamous Cell Carcinoma of Skin. DNA Cell Biol. 2009, 28, 311–318. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
242. Park, S.; Lippard, S.J. Binding Interaction of HMGB4 with Cisplatin-Modified DNA. Biochemistry 2012, 51, 6728–6737. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
243. Trimmer, E.E.; Zamble, D.B.; Lippard, S.J.; Essigmann, J.M. Human testis-determining factor SRY binds to the major DNA adduct of cisplatin and a putative target sequence with comparable affinities. Biochemistry 1998, 37, 352–362. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
244. Chválová, K.; Sari, M.A.; Bombard, S.; Kozelka, J. LEF-1 recognition of platinated GG sequences within double-stranded DNA. Influence of flanking bases. J. Inorg. Biochem. 2008, 102, 242–250. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
245. Bounaix Morand du Puch, C.; Barbier, E.; Kraut, A.; Couté, Y.; Fuchs, J.; Buhot, A.; Livache, T.; Sève, M.; Favier, A.; Douki, T.; et al. TOX4 and its binding partners recognize DNA adducts generated by platinum anticancer drugs. Arch. Biochem. Biophys. 2011, 507, 296–303. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
246. Murakami, S.; Ninomiya, W.; Sakamoto, E.; Shibata, T.; Akiyama, H.; Tashiro, F. SRY and OCT4 Are Required for the Acquisition of Cancer Stem Cell-Like Properties and Are Potential Differentiation Therapy Targets. Stem Cells 2015, 33, 2652–2663. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
247. Santiago, L.; Daniels, G.; Wang, D.; Deng, F.; Lee, P. Wnt signaling pathway protein LEF1 in cancer, as a biomarker for prognosis and a target for treatment. Am. J. Cancer Res. 2017, 7, 1389–1406. [Google Scholar] [PubMed]
248. Cohen, S.M.; Jamieson, E.R.; Lippard, S.J. Enhanced binding of the TATA-binding protein to TATA boxes containing flanking cisplatin 1,2-cross-links. Biochemistry 2000, 39, 8259–8265. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
249. Yan, D.; Aiba, I.; Chen, H.H.W.; Kuo, M.T. Effects of Cu(II) and cisplatin on the stability of Specific protein 1 (Sp1)-DNA binding: Insights into the regulation of copper homeostasis and platinum drug transport. J. Inorg. Biochem. 2016, 161, 37–39. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
250. Kasparkova, J.; Thibault, T.; Kostrhunova, H.; Stepankova, J.; Vojtiskova, M.; Muchova, T.; Midoux, P.; Malinge, J.M.; Brabec, V. Different affinity of nuclear factor-kappa B proteins to DNA modified by antitumor cisplatin and its clinically ineffective trans isomer. FEBS J. 2014, 281, 1393–1408. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
251. Kasparkova, J.; Fojta, M.; Farrell, N.; Brabec, V. Differential recognition by the tumor suppressor protein p53 of DNA modified by the novel antitumor trinuclear platinum drug BBR3464 and cisplatin. Nucleic Acids Res. 2004, 32, 5546–5552. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
252. Wetzel, C.C.; Berberich, S.J. p53 binds to cisplatin-damaged DNA. Biochim. Biophys. Acta Gene Struct. Expr. 2001, 1517, 392–397. [Google Scholar] [CrossRef]
253. Wei, Y.D.; Tepperman, K.; Huang, M.Y.; Sartor, M.A.; Puga, A. Chromium Inhibits Transcription from Polycyclic Aromatic Hydrocarbon-inducible Promoters by Blocking the Release of Histone Deacetylase and Preventing the Binding of p300 to Chromatin. J. Biol. Chem. 2004, 279, 4110–4119. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
254. VonHandorf, A.; Sánchez-Martín, F.J.; Biesiada, J.; Zhang, H.; Zhang, X.; Medvedovic, M.; Puga, A. Chromium disrupts chromatin organization and CTCF access to its cognate sites in promoters of differentially expressed genes. Epigenetics 2018, 1–13. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
255. Henderson, D.; Hurley, L.H. Specific targeting of protein-DNA complexes by DNA-reactive drugs (+)- CC-1065 and pluramycins. J. Mol. Recognit. 1996, 9, 75–87. [Google Scholar] [CrossRef]
256. Pommier, Y.; Kohlhagen, G.; Bailly, C.; Waring, M.; Mazumder, A.; Kohn, K.W. DNA sequence- and structure-selective alkylation of guanine N2 in the DNA minor groove by ecteinascidin 743, a potent antitumor compound from the caribbean tunicate Ecteinascidia turbinata. Biochemistry 1996, 35, 13303–13309. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
257. Zewail-Foote, M.; Hurley, L.H. Ecteinascidin 743: A minor groove alkylator that bends DNA toward the major groove. J. Med. Chem. 1999, 42, 2493–2497. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
258. 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.; et al. DNA and non-DNA targets in the mechanism of action of the antitumor drug trabectedin. Chem. Biol. 2005, 12, 1201–1210. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
259. Jin, S.; Gorfajn, B.; Faircloth, G.; Scotto, K.W. Ecteinascidin 743, a transcription-targeted chemotherapeutic that inhibits MDR1 activation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2000, 97, 6775–6779. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
260. Minuzzo, M.; Marchini, S.; Broggini, M.; Faircloth, G.; D'Incalci, M.; Mantovani, R. Interference of transcriptional activation by the antineoplastic drug ecteinascidin-743. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2000, 97, 6780–6784. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
261. D'Angelo, D.; Borbone, E.; Palmieri, D.; Uboldi, S.; Esposito, F.; Frapolli, R.; Pacelli, R.; D'Incalci, M.; Fusco, A. The impairment of the High Mobility Group A (HMGA) protein function contributes to the anticancer activity of trabectedin. Eur. J. Cancer 2013, 49, 1142–1151. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
262. Forni, C.; Minuzzo, M.; Virdis, E.; Tamborini, E.; Simone, M.; Tavecchio, M.; Erba, E.; Grosso, F.; Gronchi, A.; Aman, P.; et al. Trabectedin (ET-743) promotes differentiation in myxoid liposarcoma tumors. Mol. Cancer Ther. 2009, 8, 449–457. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
263. Uboldi, S.; Bernasconi, S.; Romano, M.; Marchini, S.; Fuso Nerini, I.; Damia, G.; Ganzinelli, M.; Marangon, E.; Sala, F.; Clivio, L.; et al. Characterization of a new trabectedin-resistant myxoid liposarcoma cell line that shows collateral sensitivity to methylating agents. Int. J. Cancer 2012, 131, 59–69. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
264. Di Giandomenico, S.; Frapolli, R.; Bello, E.; Uboldi, S.; Licandro, S.A.; Marchini, S.; Beltrame, L.; Brich, S.; Mauro, V.; Tamborini, E.; et al. Mode of action of trabectedin in myxoid liposarcomas. Oncogene 2013, 33, 5201–5210. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
265. Germano, G.; Frapolli, R.; Simone, M.; Tavecchio, M.; Erba, E.; Pesce, S.; Pasqualini, F.; Grosso, F.; Sanfilippo, R.; Casali, P.G.; et al. Antitumor and anti-inflammatory effects of trabectedin on human myxoid liposarcoma cells. Cancer Res. 2010, 70, 2235–2244. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
266. Grohar, P.J.; Griffin, L.B.; Yeung, C.; Chen, Q.-R.; Pommier, Y.; Khanna, C.; Khan, J.; Helman, L.J. Ecteinascidin 743 Interferes with the Activity of EWS-FLI1 in Ewing Sarcoma Cells. Neoplasia 2011, 13, 145–153. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]

267. Harlow, M.L.; Maloney, N.; Roland, J.; Guillen Navarro, M.J.; Easton, M.K.; Kitchen-Goosen, S.M.; Boguslawski, E.A.; Madaj, Z.B.; Johnson, B.K.; Bowman, M.J.; et al. Lurbinectedin inactivates the Ewing sarcoma oncoprotein EWS-FLI1 by redistributing it within the nucleus. Cancer Res. 2016, 76, 6657–6668. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
268. Uboldi, S.; Craparotta, I.; Colella, G.; Ronchetti, E.; Beltrame, L.; Vicario, S.; Marchini, S.; Panini, N.; Dagrada, G.; Bozzi, F.; et al. Mechanism of action of trabectedin in desmoplastic small round cell tumor cells. BMC Cancer 2017, 17, 107. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
269. Peixoto, P.; Bailly, C.; David-Cordonnier, M.-H. Topoisomerase I-mediated DNA relaxation as a tool to study intercalation of small molecules into supercoiled DNA. Methods Mol. Biol. 2010, 613, 235–256. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
270. Fritzsche, H.; Triebel, H.; Chaires, J.B.; Dattagupta, N.; Crothers, D.M. Studies on Interaction of Anthracycline Antibiotics and Deoxyribonucleic Acid: Geometry of Intercalation of Iremycin and Daunomycin. Biochemistry 1982, 21, 3940–3946. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
271. Tichadou, J.L.; Genest, D.; Wahl, P.; Aubel-Sadron, G. The use of fluorescence anisotropy decay of poly d(A-T) ethidium bromide complex to estimate the unwinding angle of the double helix. Biophys. Chem. 1975, 3, 142–146. [Google Scholar] [CrossRef]
272. Cons, B.M.G.; Fox, K.R. Effects of sequence selective drugs on the gel mobility of a bent DNA fragment. Biochem. Biophys. Res. Commun. 1990, 171, 1064–1070. [Google Scholar] [CrossRef]
273. Leoni, L.; Morosetti, S.; Palermo, C.; Sampaolese, B.; Savino, M. Specific interactions between DNA left-handed supercoils and actinomycin D. Biophys. Chem. 1989, 33, 11–17. [Google Scholar] [CrossRef]
274. Waring, M.J.; Wakelin, L.P.G. Echinomycin: A bifunctional intercalating antibiotic. Nature 1974, 252, 653–657. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
275. Aishima, J.; Gitti, R.K.; Noah, J.E.; Gan, H.H.; Schlick, T.; Wolberger, C. A Hoogsteen base pair embedded in undistorted B-DNA. Nucleic Acids Res. 2002, 30, 5244–5252. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
276. Xu, Y.; McSally, J.; Andricioaei, I.; Al-Hashimi, H.M. Modulation of Hoogsteen dynamics on DNA recognition. Nat. Commun. 2018, 9, 1473. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
277. Kong, D.; Park, E.J.; Stephen, A.G.; Calvani, M.; Cardellina, J.H.; Monks, A.; Fisher, R.J.; Shoemaker, R.H.; Melillo, G. Echinomycin, a small-molecule inhibitor of hypoxia-inducible factor-1 DNA-binding activity. Cancer Res. 2005, 65, 9047–9055. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
278. Regazzetti, C.; Bost, F.; Le Marchand-Brustel, Y.; Tanti, J.F.; Giorgetti-Peraldi, S. Insulin induces REDD1 expression through hypoxia-inducible factor 1 activation in adipocytes. J. Biol. Chem. 2010, 285, 5157–5164. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
279. Wang, Z.; Zhang, Z.; Wu, Y.; Chen, L.; Luo, Q.; Zhang, J.; Chen, J.; Luo, Z.; Huang, X.; Cheng, Y. Effects of echinomycin on endothelin-2 expression and ovulation in immature rats primed with gonadotropins. Exp. Mol. Med. 2012, 44, 615–621. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
280. Yu, J.; Li, J.; Zhang, S.; Xu, X.; Zheng, M.; Jiang, G.; Li, F. IGF-1 induces hypoxia-inducible factor 1α-mediated GLUT3 expression through PI3K/Akt/mTOR dependent pathways in PC12 cells. Brain Res. 2012, 1430, 18–24. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
281. Yonekura, S.; Itoh, M.; Okuhashi, Y.; Takahashi, Y.; Ono, A.; Nara, N.; Tohda, S. Effects of the HIF1 inhibitor, echinomycin, on growth and NOTCH signalling in leukaemia cells. Anticancer Res. 2013, 33, 3099–3104. [Google Scholar] [PubMed]
282. Vakili, H.; Jin, Y.; Cattini, P.A. Negative regulation of human growth hormone gene expression by insulin is dependent on hypoxia-inducible factor binding in primary non-tumor pituitary cells. J. Biol. Chem. 2012, 287, 33282–33292. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
283. Tsuzuki, T.; Okada, H.; Shindoh, H.; Shimoi, K.; Nishigaki, A.; Kanzaki, H. Effects of the hypoxia-inducible factor-1 inhibitor echinomycin on vascular endothelial growth factor production and apoptosis in human ectopic endometriotic stromal cells. Gynecol. Endocrinol. 2016, 32, 323–328. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
284. Hattori, K.; Koike, K.; Okuda, K.; Hirayama, T.; Ebihara, M.; Takenaka, M.; Nagasawa, H. Solution-phase synthesis and biological evaluation of triostin A and its analogues. Org. Biomol. Chem. 2016, 14, 2090–2111. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
285. Dai, J.; Punchihewa, C.; Mistry, P.; Ooi, A.T.; Yang, D. Novel DNA bis-intercalation by MLN944, a potent clinical bisphenazine anticancer drug. J. Biol. Chem. 2004, 279, 46096–46103. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
286. Sidell, N.; Mathad, R.I.; Shu, F.J.; Zhang, Z.; Kallen, C.B.; Yang, D. Intercalation of XR5944 with the estrogen response element is modulated by the tri-nucleotide spacer sequence between half-sites. J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 2011, 124, 121–127. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
287. Lin, C.; Mathad, R.I.; Zhang, Z.; Sidell, N.; Yang, D. Solution structure of a 2:1 complex of anticancer drug XR5944 with TFF1 estrogen response element: Insights into DNA recognition by a bis-intercalator. Nucleic Acids Res. 2014, 42, 6012–6024. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
288. Bible, K.C.; Bible, R.H.; Kottke, T.J.; Svingen, P.A.; Xu, K.; Pang, Y.; Hajdu, E.; Kaufmann, S.H. Flavopiridol Binds to Duplex DNA Flavopiridol Binds to Duplex DNA 1. Cancer Res. 2000, 60, 2419–2428. [Google Scholar] [PubMed]
289. Lee, Y.K.; Isham, C.R.; Kaufman, S.H.; Bible, K.C. Flavopiridol disrupts STAT3/DNA interactions, attenuates STAT3-directed transcription, and combines with the Jak kinase inhibitor AG490 to achieve cytotoxic synergy. Mol. Cancer Ther. 2006, 5, 138–148. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
290. Fathi, A.T.; Karp, J.E. New agents in acute myeloid leukemia: Beyond cytarabine and anthracyclines. Curr. Oncol. Rep. 2009, 11, 346–352. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
291. Talib, J.; Beck, J.L.; Urathamakul, T.; Nguyen, C.D.; Aldrich-Wright, J.R.; Mackay, J.P.; Ralph, S.F. A mass spectrometric investigation of the ability of metal complexes to modulate transcription factor activity. Chem. Commun. 2009, 5546–5548. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
292. Chakree, K.; Ovatlarnporn, C.; Dyson, P.J.; Ratanaphan, A. Altered DNA binding and amplification of human breast cancer suppressor gene BRCA1 induced by a novel antitumor compound, [Ru(η(6)-p-phenylethacrynate)Cl(2)(pta)]. Int. J. Mol. Sci. 2012, 13, 13183–13202. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
293. Welch, J.J.; Rauscher, F.J.; Beerman, T.A. Targeting DNA-binding drugs to sequence-specific transcription factor-DNA complexes. Differential effects of intercalating and minor groove binding drugs. J. Biol. Chem. 1994, 269, 31051–31058. [Google Scholar] [PubMed]
294. Liaw, Y.C.; Gao, Y.G.; Robinson, H.; van der Marel, G.A.; van Boom, J.H.; Wang, A.H.J. Antitumor Drug Nogalamycin Binds DNA in Both Grooves Simultaneously: Molecular Structure of Nogalamycin-DNA Complex. Biochemistry 1989, 28, 9913–9918. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
295. Williams, L.D.S.; Egli, M.; Gao, Q.; Rich, A. DNA intercalation: Helix unwinding and neighbor exclusion. Struct. Funct. 1992, 1, 107–125. [Google Scholar]
296. Odom, D.T.; Parker, C.S.; Barton, J.K. Site-specific inhibition of transcription factor binding to DNA by a metallointercalator. Biochemistry 1999, 38, 5155–5163. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]

297.Hélène, C. The anti-gene strategy: Control of gene expression by triplex-forming-oligonucleotides. Anticancer Drug Des. 1991, 6, 569–584. [Google Scholar] [PubMed]
298.Giovannangeli, C.; Helene, C. Triplex-forming molecules for modulation of DNA information processing. Curr. Opin. Mol. Ther. 2000, 2, 288–296. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
299.Duca, M.; Vekhoff, P.; Oussedik, K.; Halby, L.; Arimondo, P.B. The triple helix: 50 years later, the outcome. Nucleic Acids Res. 2008, 36, 5123–5138. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
300.Vijayalakshmi, R.; Kanthimathi, M.; Subramanian, V.; Nair, B.U. Interaction of DNA with [Cr(Schiff base)(H2O)2]ClO4. Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj. 2000, 1475, 157–162. [Google Scholar] [CrossRef]
301.Fu, P.K.-L.; Turro, C. Transcription inhibition by Rh(phi)2(phen)3+. Chem. Commun. 2001, 2, 279–280. [Google Scholar] [CrossRef]
302.Wang, P.; Leung, C.H.; Ma, D.L.; Sun, R.W.Y.; Yan, S.C.; Chen, Q.S.; Che, C.M. Specific blocking of CREB/DNA binding by cyclometalated platinum(II) complexes. Angew. Chem. Int. Ed. 2011, 50, 2554–2558. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
303.Wang, S.; Munde, M.; Wang, S.; Wilson, W.D. Minor groove to major groove, an unusual DNA sequence-dependent change in bend directionality by a distamycin dimer. Biochemistry 2011, 50, 7674–7683. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
304.Zimmer, C.; Reinert, K.E.; Luck, G.; Wähnert, U.; Löber, G.; Thrum, H. Interaction of the oligopeptide antibiotics netropsin and distamycin a with nucleic acids. J. Mol. Biol. 1971, 58, 329–348. [Google Scholar] [CrossRef]
305.Melnikova, A.F.; Zasedatelev, A.S.; Kolchinsky, A.M.; Gursky, G.V.; Zhuze, A.L.; Grochovsky, S.L.; Mirzabekov, A.D. Accessibility of the minor groove of DNA in chromatin to the binding of antibiotics netropsin and distamycin A. Mol. Biol. Rep. 1975, 2, 135–142. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
306.Grant, M.A.; Baron, R.M.; Macias, A.A.; Layne, M.D.; Perrella, M.A.; Rigby, A.C. Netropsin improves survival from endotoxaemia by disrupting HMGA1 binding to the NOS2 promoter. Biochem. J. 2009, 418, 103–112. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
307.Baliga, R.; Crothers, D.M. On the kinetics of distamycin binding to its target sites on duplex DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2000, 97, 7814–7818. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
308.Broggini, M.; Ponti, M.; Ottolenghi, S.; D'incalci, M.; Mongelli, N.; Mantovani, R. Distamycins inhibit the binding of OTF-1 and NFE-1 transfactors to their conserved DNA elements. Nucleic Acids Res. 1989, 17, 1051–1059. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
309.Ciucci, A.; Feriotto, G.; Mischiati, C.; Gambari, R.; Animati, F.; Lombardi, P.; Giorgio Natali, P.; Arcamone, F.; Giacomini, P. Distamycin analogues with improved sequence-specific DNA binding activities. Biochem. Pharmacol. 1994, 48, 1583–1591. [Google Scholar] [CrossRef]
310.Feriotto, G.; Ciucci, A.; Mischiati, C.; Animati, F.; Lombardi, P.; Giacomini, P.; Arcamone, F.; Gambari, R. Binding of Epstein-Barr virus nuclear antigen 1 to DNA: Inhibition by distamycin and two novel distamycin analogues. Eur. J. Pharmacol. Mol. Pharmacol. 1994, 267, 143–149. [Google Scholar] [CrossRef]
311.Chiang, S.Y.; Azizkhan, J.C.; Beerman, T.A. A comparison DNA-binding drug as inhibitors of E2F1- and Sp1-DNA complexes and associated gene expression. Biochemistry 1998, 37, 3109–3115. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
312.Massaad-Massade, L.; Navarro, S.; Krummrei, U.; Reeves, R.; Beaune, P.; Barouki, R. HMGA1 enhances the transcriptional activity and binding of the estrogen receptor to its responsive element. Biochemistry 2002, 41, 2760–2768. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
313.Baron, R.M.; Lopez-Guzman, S.; Riascos, D.F.; Macias, A.A.; Layne, M.D.; Cheng, G.; Harris, C.; Chung, S.W.; Reeves, R.; von Andrian, U.H.; et al. Distamycin A inhibits HMGA1-binding to the P-selectin promoter and attenuates lung and liver inflammation during murine endotoxemia. PLoS ONE 2010, 5. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
314.Munde, M.; Poon, G.M.K.; Wilson, W.D. Probing the electrostatics and pharmacological modulation of sequence-specific binding by the dna-binding domain of the ETS family transcription factor Pu.1: A binding affinity and kinetics investigation. J. Mol. Biol. 2013, 425, 1655–1669. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
315.Bazhulina, N.P.; Nikitin, A.M.; Rodin, S.A.; Surovaya, A.N.; Kravatsky, Y.V.; Pismensky, V.F.; Archipova, V.S.; Martin, R.; Gursky, G.V. Binding of Hoechst 33258 and its derivatives to DNA. J. Biomol. Struct. Dyn. 2009, 26, 701–718. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
316.White, C.M.; Heidenreich, O.; Nordheim, A.; Beerman, T.A. Evaluation of the effectiveness of DNA-binding drugs to inhibit transcription using the c-fos serum response element as a target. Biochemistry 2000, 39, 12262–12273. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
317.Wu, J.; Apontes, P.; Song, L.; Liang, P.; Yang, L.; Li, F. Molecular mechanism of upregulation of survivin transcription by the AT-rich DNA-binding ligand, Hoechst33342: Evidence for survivin involvement in drug resistance. Nucleic Acids Res. 2007, 35, 2390–2402. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
318.Bruice, T.C.; Sengupta, D.; Blaskó, A.; Chiang, S.Y.; Beerman, T.A. A microgonotropen branched decaaza decabutylamine and its DNA and DNA/transcription factor interactions. Bioorgan. Med. Chem. 1997, 5, 685–692. [Google Scholar] [CrossRef]
319.White, C.M.; Satz, A.L.; Gawron, L.S.; Bruice, T.C.; Beerman, T.A. Inhibiting transcription factor/DNA complexes using fluorescent microgonotropens (FMGTs). Biochim. Biophys. Acta Gene Struct. Expr. 2002, 1574, 100–108. [Google Scholar] [CrossRef]
320.Dervan, P.B.; Doss, R.M.; Marques, M. a Programmable DNA binding oligomers for control of transcription. Curr. Med. Chem. Anticancer Agents 2005, 5, 373–387. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
321.Kawamoto, Y.; Bando, T.; Sugiyama, H. Sequence-specific DNA binding Pyrrole–imidazole polyamides and their applications. Bioorgan. Med. Chem. 2018, 26, 1393–1411. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
322.Yang, F.; Nickols, N.G.; Li, B.C.; Marinov, G.K.; Said, J.W.; Dervan, P.B. Antitumor activity of a pyrrole-imidazole polyamide. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2013, 110, 1863–1868. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
323.Ehley, J.A.; Melander, C.; Herman, D.; Baird, E.E.; Ferguson, H.A.; Goodrich, J.A.; Dervan, P.B.; Gottesfeld, J.M. Promoter scanning for transcription inhibition with DNA-binding polyamides. Mol. Cell. Biol. 2002, 22, 1723–1733. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
324.Supekova, L.; Pezacki, J.P.; Su, A.I.; Loweth, C.J.; Riedl, R.; Geierstanger, B.; Schultz, P.G.; Wemmer, D.E. Genomic effects of polyamide/DNA Interactions on mRNA expression. Chem. Biol. 2002, 9, 821–827. [Google Scholar] [CrossRef]
325.Gearhart, M.D.; Dickinson, L.; Ehley, J.; Melander, C.; Dervan, P.B.; Wright, P.E.; Gottesfeld, J.M. Inhibition of DNA binding by human estrogen-related receptor 2 and estrogen receptor alpha with minor groove binding polyamides. Biochemistry 2005, 44, 4196–4203. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
326.Nickols, N.G.; Dervan, P.B. Suppression of androgen receptor-mediated gene expression by a sequence-specific DNA-binding polyamide. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2007, 104, 10418–10423. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
327.Chenoweth, D.M.; Dervan, P.B. Structural basis for cyclic Py-Im polyamide allosteric inhibition of nuclear receptor binding. J. Am. Chem. Soc. 2010, 132, 14521–14529. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
328.Fechter, E.J.; Dervan, P.B. Allosteric inhibition of protein-DNA complexes by polyamide-intercalator conjugates. J. Am. Chem. Soc. 2003, 125, 8476–8485. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
329.Bremer, R.E.; Baird, E.E.; Dervan, P.B. Inhibition of major-groove-binding proteins by pyrrole-imidazole polyamides with an Arg-Pro-Arg positive patch. Chem. Biol. 1998, 5, 119–133. [Google Scholar] [CrossRef]

330. Matsuda, H.; Fukuda, N.; Ueno, T.; Tahira, Y.; Ayame, H.; Zhang, W.; Bando, T.; Sugiyama, H.; Saito, S.; Matsumoto, K.; et al. Development of gene silencing pyrrole-imidazole polyamide targeting the TGF-β1 promoter for treatment of progressive renal diseases. J. Am. Soc. Nephrol. 2006, 17. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
331. Inami, M.; Fukushima, A.; Ueno, T.; Yamada, T.; Tsunemi, A.; Matsumoto, Y.; Fukuda, N.; Soma, M.; Moriyama, M. Reduction of Dimethylnitrosamine-Induced Liver Fibrosis by the Novel Gene Regulator PI Polyamide Targeting Transforming Growth Factor β1 Gene. Biol. Pharm. Bull. 2015, 38, 1836–1842. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
332. Ueno, T.; Fukuda, N.; Tsunemi, A.; Yao, E.H.; Matsuda, H.; Tahira, K.; Matsumoto, T.; Matsumoto, K.; Matsumoto, Y.; Nagase, H.; et al. A novel gene silencer, pyrrole-imidazole polyamide targeting human lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 gene improves endothelial cell function. J. Hypertens. 2009, 27, 508–516. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
333. Dickinson, L.A.; Trauger, J.W.; Baird, E.E.; Dervan, P.B.; Graves, B.J.; Gottesfeld, J.M. Inhibition of Ets-1 DNA binding and ternary complex formation between Ets-1, NF-κB, and DNA by a designed DNA-binding ligand. J. Biol. Chem. 1999, 274, 12765–12773. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
334. Bashkin, J.K.; Aston, K.; Ramos, J.P.; Koeller, K.J.; Nanjunda, R.; He, G.; Dupureur, C.M.; David Wilson, W. Promoter scanning of the human COX-2 gene with 8-ring polyamides: Unexpected weakening of polyamide-DNA binding and selectivity by replacing an internal N-Me-pyrrole with β-alanine. Biochimie 2013, 95, 271–279. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
335. 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.; et al. Targeting a DNA binding motif of the EVI1 protein by a pyrrole-imidazole polyamide. Biochemistry 2011, 50, 10431–10441. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
336. Syed, J.; Pandian, G.N.; Sato, S.; Taniguchi, J.; Chandran, A.; Hashiya, K.; Bando, T.; Sugiyama, H. Targeted suppression of EVI1 oncogene expression by sequence-specific Pyrrole-imidazole polyamide. Chem. Biol. 2014, 21, 1370–1380. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
337. Liu, B.; Wang, S.; Aston, K.; Koeller, K.J.; Kermani, S.F.H.; Castañeda, C.H.; Scuderi, M.J.; Luo, R.; Bashkin, J.K.; Wilson, W.D. β-Alanine and N-terminal cationic substituents affect polyamide-DNA binding. Org. Biomol. Chem. 2017, 15, 9880–9888. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
338. Gottesfeld, J.M.; Melander, C.; Suto, R.K.; Raviol, H.; Luger, K.; Dervan, P.B. Sequence-specific recognition of DNA in the nucleosome by pyrrole-imidazole polyamides. J. Mol. Biol. 2001, 309, 615–629. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
339. Neely, L.; Trauger, J.W.; Baird, E.E.; Dervan, P.B.; Gottesfeld, J.M. Importance of minor groove binding zinc fingers within the transcription factor IIIA-DNA complex. J. Mol. Biol. 1997, 274, 439–445. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
340. Nguyen-Hackley, D.H.; Ramm, E.; Taylor, C.M.; Joung, J.K.; Dervan, P.B.; Pabo, C.O. Allosteric Inhibition of Zinc-Finger Binding in the Major Groove of DNA by Minor-Groove Binding Ligands. Biochemistry 2004, 43, 3880–3890. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
341. Henry, J.A.; Le, N.M.; Nguyen, B.; Howard, C.M.; Bailey, S.L.; Horick, S.M.; Buchmueller, K.L.; Kotecha, M.; Hochhauser, D.; Hartley, J.A.; et al. Targeting the inverted CCAAT box 2 in the topoisomerase IIalpha promoter by JH-37, an imidazole-pyrrole polyamide hairpin: Design, synthesis, molecular biology, and biophysical studies. Biochemistry 2004, 43, 12249–12257. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
342. Hochhauser, D.; Kotecha, M.; O'hare, C.; Morris, P.J.; Hartley, J.A.J.M.; Taherbhai, Z.; Harris, D.; Forni, C.; Mantovani, R.; Lee, M. Modulation of topoisomerase IIalpha expression by a DNA sequence-specific polyamide. Mol. Cancer Ther. 2007, 6, 346–354. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
343. Kiakos, K.; Pett, L.; Satam, V.; Patil, P.; Hochhauser, D.; Lee, M.; Hartley, J.A. Nuclear Localization and Gene Expression Modulation by a Fluorescent Sequence-Selective p-Anisyl-benzimidazolecarboxamido Imidazole-Pyrrole Polyamide. Chem. Biol. 2015, 22, 862–875. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
344. Brucoli, F.; Hawkins, R.M.; James, C.H.; Jackson, P.J.M.; Wells, G.; Jenkins, T.C.; Ellis, T.; Kotecha, M.; Hochhauser, D.; Hartley, J.A.; et al. An extended pyrrolobenzodiazepine-polyamide conjugate with selectivity for a DNA sequence containing the ICB2 transcription factor binding site. J. Med. Chem. 2013, 56, 6339–6351. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
345. Pett, L.; Kiakos, K.; Satam, V.; Patil, P.; Laughlin-Toth, S.; Gregory, M.; Bowerman, M.; Olson, K.; Savagian, M.; Lee, M.; et al. Modulation of topoisomerase IIα expression and chemosensitivity through targeted inhibition of NF-Y:DNA binding by a diamino p-anisyl-benzimidazole (Hx) polyamide. Biochim. Biophys. Acta Gene Regul. Mech. 2017, 1860, 617–629. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
346. Raskatov, J.A.; Meier, J.L.; Puckett, J.W.; Yang, F.; Ramakrishnan, P.; Dervan, P.B. Modulation of NF-κB-dependent gene transcription using programmable DNA minor groove binders. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2012, 109, 1023–1028. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
347. Kojima, T.; Wang, X.; Fujiwara, K.; Osaka, S.; Yoshida, Y.; Osaka, E.; Taniguchi, M.; Ueno, T.; Fukuda, N.; Soma, M.; et al. Inhibition of Human Osteosarcoma Cell Migration and Invasion by a Gene Silencer, Pyrrole-Imidazole Polyamide, Targeted at the Human MMP9 NF-κB Binding Site. Biol. Pharm. Bull. 2014, 37, 1460–1465. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
348. Olenyuk, B.Z.; Zhang, G.-J.; Klco, J.M.; Nickols, N.G.; Kaelin, W.G.; Dervan, P.B. Inhibition of vascular endothelial growth factor with a sequence-specific hypoxia response element antagonist. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2004, 101, 16768–16773. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
349. Kageyama, Y.; Sugiyama, H.; Ayame, H.; Iwai, A.; Fujii, Y.; Huang, L.E.; Kizaka-Kondoh, S.; Hiraoka, M.; Kihara, K. Suppression of VEGF transcription in renal cell carcinoma cells by pyrrole-imidazole hairpin polyamides targeting the hypoxia responsive element. Acta Oncol. 2006, 45, 317–324. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
350. Szablowski, J.O.; Raskatov, J.A.; Dervan, P.B. An HRE-Binding Py-Im Polyamide Impairs Hypoxic Signaling in Tumors. Mol. Cancer Ther. 2016, 15, 608–617. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
351. Mysore, V.S.; Szablowski, J.; Dervan, P.B.; Frost, P.J. A DNA-binding Molecule Targeting the Adaptive Hypoxic Response in Multiple Myeloma Has Potent Antitumor Activity. Mol. Cancer Res. 2016, 14, 253–266. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
352. Taniguchi, M.; Fujiwara, K.; Nakai, Y.; Ozaki, T.; Koshikawa, N.; Toshio, K.; Kataba, M.; Oguni, A.; Matsuda, H.; Yoshida, Y.; et al. Inhibition of malignant phenotypes of human osteosarcoma cells by a gene silencer, a pyrrole-imidazole polyamide, which targets an E-box motif. FEBS Open Bio 2014, 4, 328–334. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
353. Mishra, R.; Watanabe, T.; Kimura, M.T.; Koshikawa, N.; Ikeda, M.; Uekusa, S.; Kawashima, H.; Wang, X.; Igarashi, J.; Choudhury, D.; et al. Identification of a novel E-box binding pyrrole-imidazole polyamide inhibiting MYC-driven cell proliferation. Cancer Sci. 2015, 106, 421–429. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
354. Obinata, D.; Takayama, K.; Fujiwara, K.; Suzuki, T.; Tsutsumi, S.; Fukuda, N.; Nagase, H.; Fujimura, T.; Urano, T.; Homma, Y.; et al. Targeting Oct1 genomic function inhibits androgen receptor signaling and castration-resistant prostate cancer growth. Oncogene 2016, 35, 6350–6358. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
355. Hayatigolkhatmi, K.; Padroni, G.; Su, W.; Fang, L.; Gómez-Castañeda, E.; Hsieh, Y.C.; Jackson, L.; Holyoake, T.L.; Pellicano, F.; Burley, G.A.; et al. Investigation of a minor groove-binding polyamide targeted to E2F1 transcription factor in chronic myeloid leukaemia (CML) cells. Blood Cells Mol. Dis. 2018, 69, 119–122. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]

356. Wilson, W.D.; Nguyen, B.; Tanious, F.A.; Mathis, A.; Hall, J.E.; Stephens, C.E.; Boykin, D.W. Dications that target the DNA minor groove: Compound design and preparation, DNA interactions, cellular distribution and biological activity. Curr. Med. Chem. Anticancer Agents 2005, 5, 389–408. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
357. Yeates, C. DB-289 Immtech International. IDrugs 2003, 6, 1086–1093. [Google Scholar] [PubMed]
358. Bailly, C.; Tardy, C.; Wang, L.; Armitage, B.; Hopkins, K.; Kumar, A.; Schuster, G.B.; Boykin, D.W.; Wilson, W.D. Recognition of ATGA sequences by the unfused aromatic dication DB293 forming stacked dimers in the DNA minor groove. Biochemistry 2001, 40, 9770–9779. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
359. Peixoto, P.; Liu, Y.; Depauw, S.; Hildebrand, M.P.; Boykin, D.W.; Bailly, C.; Wilson, W.D.; David-Cordonnier, M.-H. 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. 2008, 36, 3341–3353. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
360. Tomlins, S.A.; Rhodes, D.R.; Perner, S.; Dhanasekaran, S.M.; Mehra, R.; Sun, X.W.; Varambally, S.; Cao, X.; Tchinda, J.; Kuefer, R.; et al. Recurrent fusion of TMPRSS2 and ETS transcription factor genes in prostate cancer. Science 2005, 310, 644–648. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
361. Sorensen, P.H.B.; Lessnick, S.L.; Lopez-Terrada, D.; Liu, X.F.; Triche, T.J.; Denny, C.T. A second ewing's sarcoma translocation, t(21;22), fuses the EWS gene to another ETS-family transcription factor, ERG. Nat. Genet. 1994, 6, 146–151. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
362. Shimizu, K.; Ichikawa, H.; Tojo, A.; Kaneko, Y.; Maseki, N.; Hayashi, Y.; Ohira, M.; Asano, S.; Ohki, M. An ets-related gene, ERG, is rearranged in human myeloid leukemia with t(16;21) chromosomal translocation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1993, 90, 10280–10284. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
363. Moore, S.D.P.; Offor, O.; Ferry, J.A.; Amrein, P.C.; Morton, C.C.; Dal Cin, P. ELF4 is fused to ERG in a case of acute myeloid leukemia with a t(X;21)(q25-26;q22). Leuk. Res. 2006, 30, 1037–1042. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
364. Marcucci, G.; Baldus, C.D.; Ruppert, A.S.; Radmacher, M.D.; Mrózek, K.; Whitman, S.P.; Kolitz, J.E.; Edwards, C.G.; Vardiman, J.W.; Powell, B.L.; et al. 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. 2005, 23, 9234–9242. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
365. Nhili, R.; Peixoto, P.; Depauw, S.; Flajollet, S.; Dezitter, X.; Munde, M.M.; Ismail, M.A.; Kumar, A.; Farahat, A.A.; Stephens, C.E.; et al. Targeting the DNA-binding activity of the human ERG transcription factor using new heterocyclic dithiophene diamidines. Nucleic Acids Res. 2013, 41, 125–138. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
366. Munde, M.; Kumar, A.; Peixoto, P.; Depauw, S.; Ismail, M.A.; Farahat, A.A.; Paul, A.; Say, M.V.; David-Cordonnier, M.-H.; Boykin, D.W.; et al. The unusual monomer recognition of guanine-containing mixed sequence DNA by a dithiophene heterocyclic diamidine. Biochemistry 2014, 53, 1218–1227. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
367. Flajollet, S.; Tian, T.V.; Flourens, A.; Tomavo, N.; Villers, A.; Bonnelye, E.; Aubert, S.; Leroy, X.; Duterque-Coquillaud, M. Abnormal Expression of the ERG Transcription Factor in Prostate Cancer Cells Activates Osteopontin. Mol. Cancer Res. 2011, 9, 914–924. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
368. Munde, M.; Wang, S.; Kumar, A.; Stephens, C.E.; Farahat, A.A.; Boykin, D.W.; Wilson, W.D.; Poon, G.M.K. Structure-dependent inhibition of the ETS-family transcription factor PU.1 by novel heterocyclic diamidines. Nucleic Acids Res. 2014, 42, 1379–1390. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
369. Antony-Debré, I.; Paul, A.; Leite, J.; Mitchell, K.; Kim, H.M.; Carvajal, L.A.; Todorova, T.I.; Huang, K.; Kumar, A.; Farahat, A.A.; et al. Pharmacological inhibition of the transcription factor PU.1 in leukemia. J. Clin. Investig. 2017, 127, 4297–4313. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
370. Solomon, L.A.; Li, S.K.H.; Piskorz, J.; Xu, L.S.; DeKoter, R.P. Genome-wide comparison of PU.1 and Spi-B binding sites in a mouse B lymphoma cell line. BMC Genom. 2015, 16, 76. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
371. Rao, G.; Rekhtman, N.; Cheng, G.; Krasikov, T.; Skoultchi, A.I. Deregulated expression of the PU.1 transcription factor blocks murine erythroleukemia cell terminal differentiation. Oncogene 1997, 14, 123–131. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
372. Rosenbauer, F.; Wagner, K.; Kutok, J.L.; Iwasaki, H.; Le Beau, M.M.; Okuno, Y.; Akashi, K.; Fiering, S.; Tenen, D.G. Acute myeloid leukemia induced by graded reduction of a lineage-specific transcription factor, PU.1. Nat. Genet. 2004, 36, 624–630. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
373. Bonadies, N.; Pabst, T.; Mueller, B.U. Heterozygous deletion of the PU.1 locus in human AML. Blood 2010, 115, 331–334. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
374. Will, B.; Vogler, T.O.; Narayanagari, S.; Bartholdy, B.; Todorova, T.I.; Da Silva Ferreira, M.; Chen, J.; Yu, Y.; Mayer, J.; Barreyro, L.; et al. Minimal PU.1 reduction induces a preleukemic state and promotes development of acute myeloid leukemia. Nat. Med. 2015, 21, 1172–1181. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
375. Budiman, M.E.; Bierbach, U.; Alexander, R.W. DNA minor groove adducts formed by a platinum-acridine conjugate inhibit association of TATA-binding protein with its cognate sequence. Biochemistry 2005, 44, 11262–11268. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
376. Ng, P.Y.; Tang, Y.; Knosp, W.M.; Stadler, H.S.; Shaw, J.T. Synthesis of diverse lactam carboxamides leading to the discovery of a new transcription-factor inhibitor. Angew. Chem. Int. Ed. 2007, 46, 5352–5355. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
377. Zhang, Z.; Zhang, J.; Jin, L.; Song, T.; Wu, G.; Gao, J. Tanshinone IIA interacts with DNA by minor groove-binding. Biol. Pharm. Bull. 2008, 31, 2342–2345. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
378. Park, S.; Song, J.S.; Lee, D.K.; Yang, C.H. Suppression of AP-1 activity by tanshinone and cancer cell growth inhibition. Bull. Korean Chem. Soc. 1999, 20, 925–928. [Google Scholar]
379. Tsai, M.H.; Lin, Z.C.; Liang, C.J.; Yen, F.L.; Chiang, Y.C.; Lee, C.W. Eupafolin inhibits PGE2 production and COX2 expression in LPS-stimulated human dermal fibroblasts by blocking JNK/AP-1 and Nox2/p47phoxpathway. Toxicol. Appl. Pharmacol. 2014, 279, 240–251. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
380. Zhang, Z.; Gao, J.; Wang, Y.; Song, T.; Zhang, J.; Wu, G.; Zhang, T.; Du, G. Tanshinone IIA triggers p53 responses and apoptosis by RNA polymerase II upon DNA minor groove binding. Biochem. Pharmacol. 2009, 78, 1316–1322. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
381. Malek, A.; Núñez, L.-E.; Magistri, M.; Brambilla, L.; Jovic, S.; Carbone, G.M.; Morís, F.; Catapano, C.V. Modulation of the Activity of Sp Transcription Factors by Mithramycin Analogues as a New Strategy for Treatment of Metastatic Prostate Cancer. PLoS ONE 2012, 7, e35130. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
382. Zhang, J.P.; Zhang, H.; Wang, H.B.; Li, Y.X.; Liu, G.H.; Xing, S.; Li, M.Z.; Zeng, M.S. Down-regulation of Sp1 suppresses cell proliferation, clonogenicity and the expressions of stem cell markers in nasopharyngeal carcinoma. J. Transl. Med. 2014, 12, 222. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
383. Sastry, M.; Patel, D.J. Solution Structure of the Mithramycin Dimer–DNA Complex. Biochemistry 1993, 32, 6588–6604. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]

384. Bailly, C.; Payet, D.; Travers, A.A.; Waring, M.J. PCR-based development of DNA substrates containing modified bases: An efficient system for investigating the role of the exocyclic groups in chemical and structural recognition by minor groove binding drugs and proteins. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1996, 93, 13623–13628. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
385. Ray, R.; Snyder, R.C.; Thomas, S.; Koller, C.A.; Miller, D.M. Mithramycin blocks protein binding and function of the SV40 early promoter. J. Clin. Investig. 1989, 83, 2003–2007. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
386. Snyder, R.C.; Ray, R.; Blume, S.; Miller, D.M. Mithramycin Blocks Transcriptional Initiation of the c-myc P1 and P2 Promoters. Biochemistry 1991, 30, 4290–4297. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
387. Petrovic, V.; Costa, R.H.; Lau, L.F.; Raychaudhuri, P.; Tyner, A.L. Negative regulation of the oncogenic transcription factor FoxM1 by thiazolidinediones and mithramycin. Cancer Biol. Ther. 2010, 9, 1008–1016. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
388. Mihara, N.; Chiba, T.; Yamaguchi, K.; Sudo, H.; Yagishita, H.; Imai, K. Minimal essential region for krüppel-like factor 5 expression and the regulation by specificity protein 3-GC box binding. Gene 2017, 601, 36–43. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
389. Liu, R.; Zhi, X.; Zhou, Z.; Zhang, H.; Yang, R.; Zou, T.; Chen, C. Mithramycin A suppresses basal triple-negative breast cancer cell survival partially via down-regulating Krüppel-like factor 5 transcription by Sp1. Sci. Rep. 2018, 8. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
390. Li, J.; Gao, H.; Meng, L.; Yin, L. Mithramycin inhibits epithelial-tomesenchymal transition and invasion by downregulating SP1 and SNAI1 in salivary adenoid cystic carcinoma. Tumor Biol. 2017, 39. [Google Scholar] [CrossRef]
391. Koutsodontis, G.; Kardassis, D. Inhibition of p53-mediated transcriptional responses by mithramycin A. Oncogene 2004, 23, 9190–9200. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
392. Estève, P.O.; Hang, G.C.; Pradhan, S. Molecular mechanisms of transactivation and doxorubicin-mediated repression of survivin gene in cancer cells. J. Biol. Chem. 2007, 282, 2615–2625. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
393. Tian, H.; Qian, G.W.; Li, W.; Chen, F.F.; Di, J.H.; Zhang, B.F.; Pei, D.S.; Ma, P.; Zheng, J.N. A critical role of Sp1 transcription factor in regulating the human Ki-67 gene expression. Tumor Biol. 2011, 32, 273–283. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
394. Vizcaíno, C.; Núñez, L.-E.; Morís, F.; Portugal, J. Genome-wide modulation of gene transcription in ovarian carcinoma cells by a new mithramycin analogue. PLoS ONE 2014, 9, e104687. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
395. Logotheti, S.; Michalopoulos, I.; Sideridou, M.; Daskalos, A.; Kossida, S.; Spandidos, D.A.; Field, J.K.; Vojtesek, B.; Liloglou, T.; Gorgoulis, V.; et al. Sp1 binds to the external promoter of the p73 gene and induces the expression of TAp73γ in lung cancer. FEBS J. 2010, 277, 3014–3027. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
396. Kong, X.; Xu, P.; Cai, W.-J.; Wang, H.-G.; Li, B.-B.; Huang, G.-L.; He, Z.-W.; Chen, G.; Ye, C.-G. ZBP-89 and Sp1 contribute to Bak expression in hepatocellular carcinoma cells. BMC Cancer 2018, 18, 419. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
397. Krikun, G.; Schatz, F.; Mackman, N.; Guller, S.; Demopoulos, R.; Lockwood, C.J. Regulation of tissue factor gene expression in human endometrium by transcription factors Sp1 and Sp3. Mol. Endocrinol. 2000, 14, 393–400. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
398. Aslam, F.; Palumbo, L.; Augenlicht, L.H.; Velcich, A. The Sp family of transcription factors in the regulation of the human and mouse MUC2 gene promoters. Cancer Res. 2001, 61, 570–576. [Google Scholar] [PubMed]
399. Lee, J.J.; Park, K.; Shin, M.H.; Yang, W.J.; Song, M.J.; Park, J.H.; Yong, T.S.; Kim, E.K.; Kim, H.P. Accessible chromatin structure permits factors Sp1 and Sp3 to regulate human TGFBI gene expression. Biochem. Biophys. Res. Commun. 2011, 409, 222–228. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
400. Dang, X.; Zeng, X.; Coimbra, R.; Eliceiri, B.P.; Baird, A. Counter regulation of ECRG4 gene expression by hypermethylation-dependent inhibition and the Sp1 transcription factor-dependent stimulation of the c2orf40 promoter. Gene 2017, 636, 103–111. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
401. Wang, L.G.; Ferrari, A.C. Mithramycin targets sp1 and the androgen receptor transcription level-potential therapeutic role in advanced prostate cancer. Transl. Oncogenom. 2006, 1, 19–31. [Google Scholar]
402. Yang, W.J.; Song, M.J.; Park, E.Y.; Lee, J.J.; Park, J.H.; Park, K.; Park, J.H.; Kim, H.P. Transcription factors Sp1 and Sp3 regulate expression of human ABCG2 gene and chemoresistance phenotype. Mol. Cells 2013, 36, 368–375. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
403. Yu, S.; Yerges-Armstrong, L.M.; Chu, Y.; Zmuda, J.M.; Zhang, Y. Transcriptional regulation of frizzled-1 in human osteoblasts by Sp1. PLoS ONE 2016, 11, e163277. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
404. Blume, S.W.; Snyder, R.C.; Ray, R.; Thomas, S.; Koller, C.A.; Miller, D.M. Mithramycin inhibits SP1 binding and selectively inhibits transcriptional activity of the dihydrofolate reductase gene in vitro and in vivo. J. Clin. Investig. 1991, 88, 1613–1621. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
405. Kaluz, S.; Kaluzová, M.; Stanbridge, E.J. Expression of the hypoxia marker carbonic anhydrase IX is critically dependent on SP1 activity. Identification of a novel type of hypoxia-responsive enhancer. Cancer Res. 2003, 63, 917–922. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
406. Zhang, M.R.; Xi, S.; Shukla, V.; Hong, J.A.; Chen, H.; Xiong, Y.; Ripley, R.T.; Hoang, C.D.; Schrump, D.S. The Pluripotency Factor Musashi-2 Is a Novel Target for Lung Cancer Therapy. Ann. Am. Thorac. Soc. 2018, 15, S124. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
407. Jun, D.Y.; Lee, J.Y.; Park, H.S.; Lee, Y.H.; Kim, Y.H. Tumor suppressor protein p53-mediated repression of human mitotic centromere-associated kinesin gene expression is exerted via down-regulation of Sp1 level. PLoS ONE 2017, 12, e189698. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
408. Hou, C.; Weidenbach, S.; Cano, K.E.; Wang, Z.; Mitra, P.; Ivanov, D.N.; Rohr, J.; Tsodikov, O.V. Structures of mithramycin analogues bound to DNA and implications for targeting transcription factor FLI1. Nucleic Acids Res. 2016, 44, 8990–9004. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
409. Hanahan, D.; Weinberg, R.A. Hallmarks of cancer: The next generation. Cell 2011, 144, 646–674. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
410. Grohar, P.J.; Glod, J.; Peer, C.J.; Sissung, T.M.; Arnaldez, F.I.; Long, L.; Figg, W.D.; Whitcomb, P.; Helman, L.J.; Widemann, B.C. A phase I/II trial and pharmacokinetic study of mithramycin in children and adults with refractory Ewing sarcoma and EWS–FLI1 fusion transcript. Cancer Chemother. Pharmacol. 2017, 80, 645–652. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
411. Hanahan, D.; Weinberg, R.A. The hallmarks of cancer. Cell 2000, 100, 57–70. [Google Scholar] [CrossRef]
412. Morales, C.P.; Souza, R.F.; Spechler, S.J. Hallmarks of cancer progression in Barrett's oesophagus. Lancet 2002, 360, 1587–1589. [Google Scholar] [CrossRef]
413. De Palma, M.; Hanahan, D. The biology of personalized cancer medicine: Facing individual complexities underlying hallmark capabilities. Mol. Oncol. 2012, 6, 111–127. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
414. Bernstein, J.M.; Bernstein, C.R.; West, C.M.L.; Homer, J.J. Molecular and cellular processes underlying the hallmarks of head and neck cancer. Eur. Arch. Otorhinolaryngol. 2013, 270, 2585–2593. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
415. Stahl, M.; Kohrman, N.; Gore, S.D.; Kim, T.K.; Zeidan, A.M.; Prebet, T. Epigenetics in Cancer: A Hematological Perspective. PLoS Genet. 2016, 12, e1006193. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
416. Datta, D.; Aftabuddin, M.; Gupta, D.K.; Raha, S.; Sen, P. Human Prostate Cancer Hallmarks Map. Sci. Rep. 2016, 6, 30691. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]

417. Nørøxe, D.S.; Poulsen, H.S.; Lassen, U. Hallmarks of glioblastoma: A systematic review. ESMO Open 2016, 1, e000144. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
418. Viatour, P.; Merville, M.-P.; Bours, V.; Chariot, A.; Karin, M.; Hunter, T.; Karin, M.; Ben-neriah, Y.; Hsu, H.; Al, E.; et al. Phosphorylation of NF-kappaB and IkappaB proteins: Implications in cancer and inflammation. Trends Biochem. Sci. 2005, 30, 43–52. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
419. Yeung, S.J.; Pan, J.; Lee, M.H. Roles of p53, MYC and HIF-1 in regulating glycolysis—The seventh hallmark of cancer. Cell. Mol. Life Sci. 2008, 65, 3981–3999. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
420. Reddy, A.; Huang, C.C.; Liu, H.; Delisi, C.; Nevalainen, M.T.; Szalma, S.; Bhanot, G. Robust gene network analysis reveals alteration of the STAT5a network as a hallmark of prostate cancer. Genome Inf. 2010, 24, 139–153. [Google Scholar] [CrossRef]
421. Gabay, M.; Li, Y.; Felsher, D.W. MYC activation is a hallmark of cancer initiation and maintenance. Cold Spring Harb. Perspect. Med. 2014, 4. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
422. Kasai, K. GLI1, a master regulator of the hallmark of pancreatic cancer. Pathol. Int. 2016, 66, 653–660. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
423. Abou-Ouf, H.; Zhao, L.; Bismar, T.A. ERG expression in prostate cancer: Biological relevance and clinical implication. J. Cancer Res. Clin. Oncol. 2016, 142, 1781–1793. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
424. Deltcheva, E.; Nimmo, R. RUNX transcription factors at the interface of stem cells and cancer. Biochem. J. 2017, 474, 1755–1768. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
425. Yadav, R.K.; Chauhan, A.S.; Zhuang, L.; Gan, B. FoxO transcription factors in cancer metabolism. Semin. Cancer Biol. 2018. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
426. Monterisi, S.; Riso, P.L.; Russo, K.; Bertalot, G.; Vecchi, M.; Testa, G.; Di Fiore, P.P.; Bianchi, F. HOXB7 overexpression in lung cancer is a hallmark of acquired stem-like phenotype. Oncogene 2018. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
427. Rojo de la Vega, M.; Chapman, E.; Zhang, D.D. NRF2 and the Hallmarks of Cancer. Cancer Cell 2018. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
428. Freed-Pastor, W.A.; Prives, C. Mutant p53: One name, many proteins. Genes Dev. 2012, 26, 1268–1286. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
429. Parrales, A.; Iwakuma, T. Targeting Oncogenic Mutant p53 for Cancer Therapy. Front. Oncol. 2015, 5. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
430. Liu, L.; Jin, G.; Zhou, X. Modeling the relationship of epigenetic modifications to transcription factor binding. Nucleic Acids Res. 2015, 43, 3873–3885. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
431. Ahuja, N.; Sharma, A.R.; Baylin, S.B. Epigenetic Therapeutics: A New Weapon in the War Against Cancer. Annu. Rev. Med. 2016, 67, 73–89. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]

Annexe 2

Soumis pour publication à la revue Journal of Medicinal Chemistry

Heterocyclic Diamidine DNA ligands as HOXA9 Transcription Factor Inhibitors: Design, Molecular Evaluation and Cellular Consequences in HOXA9-Dependant Leukemia Cell Model Targeting Transcription Factors for Cancer Treatment

Sabine Depauw,‡,1 Mélanie Lambert,‡,1 Samy Jambon,‡,1 Paul Peixoto,1 Raja Nhili,1 Ananya Paul,2 Laura Morongiu,1 Martin Figeac,3 Christelle Dassi,1 Charles Paul-Constant,1 Benjamin Billoré,1 Arvind Kumar,2 Abdelbasset A. Farahat,2,4 Mohamed A. Ismail,2,5 Ekaterina Mineva,2 Daniel P. Sweat,6 Chad E. Stephens,6 David W. Boykin,2 W. David Wilson,2 and Marie-Hélène David-Cordonnier*,1

1 UMR-S1172-JPARC (Jean-Pierre Aubert Research Center), INSERM, University of Lille, Centre Hospitalier Universitaire de Lille, IRCL, F-59045 Lille, France.
2 Department of Chemistry, Georgia State University, Atlanta, GA 30303, United States.
3 Functional and Structural Genomic Platform, Lille University, F-59000 Lille, France.
4 Department of Pharmaceutical Organic Chemistry, Faculty of Pharmacy, Mansoura University, Mansoura 35516, Egypt.
5 Department of Chemistry, Faculty of Science, Mansoura University, Mansoura 35516, Egypt.
6 Department of Chemistry and Physics, Augusta University, Augusta, GA 30904, United States

* To whom correspondence should be addressed. Tel: +33 320 169 223; Fax: +33 320 538 562; Email: marie-helene.david@inserm.fr

‡ The authors wish it to be known that, in their opinion, these authors should be regarded as joint First Authors

ABSTRACT:
Transcription factors were for long time considered as undruggable targets due to the absence of binding pockets in most of them. An alternative to direct protein targeting is to inhibit its function through the inhibition of transcription factor binding to DNA. HOXA9 is one of them, implicated in acute myeloid leukemia, associated with differentiation blockade. To date, only indirect targeting of HOXA9 expression and multi-target HOX/PBX protein/protein interaction inhibitors have been developed. Targeting transcription factor/DNA binding is an attractive strategy to control transcription factor function but at this time such DNA approach has never been developed against HOXA9. In the present study, we selected a series of heterocyclic diamidines for competitive HOXA9/DNA binding and showed that they interact with the HOXA9 cognate sequence as groove binders. Furthermore, the compounds selected, DB818 and DB1055, showed excellent inhibition of HOXA9-mediated transcription in luciferase assays. Global gene expression analysis on treated murine Hoxa9-transformed hematopoietic cells highlighted a decrease in blood cell production and an increase in cell differentiation. Cell analyses showed that Hoxa9 inhibition by selected compounds reduced cell survival, altered cell cycle and increased both cell death and granulocyte/monocyte differentiation. Altogether, these data clearly demonstrate for the first time the propensity of sequence-selective DNA ligands to inhibit HOXA9/DNA binding both in vitro and in a murine Hoxa9-dependent leukemic cell model.

INTRODUCTION

Transcription factors are often associated with different phases of the oncogenic process (initiation, development, invasion, metastasis…) and represent ~20% of the established targets in cancers. However, only a few of them are targeted in cancer therapies. The different approaches for targeting transcription factors are i) to directly target the protein via a functional pocket, ii) to target protein-protein interactions and iii) to interfere with the transcription factor's ability to interact with its cognate binding site on a targeted DNA sequence.[1–4] Only a few of them can be targeted through their ligand binding pocket. Hormone/retinoid receptors are a notable example, and more precisely the retinoid receptor RARα, which can be targeted by all-trans retinoic acid (ATRA). This compound has been used in human therapy for three decades in PML-RARα- rearranged acute promyelocytic leukemia (APL) through the induction of differentiation.5 Other transcription factors families have been considered as undruggable targets.[6] Alternatives are protein/protein inhibitors that can target the p53 and mdm2/mdmx interface[7], BCL6[8] and STAT3 homodimers[9], YAP/TAZ[10,11] or CBP/βcatenin12 interactions. Only a limited number of strategies are dedicated to direct targeting of transcription factor-DNA binding domains and a recent example is the PAX2 transcription factor DNA binding domain.[13] Alternatively, another manner to target a transcription factor at the DNA binding level is to develop molecules that target the DNA promoter sequence and compete with transcription factor binding to its cognate sequence. This is the case for a variety of minor groove DNA binding structures. Many different series of DNA minor groove binders are also in preclinical development such as mithramycines, polyamides and diamidine heterocyclic derivatives.[1,4,14,15] Among this group, mithramycin A and some of its derivatives inhibits SP1/DNA,[16] which is associated with the deregulation of many SP1-driven genes such as MYC, FOXM1, p21, Ki-67, CRABP1, BAK or KLF5.[4] Mithramycin A and derivatives also block EWS-Fli-1/DNA interaction[17] and have entered clinical trials against refractory Ewing sarcoma[18]. Interestingly, two other minor groove DNA binders recently showed interesting anti-leukemic activities by targeting transcription factors associated with acute myeloid leukemia (AML): the alkylating agent–conjugated pyrrole-imidazole polyamide Chb-M against RUNX1[19] and DB2313 against PU.1[20].

HOXA9 is a well-known transcription factor implicated in oncogenic and leukemic processes. Besides its implication in some solid tumors,[21–25] HOXA9 is clearly associated with different hematologic malignancies.[26–30] Indeed, HOXA9 is over-expressed in ~70 % of AML or fused to NUP98 in the t(7;11)(p15;p15) translocation leading to the hybrid protein NUP98-HOXA9 responsible for 2-5 % of AML[31,32] and 5 % of myelodysplasic syndromes (MDS)[33]. Functionally, HOXA9 is involved in the differentiation blockade, resulting in the accumulation of leukemic blasts in patients.[26,27,30,34] Such leukemic activity is directly attributable to the HOXA9 DNA binding activity. Indeed, deletion of its homeodomain abolishes the propensity of HOXA9 to induce leukemia in mice.[35–37] Furthermore, HOXA9 was found quite recently as one of the genes associated with leukemic stem cell signature and resulting in poor prognosis.[38] The HOXA9 transcription factor is therefore a good candidate for the development of new targeted therapies for differentiation that would be intended for a large number of patients suffering from AML. HOXA9 binds to it regulatory DNA sequence at a 5'-tgATTTAt site (JASPAR MA0594.1), as defined by ChIP-seq in a murine model expressing a tagged-Hoxa9 protein.[39] DNA recognition occurs through the interaction between the third α-helix of its homeodomain and the DNA major groove, and between the amino-terminal unfolded module of its homeodomain which makes deep contacts in the minor groove of the AT-rich segment of the consensus binding site.[40] In the present study, we evaluated a focused library of heterocyclic diamidine DNA ligands as functional inhibitors of human HOXA9/DNA binding activity. We evaluated their mode of binding to DNA in vitro and the cellular consequences of the protein-DNA complex inhibition. We further selected DB818 and DB1055 for additional investigation and evidenced their inhibitory effect on HOXA9-induced transcription control by using HOXA9-driven luciferase gene expression. The compound effects on cell survival and clonogenic activity of Hoxa9-transformed murine bone marrow cells argues for cell differentiation process, as highlighted by transcriptomic analyses of DB818-treated leukemic cells. These results clearly show for the first time the selection of direct functional inhibitors of HOXA9/DNA binding through the targeting of the HOXA9 consensus binding site by DNA ligands.

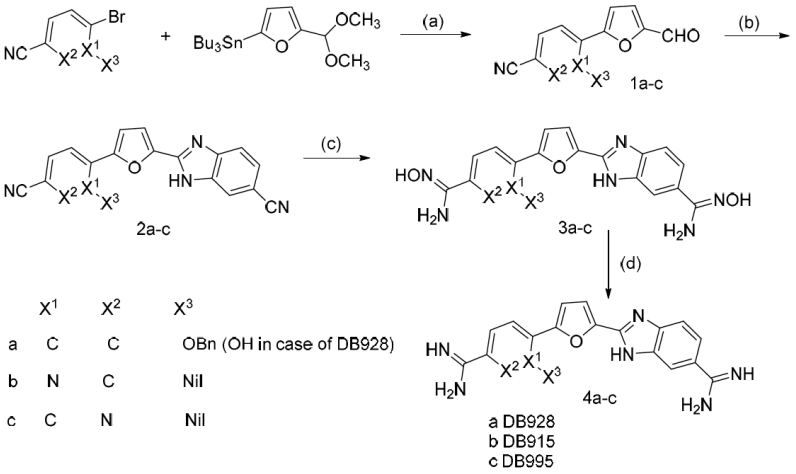
RESULTS AND DISCUSSION

Design of the evaluated compounds

In order to develop inhibitors for the HOXA9 transcription factor at its DNA binding level, we took advantage of the HOXA9 DNA binding domain particularities. Indeed HOXA9 binds through a direct interaction of the third α-helix and the N-terminal portion of its homeodomain with the major and minor grooves, respectively. The key interaction are with the 5'-ATT(A/T) sequence of the 5'-tgATTTAt defined consensus site.[39,40] We were specifically interested in heterocyclic diamidine compounds that have been previously reported to be potent in vitro transcription factor DNA binding inhibitors: DB293 against Pit-1 and Brn-3[41] and DB1255 against the ERG transcription factor[42,43]. The AT specific minor groove binding diamidines evaluated as HOXA9 inhibitors were obtained from our large library of heterocyclic diamidines synthesized as potential antiparasitic agents. The selections were made from a number of structurally diverse diamidine types with many selected for their binding to AT-rich, ATT(A/T) or ATGA binding to DNA [44,45] and new structures were designed on the basis of three central aromatic groups R1, R2 and R3 flanked by an amidine moiety at each extremity (Table 1). A series of 39 compounds are classified based on the presence of R2 as a 5- or 6-membered ring, on the nature or R3 rings (general with a phenyl or a benzimidazole). Modifications of the R1 ring and the amidine extremities (R4 and R5) offer a large diversity of molecules to expand structure/function relationships (Table 1). Approximately two-thirds of those selected have been previously reported and references to their synthesis are provided in Supplementary Information. The syntheses of those previously unreported are described below.

The synthesis of three furan benzimidazole analogues (4a-c; DB915, DB928, DB995) is outlined in Scheme 1. The 2-cyanoaryl-5-formyl furans were prepared employing standard Stille cross-coupling conditions allowing 2-(tri-n-butylstannyl) - 5-(dimethoxymethyl) furan- to react with the various cyanoaryl bromides in the presence of tetrakis (triphenylphospine) palladium. The required bis-nitriles were obtained by oxidative coupling of 3, 4-diaminobenzonitrile with the various 2-

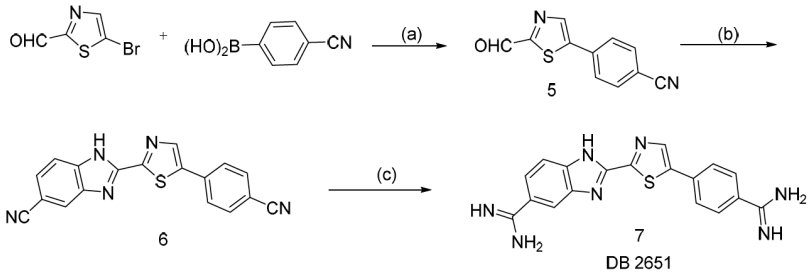
cyanoaryl-5-formyl furans using benzoquinone as the oxidant. The diamidines were prepared by first converting the bis-nitrile into the corresponding amidoximes, which were acetylated, and subsequently subjected to hydrogenolysis to yield the desired diamidines. In the case of DB928, the hydrogenolysis in addition to cleaving the N-OAc bond also cleaved the benzyl group.



	X^1	X^2	X^3
a	C	C	OBn (OH in case of DB928)
b	N	C	Nil
c	C	N	Nil

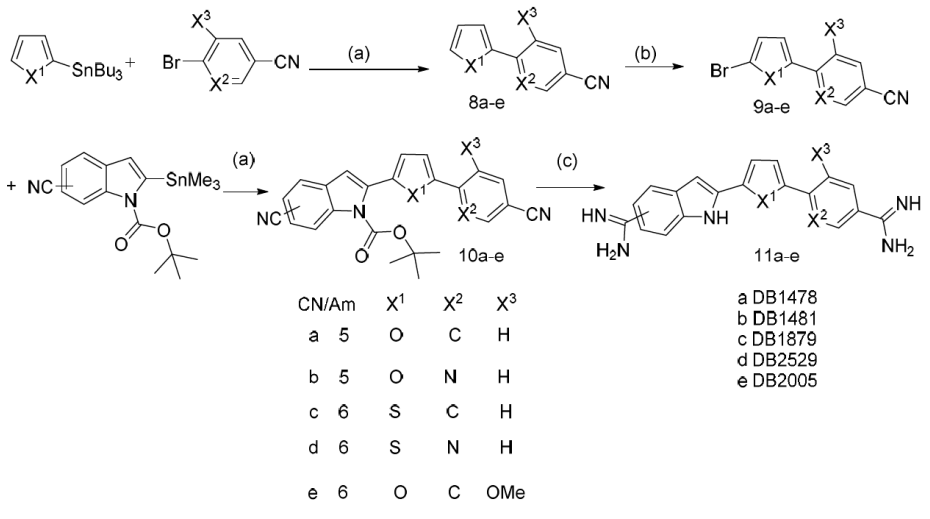
Scheme 1. Reagents and conditions: (a) i. Pd(PPh3)4, 1,4-dioxane,ii. 2.0 M HCl; (b) 3,4-diaminobenzonitrile, 1,4-benzoquinone, EtOH; (c) NH_2OH-HCl/KO-t-Bu, DMSO; (d) i. AcOH/Ac_2O, ii. H_2/Pd-C, AcOH.

The route employed for synthesis of the thiazole benzimidazole (7; DB2651) is shown in Scheme 2. In this case Suzuki cross-coupling between 5-bromothiazole-2-carbaldhyde and 4- cyanophenylboronic acid was utilized to obtain 5-(4-cyanophenyl) thiazole-2-carbaldehyde. In this example, the bis-nitrile was achieved by oxidative coupling of 3, 4-diaminobenzonitrile and the thiazole aldehyde using sodium metabisulfite as the oxidant. The diamidine was obtained from the bis-nitrile using classical Pinner methodology.



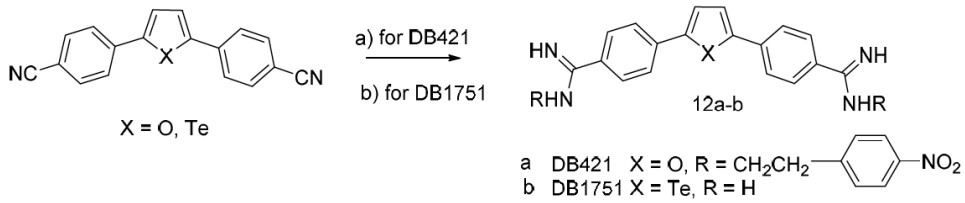
Scheme 2. Reagents and conditions: (a) $Pd(PPh_3)_4$, Na_2CO_3/H_2O, dioxane, reflux; (b) 3,4-diaminobenzonitrile, $Na_2S_2O_3$/ DMSO, 140 ^oC; (c) i HCl(g), EtOH, ii NH_3 (g), EtOH.

In Scheme 3 the synthesis approach to five (11a-e; DB1478, DB1481, DB1879, DB2005, DB2529) heteroaryl indole diamidines is presented. The 2-arylcyanofurans and thiophenes were obtained using Stille coupling between 2-(tri-n-butylstannyl) furan and 2-(tri-n-butylstannyl) thiophene with the indicated cyanoaryl bromides. NBS bromination of the 2-aryl furans and thiophenes at room temperature yielded the corresponding 5-bromo-2-aryl furans and thiophenes. Reaction of either the Boc-protected 5 or 6-cyano-2-(trimethlystannyl) indole with the 5-bromo-2-aryl furans or thiophenes yield the Boc-protected bis-nitriles. The bis-nitriles were converted into the diamidines by reaction with lithium bis(trimethylsilyl) amide.



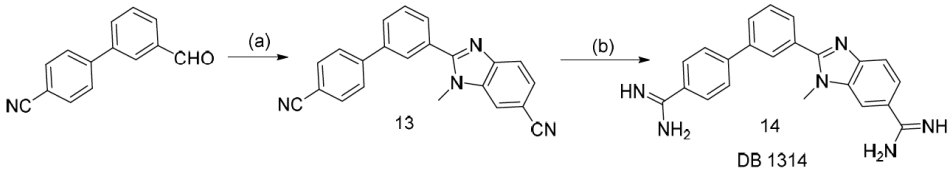
Scheme 3: Reagents and conditions; (a) $Pd(PPh_3)_4$, Dioxane; (b) NBS,DMF, rt; (c) i $LiN(TMS)_2$/THF, ii HCl(g), EtOH.

The synthesis of the bis-N-(4-nitrophenylethyl) analogue (12a; DB421) of furamidine and the tellurophene analogue (12b; DB1751) of furamidine is presented in Scheme 4. The former was obtained from the bis-nitrile by conversion into the corresponding imidate ester, which on reaction with 4-nitrophenethyl amine yielded DB421. Reaction of 2, 5-bis-(4-cynophenyl) tellurophene with lithium bis(trimethylsilyl)amide provided DB1751.



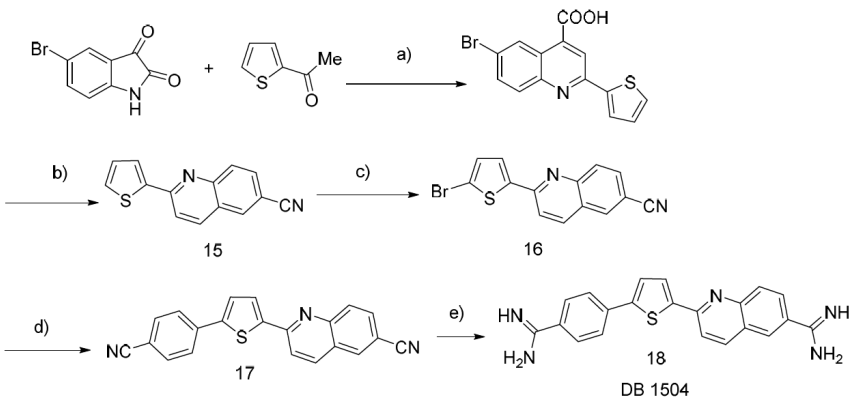
Scheme 4. Reagents and conditions; (a) i HCl(g), EtOH ii 4-nitrophenethylamine, EtOH; (b) i $LiN(TMS)_2$,THF, rt, ii HCl(g), EtOH.

The synthesis of the N-methylbenzimidazole analogue (14; DB1314) is shown in Scheme 5. The required bis-nitrile was obtained by oxidative coupling of 3-(methylamino)-4-aminobenzonitrile with 4-cyano-3′-formyl-1, 1′-biphenyl using sodium metabisulfite as the oxidant. The mentioned lithium bis(trimethylsilyl)amide method was used to convert the bisnitrile into the diamidine.



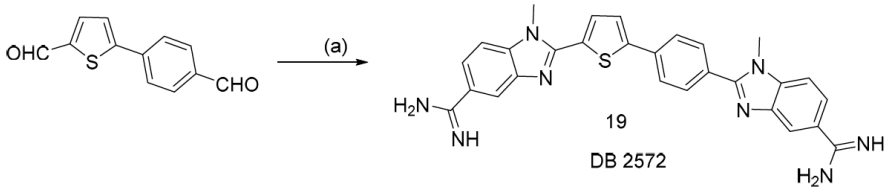
Scheme 5. Reagents and conditions: (a) 4-amino-3-(methylamino)benzonitrile, $Na_2S_2O_3$, DMF, reflux. (b) i $LiN(TMS)_2$, THF, rt ii HCl(g), EtOH.

The route utilized for synthesis of the quinoline analog (18; DB1504) is outlined in Scheme 6. The Pfitzinger reaction between 2-acetylthiophene and 6-bromoisatin provided six-bromo-2- (thiophen-2-yl)quinoline-4-carboxylic acid which on heating in the presence of copper(I)cyanide results in both decarboxylation and replacement of the bromo group with a cyano group. Once again, NBS bromination of the 2-aryl thiophene at room temperature yielded the desired 5- bromo-2-aryl thiophene analogue. Reaction of 4-cyanphenylboronic acid with the 5-bromo-2- aryl thiophene derivative under standard Suzuki coupling conditions provided the needed bisnitrile. Again, the lithium bis(trimethylsilyl)amide methodology was employed to obtain the diamidine DB1504.



Scheme 6. Reagents and conditions: (a) NaOH, H_2O,100°C, overnight; (b) CuCN, DMF, 140°C (c) NBS, DMF, rt ;(d) 4-cyanophenylboronic acid, 1,4-dioxane, $Pd(PPh_3)_4$, 2M K_2CO_3, 70°C, overnight; (e) i LiN$(TMS)_2$, THF, rt, 48 h, ii HCl(g), EtOH.

Scheme 7 shows the approach used for the synthesis of the bis-N-methylbenzimidazole analogue (19; DB2572). In this case, the bis-aldehyde was oxidatively coupled, mediated by benzoquinone, with 3-amino-4-(methylamino)benzamidine to directly yield DB2572.



Scheme 7. Reagents and conditions: (a) 3-amino-4-(methylamino)benzamidine, benzoquinone, EtOH, reflux.

Selection of HOXA9/DNA binding inhibitors

An ELISA-derived DNA binding inhibition assay was first used to evaluate this series of compounds for the inhibition of the HOXA9 protein interaction with its cognate DNA binding sequence 5'-aTGATTTA (HBS for HOXA9-binding site) which is 5'-biotinylated in order to be immobilized on streptavidin-coated 96-wells plates. Specific (HBS) and nonspecific (NS) oligonucleotides (sequences in Supplementary Table S1) were used as competitor DNAs to validate the experimental conditions for selective protein/DNA inhibition experiments. The ATrich DNA ligand DB75 and the ATGA-site DNA binding compound DB293, which have been previously characterized, were used as controls. Among those evaluated, ten compounds showed significant activity on HOXA9/DNA binding (grey and white box for at least 50% and 75% inhibition, respectively) (Figure 1A) and were further evaluated using EMSA (representative gels presented in Figure 1B and Supplementary Figure S1). HOXA9 protein expressed using a reticulocyte lysate system was incubated with radiolabelled HBS-double stranded oligonucleotide (sequence in supplementary Table S1) and increasing concentrations of the tested compounds. The retarded band on the gel shows the formation of the HOXA9/HBS complex (bound, b), separated from the free HBS DNA (f). This conclusion was further validated by addition of HOXA9-directed antibody (Ab) and by the absence of the retarded band using reticulocyte lysate prepared in the absence of HOXA9-expressing vector (first and last lanes "0" from the upper left panel in Figure 1B). Quantification of the HOXA9/DNA inhibition from EMSA is presented in Figure 1C. This result demonstrated that DB818, DB1055, DB884, DB1879 and DB2529 are highly potent inhibitors of HOXA9/DNA binding with more that 90% inhibition at 2.5 µM ("High" panel). DB1177, DB883 and DB2223, on the other hand, are less efficient ("Medium" panel) with 90% inhibition reached using 7.5 µM. By contrast, DB1620, DB1878 and DB911 are poor inhibitors ("Low" panel) while others are considered to be inactive (right panel, "Inactive").

In terms of structure activity relationship, DB818, DB1879 and DB2529 are structurally related compounds that share a common central thiophene ring but differ by the presence or absence of a nitrogen atom that converts (i) the indole ring of DB1879 to a benzimidazole ring in the DB818 for R3 position or (ii) a phenyl ring in R1 position of DB1879 and to a pyridine ring in DB2529. Neither modification alters their propensity to inhibit the HOXA9/DNA interaction. By contrast, changing the thiophene ring of DB818, DB1879 or DB2529 to a furan (DB293, DB1878 or DB915, respectively) or a thiazole ring (DB2651) in the benzimidazole series strongly reduces HOXA9 inhibition efficacy whereas a pyrazole ring modification still confers some weaker inhibitory activity to DB2223. Surprisingly, such modification of the thiophene ring to a thiazole ring in the di-phenyl series changes an inactive compound (DB351) to an effective (but low) inhibitor of HOXA9/DNA binding (DB1620). The addition of a methyl group on the benzimidazole ring (DB818) at the R3 position or changing the DB818 benzimidazole ring to a quinoline ring or to a N-isopropyl-benzimidazole-phenyl moiety strongly alters its propensity to inhibit the HOXA9/DNA interaction (see DB2429, DB1504 or DB2708) relative to DB818. A methyl group on the phenyl ring in R1 also alters the inhibitory effect of DB1878 (unmethylated) as shown using DB2005 (methylated) (Figure 1A). Moreover, the addition of a methyl group to the benzimidazole ring in the R3 position alters the HOXA9 inhibition efficiency as observed with the highly active unmethylated compounds DB818 and DB2529, relative to their inactive methylated counterparts DB2429 and DB2430

(of note, this latter also differs by the presence of a furan 5-membered ring in R2 position instead of a thiophene). Finally, the two pyrrole derivatives bearing an additional ring (phenyl for DB884 or pyridine for DB883) at both the R1/R5 positions are identified as high (DB884) and medium (DB883) inhibitors.
The results obtained from ELISA-derived DNA binding inhibition assay and EMSA are in good agreement and highlight DB818, DB1055, DB883, DB1879 and DB2529 as interesting inhibitors of HOXA9/DNA binding. By contrast, DB828, that failed to inhibit HOXA9/DNA binding, was selected as a negative control for further analyses.

Direct DNA binding of the selected HOXA9/DNA inhibitors into the groove of DNA
Thermal melting experiments allow a robust screening for the relative binding affinity of the ligands with DNA sequences. In order to understand ligand-DNA complex stability, we conducted thermal melting studies of different diamidine compounds with cognate HBS sequences. Ligand and HBS duplex DNA sequences were prepared at a ratio of 1:1 and 2:1 (Figures 2A). At R=1:1, DB818, DB1055 and DB2529 showed _Tm values of 7-10°C. The thermal stability of the complex increase at R=2:1 ligand-DNA ratio (ΔTm >10°C) for DB818, DB1055, DB2529, DB1879 and DB1878. On the other hand, DB884 and DB1177 showed moderate binding with the HBS duplex (ΔTm = 8-9°C). However, DB883, DB884, DB2223 and DB1620 bind very weakly with the cognate HBS sequence.
To evaluate the binding mode of diamidine compounds with the same HOXA9-binding site the circular dichroism spectral (CD) experiment was performed (Figure 2B). Neither the duplex DNA nor the free diamidines compound exhibits CD signals in the compound absorption region above 300 nm. Adding increasing amounts of diamidine compounds that have showed in vitro positive results, lead to a substantial positive induced CD signals (ICD) for the complex formation with DNA at the wavelengths between 300 and 400 nm. This observation indicates that the diamidine compounds bind to the minor groove of the HBS DNA sequence, as in the crystal and/or NMR structure for DB818, DB1055, DB884 or DB293 to 5'-AATT-containing DNA (PDB: 1VZK, 2I5A, 2I2I, 2GYX)45–47 On the other hand, DB828 induces only weak CD changes at the highest drug concentrations in agreement with the low _Tm. All tested compounds except DB1177 and DB828 changed the positive ellipticity band of the DNA helix (positive CD band near 275 nm), suggesting that they induce modification of the stacking of the successive bases of the DNA.

HOXA9/DNA inhibitors directly bind to HOXA9-cognate sequence
To define the specific drug/DNA binding sequence, DNaseI footprinting experiments were used for selected compounds from the "High" (DB818, DB1055, DB1879, DB2529), "Medium" (DB1177, DB883), "low" (DB1878) and "inactive" (DB828) subgroups. As can be seen from Figure 3A, DNase I generated DNA fragments were separated upon electrophoretic migration from top to bottom. Some of the cleavage sites were protected from DNaseI digestion around the 50bp position with addition of increasing concentrations of selected diamidine compounds. The protected site was clearly evidenced on the corresponding densitometric analysis located on the HOXA9 binding site 5'-ATTTA for compounds from the "High" subgroup DB818, DB1055, DB1879 and DB2529 (Figure 3B). By contrast, DB828 and DB883 failed to recognize the 5'- ATTTA sequence, whereas DB1878 and DB1177 has a much weaker binding activity of the 5'- ATTTA site (Figure 3B). These results are in agreement with the DNA melting temperature studies on the HBS sequence (Figures 2A). We used the same UV/vis DNA melting approach to evaluate the binding of DB818, DB1055 and DB828 on the mutated HBS-oligonucleotide sequences. We have mutated the sequence at the 5'-ATGA (HBS-ATGAm) or the AT-rich (HBS-ATm) or containing both mutations (HBS-2mut) (oligonucleotide sequences are presented in Supplementary Table S1). For the HBS-ATGAm sequence, the _Tm values obtained with DB818 and DB1055 were similar to that obtained with wild-type HBS oligonucleotide which suggest that the diamidine compounds do not bind at the 5'-ATG binding site of HBS (Figure 3C). By contrast, when the 5'-ATTTA site was mutated alone for HBS-ATm or together with the ATGA portion for HBS-2mut, _Tm values decreased by 4ÅãC, which is similar to the observed value for the DB828. From the previous experiment (Figure 2A) it has been observed that DB828 binds with HBS as a week nonspecific binder. This result is in agreement with the DNase I footprinting experiments which suggest that both DB818 and DB1055 interact at the 5'- ATTTA-sequence of the HOXA9 binding site. This sequence specific binding evidenced DB818 and DB1055 as competitors for HOXA9 binding to its cognate sequence on the DNA helix. Surface plasmon resonance (SPR) experiments were applied to measure the dissociation constants KD for DB818 or DB1055 on HBS or HBS-2mut sequences (Figure 4). DB818 and DB1055 have similar strong KD values on HBS sequence (4.6 nM and 6.2 nM, respectively). The dissociation constant is much greater on the mutated sequence (0.35 µM and 1.7 µM, respectively), highlighting that DB818 is ~75-fold more selective for HBS than to HBS-mutated sequence whereas DB1055 is even more selective with >250-fold difference in KD values (Figure 4).

HOXA9/DNA binding inhibitors are effective at entering cells and localizing to the nucleus.
In order to address the cellular consequences of HOXA9 inhibitors, we used MigA9 cells, resulting from retroviral transduction of the murine Hoxa9 gene in murine bone marrow cells that were injected in sub-lethally irradiated mice and then collected from the bone marrow after leukemia burden and cultured in appropriate medium as described.[26] We first evaluated the cytotoxic effect of a series of diamidine compounds. Cell survival activity (IC50) on MigA9 cells was measured by using MTS reaction at 72 hours treatment. The IC50 values of diamidine compounds are at micromolar range except DB828 which has very high IC50 and supports previous in vitro observations. Surprisingly, DB2223, as an effective in vitro inhibitor of the HOXA9/DNA binding complex, failed to alter MigA9 cell survival (Table 2). We also evaluated their susceptibilities to enter cells and localize in the nucleus by using fluorescence microscopy as previously described for DB75 and its derivatives.[48] Most of the diamidines have intrinsic fluorescence properties in blue wavelengths. Compounds were evaluated either on MigA9 murine leukemia cell line (Figure 5A and Supplementary Figure S2) and/or HT-29 adherent cell line (Supplementary Figure S3). All evaluated compounds entered the nucleus except DB911 which could not be detected due to the lack of intrinsic

fluorescence properties. DB828, which also localized to the nucleus but failed to inhibit HOXA9 DNA binding, was used as a negative control in the following cellular studies.

DB818 and DB1055, but not DB828, inhibit HOXA9-dependant transcription control

In order to address the inhibitory effect of DB818 and DB1055 on the HOXA9-mediated transcriptional control, we performed luciferase assays. We used a pGL3-promoter vector in which the minimal promoter is under the control of 6-repeated HBS sequences, either the wildtype or mutated sequence at the 5'-ATTTA binding site (HBS and HBS-mut oligonucleotides, Supplementary Table S1). Cell transfection was performed in the K562 cell line as a leukemic cell model that is known for its lack of internal HOXA9 expression[49] (The absence of HOXA9 expression has been validated by validated using qRT-PCR and western-blotting, personal information and Supplementary Figure S4A, respectively). In this cell line, both DB818, DB1055 and DB828 compounds have no effect on cell survival and clonogenic propensities (Supplementary Table S3B, Table 4). Extrinsic HOXA9 protein was expressed by transfecting the pCMV-AD-HOXA9 vector in the K562 HOXA9-negative cells (Supplementary Figure S4A). HOXA9 protein has only low propensity to transactivate by itself in the absence of cofactors. Therefore, the region encoding the transactivation domain (AD) of NF-κB was fused in frame to the HOXA9 full length open-reading frame in order to express the HOXA9-AD fused protein that presents increased transactivation properties relatively to HOXA9 alone (personal information, see also Material and Methods section). Luciferase assays were performed in the presence versus absence of evaluated compounds of DB818 and DB1055 as HOXA9/DNA binding inhibitors, or DB828 as a negative control. The results showed that both DB818 and DB1055, but not DB828, were able to inhibit HOXA9-mediated transactivation in the presence of wild-type HBS sequences by controlling luciferase expression but not in the presence of HBSmut sequences (Figure 5B). These results also suggested that the HBS binding site is required for selective inhibition of HOXA9 transcriptional activity.

Gene expression analysis of MigA9 cells treated with DB818 highlights induced cell death processes.

In order to investigate the cellular mechanistic action of selected diamidine HOXA9/DNA inhibitors, we initially used a global gene expression analysis of MigA9 cells which were treated with DB818 (2.5µM) for 6, 12 and 24 hours. Co-deregulated genes with |mean fold changes| ≥ 1.5 are presented as heatmap in Figure 6A (|mean fold changes| ≥ 1.5). GSEA analyses on MSigDB C2-Chemical and Genetic Perturbation gene sets (Figure 6B) evidenced that the significant genes up-regulated in DB818-treated MigA9 cells at the different time correspond to genes that were down-regulated in human CD34+ cells transduced with NUP98-HOXA9 fusion (TAKEDA TARGETS OF NUP98 HOXA9 FUSION 8D DN), Figure 6B. Similarly, the list of significant commonly down-regulated genes in DB818-treated MigA9 cells are highlighted in geneset enrichments corresponding to genes up-regulated in murine HoxA9+Meis1 transformed cells (WANG IMMORTALIZED BY HOXA9 AND MEIS1 UP). Both results of CGP genesets enrichments suggest that the gene deregulation in opposite way between the transformation of hematopoietic progenitors with HoxA9+Meis1 or NUP98-HOXA9 and the inhibition of HOXA9 activity by DB818 in MigA9. Other genesets associated with HOXA9 expression control (NUYTTEN EZH2 TARGETS UP),[50] genes controlled by HOXA9 (GABRIELY MIR21 TARGETS).[51] leukemic stem cell inhibition (GAL LEUKEMIC STEM CELL DN) and AMLinduced differentiation (MARTENS TRETINOIN RESPONSE DN) were also found as significantly enriched in our dataset (Figure 6B). Ingenuity Pathway Analysis (IPA) of deregulated genes highlights the activation of macrophage differentiation, a reduced quantity of hematopoietic cells and an increase in apoptosis (Figure 6C). Analysis of the BloodSpot database (www.bloodspot.eu) found multiple commonly deregulated genes (identified as arrows in Figure 6A) which are significantly associated with the differentiation of granulocyte-monocyte progenitors (GMP) to granulocytes and monocytes (Supplementary Figure S5). Among them, the well-known monocyte/macrophage expressing the integrin Itgam (CD11b) is expressed upon differentiation of AML blasts[52,53] and the Oasl2 enzyme that is also associated with the differentiation of monocytes and dendritic cells[54]. Such over-expression of Itgam and Oasl2 were validated by qRT-PCR after a 48 hours of treatment with DB818 (5 or 10µM), as were validated the over-expression of Arfgef1 and Akap13 (Figure 6D) as examples of genes associated with granulocyte and/or monocyte differentiation (Supplementary Figure S5). Similar results of overexpression of these genes were also observed for DB1055, (Figure 4D) but DB828 failed to achieve the similar results.

Using the list of deregulated genes, IPA verified two main biological processes that were altered following DB818 treatment on MigA9 cells: cell differentiation (up-regulated) and cell proliferation (down-regulated). Based on this in silico transcriptomic analysis, cellular analyses were then performed to address the impact of DB818 and its derivatives on the cell proliferation and differentiation in MigA9 cells.

Inhibition of MigA9 cell proliferation

MTS measurements (Table 2) showed that most of the diamidines (except DB828 and DB2223) reduced the cell survival of the HoxA9-transformed cell line MigA9. Comprehensive changes in cell survival, determined by using MTS, may be due to multiple cellular processes such as cell death, cell cycle arrest and cell differentiation processes among others. Consequently, we then further addressed the impact of diamidine compound treatment on each of those cellular processes to have a better insight in the mechanism of action of those molecules. First, we validated the induction of cell death by DB818, as highlighted in transcriptomic analysis, using both the quantification of the proportion of propidium iodide-positive cells (PI+) and of subG1 population, two markers of cell death addressed from cell cycle analysis. The results in Table 2 show an increase in the PI-positive population for both 24 and 48 hours treatment and for the subG1 proportion at 48 hours treatment with DB818. These results suggest that DB818 induces apoptotic cell death, in agreement with transcriptomic analyses that highlighted expression of gene sets associated with a decrease of the quantity of blood cells upon treatment with DB818 (Figure 6). Using the same experimental approaches, we showed that DB1878, DB1879 and DB2529, as close derivatives of DB818, also strongly induce cell death (Table 2). Interestingly, the five ring containing compounds DB883 and DB884 were the most active in terms of cell death, suggesting that cell death is the main cellular process that is responsible for the decreaseof cell survival

by DB883 and DB884. By contrast, DB1055 does not induce cell death after 24 or 48 hours treatment to explain its effect on global cell survival. The impact of drug treatment on cell cycle resulted in a strong reduction in the proportion of MigA9 cells in S-phase upon treatment with DB818 and derivatives (DB1878/1879/2529), as well as with DB1055 and DB1620 (Table 3). This reduction of cycling cells is associated with a strong increase in the G0/G1 phase (DB1055, DB1878, DB2529), in the G2/M phase (DB818) or in both phases (DB1879, DB1620) at the tested concentrations and at 48H treatment.
Anti-clonogenic activities were then performed by using DB818, DB1055 and DB828 to address cell death and cell differentiation processes. This experiment first highlights the impact of both DB818 and DB1055 on global clonogenic propensity of the HOXA9-positive MigA9 cell line, but not on the HOXA9-negative K562 cell line (Table 4 and Supplementary Figure S4C-D). Surprisingly, the intrinsic fluorescence of DB818 and DB828 were still visible even after 10 days of culture in Methocult using fluorescence microscopy with DAPI-filters, which indicates very high stability of the diamidine compounds within the cells (Supplementary Figure S4D). Results for clonogenic assays clearly show reduction in the number of colony sub-types obtained in the presence of DB818 or DB1055, but not DB828, for the untreated wells (CTR) (Table 4).

Induction of granulocyte/monocyte differentiation.
Finally, using the same anti-clonogenic experiment, we proved that the global decrease in the colony number is associated with a reduced proportion of CFU-GM (granulocyte and monocyte) in favor of an increase of CFU-M (monocyte only) and CFU-G (granulocyte only). These results suggest that both DB818 and DB1055 induced a decrease in the number of the most immature hematopoietic progenitors cells (CFU-GM) and favored the development of colonies that aremore engaged in granulocytic or monocytic differentiation (CFU-G, CFU-M). This result is in agreement with gene expression analyses with DB818 (GSEA, IPA analyses), confirmed by qRT-PCR for both DB818 and DB1055 (but not for DB828) on Itgam (CD11b) as well as on CD14 expression as two markers of monocytic to macrophagic differentiation. Altogether these molecular and cellular experiments highlight the leukemic cell differentiation process associated with treatment with the HOXA9/DNA binding inhibitors DB818 and DB1055.

CONCLUSIONS
In the present work, we selected a series of heterocyclic diamidines and derivatives as sequence-selective DNA ligands that directly inhibit HOXA9/DNA binding (Figure 1, Figure 2A) through groove binding (Figure 2B) on the HOXA9 cognate DNA sequence (Figure 3). Particularly, we identified DB818, DB1055, DB884, DB1879 and DB2529 as strong inhibitors of HOXA9/DNA binding using both an ELISA-derived DNA binding inhibition assay (Figure 1A) and EMSA with more than 90% inhibition at 2.5 µM (Figure 1B-C). Those compounds also strongly stabilize the DNA helix based on DNA melting temperature results (Figure 2A). DB818, DB1055 and DB2529 were the most efficient compounds based on results obtained at the lower drug/DNA ratio (R=1:1). The recognition occurs through minor groove binding, as shown using circular dichroism (Figure 2B), and at the HOXA9 cognate DNA sequence as demonstrated using DNase I footprinting experiments (Figure 3). Using this latter experiment, DB818 and DB1055 appeared to be very active and selective compounds on binding to the HOXA9-binding site (HBS). We therefore selected DB818 and DB1055 as highly potent inhibitors that compete with HOXA9 for binding to its cognate sequence. DB818 and DB1055 were previously shown to interact with AT-rich DNA sequences[45] with binding KD values of 9 nM and 17 nM respectively. Our KD measurements obtained with the HBS-containing DNA sequence highlight stronger interaction with values of 4.6 and 6.2 nM, respectively (Figure 4). The binding of DB818 and DB1055 to HBS requires the presence of the 5'-ATTTA portion of HBS since mutation of the HBS site on this AT-rich site abolished binding of DB818 and DB1055 to the DNA. More precisely, the interaction of DB818 or DB1055 in the minor groove of DNA (Figure 2) is an interesting point regarding the mode of DNA binding of the HOXA9 transcription factor that implies the correct orientation of three alpha-helices of HOXA9 homeodomain. The HOXA9 helix-3 binds in the major groove of the DNA helix, whereas the amino-terminal part of its homeodomain deeply bound in the minor groove of the AT-rich portion of the HOXA9-binding site.[40] This interaction with the minor groove is associated with direct contact of Arg-5 with A2 on upper strand and T3 on lower strand of the HOXA9/DNA binding site (upper strand: 5'-$T_1A_2A_3A_4T_5$ / lower strand: 5'-$A_5T_4T_3T_2A_1$). Water-mediated additional contacts of Arg-5 with A3 of the upper strand, and water-mediated contacts of Arg-2 with both A4 and T5 on upper strand reinforce the DNA binding.[40] This AT-rich portion is the exact position where DB818 and DB1055 are lying in the minor groove, which allows them to block the correct positioning of HOXA9 homeodomain to its cognate site. HOXA9 binding to the DNA is associated with a DNA bending of ~20° resulting from minor groove compression in order to allow deep contacts of helix-3 to an enlarged major groove on the opposite side. Such DNA distortion towards the minor groove results from interaction of amino acids of the aminoterminal arm (Pro-7 and Tyr-8) with helix-1 of the homeodomain of HOXA9 (Thr-13). Binding of DB818 and DB1055 to the HOXA9 binding site may also not be compatible with minor groove compression by helix-3 binding in the major groove and may enhance HOXA9/DNAbinding inhibition by DB818/1055. At the cellular level, both DB818 and DB1055 control HOXA9-directed transcription based on luciferase gene expression assays (Figure 5B) and induce, among other derivatives, cell death, cell cycle arrest and cell differentiation in a model of Hoxa9-transformed murine MigA9 leukemia cell line (Tables 2-4, Figure 6 and Supplementary Figure S4).
Up to now, no direct HOXA9/DNA binding inhibitors have been discovered. Only indirect inhibition strategies have been developed. The first approach is by targeting proteins of the MLL complex that control HOXA9 gene expression. This is the case with inhibitors of DOT1L like EPZ-5676 (pinometostat, currently in a phase I clinical trial) that reduce HOXA9 gene expression and induce cell differentiation[55,56] or of the menin/MLL interaction[57,58]. The second approach is the targeting of the HOX/PBX interface of multiple HOX proteins with their cofactors of the PBX family by the HXR9 peptidomimetic developed against a variety of solid tumors and hematopoietic malignancies.[59]
Some other heterocyclic diamidines were previously identified as transcription factors inhibitors, DB293 against Pit-1 and Brn-3,[41] DB1255 against ERG[42,43] and DB2113 against PU.1[20,60] but none were previously evaluated against the HOXA9 transcription factor. Identification of DB818 and DB1055 as HOXA9/DNA binding competitors and inducers of

granulocyte/monocyte differentiation offers an exciting new opportunity to target the HOXA9 transcription factor. HOXA9 is one of the master regulators of the differentiation blockade in acute myeloid leukemia[26,27,30,34], being at the crossroads of many cell signaling perturbations resulting from well-characterized mutations or translocations defining AML subgroups such as for instance MLL translocations, MYST3-CREBBP or NUP98-NSD1 fusion proteins and NPM1or EZH2 mutations.[28,29] Therefore, treatment of such AML subtypes with DB818/DB1055 needs to be further evaluated in the future to offer new potential differentiation therapies. HOXA9 is also associated with different solid tumor models such as glioblastoma, gastric and prostate cancers[21–24] against which DB818, DB1055 and/or derivatives might also be evaluated to propose future therapeutic strategies. This DNA targeting approach to inhibit HOXA9/DNA binding and function is a very promising strategy with the potential to develop new anti-cancer treatments and particularly new differentiation therapies in leukemia.

Experimental Section

Chemistry

References for previously reported diamidines are provided in Supplementary Information. New compounds synthesis is described in result section and further detailed in supplementary information.

Biological Assays.

DNA and Proteins.

All oligonucleotides (Supplementary Table S1) were purchased from Eurogentec (Belgium). The pGL3-prom-HBS-1R, pGL3-prom-HBS-6R and pGL3-prom-HBSmut-6R reporter vectors were obtained by double digestion of the pGL3-promoter plasmid (Promega, France) at MluI and NheI (NEB, France) restriction sites localized 5' upstream to the SV40 minimal promoter, followed by ligation with phosphorylated double stranded oligonucleotides obtained from hybridization of FP-HBS-1Ra and FP-HBS-1Rb, Luc-HBS-6Ra and Luc-HBS-6Rb or Luc-HBSmut-6Ra andLuc-HBSmut-6Rb oligonucleotides. The pcDNA3-HOXA9 expression vector was a kind gift from Dr Nabeel B. Yaseen (Northwestern University, Chicago, USA).[49] A TY-tag was added in 5' to HOXA9 cDNA to be expressed in reticulocyte lysate system for ELISA-derived Protein/DNA Binding inhibition assay. The pCMV-AD-HOXA9 expression vector used for luciferase assays was constructed by subcloning HOXA9 cDNA from pRc/CMV-HOXA9 (a gift from Prof. Corey Largman†, University of California, San Francisco, USA) into the pCMV-AD vector (Stratagene, France) to fuse the NF-κB activation domain to HOXA9 protein in order to improve the transactivation capacity of HOXA9 in the absence of co-activators for luciferase assays.

ELISA-derived Protein/DNA Binding inhibition assay (EPDBi)

The 96-wells screening procedure was performed essentially as described[42] with the following modifications. Streptavidin coated 96-wells plates (ThermoFicher, France) were blocked for 1h at room temperature in 200µL of blocking solution of TBS-T (Tris-HCl 10mM pH 8.0, NaCl 150mM, Tween 0.5%) supplemented with 10% skimmed milk powder. After three 5min washes at room temperature with TBS-T, 20nM of double stranded biotinylated HOXA9-binding site containing oligonucleotides (Supplementary Table S1) were immobilized per well for 20min at room temperature in 100µL of binding buffer (Tris-HCl 10mM pH7.5, EDTA 1mM pH7.5, NaCl 50mM, DTT 1mM, BSA 10µg/µL, Glycerol 6%) with or without 5 or 10µM of the tested diamidine compounds. After two 5 min washes at room temperature with 200µL of binding buffer, 40µL of binding buffer containing HOXA9 proteins expressed from reticulocyte lysate system (Promega, Madison, Wisconsin, USA) (2µL of lysate) were incubated for 1H at room temperature with or without 50- or 100-fold excess of non-biotinylated oligonucleotides of the same HBS-containing sequence or a non-specific sequence. The unbound proteins were removedby three successive washes with the binding buffer. The HOXA9/DNA complex was revealed by addition of 85ng of a mouse anti-TY1-tag antibody (C1520054, Diagenode, Belgium) in TBS-T for 1H at room temperature followed by three washing steps and addition of a 1/2000 dilution of a secondary sheep HRP-conjugated anti-mouse antibody (NXA931, GE Healthcare, France). After three 5min washes with 200µL of TBS-T, 50µL of TMB (Promega, Madison, Wisconsin, USA) were added for 7min at room temperature. The reaction was stopped by addition of 50µL of 0.5M H2SO4 and the absorbance was measured at 450nm on a microplate spectrometer (Spectramax-I3, Molecular Devices). All collected data were analyzed using SoftMax Pro software.

Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)

The HBS double-strand oligonucleotide (Supplementary Table S1) was radiolabeled at 5'-end as described previously.[41] The binding experiments were performed as previously reported41 with some modifications. Briefly, 2µL of HOXA9 protein-expressing reticulocyte lysates (TNT. coupled reticulocyte lysate system, Promega, Madison, Wisconsin, USA) were incubated 20min at 4°C in binding buffer with the radio-labeled HBS-containing DNA and diamidine compounds at 0.5, 1, 2.5 or 5µM. Free DNA was separated from protein-DNA complexes on a 6% native polyacrylamide gel under electrophoresis for 3H at 300V in 0.5X TBE buffer. Gels revelations were performed using a Pharos-PMI equipment (BioRad) and analyzed with the ImageQuant-3.3 software.

Circular dichroism (CD) and DNA thermal melting assay

CD spectra and DNA melting temperature studies were performed using double stranded oligonucleotides of various DNA sequences in the absence or presence of diamidine compounds essentially as previously reported,[61] with the following modifications. Double stranded oligonucleotides were obtained by equimolar hybridization of the corresponding -a and -b strands (Supplementary Table S1). For CD analysis, 5µM of double stranded HBS oligonucleotide was incubated in TNE buffer (50mM Tris-HCl pH7.4 + 100mM NaCl + 1mM EDTA) and CD spectra were collected in a quartz cell of 10mm path length as an average of three accumulations from 480 to 230nm using a J-810 Jasco spectropolarimeter at a controlled temperature of 25°C fixed by a PTC-424S/L peltier type cell changer (Jasco) as described previously[62]. DB818, DB1055 and DB828 (1, 2, 3, 4, 5, 6, 8 and 10 µM) were gradually added to the DNA sample separately and CD was measured at each drug/DNA ratio. For

Tm measurements, indicated compounds and oligonucleotides were mixed in TNE buffer at drug/DNA ratio R of 1:1 or 2:1 as indicated. The DNA absorbance at 260nm was measured in quartz cells using an Uvikon XL spectrophotometer thermostated with a peltier cryostat every min over a range of 15 to 100ÅãC with an increment of 1ÅãC/min. The Tm values were deduced from the midpoint of the hyperchromic transition obtained from first-derivative plots. The variation of melting temperature (dTm) were obtained by subtracting the melting temperature measurement of CT-DNA alone (control Tm) to that obtained with DNA incubated with the compounds (dTm values = Tm[compound + DNA] - Tm[DNA alone]).

DNase I Footprint Assay

The pGL3-prom-HBS-1R plasmid was digested by ClaI and BglII restriction enzymes and radiolabelled at 3' termini with [α-^{32}P]-dATP (PerkinElmer, France). DNase I digestion and electrophoretic separation were performed as reported.[63] The DNA sequence was deduced from guanine positions cleaved upon DMS and piperidine treatment (G-track). The gels were exposedto storage screen for the appropriated delay at room temperature. The results were collected using Pharos-PMI equipment (BioRad).

Surface Plasmon Resonance (SPR)

SPR measurements were performed with four-channel Biacore T200 optical biosensor systems (GE Healthcare, Inc., Piscataway, NJ). A streptavidin-derivatized (SA) sensor chip was prepared for use by conditioning with a series of 60s injections of 1M NaCl in 50mM NaOH (activation buffer) followed by extensive washing with HBS buffer [10mM HEPES, 150mM NaCl, 3mM EDTA, and 0.05% P20 (pH7.4)]. Biotinylated HP-HBS and HP-HBS-ATm (Supplementary Table1) DNA hairpins (25-50nM) were prepared in HBS buffer and immobilized on the flow cell surface by noncovalent capture as previously described.[64,65] Flow cell 1 was left blank as a reference, while flow cells 2-4 were immobilized with DNA by manual injection of DNA stock solutions (flow rate of 1 µL/min) until the desired amount of DNA response units (RU) was obtained (320−330 RU). Ligand solutions were prepared with degassed and filtered 50 mM Tris- HCl buffer pH 7.42 by serial dilutions from a concentrated stock solution. Typically, a series of different ligand concentrations (from 1 nM to 1 µM) were injected over the DNA sensor chip at a flow rate of 100µL/min until a constant steady-state response was obtained (3min), and this was followed by buffer flow for ligand dissociation (10-20 min). After each cycle, the sensor chip surface was regenerated with a 10 mM glycine solution at pH 2.5 for 30s followed by multiple buffer injections to yield a stable baseline for the following cycles. RUobs was plotted as a function of free ligand concentration (Cfree), and the equilibrium binding constants (KA) were determined either with a one-site binding model (K2=0) for DB818 or with a two-site model for DB1055 (due to some non-specific interactions), where r represents the moles of bound compound per mol of DNA hairpin duplex and K1 and K2 are macroscopic binding constants. r = (K1•Cfree + 2K1•K2•Cfree2)/(1 + K1•Cfree + K1•K2•Cfree2) (1) RUmax in the equation was used as a fitting parameter, and the obtained value was compared to the predicted maximal response per bound ligand to independently evaluate the stoichiometry.[92] One-site binding models have been applied for DB818 with HP-HBS and HPHBS- ATm DNA and also for DB1055 with HP-HBS-ATm DNA. Due to some non-specific interactions, two-site interaction model has been applied for DB1055 with HP-HBS DNA. Kinetic analyses were performed by globally fitting the binding results for the entire concentration series using a standard 1:1 kinetic model with integrated mass transport-limited binding parameters as described previously.[65]

Cellular distribution of the compounds using fluorescence microscopy

GFP-expressing MigA9 suspension cells (2x105) were treated with the indicated compounds at 20 µM during 2h and allowed to attach onto poly-L-lysine-coated coverslips overnight prior to fixation with formaldehyde 4%. Nuclear compartment was stained through DNA binding of TOPRO- 3 iodide (1 mM, Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific, USA) or propidium iodide (10µg/mL, Sigma-Aldrich, USA) supplemented with RNase A (300µg/mL, Sigma-Aldrich, USA) for 30min in the dark at room temperature. Coverslips were mounted with a drop of antifade medium. Adherent human colon carcinoma HT-29 cells were treated with 5µM of the indicated compounds for 16H and fixed with 2% paraformaldehyde prior to addition of 75nM of DiOC6 and 1µg/mL of PI supplemented with RNaseA. Based on the intrinsic fluorescence of evaluated compounds, images were acquired either on a confocal inverted LSM880 microscope (Carl Zeiss microscopy, Zeiss GmbH, Germany) or on a wide field fluorescence inverted DMi8 (Leica Microsystems, Germany) microscope, both with a x63 objective. Excitation and emission wavelengths are indicated in the legends.

Transient transfections

The K562 cell line was used as an HOXA9-negative leukemia cell model that has strong potency for transfection (AMAXA V-kit system, Lonza). K562 cells (2x106) were pre-cultured overnight in RPMI-1640 supplemented with GlutaMAX™-I (Gibco) and mixed with 2µg of the expression vector (pCMVAD-HOXA9 or pCMVAD as control), reporter vector (pGL3-Prom-HBS-6R, pGL3-Prom-HBSmut-6R or pGL3-Prom as control) and vectors for validation/normalizing of transfection efficiency pmaxGFP™ (0.5µg) and pCDNA4-βgal (0.5µg) in 100µL of BufferV to then be electroporated using a Amaxa™ Nucleofactor™ as recommended by the provider (Nucleofector. kit V, LONZA, France). Each transfected cell sample was recovered in 4mL of complete RPMI-media to be split in two equal amounts (1x106 cells) in 12-wells plates. After 6H, compounds were added at 20µM in one of them whereas the other one received vehicle (deionized H2O). After 48H, cells were rinsed with PBS and lysed under non-denaturing conditions 20min at 4ÅãC with 0.5mL of Lysis passive Buffer 5X (Promega, Madison, Wisconsin, USA) and supernatant was recovered after a 15min centrifugation at 13000g. For β-galactosidase activity, 200µL of luminescent β-galactosidase detection kit-II (Clontech, France) were added to 25µL of supernatant. The fluorescence of GFP protein was detected using a 96-well fluorimeter at λexcitation = 485nm and λemission = 535nm. The luciferase activity was finally measured using the Luciferase assay system (Promega, Madison, Wisconsin, USA) according to manual recommendations. All data were collected using a Mithras LB940 (Berthold).

DNA microarray analysis
MigA9 cells (2x106) were treated in presence and absence of 5µM of DB818 in duplicates for 6, 12 or 24H treatments. Total RNA was then purified with RNAeasy kit from Qiagen including DNAseI treatment and the duplicates were pooled. Mouse Whole Genome Agilent 44K 60-mer oligonucleotide Microarrays were performed according to the Two-Color Microarray-Based Gene Expression protocol (Agilent Technologies). Microarrays were scanned using the Agilent scanner G2505B. The expression data were extracted by Feature Extraction and processed with Limma R package,66 combining the three data points (6, 12 and 24H) for normalization, filtering, and statistical analysis. The genes commonly up-regulated or down-regulated with adjusted pvalues< 0.05 and with |FoldChange|≥1.5 at 6, 12 and 24H were further analyzed with GSEA and Ingenuity Pathway Analysis softwares.

qRT-PCR
MigA9 cells were treated in presence and absence of 5 and 10 µM of DB818, DB1055 and DB828 at n=6 per condition for 48H treatments prior to the purification of total RNA. RNAs were reverse-transcribed with High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems™, ThermoFisher, USA) to generate the corresponding cDNAs and amplified using qPCR primer sequences as presented in Supplementary Table S1. Specificity and efficacy of the primers were addressed. PCR amplification was performed in duplicate using 200nM of oligonucleotide primers and SYBR Green PCR Master Mix reagent (ThermoFisher Scientific, USA) following the manufacturer's instructions on a StepOnePlus apparatus using StepOneTM Real-Time PCR software (Applied Biosystems™, ThermoFisher, USA). The mRNA levels of each target gene were normalized relatively to the mouse housekeeping gene Gapdh quantified for each sample. The relative expression ratio was calculated using the delta-delta-Ct method.

Cell survival
For the MTS assay, MigA9 cells were seeded into 96-well plates at a density of 1.5Å~104/well in 100µL of complete medium and treated with DB818, DB1055 or DB828 compounds at 0.1 to 50µM or the corresponding control vehicle for 72H before analysis using CellTiter 96.AQueous One Solution Cell Proliferation Assay kit following the manufacturer's instruction. The absorbance was detected at 490nm with a Microplate Reader (Spectramax, Molecular Devices). Measurements were performed in duplicates or triplicates and repeated at least three times.

Cell death and cell cycle analysis using flow cytometry
MigA9 cells (105 cells/mL) were treated for 24 and/or 48H with various diamidine compounds at the mentioned concentrations, in triplicate. For propidium iodide-positive cell labeling, 2.5x104 treated cells were stained by propidium iodide (P4170, Sigma Aldrich, USA, 5µg/mL). Cells were analyzed by flow cytometry using LSR-Fortessa X20 (BD Biosciences) and data were analyzed using FlowJo software (BD Biosciences). For cell cycle analysis, 106 cells were first treated with 10 µM EdU for 1 hour using Click-iT. EdU Flow Cytometry Assay Kit (Molecular probes) prior to fixation using cold 70% ethanol followed by addition of propidium iodide at 50 µg/mL in the presence of RNaseA 100µg/mL for 30 min. Cell cycle was acquired by flow cytometry using CyAn-ADP (Beckman Coulter, USA) and data were analyzed using Summit software (Beckman Coulter, USA).

Colony-forming assays
Murine MigA9 or human K562 cell line (1000 cells/well of 6-wells plates) were mixed with 1mL of complete M3434 (murine) or H4535 (human) Colony-Forming Cell Assays MethoCult. (Stemcell Technologies, France) in the presence or absence of 2.5µM of the mentioned compounds in duplicates and plated in 6-wells plates for 10 days. Full wells were then photographed under visible light and clones were quantified as individual clones for K562 and murine cell lines. For MigA9 cell line, representative clones were photographed under visible light or for intrinsic compound fluorescence using an inverted fluorescence microscope with an excitation wavelength/bandpath of 350/50nm and an emission wavelength/bandpath of 460/50nm with a dry X5 objective and the individual clones were further identified as CFU-GM, CFU-M CFU-G or BFU-E based on morphological criteria as presented by the supplier.

Statistics
Student unpaired t-tests were performed using Prism Software 7.0 (GraphPad, La Jolla, CA, USA).

Author Contributions
The manuscript was written through contributions of all authors. All authors have given approval to the final version of the manuscript. ‡ These authors contributed equally.

Funding Sources
This work is supported by the Ligue contre le Cancer-Septentrion (Comit. du Nord, Comit. du Pas-de-Calais), the Association Laurette Fugain [ALF-2009/06, ALF-2016/05], the Association pour la Recherche sur le Cancer [ARC-SFI20111203669], the FEDER-R.gion Nord-Pas-de- Calais and the Institut pour la Recherche sur le Cancer de Lille (IRCL) to M.-H.D.-C, and by the National Institutes of Health [GM111749 to W.D.W and D.W.B].

Notes
This work is dedicated to Dr Jean-Pierre Kerckaert who generated transcriptomic data (Agilent platform of the University of Lille) and to Prof. Corey Largman who kindly provided MigA9 cells.

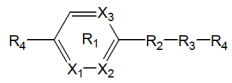
ACKNOWLEDGMENT
M.L. thanks the University of Lille, the French Research Ministry and the French Hematological Society (SFH), S.J. thanks the ARC Foundation, P.P. and R.N. thanks the IRCL, for their respective PhD fellowships. M.H.-D.C. thanks Dr Nabeel Yaseen (Northwestern University, Chicago, USA) for the kind gift of pcDNA3-HOXA9 expressing vector, Dr Samuel Meignan (Centre Oscar Lambret, Lille) for access to the confocal inverted LSM880 microscope and the University of Lille, for access to the Pharos-PMI phosphorimaging equipment.

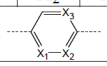
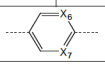
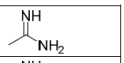
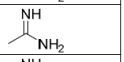
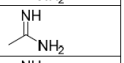
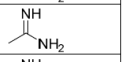
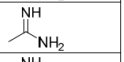
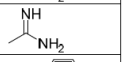
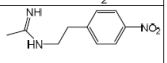
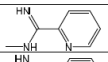
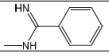
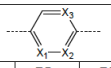
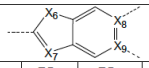
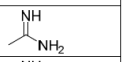
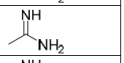
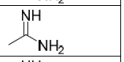
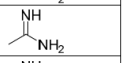
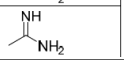
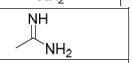
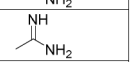
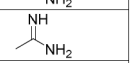
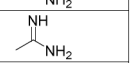
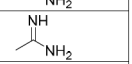
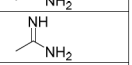
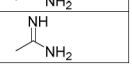
References

(1) Bouhlel, M. A.; Lambert, M.; David-Cordonnier, M.-H. Targeting Transcription Factor Binding to DNA by Competing with DNA Binders as an Approach for Controlling Gene Expression. Curr. Top. Med. Chem. 2015, 15 (14), 1323–1358.
(2) Hagenbuchner, J.; Ausserlechner, M. J. Targeting Transcription Factors by Small Compounds—Current Strategies and Future Implications. Biochem. Pharmacol. 2016, 107, 1–13.
(3) Portugal, J.; Barcel., F. Noncovalent Binding to DNA: Still a Target in Developing Anticancer Agents. Curr. Med. Chem. 2016, 23 (36), 4108–4134.
(4) Lambert, M.; Jambon, S.; Depauw, S.; David-Cordonnier, M.-H. Targeting Transcription Factors for Cancer Treatment. Molecules 2018, 23, 1479.
(5) Lo-Coco, F.; Cicconi, L. History of Acute Promyelocytic Leukemia: A Tale of Endless Revolution. Mediterr. J. Hematol. Infect. Dis. 2011, 3 (1), e2011067.
(6) Dang, C. V.; Reddy, E. P.; Shokat, K. M.; Soucek, L. Drugging the "undruggable" Cancer Targets. Nat. Rev. Cancer 2017, 17 (8), 502–508.
(7) Tisato, V.; Voltan, R.; Gonelli, A.; Secchiero, P.; Zauli, G. MDM2/X Inhibitors under Clinical Evaluation: Perspectives for the Management of Hematological Malignancies and Pediatric Cancer. J. Hematol. Oncol. 2017, 10 (1), 133.
(8) Leeman-Neill, R. J.; Bhagat, G. BCL6 as a Therapeutic Target for Lymphoma. Expert Opin. Ther. Targets 2018, 22 (2), 143–152.
(9) Furtek, S. L.; Backos, D. S.; Matheson, C. J.; Reigan, P. Strategies and Approaches of Targeting STAT3 for Cancer Treatment. ACS Chem. Biol. 2016, 11 (2), 308–318.
(10) Liu-Chittenden, Y.; Huang, B.; Shim, J. S.; Chen, Q.; Lee, S. J.; Anders, R. A.; Liu, J. O.; Pan, D. Genetic and Pharmacological Disruption of the TEAD-YAP Complex Suppresses the Oncogenic Activity of YAP. Genes Dev. 2012, 26 (12), 1300–1305.
(11) Gibault, F.; Bailly, F.; Corvaisier, M.; Coevoet, M.; Huet, G.; Melnyk, P.; Cotelle, P. Molecular Features of the YAP Inhibitor Verteporfin: Synthesis of Hexasubstituted Dipyrrins as Potential Inhibitors of YAP/TAZ, the Downstream Effectors of the Hippo Pathway. ChemMedChem 2017, 12 (12), 954–961.
(12) Kim, Y.-M.; Gang, E.-J.; Kahn, M. CBP/Catenin Antagonists: Targeting LSCs' Achilles Heel. Exp. Hematol. 2017, 52, 1–11.
(13) Grimley, E.; Liao, C.; Ranghini, E. J.; Nikolovska-Coleska, Z.; Dressler, G. R. Inhibition of Pax2 Transcription Activation with a Small Molecule That Targets the DNA Binding Domain. ACS Chem. Biol. 2017, 12 (3), 724–734.
(14) Leung, C. H.; Chan, D. S. H.; Ma, V. P. Y.; Ma, D. L. DNA-Binding Small Molecules as Inhibitors of Transcription Factors. Med. Res. Rev. 2013, 33 (4), 823–846.
(15) Fontaine, F.; Overman, J.; Fran.ois, M. Pharmacological Manipulation of Transcription Factor Protein-Protein Interactions: Opportunities and Obstacles. Cell Regen. (London, England) 2015, 4 (1), 2.
(16) Blume, S. W.; Snyder, R. C.; Ray, R.; Thomas, S.; Koller, C. A.; Miller, D. M. Mithramycin Inhibits SP1 Binding and Selectively Inhibits Transcriptional Activity of the Dihydrofolate Reductase Gene in Vitro and in Vivo. J. Clin. Invest. 1991, 88 (5), 1613–1621.
(17) 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.; et al. Identification of an Inhibitor of the EWS-FLI1 Oncogenic Transcription Factor by High-Throughput Screening. J. Natl. Cancer Inst. 2011, 103 (12), 962–978.
(18) Grohar, P. J.; Glod, J.; Peer, C. J.; Sissung, T. M.; Arnaldez, F. I.; Long, L.; Figg, W. D.; Whitcomb, P.; Helman, L. J.; Widemann, B. C. A Phase I/II Trial and Pharmacokinetic Study of Mithramycin in Children and Adults with Refractory Ewing Sarcoma and EWS– FLI1 Fusion Transcript. Cancer Chemother. Pharmacol. 2017, 80 (3), 645–652.
(19) Morita, K.; Suzuki, K.; Maeda, S.; Matsuo, A.; Mitsuda, Y.; Tokushige, C.; Kashiwazaki, G.; Taniguchi, J.; Maeda, R.; Noura, M.; et al. Genetic Regulation of the RUNX Transcription Factor Family Has Antitumor Effects. J. Clin. Invest. 2017, 127 (7), 2815– 2828.
(20) Antony-Debré, I.; Paul, A.; Leite, J.; Mitchell, K.; Kim, H. M.; Carvajal, L. A.; Todorova, T. I.; Huang, K.; Kumar, A.; Farahat, A. A.; et al. Pharmacological Inhibition of the Transcription Factor PU.1 in Leukemia. J. Clin. Invest. 2017, 127 (12), 4297–4313.
(21) Shah, N.; Sukumar, S. The Hox Genes and Their Roles in Oncogenesis. Nat. Rev. Cancer 2010, 10 (5), 361–371.
(22) Gon.alves, C. S.; Xavier-Magalh.es, A.; Pojo, M.; Oliveira, A. I.; Correia, S.; Reis, R. M.; Sousa, N.; Rocha, M.; Costa, B. M. Transcriptional Profiling of HOXA9-Regulated Genes in Human Glioblastoma Cell Models. Genomics Data 2015, 5, 54–58.
(23) Pires-Lu.s, A. S.; Costa-Pinheiro, P.; Ferreira, M. J.; Antunes, L.; Lobo, F.; Oliveira, J.; Henrique, R.; Jer.nimo, C. Identification of Clear Cell Renal Cell Carcinoma and Oncocytoma Using a Three-Gene Promoter Methylation Panel. J. Transl. Med. 2017, 15 (1).
(24) Malek, R.; Gajula, R. P.; Williams, R. D.; Nghiem, B.; Simons, B. W.; Nugent, K.; Wang, H.; Taparra, K.; Lemtiri-Chlieh, G.; Yoon, A. R.; et al. TWIST1-WDR5-Hottip Regulates Hoxa9 Chromatin to Facilitate Prostate Cancer Metastasis. Cancer Res. 2017, 77 (12), 3181–3193.
(25) Ma, Y.; Zhang, Y.; Mou, X.; Liu, Z.; Ru, G.; Li, E. High Level of Homeobox A9 and PBX Homeobox 3 Expression in Gastric Cancer Correlates with Poor Prognosis. Oncol. Lett. 2017, 14 (5), 5883–5889.

(26) Vijapurkar, U.; Fischbach, N.; Shen, W.; Brandts, C.; Stokoe, D.; Lawrence, H. J.; Largman, C. Protein Kinase C-Mediated Phosphorylation of the Leukemia-Associated HOXA9 Protein Impairs Its DNA Binding Ability and Induces Myeloid Differentiation. Mol. Cell. Biol. 2004, 24 (9), 3827–3837.
(27) Faber, J.; Krivtsov, A. V.; Stubbs, M. C.; Wright, R.; Davis, T. N.; Van Heuvel-Eibrink, M. Den; Zwaan, C. M.; Kung, A. L.; Armstrong, S. A. HOXA9 Is Required for Survival in Human MLL-Rearranged Acute Leukemias. Blood 2009, 113 (11), 2375–2385.
(28) Collins, C. T.; Hess, J. L. Role of HOXA9 in Leukemia: Dysregulation, Cofactors and Essential Targets. Oncogene 2016, 35 (9), 1090–1098.
(29) Collins, C. T.; Hess, J. L. Deregulation of the HOXA9/MEIS1 Axis in Acute Leukemia. Curr. Opin. Hematol. 2016, 23 (4), 354–361.
(30) Chen, S.; Yu, J.; Lv, X.; Zhang, L. HOXA9 Is Critical in the Proliferation, Differentiation, and Malignancy of Leukaemia Cells Both in Vitro and in Vivo. Cell Biochem. Funct. 2017, 35 (7), 433–440.
(31) Xu, H.; Valerio, D. G.; Eisold, M. E.; Sinha, A.; Koche, R. P.; Hu, W.; Chen, C. W.; Chu, S. H.; Brien, G. L.; Park, C. Y.; et al. NUP98 Fusion Proteins Interact with the NSL and MLL1 Complexes to Drive Leukemogenesis. Cancer Cell 2016, 30 (6), 863–878.
(32) Rio-Machin, A.; G.mez-L.pez, G.; Mu.oz, J.; Garcia-Martinez, F.; Maiques-Diaz, A.; Alvarez, S.; Salgado, R. N.; Shrestha, M.; Torres-Ruiz, R.; Haferlach, C.; et al. The Molecular Pathogenesis of the NUP98-HOXA9 Fusion Protein in Acute Myeloid Leukemia. Leukemia 2017, 31 (9), 2000–2005.
(33) Borrow, J.; Shearman, A. M.; Stanton, V. P.; Becher, R.; Collins, T.; Williams, A. J.; Dub., I.; Katz, F.; Kwong, Y. L.; Morris, C.; et al. The t(7;11)(P15;P15) Translocation in Acute Myeloid Leukaemia Fuses the Genes for Nucleoporin NUP98 and Class I Homeoprotein HOXA9. Nat. Genet. 1996, 12 (2), 159–167.
(34) Tan, L.; Xu, H.; Chen, G.; Wei, X.; Yu, B.; Ye, J.; Xu, L.; Tan, H. Silencing of HMGA2 Reverses Retardance of Cell Differentiation in Human Myeloid Leukaemia. Br. J. Cancer 2018, 118 (3), 405–415.
(35) Calvo, K. R.; Sykes, D. B.; Pasillas, M.; Kamps, M. P. Hoxa9 Immortalizes a Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor-Dependent Promyelocyte Capable of Biphenotypic Differentiation to Neutrophils or Macrophages, Independent of Enforced Meis Expression. Mol. Cell. Biol. 2000, 20 (9), 3274–3285.
(36) Hu, Y. L.; Passegu., E.; Fong, S.; Largman, C.; Lawrence, H. J. Evidence That the Pim1 Kinase Gene Is a Direct Target of HOXA9. Blood 2007, 109 (11), 4732–4738.
(37) Breitinger, C.; Maethner, E.; Garcia-Cuellar, M. P.; Slany, R. K. The Homeodomain Region Controls the Phenotype of HOX-Induced Murine Leukemia. Blood 2012, 120 (19), 4018–4027.
(38) Ng, S. W. K.; Mitchell, A.; Kennedy, J. A.; Chen, W. C.; McLeod, J.; Ibrahimova, N.; Arruda, A.; Popescu, A.; Gupta, V.; Schimmer, A. D.; et al. A 17-Gene Stemness Score for Rapid Determination of Risk in Acute Leukaemia. Nature 2016, 540 (7633), 433–437.
(39) Huang, Y.; Sitwala, K.; Bronstein, J.; Sanders, D.; Dandekar, M.; Collins, C.; Robertson, G.; MacDonald, J.; Cezard, T.; Bilenky, M.; et al. Identification and Characterization of Hoxa9 Binding Sites in Hematopoietic Cells. Blood 2012, 119 (2), 388–398.
(40) LaRonde-LeBlanc, N. A.; Wolberger, C. Structure of HoxA9 and Pbx1 Bound to DNA: Hox Hexapeptide and DNA Recognition Anterior to Posterior. Genes Dev. 2003, 17 (16), 2060–2072.
(41) Peixoto, P.; Liu, Y.; Depauw, S.; Hildebrand, M. P.; Boykin, D. W.; Bailly, C.; Wilson, W. D.; David-Cordonnier, M. H. 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. 2008, 36 (10), 3341–3353.
(42) Nhili, R.; Peixoto, P.; Depauw, S.; Flajollet, S.; Dezitter, X.; Munde, M. M.; Ismail, M. A.; Kumar, A.; Farahat, A. A.; Stephens, C. E.; et al. Targeting the DNA-Binding Activity of the Human ERG Transcription Factor Using New Heterocyclic Dithiophene Diamidines. Nucleic Acids Res. 2013, 41 (1), 125–138.
(43) Munde, M.; Kumar, A.; Peixoto, P.; Depauw, S.; Ismail, M. A.; Farahat, A. A.; Paul, A.; Say, M. V.; David-Cordonnier, M. H.; Boykin, D. W.; et al. The Unusual Monomer Recognition of Guanine-Containing Mixed Sequence DNA by a Dithiophene Heterocyclic Diamidine. Biochemistry 2014, 53 (7), 1218–1227.
(44) 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.; et al. DNA Minor Groove Induced Dimerization of Heterocyclic Cations: Compound Structure, Binding Affinity, and Specificity for a TTAA Site. J. Mol. Biol. 2010, 402 (5), 847–864.
(45) Liu, Y.; Kumar, A.; Depauw, S.; Nhili, R.; David-Cordonnier, M. H.; Lee, M. P.; Ismail, M. A.; Farahat, A. A.; Say, M.; Chackal-Catoen, S.; et al. Water-Mediated Binding of Agents That Target the DNA Minor Groove. J. Am. Chem. Soc. 2011, 133 (26), 10171– 10183.
(46) Mallena, S.; Lee, M. P. H.; Bailly, C.; Neidle, S.; Kumar, A.; Boykin, D. W.; Wilson, W. D. Thiophene-Based Diamidine Forms a “Super” AT Binding Minor Groove Agent. J. Am. Chem. Soc. 2004, 126 (42), 13659–13669.
(47) Sheng, J.; Gan, J.; Huang, Z. Structure-Based DNA-Targeting Strategies with Small Molecule Ligands for Drug Discovery. Med. Res. Rev. 2013, 33 (5), 1119–1173.
(48) Lansiaux, A.; Tanious, F.; Mishal, Z.; Dassonneville, L.; Kumar, A.; Stephens, C. E.; Hu, Q.; Wilson, W. D.; Boykin, D. W.; Bailly, C. Distribution of Furamidine Analogues in Tumor Cells: Targeting of the Nucleus or Mitochondria Depending on the Amidine Substitution. Cancer Res. 2002, 62 (24), 7219–7229.
(49) Ghannam, G.; Takeda, A.; Camarata, T.; Moore, M. A.; Viale, A.; Yaseen, N. R. The Oncogene Nup98-HOXA9 Induces Gene Transcription in Myeloid Cells. J. Biol. Chem. 2004, 279 (2), 866–875.
(50) Nagel, S.; Venturini, L.; Marquez, V. E.; Meyer, C.; Kaufmann, M.; Scherr, M.; MacLeod, R. A. F.; Drexler, H. G. Polycomb Repressor Complex 2 Regulates HOXA9 and HOXA10, Activating ID2 in NK/T-Cell Lines. Mol. Cancer 2010, 9, 151.

(51) Velu, C. S.; Chaubey, A.; Phelan, J. D.; Horman, S. R.; Wunderlich, M.; Guzman, M. L.; Jegga, A. G.; Zeleznik-Le, N. J.; Chen, J.; Mulloy, J. C.; et al. Therapeutic Antagonists of MicroRNAs Deplete Leukemia-Initiating Cell Activity. J. Clin. Invest. 2014, 124 (1), 222–236.
(52) Wu, J. J.; Cantor, A.; Moscinski, L. C. B2 Integrins Are Characteristically Absent in Acute Promyelocytic Leukemia and Rapidly Upregulated in Vivo upon Differentiation with All-Trans Retinoic Acid. Leuk. Res. 2007, 31 (1), 49–57.
(53) Fang, J.; Ying, H.; Mao, T.; Fang, Y.; Lu, Y.; Wang, H.; Zang, I.; Wang, Z.; Lin, Y.; Zhao, M.; et al. Upregulation of CD11b and CD86 through LSD1 Inhibition Promotes Myeloid Differentiation and Suppresses Cell Proliferation in Human Monocytic Leukemia Cells. Oncotarget 2017, 8 (49), 85085–85101.
(54) Jin, P.; Han, T. H.; Ren, J.; Saunders, S.; Wang, E.; Marincola, F. M.; Stroncek, D. F. Molecular Signatures of Maturing Dendritic Cells: Implications for Testing the Quality of Dendritic Cell Therapies. J. Transl. Med. 2010, 8, 4.
(55) 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.; et al. Selective Killing of Mixed Lineage Leukemia Cells by a Potent Small-Molecule DOT1L Inhibitor. Cancer Cell 2011, 20 (1), 53–65.
(56) Waters, N. J. Preclinical Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Pinometostat (EPZ- 5676), a First-in-Class, Small Molecule S-Adenosyl Methionine Competitive Inhibitor of DOT1L. Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet. 2017, 42 (6), 891–901.
(57) Shi, A.; Murai, M. J.; He, S.; Lund, G.; Hartley, T.; Purohit, T.; Reddy, G.; Chruszcz, M.; Grembecka, J.; Cierpicki, T. Structural Insights into Inhibition of the Bivalent Menin- MLL Interaction by Small Molecules in Leukemia. Blood 2012, 120 (23), 4461–4469.
(58) Xu, S.; Aguilar, A.; Xu, T.; Zheng, K.; Huang, L.; Stuckey, J.; Chinnaswamy, K.; Bernard, D.; Fern.ndez-Salas, E.; Liu, L.; et al. Design of the First-in-Class, Highly Potent Irreversible Inhibitor Targeting the Menin-MLL Protein–Protein Interaction. Angew. Chemie - Int. Ed. 2018, 57 (6), 1601–1605.
(59) Morgan, R.; El-Tanani, M.; Hunter, K. D.; Harrington, K. J.; Pandha, H. S. Targeting HOX/PBX Dimers in Cancer. Oncotarget 2015, 8 (19), 32322–32331.
(60) Munde, M.; Wang, S.; Kumar, A.; Stephens, C. E.; Farahat, A. A.; Boykin, D. W.; Wilson, W. D.; Poon, G. M. K. Structure-Dependent Inhibition of the ETS-FamilyTranscription Factor PU.1 by Novel Heterocyclic Diamidines. Nucleic Acids Res. 2014, 42 (2), 1379–1390.
(61) Racané, L.; Tralić-Kulenović, V.; Pavelić, S. K.; Ratkaj, I.; Peixoto, P.; Nhili, R.; Depauw, S.; Hildebrand, M. P.; David-Cordonnier, M. H.; Pavelić, K.; et al. Novel Diamidino-Substituted Derivatives of Phenyl Benzothiazolyl and Dibenzothiazolyl Furans and Thiophenes: Synthesis, Antiproliferative and DNA Binding Properties. J. Med. Chem. 2010, 53 (6), 2418–2432.
(62) Messaoudi, S.; Anizon, F.; L.once, S.; Pierr., A.; Pfeiffer, B.; Prudhomme, M. Synthesis and Cytotoxicities of 7-Aza Rebeccamycin Analogues Bearing Various Substituents on the Sugar Moiety, on the Imide Nitrogen and on the Carbazole Framework. Eur. J. Med. Chem. 2005, 40 (10), 961–971.
(63) Gros, C.; Fleury, L.; Nahoum, V.; Faux, C.; Valente, S.; Labella, D.; Cantagrel, F.; Rilova, E.; Bouhlel, M. A.; David-Cordonnier, M. H.; et al. New Insights on the Mechanism of Quinoline-Based DNA Methyltransferase Inhibitors. J. Biol. Chem. 2015, 290 (10), 6293–6302.
(64) Nguyen, B.; Tanious, F. A.; Wilson, W. D. Biosensor-Surface Plasmon Resonance: Quantitative Analysis of Small Molecule-Nucleic Acid Interactions. Methods 2007, 42 (2), 150–161.
(65) Nanjunda, R., Munde, M., Liu, Y. and Wilson, W. D. Real-Time Monitoring of Nucleid Acid Interactions with Biosensor-Surface Plasmon Resonance. In Methods for Studying Nucleic Acid/Drug Interactions; 2011; Vol. Chapter 4.
(66) Ritchie, M. E.; Phipson, B.; Wu, D.; Hu, Y.; Law, C. W.; Shi, W.; Smyth, G. K. Limma Powers Differential Expression Analyses for RNA-Sequencing and Microarray Studies. Nucleic Acids Res. 2015, 43 (7), e47.



Compound Name	R_1			R_2		R_3		R_4
	X_1	X_2	X_3	X_4	X_5	X_6	X_7	
R_2 as 5-member ring R_3 as 6-member ring								
DB75	CH	CH	CH	O	CH	CH	CH	
DB351	CH	CH	CH	S	CH	CH	CH	
DB262	CH	CH	CH	NH	CH	CH	CH	
DB1751	CH	CH	CH	Te	CH	CH	CH	
DB484	CH	CH	CH	O	N	CH	CH	
DB1620	CH	CH	CH	S	N	CH	CH	
DB421	CH	CH	CH	O	CH	CH	CH	
DB883	CH	CH	CH	NH	CH	CH	CH	
DB884	CH	CH	CH	NH	CH	CH	CH	
R_2 as 5-member ring R_3 as benzimidazole or derivative								R_4
	X_1	X_2	X_3	X_4	X_5	X_6	X_7	X_8	X_9	
DB293	CH	CH	CH	O	CH	NH	N	C-R_4	CH	
DB995	N	CH	CH	O	CH	NH	N	C-R_4	CH	
DB915	CH	N	CH	O	CH	NH	N	C-R_4	CH	
DB928	CH	C-OH	CH	O	CH	NH	N	C-R_4	CH	
DB850	CH	C-CH_3	CH	O	CH	NH	N	C-R_4	CH	
DB1478	CH	CH	CH	O	CH	NH	CH	CH	C-R_4	
DB1481	CH	N	CH	O	CH	NH	CH	CH	C-R_4	
DB1878	CH	CH	CH	O	CH	NH	CH	C-R_4	CH	
DB2005	CH	CH	CO-CH_3	O	CH	NH	CH	C-R_4	CH	
DB2430	CH	CH	CH	O	CH	N-CH_3	N	CH	C-R_4	
DB818	CH	CH	CH	S	CH	NH	N	C-R_4	CH	
DB2651	CH	CH	CH	S	N	NH	N	C-R_4	CH	

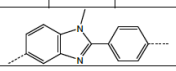
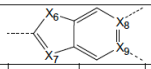
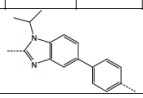
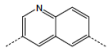
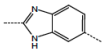
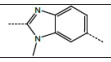
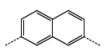
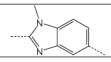
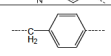
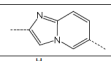
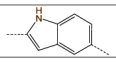
DB1879	CH	CH	CH	S	CH	NH	CH	C-R_4	CH	
DB2529	CH	N	CH	S	CH	NH	CH	C-R_4	CH	
DB2429	CH	CH	CH	S	CH	N-CH_3	N	CH	C-R_4	
DB2223	CH	CH	CH			NH	N	C-R_4	CH	
DB2572				S	CH	N-CH_3	N	CH	C-R_4	
R2 as 5-members ring R3 as Others										R_4
	X_1	X_2	X_3	X_4	X_5	X_6	X_7	X_8	X_9	
DB828	CH	CH	CH	O	CH	O	N	CH	C-R_4	
DB2708	CH	CH	CH	S	CH					
DB1504	CH	CH	CH	S	CH					
R_2 as 6-members ring R3 as Others						R_3				R_4
DB1055				CH	CH					
B911	CH	CH	CH							
DB1314	CH	CH	CH							
DB1175	CH	CH	CH							
DB1177	CH	CH	CH	CH	CH					
DB1210	CH	CH	CH							
DB1302	CH	CH	CH	CH	CH					
DB1263	CH	CH	CH	CH	CH					
DB877	CH	CH	CH	CH	CH					
DB1798	CH	CH	CH	CH	CH					

Table 1. Structures of the 39 evaluated diamidine derivatives.

Compound	MTS IC_{50} 72H (µM)	Conc. (µM)	% PI-positive cells 24H	% PI-positive cells 48H	% SubG1 48H
DB818	9.97 +/- 2.40	10	6.95 +/- 0.48	**29.40 +/- 3.29** $	**9.46 +/- 1.91** $
		15	**13.50 +/- 1.37** #	**64.03 +/- 3.25** $	**14.58 +/- 1.30** $
		20	**21.07 +/- 1.25** $	**75.53 +/- 0.60** $	**12.00 +/- 0.90** $
DB1055	14.09 +/- 1.69	15	3.87 +/- 0.03	5.72 +/- 0.06	1.27 +/- 0.20
		20	5.17 +/- 0.35	9.45 +/- 0.52	1.65 +/- 0.37
DB1878	6.34 +/- 1.41	10	8.72 +/- 0.35	**44.93 +/- 1.03** $	**15.94 +/- 1.80** $
		15	11.76 +/- 1.88	**52.73 +/-17.16** #	**27.88 +/- 16.14** *
DB1879	3.58 +/- 0.92	5	7.42 +/- 0.19	**77.87 +/- 0.32** $	**33.64 +/- 15.95** #
		10	**23.83 +/- 0.58** $	**98.17 +/- 0.20** $	na
DB2529	2.24 +/- 0.22	5	6.21 +/- 0.34	**39.40 +/-12.96** #	**4.48 +/- 0.95** †
		10	**13.57 +/- 1.19** #	**96.03 +/- 0.77** $	na
DB883	3.87 +/- 0.17	0.5	5.19 +/- 0.10	8.01 +/- 0.12	1.23 +/- 0.35
		1	**14.43 +/- 0.83** #	**17.60 +/- 1.06** $	1.04 +/- 0.35
DB884	2.14 +/- 0.26	0.5	**12.90 +/- 0.40** #	**18.33 +/- 0.77** $	**2.47 +/- 1.02** *
		1	**68.80 +/- 1.06** $	**99.33 +/- 0.15** $	na
DB1620	23.93 +/- 0.86	15	5.69 +/- 0.21	10.45 +/- 1.50	0.88 +/- 0.10
		20	5.91 +/- 0.15	**22.90 +/- 2.36** $	**1.71 +/- 0.06** †
DB2223	>50	15	8.64 +/- 0.42	6.48 +/- 0.11	0.65 +/- 0.10
		20	10.43 +/- 0.69	6.72 +/- 0.18	0.67 +/- 0.17
DB828	>50	15	8.89 +/- 0.32	7.32 +/- 0.03	0.95 +/- 0.18
		20	8.38 +/- 0.45	7.77 +/- 0.10	0.92 +/- 0.19
None		**Untreated**	9.06 +/- 0.53	8.75 +/- 0.23	0.76 +/- 0.16

Table 2. Cell survival and cell death. Cell survival is determined by using the MTS measurements (n>3) on the HOXA9-expressing murine MigA9 cell line. IC50 corresponds to the concentration of compound associated with the presence of 50% cell survival relatively to untreated controls, measured by using MTS reagent. “>50” means that IC50 was not reached, even at the maximum amount concentration of 50 µM used in the experiments. Cell death is established from PI-labeling of MigA9 living cells (PI-positive) or as sub-G1 population from PI-labeling of fixed MigA9 cells treated for 24 (PI-positive cells) or 48 hours (PI-positive cells and subG1 quantification) with the indicated concentrations of evaluated compounds. Results are expressed as mean values or mean percentage +/- s.e.m (n=3 to 7). Statistic, student t-test: *,p<0.05; #, p<0.01; †, p<0.001; $, p<0.0001; na, not applicable due to high proportion of dead cells.

Treatment		Cell Cycle		
Cpd	Conc. (µM)	G0/G1	S	G2/M
None	**Untreated**	48.77 +/- 0.19	46.68 +/- 0.21	4.55 +/- 0.16
DB818	10	50.38 +/- 0.77 *	35.42 +/- 1.57 $	**14.19 +/- 1.50** $
	15	58.30 +/- 3.71 #	**14.80 +/- 3.59** $	**26.90 +/- 1.96** $
	20	56.02 +/- 2.41 #	**9.25 +/- 2.09** $	**34.73 +/- 0.93** $
DB1055	15	**61.49 +/- 0.19** $	**34.13 +/- 0.93** $	4.38 +/- 0.20
	20	**70.98 +/- 0.90** $	**23.91 +/- 1.29** $	5.11 +/- 0.38
DB1878	10	**87.28 +/- 0.44** $	**8.02 +/- 0.24** $	4.70 +/- 0.58
	15	**85.95 +/- 5.39** $	**10.06 +/- 5.92** $	3.99 +/- 1.26
DB1879	5	**77.92 +/- 1.89** $	**9.15 +/- 2.81** $	**12.93 +/- 4.68** *
	10	na	na	na
DB2529	5	**67.95 +/- 1.78** $	**22.55 +/- 1.80** $	**9.50 +/- 0.09** $
	10	na	na	na
DB883	0.5	48.44 +/- 0.35	46.06 +/- 0.58	5.50 +/- 0.27 *
	1	50.15 +/- 0.19 *	43.51 +/- 0.95 #	6.34 +/- 0.23 †
DB884	0.5	53.83 +/- 1.07 $	38.84 +/- 1.18 $	**7.32 +/- 0.30** $
	1	na	na	na
DB1620	15	54.87 +/- 2.31 #	38.65 +/- 2.94 #	6.47 +/- 0.65 #
	20	**64.53 +/- 1.69** $	**27.33 +/- 1.99** $	**8.14 +/- 0.30** $
DB2223	15	52.29 +/- 0.63 $	43.65 +/- 0.65 †	4.06 +/- 0.33
	20	53.56 +/- 0.53 $	43.02 +/- 0.80 †	3.42 +/- 0.27 #
DB828	15	**58.66 +/- 0.38** $	37.22 +/- 0.54 $	4.12 +/- 0.22
	20	**62.21 +/- 0.20** $	33.86 +/- 0.22 $	3.93 +/- 0.11 *

Table 3. Cell cycle. HOXA9-expressing murine MigA9 cells were collected after 48 hours treatment with the indicated concentrations of evaluated compounds or control cells (n=3 to 6) and further analyzed by cytometry for cell cycle using EdU and PI staining on fixed cells. All results are expressed as mean percentage +/- s.e.m. Statistic, student t-test: *, p<0.05; #, p<0.01; †, p<0.001; $, p<0.0001; na, not applicable due to high proportion of dead cells (PI-positive cells, Table 2).

Colony assay	Type of colonies	CTR	DB818	DB1055	DB828
K562 Number	Total	445 +/- 28	448 +/- 17	467 +/- 12	nd
MigA9 Number (%)	Total	148 (100%)	101 (100%)	115 (100%)	170 (100%)
	CFU-GM	64 (43.2%)	**23 (22.8%)**	**0 (0%)**	90 (52.9%)
	CFU-G	49 (33.1%)	**55 (54.5%)**	**58 (50.4%)**	62 (36.5%)
	CFU-M	28 (18.9%)	20 (19.8%)	**55 (47.8%)**	16 (9.4%)
	BFU-E	7 (4.7%)	3 (3%)	2 (1.7%)	2 (1.2%)

Table 4. Anti-clonogenic activities. MigA9 cells (1000 cells/ well) were seeded in duplicates in complete M3434 Mouse Colony-Forming Cell Assays MethoCult. in the presence or absence (CTR) of 2.5µM of the indicated compounds and plated in 6-wells plates for 10 days prior to quantification of clones and further identification of the individual CFU-GM, CFU-M and CFUG colonies on morphological criteria. na: not applicable; nd: not determined. K562 cells (1000 cells/ well) were treated in the same conditions, plated on H4535 (human) Colony-Forming Cell Assays MethoCult. and counted (Mean +/- s.e.m). Data that are statistically different from the untreated control are presented in bold letters.

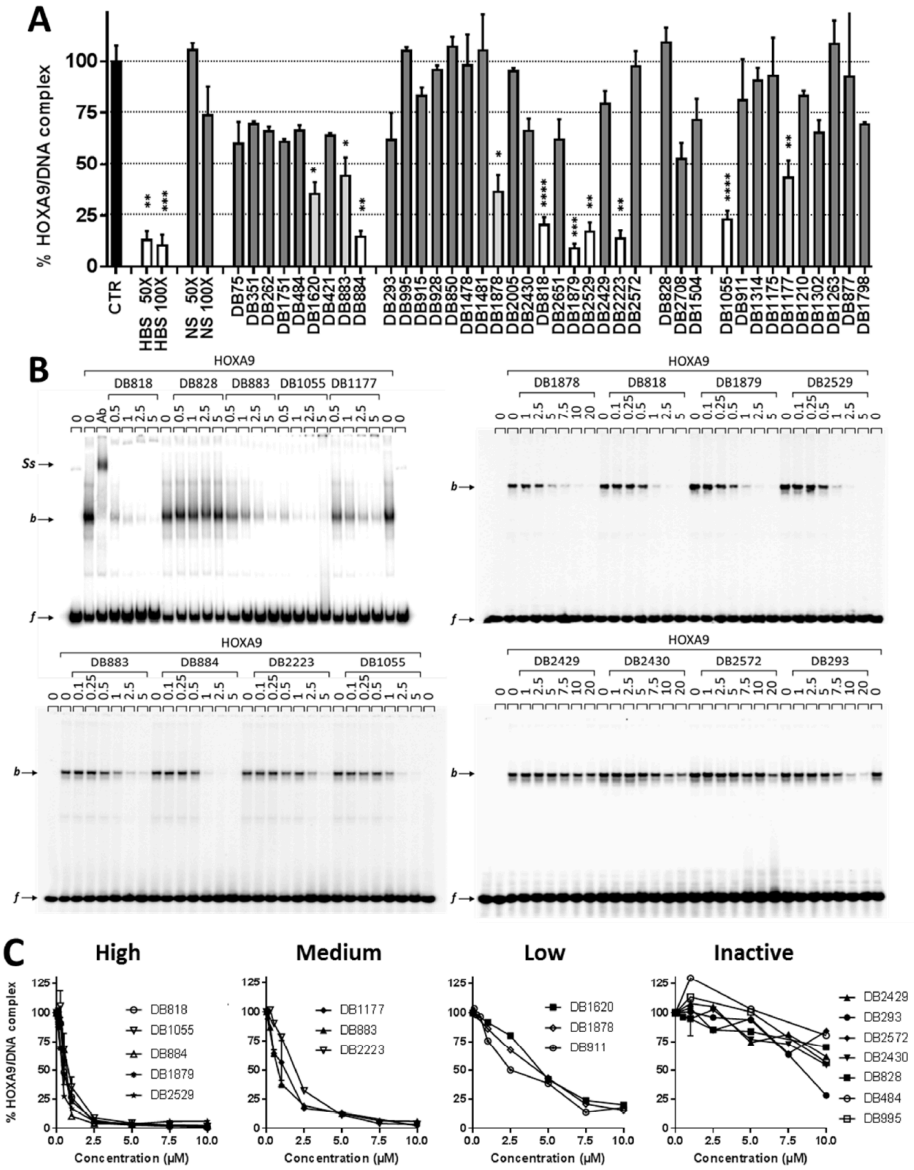


Figure 1. In vitro selection of DB818 and B1055 as HOXA9/DNA binding inhibitors.

A. ELISA-derived protein/DNA binding inhibition assay for selection of HOXA9/DNA binding inhibitors. HOXA9 protein was expressed from reticulocyte lysate and incubated with immobilized HBS-containing sequence (CTR). Free HBS or non-specific (NS) DNA at 50X or 100X the quantity of immobilized HBS oligonucleotide or the various indicated DB compounds (5 or 10µM) were then added. Graph represents mean +/- s.e.m. of up to 15 independent measurements.

B. Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) gel. 5'-end 32P-radiolabeled HBS DNA sequence ("f", free DNA) was incubated with reticulocyte lysate expressing HOXA9 protein ("HOXA9") to form a complex (bound "b") and in the presence HOXA9-directed antibody ("Ab") to generate a super-shifted ("Ss") DNA band, or in the presence of increasing concentrations of the indicated DB compounds (µM).

C. Quantitative analysis of the inhibition of HOXA9/DNA complex formation from EMSA defines sub-groups based on their HOXA9/DNA binding inhibition activity. The percentage of bound HOXA9/DNA complex was quantified from EMSA in panel B, relatively to the mean of the three control samples (100%) and plotted over drug concentration.

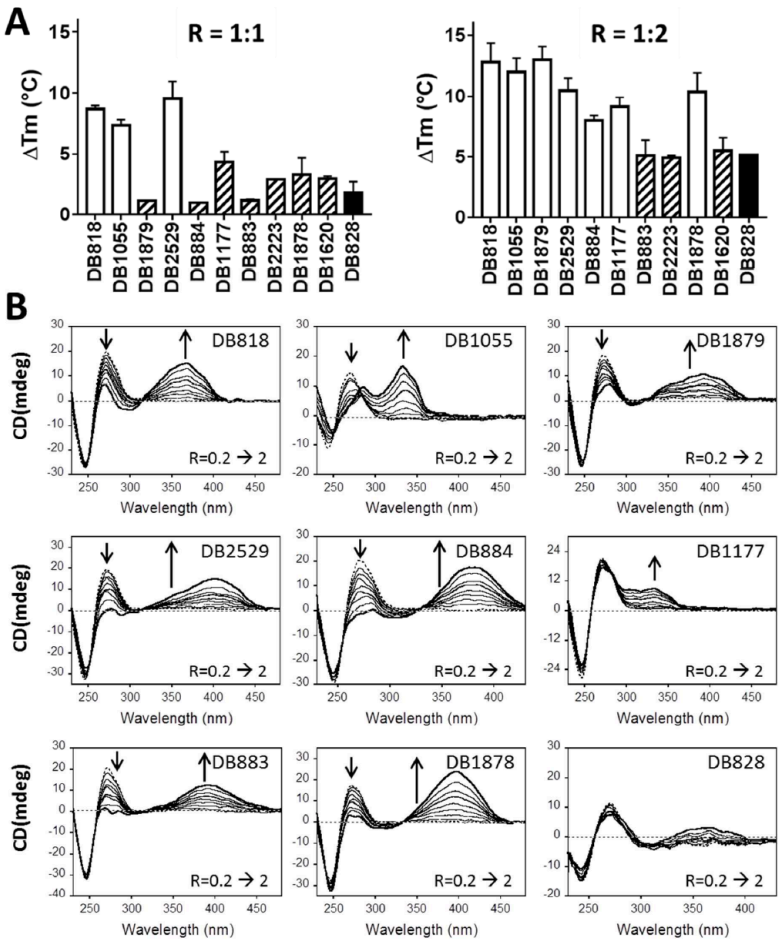


Figure 2. Comparison and mode of binding to an oligonucleotide containing a HOXA9/DNA binding site.
A. Melting temperature studies on the HBS-containing DNA. Double stranded HBS-containing oligonucleotides (0.5µM) were incubated with 0.5µM (R=1:1) or 1µM (R=2:1) of the indicated compounds in TNE buffer prior to be subjected to the measurement of the DNA hyperchromic variation upon step by step heating using absorbance measurement at 260nm. The _Tm values are calculated from Tm(DNA+DB)-Tm(DNA).
B. Circular dichroism spectra is showing minor groove binding of duplex DNA. Double stranded HBS-containing oligonucleotides (5µM) were incubated in TNE buffer with increasing concentrations of the indicted compounds at increasing drug/oligonucleotide ratios R as indicated (bottom to top at the drug wavelength : 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10 µM of drug). Dashed lanes are CD spectra for oligonucleotides in the absence of compounds. Thick lanes highlight CD spectra at R=1:1 and R=2:1.

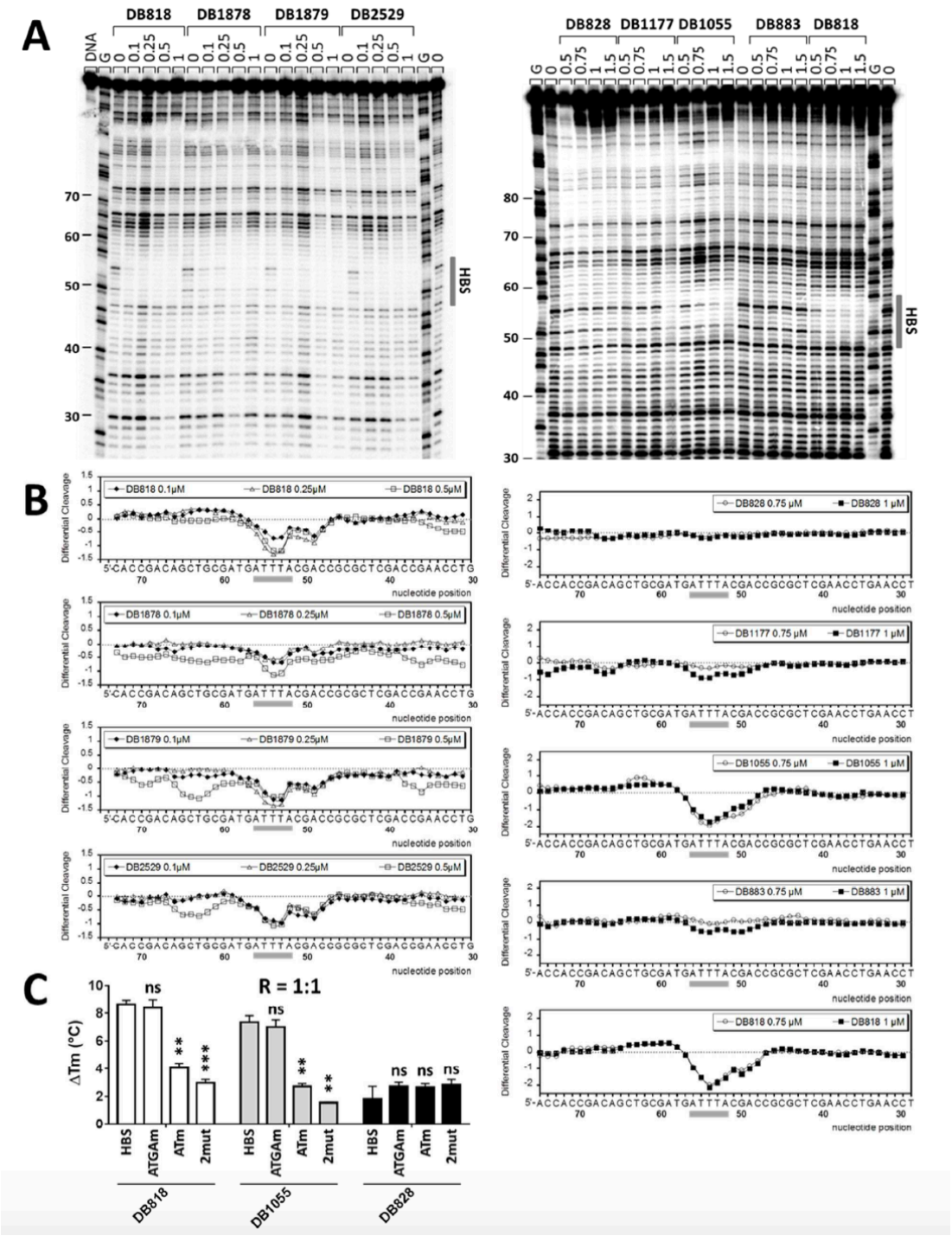


Figure 3. Evaluation of the drug interaction to HOXA9 consensus DNA binding site.

A. DNaseI footprinting gels. Increasing concentrations of the indicated compounds (µM) were incubated with a 3'-end 32P-radiolabelled HBS-containing DNA fragment prior to DNaseI milddigestion prior to be subjected to denaturing gel electrophoresis. "G" lanes, G-track localizes guanines within the radio-labeled DNA sequence. "0" lanes, DNA fragment without drug. Grey line locates the HOXA9-binding site (HBS).

B. Densitometric analyses from DNaseI footprinting gels. Each band from lanes generated in the presence of 1µM (o) or 1.5µM (■) of the indicated compounds was quantified regarding each identical base from the untreated lanes ("0") to visualize the differential cleavage at the HBS sequence (grey lines) or not depending on the evaluated compounds from gels in section A.

C. Melting temperature studies on ATGA- and/or AT-mutated sites from the HBS-containing DNA. Experiments were performed at equimolar drug/DNA ratio (R=1:1) in similar conditions as in Figure 2 A but with oligonucleotides mutated on the ATGA sequence (ATGAm), the ATrich site (ATm) or both (2Mut) (sequences presented in Supplementary Table S1). Statistic, student t-test: ns, $p>0.05$; **, $p<0.01$; ***, $p<0.001$.

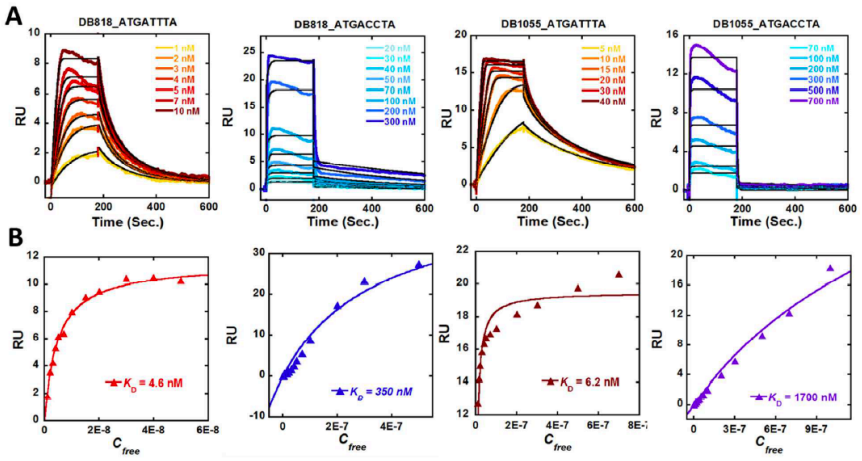


Figure 4. Kinetic and affinity analysis of DB818 and DB1055 binding to HBS and HBS-mut DNA sequences using BIAcore technology. A. SPR sensorgrams for the evaluation of the interaction kinetics of DB818 and DB1055 with the HBS ("ATGATTTA") or HBS-mut ("ATGACCTA") DNA sequences in P20-TNE binding buffer. The black lines are best fit curves determined by kinetic fitting. The concentrations are indicated in the graphs from bottom to top. The surface interaction of the diamidines at high concentrations causes the drift in the sensorgrams. B. Steady-state fitting curves for of DB818 and DB1055 on the HBS or HBS-mut DNA hairpin sequences. A stoichiometric value of one was used for data fitting based on the maximum RU values for the different sequences that was similar to that for netropsin binding to AATT sequence used as CHIP control.

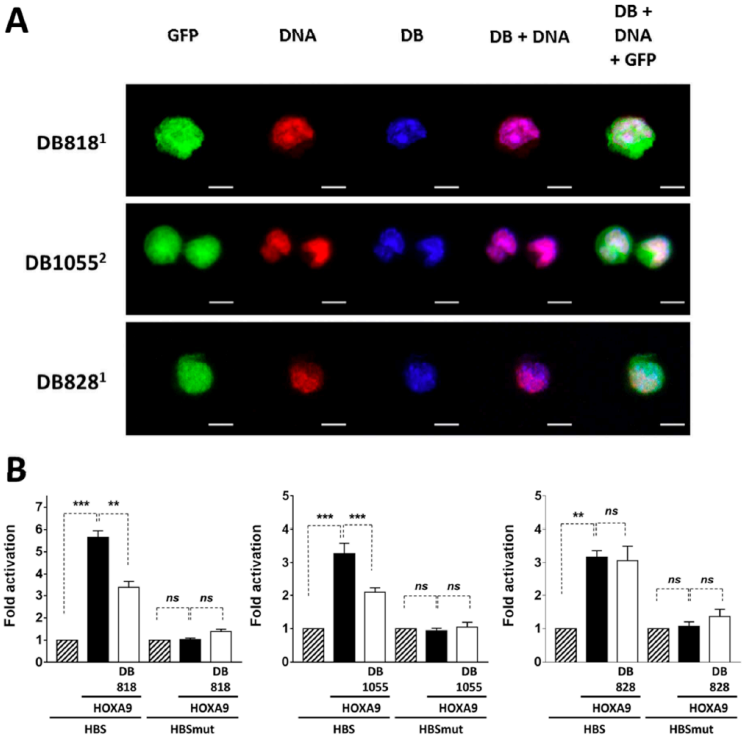
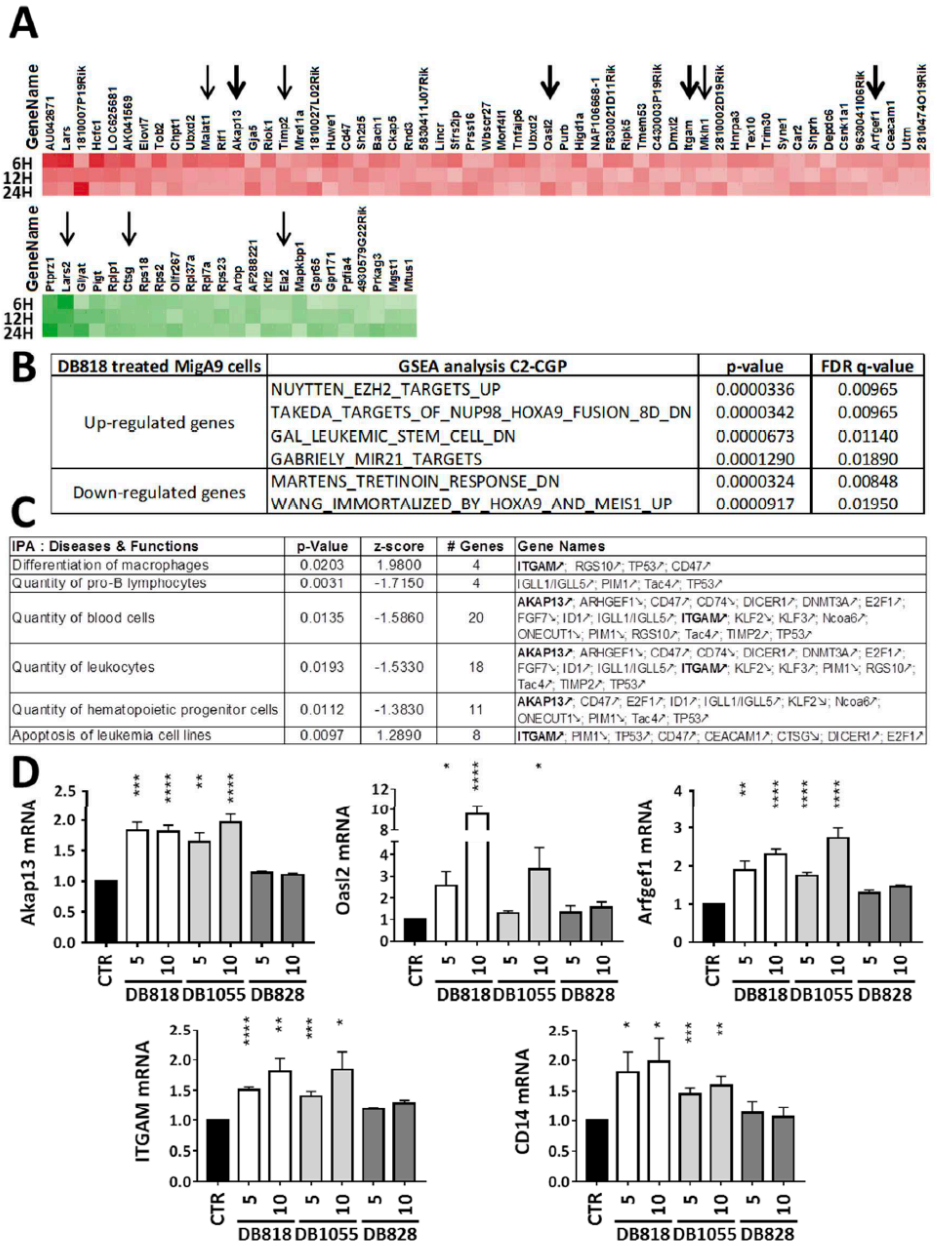


Figure 5. Cellular analysis of HOXA9 transcription factor inhibition by DB818 and DB1055.
A. Subcellular distribution of DB818, DB1055 and DB828 using cell fluorescence microscopy. GFP-positive MigA9 cells (in green) were treated with 20µM of the indicated compounds (in blue) for 2H. Nucleus was counterstained using TO-PRO-3 or propidium iodide (PI) staining of DNA (in red). Merged images are presented on the right. Scale bars correspond to 5µm. 1: Images acquired with a confocal Zeiss LSM880 microscope. GFP (Ex488nm, Em495-551nm), TO-PRO-3 (Ex633nm, Em640-735nm), DB818 (Ex405nm, Em445-485nm), DB828 (Ex 405nm, Em425-465nm). 2: Images acquired with a widefield Leica DMi8 microscope. GFP (ExBP480/40, EmBP527/30), PI (ExBP546/10, EmBP585/40), DB (ExBP350/50, EmBP460/50).
B. Inhibition of HOXA9 transcriptional control by DB818 and DB1055 evidenced by luciferase assays. K562 cells were co-transfected with pGL3-prom reporter vector containing 6-repeated HBS sequences as WT sequence ("HBS") or mutated sequence ("HBSmut") +/- pCMV-ADHOXA9 ("HOXA9") prior to addition of the indicated DB compounds or vehicle. Graphs represent mean +/- s.e.m. of 3 to 8 independent points. Statistic, student t-test: *, p<0.05; **, p<0.01; ***, p<0.001.



DB818 treated MigA9 cells	GSEA analysis C2-CGP	p-value	FDR q-value
Up-regulated genes	NUYTTEN_EZH2_TARGETS_UP	0.0000336	0.00965
	TAKEDA_TARGETS_OF_NUP98_HOXA9_FUSION_8D_DN	0.0000342	0.00965
	GAL_LEUKEMIC_STEM_CELL_DN	0.0000673	0.01140
	GABRIELY_MIR21_TARGETS	0.0001290	0.01890
Down-regulated genes	MARTENS_TRETINOIN_RESPONSE_DN	0.0000324	0.00848
	WANG_IMMORTALIZED_BY_HOXA9_AND_MEIS1_UP	0.0000917	0.01950

IPA : Diseases & Functions	p-Value	z-score	# Genes	Gene Names
Differentiation of macrophages	0.0203	1.9800	4	**ITGAM↗**; RGS10↗; TP53↗; CD47↗
Quantity of pro-B lymphocytes	0.0031	-1.7150	4	IGLL1/IGLL5↗; PIM1↗; Tac4↗; TP53↗
Quantity of blood cells	0.0135	-1.5860	20	**AKAP13↗**; ARHGEF1↘; CD47↗; CD74↘; DICER1↗; DNMT3A↗; E2F1↗; FGF7↘; ID1↗; IGLL1/IGLL5↗; **ITGAM↗**; KLF2↘; KLF3↗; Ncoa6↗; ONECUT1↘; PIM1↘; RGS10↗; Tac4↗; TIMP2↗; TP53↗
Quantity of leukocytes	0.0193	-1.5330	18	**AKAP13↗**; ARHGEF1↘; CD47↗; CD74↘; DICER1↗; DNMT3A↗; E2F1↗; FGF7↘; ID1↗; IGLL1/IGLL5↗; **ITGAM↗**; KLF2↘; KLF3↗; PIM1↘; RGS10↗; Tac4↗; TIMP2↗; TP53↗
Quantity of hematopoietic progenitor cells	0.0112	-1.3830	11	**AKAP13↗**; CD47↗; E2F1↗; ID1↗; IGLL1/IGLL5↗; KLF2↘; Ncoa6↗; ONECUT1↘; PIM1↘; Tac4↗; TP53↗
Apoptosis of leukemia cell lines	0.0097	1.2890	8	**ITGAM↗**; PIM1↘; TP53↗; CD47↗; CEACAM1↗; CTSG↘; DICER1↗; E2F1↗

Figure 6. Transcriptomic analysis of MigA9 treated with 2.5µM of DB818 for 6, 12 or 24H.

A. Commonly deregulated genes with |mean fold changes| ≥ 1.5 are presented as heatmap for upregulated genes (top panel) or down-regulated genes (bottom panel). Arrows identified genes upor down-regulated during hematopoietic differentiation from progenitors to granulocyte/monocyte differentiated cells as presented in Supplementary Figure S5.

B. GSEA analyses of up-regulated or down-regulated gene expression data on MSigDB C2- Chemical and Genetic Perturbation genesets.

C. Cellular networks ("Diseases and functions" analysis in Hematological systems) deduced from Ingenuity Pathway Analysis of genes that were significantly deregulated (adjusted pvalues≤ 0.05) by DB818 treatment of MigA9 cells with |fold-changes|≥1.5. Z-score, the number of genes ("# Genes"), their names and corresponding up (↗) or down (↘) expression changes are indicated.

D. Quantification of deregulated genes using qRT-PCR on total mRNA from MigA9 cells treated with DB818, DB1055 or DB828 (5 or 10 µM) for 48 hours, as 6 independent replicates. Each gene expression was normalized relatively to that of Gapdh (see primers in supplementary Table S1) and given as mean +/- s.e.m. Statistics (Student t-test): *, p<0.05; **, p<0.01; ***, p<0.001; ****, p<0.0001.

Annexe 3

Liste des gènes communément dérégulés entre shHOXA9-1F2 et shHOXA9-1F3 avec leur FC (fold change) associé – FC>1,5 et p<0,05

ProbeName	GeneSymbol	FC (1F2 vs shCTRL)	FC (1F3 vs shCTRL)
A_23_P161218	ANKRD1	6.0210770	5.8764650
A_23_P62081	SCG5	6.3867110	4.2601023
A_24_P140608	HBEGF	5.0853410	4.3216915
A_24_P341187	GBA2	3.4792962	4.4471810
A_33_P3251093	SLC36A1	2.5483390	5.1819944
A_32_P24376	KRTAP2-3	2.7443890	4.8603454
A_23_P45396	HSD17B10	3.3225474	3.2840693
A_23_P360804	CPNE5	1.7665898	4.8367023
A_23_P150018	DUSP5	2.2405530	4.2323728
A_33_P3267305	ANKRD52	2.5622030	3.4616516
A_23_P122924	INHBA	2.9215314	3.0188816
A_23_P28953	DNMT3B	2.3274927	3.3899655
A_23_P167599	FAM134B	2.7382455	2.4175136
A_23_P101054	KRT34	2.7805092	2.3720553
A_23_P47614	PHLDA2	1.9274487	3.2039626
A_23_P345065	SCLY	2.6501462	2.4752858
A_23_P251051	NF2	2.3137167	2.7698990
A_23_P216017	ENTPD4	2.1728785	2.6538079
A_23_P151267	LIMA1	1.8912776	2.8438191
A_32_P77977	UTP11L	2.1684291	2.5575528
A_23_P131683	MAPRE3	2.5215542	2.1624506
A_23_P92261	ECE2	3.0052948	1.6680797
A_33_P3250028	EVI5L	2.2618870	2.2841218
A_24_P115621	EIF4EBP2	2.9439073	1.5640092
A_23_P344988	ICK	2.2434187	2.2038530
A_23_P141738	SS18	2.2186844	2.1932688
A_23_P62890	GBP1	1.7252517	2.6278958
A_24_P163537	TMED4	2.4299052	1.9074036
A_33_P3236651	MAP2K7	2.1835747	2.1127613
A_24_P350644	PRRC2B	2.0966560	2.1979020
A_24_P563545	SLC30A7	2.2365513	2.0198843
A_33_P3365732	TNKS1BP1	2.5723370	1.6829726
A_24_P296698	MAP2K3	1.8148912	2.4097970
A_33_P3397486	ENTPD4	1.9217225	2.2902057
A_23_P158725	SLC16A3	2.0244064	2.1680255
A_23_P101737	DOT1L	1.8520851	2.3380456
A_24_P343255	KLHDC3	2.0231843	2.1451309
A_23_P118427	MAP2K3	1.8482486	2.2626865
A_23_P71864	FAM73B	2.1699110	1.9033887
A_23_P259071	AREG	2.1627655	1.8912590
A_23_P354074	LYST	1.8733212	2.1748800
A_24_P943957	PIKFYVE	1.8945663	2.1143281
A_32_P93391	NUDT19	1.8686790	2.1391520
A_23_P215227	DNAJB6	1.6887243	2.3072164

A_23_P91076	TMEM87B	1.9450356	2.0482748
A_23_P338952	S100PBP	2.0670430	1.9087060
A_33_P3301025	CPOX	1.8989618	2.0654013
A_23_P250118	HSPBAP1	1.9005194	2.0550292
A_23_P142239	YIF1B	2.0220172	1.9311432
A_33_P3252141	TMX3	1.9934200	1.8809193
A_23_P330262	PIP5K1C	1.9331102	1.9339495
A_33_P3338300	CASZ1	2.0383878	1.8195412
A_33_P3280694	GSAP	1.7890495	2.0468185
A_23_P351757	PLCD3	2.1955874	1.6319761
A_32_P103945	B4GALT4	1.8591311	1.9483299
A_33_P3237150	BMP2	2.2603767	1.5416043
A_24_P69439	SLC25A32	1.6347040	2.1549530
A_23_P22915	SLC30A7	1.9042169	1.8811231
A_23_P200710	PIK3C2B	1.8800526	1.9022290
A_24_P40907	PPAPDC2	2.2418938	1.5364176
A_23_P418597	TNKS1BP1	2.0432029	1.7120256
A_33_P3354414	AOX1	1.9533170	1.7940065
A_21_P0005252	LOC340340	1.6711422	2.0656545
A_23_P154037	AOX1	1.9878616	1.7455107
A_23_P115366	CMPK1	1.6903735	2.0412073
A_21_P0013108	lnc-SHPRH-2	1.7616854	1.9371687
A_23_P215341	FKBP14	1.9125450	1.7523543
A_23_P334751	B3GALNT2	1.9221182	1.7319689
A_23_P398294	HIP1R	2.1214294	1.5300682
A_23_P115922	EIF4EBP2	1.9801629	1.6566207
A_33_P3411075	FSCN1	1.9484385	1.6603016
A_24_P929754	MKNK2	1.7211530	1.8842238
A_23_P57784	CLDN1	1.6254984	1.9689620
A_23_P313728	FAM98A	1.8569119	1.7243817
A_23_P71530	TNFRSF11B	1.7516954	1.8041875
A_23_P114057	SEMA4C	1.7225119	1.7249737
A_23_P359897	KDM7A	1.8957366	1.5393277
A_23_P141394	WIPI1	1.8019510	1.6317898
A_33_P3577142	lnc-ANKRD11-5	1.6732435	1.6774973
A_33_P3251685	PDP2	1.7580473	1.5715265
A_24_P368575	SLC4A7	1.6960564	1.6312836
A_23_P126103	CTH	1.7430631	1.5555250
A_33_P3233978	FBXO18	1.7356353	1.5571822
A_33_P3238815	FRMD5	1.7273833	1.5370704
A_23_P169039	SNAI2	1.6779476	1.5549659
A_23_P46170	MED8	1.6214220	1.5327569
A_23_P142310	MKNK2	1.5901610	1.5262538
A_23_P217120	EHMT1	1.5781736	1.5093764
A_21_P0000703	ZNF695	-1.6089289	-1.7191046
A_23_P383986	CHST15	-1.7986078	-1.5471872
A_23_P372834	AQP1	-1.8112668	-1.5791520
A_33_P3351554	ETNK2	-1.7493438	-1.6654195
A_23_P15299	WBP2	-1.8216418	-1.6013237

A_23_P100963	**SPNS3**	**-1.6929511**	**-1.7681011**
A_33_P3349269	**PIAS2**	**-1.9404954**	**-1.5863994**
A_23_P145175	**ZNF318**	**-1.9383731**	**-1.6052346**
A_33_P3396214	**KREMEN2**	**-1.9408303**	**-1.6188618**
A_23_P259586	**TTK**	**-1.9366484**	**-1.6345881**
A_33_P3369854	**DNAJB13**	**-1.7858231**	**-1.7956245**
A_19_P00320067	**LOC100130417**	**-2.0797884**	**-1.5135411**
A_33_P3539223	**ARHGEF39**	**-2.0236230**	**-1.5818129**
A_23_P217339	**PRKX**	**-1.9389111**	**-1.6790961**
A_19_P00809697	**LOC100130417**	**-2.0813804**	**-1.5568893**
A_23_P101871	**FBXO17**	**-1.8073853**	**-1.8534980**
A_23_P120863	**GAL3ST1**	**-1.8889130**	**-1.8018426**
A_23_P159893	**CHRDL1**	**-2.0602400**	**-1.6359118**
A_33_P3364180	**FGD5**	**-1.9363539**	**-1.7647852**
A_33_P3347413	**PBXIP1**	**-2.0568466**	**-1.6659471**
A_24_P79808	**PBXIP1**	**-2.0475010**	**-1.7052218**
A_23_P47247	**TCP11L1**	**-2.1986290**	**-1.5821020**
A_24_P927325	**C2CD3**	**-2.1654630**	**-1.6472496**
A_33_P3691860	**FAM122B**	**-1.9027257**	**-1.9315734**
A_32_P91042	**LOC100129034**	**-1.8696259**	**-1.9793407**
A_23_P334870	**TMEM217**	**-1.8732533**	**-1.9883564**
A_23_P500542	**DMBX1**	**-1.9466463**	**-1.9396325**
A_23_P122906	**AUTS2**	**-2.0498223**	**-1.8370221**
A_19_P00318418	**TBXAS1**	**-2.3166163**	**-1.5807935**
A_24_P367645	**MAP7D2**	**-2.2543560**	**-1.6465822**
A_24_P204043	**ZNF318**	**-1.9685230**	**-2.0319233**
A_33_P3409099	**ATXN1**	**-1.9348131**	**-2.0723720**
A_21_P0010335	**LOC100506271**	**-2.3285370**	**-1.6861545**
A_33_P3349536	**CHEK1**	**-2.2154596**	**-1.8010528**
A_21_P0012310	**DGCR5**	**-2.1637824**	**-1.8547728**
A_23_P416965	**FAM149A**	**-2.3433313**	**-1.6831492**
A_23_P70398	**VEGFA**	**-2.5012536**	**-1.5330837**
A_24_P365322	**ZNF709**	**-2.2702732**	**-1.7785462**
A_23_P131240	**UBXN2A**	**-2.4853540**	**-1.5722716**
A_33_P3343155	**GNAQ**	**-2.4487243**	**-1.6366086**
A_33_P3330114	**LOC100130417**	**-2.1518278**	**-1.9803569**
A_21_P0010121	**LOC101927512**	**-1.8803666**	**-2.3114166**
A_33_P3252730	**ZNF788**	**-2.6662087**	**-1.5416453**
A_23_P101351	**ZNF426**	**-2.6056082**	**-1.6212487**
A_24_P294842	**ATXN1**	**-1.9917548**	**-2.2551289**
A_23_P214821	**EDN1**	**-2.2309167**	**-2.0638950**
A_23_P100001	**FAM174B**	**-2.5570590**	**-1.7415872**
A_23_P147245	**OSBPL10**	**-2.6779895**	**-1.6379887**
A_33_P3398331	**MMP24**	**-2.6094627**	**-1.7160780**
A_32_P219279	**ELFN2**	**-2.7615595**	**-1.5812914**
A_33_P3316539	**SLC7A2**	**-1.7917598**	**-2.5580165**
A_23_P108751	**FHL2**	**-2.7334313**	**-1.6224221**
A_33_P3301970	**STRADB**	**-2.2330980**	**-2.1863230**
A_33_P3258392	**EDN1**	**-2.2879124**	**-2.1725445**

A_23_P20660	DIRAS2	-1.9842640	-2.4765542
A_24_P62659	TSPAN2	-2.8578594	-1.6312966
A_23_P91414	CCM2L	-2.7811463	-1.7110234
A_23_P131375	PQLC3	-1.9285243	-2.5873990
A_24_P418408	FAM89A	-1.7509518	-2.8132641
A_33_P3389599	ANKRD20A11P	-3.0260684	-1.6106187
A_23_P428129	CDKN1C	-1.7063790	-2.9603136
A_33_P3228460	FXYD3	-2.2308064	-2.5613656
A_32_P88415	MYOZ3	-2.1578900	-2.7126257
A_23_P142631	FKBP1B	-2.7129314	-2.1600966
A_33_P3316953	RBFOX3	-2.6127605	-2.3154166
A_33_P3234118	FAM122B	-1.9333056	-3.0313554
A_23_P41804	NKD2	-3.4070787	-1.5630095
A_24_P317907	SORBS1	-2.8190355	-2.2252634
A_33_P3691916	FAM13A	-3.0474896	-2.0601964
A_23_P380326	SLC39A9	-3.2636266	-1.9171218
A_23_P201551	VAV3	-2.2766309	-2.9396120
A_24_P353638	SLAMF7	-3.5161598	-1.7106273
A_24_P213478	SEMA6A	-3.4239256	-1.8987810
A_21_P0000747	LOC100506895	-2.5544066	-2.8202367
A_23_P165624	TNFAIP6	-3.0176947	-2.3781505
A_33_P3288329	SORBS1	-3.1833577	-2.2345920
A_21_P0001692	LOC101927412	-1.8093389	-3.7589120
A_23_P379789	ST8SIA5	-4.2432830	-1.6617525
A_33_P3377364	ITGB4	-3.3148384	-2.6081760
A_23_P90679	STRADB	-3.2305605	-2.7447033
A_23_P392384	AIF1L	-3.8800979	-2.2559612
A_33_P3243454	IGFL3	-3.6994580	-2.5181825
A_33_P3338341	PRODH	-3.9341843	-2.3373716
A_21_P0001097	lnc-TNFRSF9-1	-3.3779805	-2.9298490
A_23_P14124	RASL11A	-2.5825336	-4.1717730
A_33_P3365228	SEMA5B	-4.3414693	-2.5706997
A_33_P3254460	DLK2	-4.4967422	-2.4614816
A_23_P42868	IGFBP1	-3.1987543	-4.0299120
A_33_P3384287	PALM	-2.7600827	-5.0060353
A_33_P3239295	PRODH	-5.2279100	-2.6574445
A_33_P3392405	C10orf99	-2.0805383	-7.4945100
A_33_P3295358	ANGPTL4	-6.2726020	2.7699695
A_21_P0007793	lnc-SLC15A4-12	-5.9417543	5.5902370
A_24_P64167	PTGS1	-4.0181710	1.6823196
A_33_P3342126	PRDM8	-3.2581306	2.2810857
A_23_P200138	SLAMF8	-3.0672708	2.6274955
A_23_P5903	SLCO4A1	-3.0498362	2.7175024
A_23_P321511	MARCH3	-3.0227368	1.9120219
A_21_P0013372	LOC100506098	-2.9206111	1.5670823
A_23_P45087	ZNF107	-2.9148574	1.5834897
A_23_P374082	ADAM19	-2.8769590	2.1298532
A_21_P0006600	lnc-TBL1Y-1	-2.8057888	1.8836458
A_24_P71244	PIK3CD	-2.7745480	1.5505269

A_23_P23171	AGO4	-2.7615223	1.7060714
A_23_P40847	CHST2	-2.6886613	1.7661163
A_23_P61960	ATP6V0E2	-2.5985572	1.7217110
A_33_P3339070	LINC00704	-2.5582090	2.5421057
A_21_P0013370	LOC100506098	-2.5220697	1.5049188
A_24_P330518	CA12	-2.4818232	1.5961564
A_33_P3212490	DICER1	-2.4459305	2.3500607
A_21_P0013181	LOC100506098	-2.4024305	1.5594665
A_32_P86118	PM20D2	-2.3085790	1.7737192
A_21_P0000079	LCOR	-2.2835896	1.6105521
A_24_P393470	MEF2BNB	-2.2392128	1.7828807
A_23_P106389	SEMA7A	-2.2344503	4.5726140
A_19_P00321941	LINC00704	-2.2123618	2.5752797
A_23_P110791	CSF1R	-2.1843690	1.8049546
A_32_P4985	CAMTA1	-2.1367370	1.7537365
A_24_P931443	GPR68	-2.0655960	7.0339303
A_23_P332374	ZNF175	-2.0283935	1.6212243
A_21_P0004566	lnc-ARRDC3-1	-1.9728732	1.5409963
A_32_P160883	NEDD4	-1.9671447	1.9783766
A_23_P69810	AGPAT9	-1.9345709	1.6642970
A_23_P46936	EGR2	-1.9165570	1.5794723
A_23_P161624	FOSL1	-1.8952558	1.6878135
A_23_P52727	NAV2	-1.8934586	2.0785882
A_24_P189458	NSMCE4A	-1.8765339	1.5056487
A_23_P121064	PTX3	-1.7874840	2.5356016
A_23_P98350	BIRC3	-1.7193426	1.9189574
A_21_P0011315	INAFM2	-1.6737069	1.6176742
A_24_P159837	ZNF302	-1.6186379	2.3854299
A_32_P201773	AMMECR1	1.7570162	-3.7260664
A_21_P0000356	SCARNA11	2.5388465	-3.3111594
A_21_P0006516	LINC00629	1.5626525	-2.6656005
A_21_P0007359	LOC102723765	2.2619505	-2.5988402
A_33_P3671291	SNORA12	2.4181454	-2.3491250
A_23_P214743	SIM1	1.7025167	-2.2605371
A_33_P3379644	ALDH1A1	1.9280285	-2.2319736
A_33_P3240512	KCTD12	1.6654563	-2.1749113
A_24_P804667	METTL12	1.8463925	-2.1693215
A_23_P161297	OGDHL	2.1182225	-2.1237237
A_33_P3212109	DCDC2	1.7771213	-2.0143774
A_33_P3269924	HIP1R	1.9106953	-1.8710108
A_33_P3284129	LYPD1	2.9344492	-1.8001397
A_21_P0008404	LOC102723354	1.7507786	-1.7713560
A_33_P3346669	PLCE1	1.7585157	-1.7395874
A_33_P3338928	DAB2	1.6876049	-1.7261759
A_24_P133253	KITLG	2.1648471	-1.7027979
A_23_P36408	VPS33A	1.6577169	-1.6387600
A_23_P35617	PLCE1	1.8856192	-1.5834956
A_21_P0001050	PCAT6	1.7087927	-1.5474417

Liste des genesets « hallmarks » retrouvés significativement enrichis (FDR<0,25)

ES : enrichment score, NES : normalized enrichment score

	Nom	Nombre de gènes	ES	NES	Nominal p-val	FDR q-val
shHOXA9-1F2	HALLMARK_INTERFERON_ALPHA_RESPONSE	86	0.532	1.943	0.003	0.007
	HALLMARK_CHOLESTEROL_HOMEOSTASIS	67	0.465	1.618	0.000	0.057
	HALLMARK_REACTIVE_OXIGEN_SPECIES_PATHWAY	43	0.469	1.490	0.027	0.108
	HALLMARK_UV_RESPONSE_DN	128	0.363	1.396	0.006	0.181
	HALLMARK_TNFA_SIGNALING_VIA_NFKB	174	0.350	1.390	0.003	0.152
	HALLMARK_APOPTOSIS	133	0.350	1.362	0.015	0.159
	HALLMARK_ANDROGEN_RESPONSE	89	0.371	1.360	0.019	0.137
	HALLMARK_EPITHELIAL_MESENCHYMAL_TRANSITION	149	0.344	1.350	0.011	0.130
	HALLMARK_KRAS_SIGNALING_UP	132	0.328	1.264	0.047	0.237
	HALLMARK_E2F_TARGETS	194	-0.632	-2.389	0.000	0.000
	HALLMARK_G2M_CHECKPOINT	195	-0.525	-2.004	0.000	0.000
	HALLMARK_MITOTIC_SPINDLE	190	-0.440	-1.666	0.000	0.008
	HALLMARK_HYPOXIA	171	-0.390	-1.450	0.003	0.082
	HALLMARK_SPERMATOGENESIS	73	-0.411	-1.363	0.038	0.151
	HALLMARK_IL2_STAT5_SIGNALING	149	-0.371	-1.353	0.020	0.139

shHOXA9-1F3	HALLMARK_TNFA_SIGNALING_VIA_NFKB	174	0.626	2.362	0.000	0.000
	HALLMARK_INFLAMMATORY_RESPONSE	125	0.569	2.078	0.000	0.000
	HALLMARK_KRAS_SIGNALING_UP	132	0.563	2.068	0.000	0.000
	HALLMARK_IL6_JAK_STAT3_SIGNALING	58	0.573	1.821	0.002	0.002
	HALLMARK_ALLOGRAFT_REJECTION	118	0.497	1.789	0.000	0.004
	HALLMARK_INTERFERON_ALPHA_RESPONSE	86	0.495	1.686	0.000	0.009
	HALLMARK_IL2_STAT5_SIGNALING	149	0.455	1.686	0.000	0.008
	HALLMARK_EPITHELIAL_MESENCHYMAL_TRANSITION	149	0.451	1.664	0.000	0.009
	HALLMARK_COMPLEMENT	138	0.449	1.644	0.000	0.010
	HALLMARK_INTERFERON_GAMMA_RESPONSE	160	0.405	1.511	0.000	0.031
	HALLMARK_MYC_TARGETS_V2	56	0.478	1.503	0.013	0.031
	HALLMARK_COAGULATION	81	0.410	1.384	0.030	0.087
	HALLMARK_ANDROGEN_RESPONSE	89	0.399	1.366	0.045	0.095
	HALLMARK_TGF_BETA_SIGNALING	50	0.439	1.347	0.076	0.104
	HALLMARK_MTORC1_SIGNALING	191	0.336	1.287	0.027	0.154
	HALLMARK_ANGIOGENESIS	27	-0.547	-1.469	0.051	0.187
	HALLMARK_HEDGEHOG_SIGNALING	23	-0.559	-1.454	0.037	0.107
	HALLMARK_KRAS_SIGNALING_DN	78	-0.433	-1.448	0.021	0.076

Liste des genesets KEGG retrouvés significativement enrichis (FDR<0,25)

ES : enrichment score, NES : normalized enrichment score

	Nom	Nombre de gènes	ES	NES	Nominal p-val	FDR q-val
shHOXA9-1F2	KEGG_DRUG_METABOLISM_CYTOCHROME_P450	31	0.684	2.022	0.002	0.003
	KEGG_DRUG_METABOLISM_OTHER_ENZYMES	30	0.667	1.984	0.000	0.003
	KEGG_METABOLISM_OF_XENOBIOTICS_BY_CYTOCHROME_P450	32	0.609	1.835	0.002	0.017
	KEGG_PYRUVATE_METABOLISM	34	0.602	1.835	0.000	0.013
	KEGG_STARCH_AND_SUCROSE_METABOLISM	25	0.615	1.761	0.004	0.024
	KEGG_RETINOL_METABOLISM	24	0.553	1.590	0.025	0.130
	KEGG_STEROID_HORMONE_BIOSYNTHESIS	21	0.584	1.565	0.021	0.137
	KEGG_INOSITOL_PHOSPHATE_METABOLISM	44	0.474	1.532	0.024	0.155
	KEGG_CYTOSOLIC_DNA_SENSING_PATHWAY	33	0.505	1.510	0.031	0.165
	KEGG_CYTOKINE_CYTOKINE_RECEPTOR_INTERACTION	111	0.395	1.489	0.008	0.175
	KEGG_SELENOAMINO_ACID_METABOLISM	21	0.555	1.483	0.047	0.166
	KEGG_TYROSINE_METABOLISM	24	0.532	1.482	0.049	0.154
	KEGG_HISTIDINE_METABOLISM	18	0.553	1.478	0.054	0.146
	KEGG_PORPHYRIN_AND_CHLOROPHYLL_METABOLISM	28	0.488	1.417	0.080	0.207
	KEGG_TRYPTOPHAN_METABOLISM	29	0.470	1.399	0.054	0.220
	KEGG_DNA_REPLICATION	36	-0.667	-1.928	0.000	0.007
	KEGG_OLFACTORY_TRANSDUCTION	33	-0.658	-1.881	0.002	0.007
	KEGG_HOMOLOGOUS_RECOMBINATION	28	-0.661	-1.825	0.003	0.012
	KEGG_PROGESTERONE_MEDIATED_OOCYTE_MATURATION	69	-0.541	-1.788	0.000	0.020
	KEGG_CELL_CYCLE	117	-0.497	-1.773	0.000	0.020
	KEGG_SYSTEMIC_LUPUS_ERYTHEMATOSUS	92	-0.501	-1.706	0.002	0.042
	KEGG_VASCULAR_SMOOTH_MUSCLE_CONTRACTION	68	-0.520	-1.703	0.003	0.037
	KEGG_MISMATCH_REPAIR	23	-0.623	-1.659	0.011	0.057
	KEGG_OOCYTE_MEIOSIS	94	-0.461	-1.616	0.000	0.078
	KEGG_GLIOMA	50	-0.526	-1.603	0.009	0.080
	KEGG_LONG_TERM_POTENTIATION	48	-0.521	-1.602	0.003	0.073
	KEGG_DORSO_VENTRAL_AXIS_FORMATION	17	-0.620	-1.534	0.045	0.133
	KEGG_PROSTATE_CANCER	75	-0.454	-1.508	0.005	0.156
	KEGG_P53_SIGNALING_PATHWAY	59	-0.466	-1.491	0.017	0.167
	KEGG_PANCREATIC_CANCER	64	-0.456	-1.485	0.018	0.164
	KEGG_MTOR_SIGNALING_PATHWAY	44	-0.483	-1.469	0.039	0.178
	KEGG_SMALL_CELL_LUNG_CANCER	69	-0.450	-1.464	0.012	0.174
	KEGG_RENAL_CELL_CARCINOMA	59	-0.458	-1.445	0.025	0.193
	KEGG_ALLOGRAFT_REJECTION	17	-0.579	-1.440	0.059	0.190
	KEGG_PROXIMAL_TUBULE_BICARBONATE_RECLAMATION	15	-0.594	-1.426	0.082	0.200
	KEGG_NON_SMALL_CELL_LUNG_CANCER	45	-0.458	-1.398	0.051	0.239
shHOXA9-1F3	KEGG_CYTOKINE_CYTOKINE_RECEPTOR_INTERACTION	111	0.547	1.942	0.000	0.013
	KEGG_NOD_LIKE_RECEPTOR_SIGNALING_PATHWAY	52	0.589	1.841	0.000	0.027
	KEGG_HEMATOPOIETIC_CELL_LINEAGE	39	0.608	1.798	0.000	0.033
	KEGG_CYTOSOLIC_DNA_SENSING_PATHWAY	33	0.589	1.682	0.002	0.101
	KEGG_TOLL_LIKE_RECEPTOR_SIGNALING_PATHWAY	68	0.511	1.664	0.004	0.098
	KEGG_DNA_REPLICATION	36	0.554	1.642	0.004	0.104
	KEGG_RIG_I_LIKE_RECEPTOR_SIGNALING_PATHWAY	48	0.520	1.627	0.007	0.104
	KEGG_REGULATION_OF_AUTOPHAGY	20	0.613	1.602	0.027	0.120
	KEGG_ADIPOCYTOKINE_SIGNALING_PATHWAY	52	0.489	1.547	0.004	0.171
	KEGG_EPITHELIAL_CELL_SIGNALING_IN_HELICOBACTER_PYLORI_INFECTION	56	0.479	1.528	0.018	0.182
	KEGG_T_CELL_RECEPTOR_SIGNALING_PATHWAY	71	0.449	1.515	0.005	0.188
	KEGG_PYRIMIDINE_METABOLISM	88	0.445	1.507	0.015	0.184
	KEGG_AMINO_SUGAR_AND_NUCLEOTIDE_SUGAR_METABOLISM	40	0.499	1.505	0.022	0.172
	KEGG_JAK_STAT_SIGNALING_PATHWAY	84	0.438	1.496	0.008	0.172
	KEGG_CYSTEINE_AND_METHIONINE_METABOLISM	27	0.537	1.481	0.031	0.181

	KEGG_LYSOSOME	106	0.419	1.476	0.007	0.175
	KEGG_NATURAL_KILLER_CELL_MEDIATED_CYTOTOXICITY	72	0.434	1.448	0.021	0.207
	KEGG_PHOSPHATIDYLINOSITOL_SIGNALING_SYSTEM	57	0.447	1.429	0.043	0.226
	KEGG_METABOLISM_OF_XENOBIOTICS_BY_CYTOCHROME_P450	32	-0.667	-1.854	0.000	0.026
	KEGG_THYROID_CANCER	24	-0.628	-1.671	0.006	0.151
	KEGG_RIBOSOME	84	-0.491	-1.656	0.004	0.117
	KEGG_PROXIMAL_TUBULE_BICARBONATE_RECLAMATION	15	-0.677	-1.591	0.014	0.185
	KEGG_OLFACTORY_TRANSDUCTION	33	-0.550	-1.551	0.029	0.215
	KEGG_DRUG_METABOLISM_CYTOCHROME_P450	31	-0.544	-1.545	0.028	0.189
	KEGG_RETINOL_METABOLISM	24	-0.559	-1.497	0.025	0.246
	KEGG_MELANOGENESIS	69	-0.455	-1.487	0.018	0.231

Annexe 4

Efficacité du DB2290 in vivo dans un modèle de LAM EOL-1

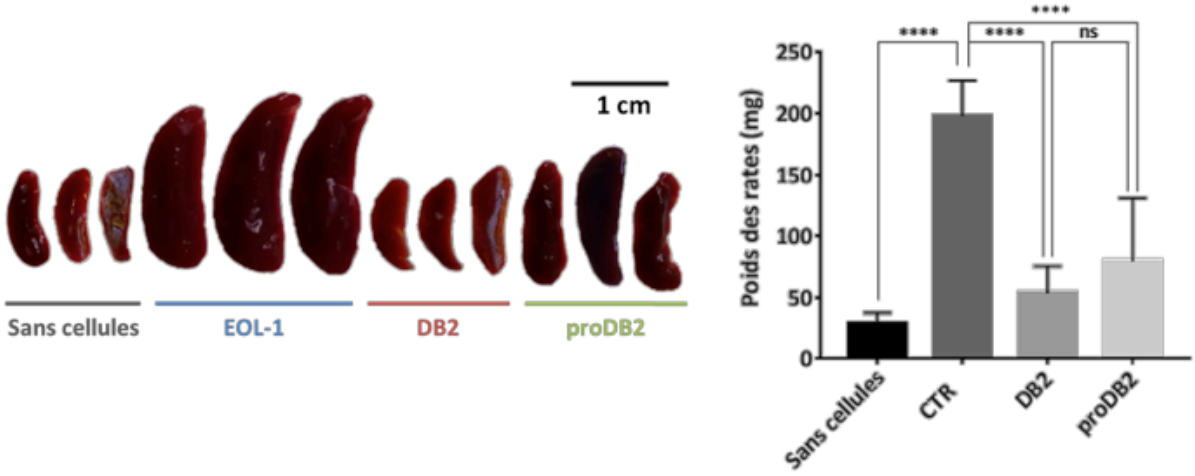


Figure 1 : **Efficacité anti-leucémique du DB2290, prodrogue du DB1055 *in vivo*.** Poids des rates au sacrifice après implantation de cellules leucémiques EOL-1 et après 2 semaines de traitement. DB2 : DB1055, proDB2 : DB2290.