Combinaisons de nouveaux inhibiteurs de désacétylase d'histones 6 avec des inhibiteurs de tyrosine kinase pour le traitement de la leucémie myéloïde chronique

Hélène Losson

▶ **To cite this version:**

Hélène Losson. Combinaisons de nouveaux inhibiteurs de désacétylase d'histones 6 avec des inhibiteurs de tyrosine kinase pour le traitement de la leucémie myéloïde chronique. Biochimie, Biologie Moléculaire. Université de Lorraine, 2020. Français. NNT : 2020LORR0003 . tel-02555739

HAL Id: tel-02555739
https://hal.univ-lorraine.fr/tel-02555739

Submitted on 6 Jul 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.

AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4
Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10
http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php
http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm

UNIVERSITÉ DE LORRAINE | BioSE

ECOLE DOCTORALE BioSE
BIOLOGIE, SANTÉ et son ENVIRONNEMENT
ED 266

Ecole Doctorale BioSE (Biologie-Santé-Environnement)

Thèse

Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE l'UNIVERSITE DE LORRAINE

Mention : « Sciences de la Vie et de la Santé »

par Hélène LOSSON

Combinaisons de nouveaux inhibiteurs de désacétylase d'histones 6 avec des inhibiteurs de tyrosine kinase pour le traitement de la leucémie myéloïde chronique

Le 16 janvier 2020

Membres du jury :

Rapporteurs :	
Madame Dominique Payet-Bornet	Docteur, Centre d'immunologie de Marseille-Luminy, France
Madame Muriel Cuendet	Professeur, Université de Genève, Suisse
Examinateurs :	
Madame Carine Michiels	Professeur, Université de Namur, Belgique
Monsieur Jean-Louis Merlin	Professeur, Université de Lorraine, France
Monsieur Marc Diederich	Professeur, LBMCC, Luxembourg et Université Nationale de Séoul, Corée du Sud Directeur de thèse
Monsieur Michael Schnekenburger	Docteur, LBMCC, Luxembourg Co-directeur de thèse
Membre invité:	
Monsieur Mario Dicato	Professeur, Centre Hospitalier de Luxembourg, Luxembourg

---

Laboratoire de Biologie Moléculaire et Cellulaire du Cancer (LBMCC)
9, rue Edward Steichen, L2540 Luxembourg

Les travaux dans ce mémoire ont été réalisés

au « Laboratoire de Biologie Moléculaire et Cellulaire du Cancer »

à l'Hôpital Kirchberg, Luxembourg

Ce travail n'aurait pu aboutir sans le soutien financier :

de la Fondation « Recherche Cancer et Sang (FRCS) »,

de l'Action Lions « Vaincre le Cancer

du « Télévie Luxembourg »,

de l'Association « Recherches Scientifiques Luxembourg (RSL) »

et

de l'Association « Een Häerz fir kriibskrank Kanner

(Un cœur pour les enfants atteints d'un cancer) ».

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier chaleureusement le Professeur Marc Diederich de m'avoir accueilli dans son laboratoire il y a maintenant quatre ans lors de mon premier stage de master, et de m'avoir fait suffisamment confiance pour me permettre d'y réaliser ma thèse. Merci pour tous les moyens mis à ma disposition et pour le suivi régulier de mon travail. Je vous remercie vivement de m'avoir donné la possibilité de partir en Corée, je n'oublierai jamais cette expérience qui m'a beaucoup apporté.

Toute ma gratitude au Docteur Michael Schnekenburger pour sa confiance et pour m'avoir appris ce qu'était le travail de recherche et l'épigénétique. Merci de m'avoir formé aux techniques de laboratoire et de m'avoir aidé et conseillé pour mener à bien ce projet.

Je remercie vivement le Professeur Carine Michiels et le Professeur Jean-Louis Merlin d'avoir accepté de faire partie de mon comité de thèse et de m'avoir guider pour améliorer la qualité de cette thèse.

Merci beaucoup au Professeur Payet-Bornet, au Professeur Debili et au Professeur Cuendet d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse.

Un grand merci à la Fondation « Recherche et Sang » et à son président, le Professeur Mario Dicato, pour le financement de ce projet.

Je tenais également à remercier chaleureusement les membres du laboratoire pour ces quatre années, Franck, Claudia, Déborah, Barbora, Sébastien, Flavia, Laurent, et à ceux qui ne sont plus présents mais qui ont participé d'une manière ou d'une autre à ce travail, Marie-Hélène, Anthoula, merci pour vos conseils et pour ces temps de midi toujours sympathiques.

Un merci tout particulier aux membres de l'équipe « Epigénétique ». Cristina merci pour ces longues discussions lorsque tu sentais que j'en avais besoin. Cindy, merci pour tout, pour tes nombreux conseils, ton soutien, tes encouragements et ta bonne humeur qui ont beaucoup compté pour moi pendant toutes ces années.

Je remercie grandement les doctorantes présentes à mes côtés pendant ce long travail, chacune y a participé à sa manière. Manon, merci pour ta gentillesse, pour nos longues discussions scientifiques et pour ces bons moments passés en Corée. Marion, merci pour tes conseils, ta bonne humeur et nos éclats de rire. Esma, merci pour tes encouragements et pour ta sérénité face au stress dont j'ai tenté de m'imprégner.

Un doux merci à ma maman sans qui cette belle aventure n'aurait pas été possible. Merci d'être toujours présente pour moi, de me soutenir, de m'encourager et de m'aimer comme tu le fais.

Et enfin merci à celui qui m'a soutenu, qui a supporté mes plaintes, qui m'a aidé à y voir plus clair, qui m'a encouragé à en faire toujours plus, qui a grandement participé à ce travail en répondant toujours présent lorsque j'en avais besoin, qui a écouté toutes mes présentations et qui connaît mon sujet par cœur. Merci infiniment.

« S'il n'y avait pas d'hiver, le printemps ne serait pas si agréable : si nous ne goûtions pas à l'adversité, la réussite ne serait pas tant appréciée. » Anne Bradstreet

A toi papa,

Sommaire

Liste des abréviations **1**

Liste des illustrations **4**

Liste des tableaux **6**

Préambule **7**

Introduction **8**

I. Leucémie myéloïde chronique **8**

1. Épidémiologie 9
2. Évolution de la leucémie myéloïde chronique 9
3. Réarrangement chromosomique de la leucémie myéloïde chronique 10
4. Diagnostic 11
5. Gène et protéine ABL 11
6. Gène et protéine BCR 15
7. Transcrits et protéines BCR-ABL 15

II. Traitements de la leucémie myéloïde chronique et résistances associées **22**

1. Historique des thérapies 22
2. Thérapie ciblée par un inhibiteur de tyrosine kinase 22
3. Résistances à l'imatinib 24
   a. Résistances dépendantes de BCR-ABL 27
   b. Résistances indépendantes de BCR-ABL 29
4. Développement de nouveaux inhibiteurs de tyrosine kinase 31

III. Inhibiteurs d'HDAC6 en co-traitement **32**

1. Les protéines HDAC 32
2. La protéine HDAC6 36
   a. Structure 36
   b. Fonction 37
   c. Régulation post-transcriptionnelle 46
   d. Régulation post-traductionnelle 46
3. Inhibiteurs d'HDAC6 49
4. Nouveaux inhibiteurs d'HDAC6 55

Hypothèses et objectifs **57**

Matériel et méthodes **59**

I. Études *in silico* **59**

1. Propriétés pharmacologiques des composés 59
2. *Docking* 59
3. Analyse de données transcriptomiques de bases de données publiques 59

II. Culture cellulaire **60**

1. Modèles cellulaires 60
2. Purification des cellules $CD34^+$ de sang de cordon ombilical 60
3. Isolement de cellules mononucléées du sang périphérique de donneurs sains et induction de leur prolifération 61
4. Milieux de culture et maintenance cellulaire 62
5. Traitement des cellules 63
6. Viabilité et comptages cellulaires 63

III. Extractions protéiques **64**

1. Extraction des protéines totales 64
2. Extraction des histones 64
3. Dosage protéique 64
IV. Western Blot 65
V. Analyse de l'expression génique 69
1. Extraction de l'ARN 69
2. Transcription inverse 69
3. Amplification par PCR en temps réel 69
VI. Analyse de la morphologie nucléaire par microscopie de fluorescence 70
VII. Mesure de l'activité enzymatique des caspases 3/7, 8 et 9 70
VIII. Marquage à l'annexine V-fluorochrome isothiocyanate de fluorescéine (FITC) et à l'iodure de propidium 70
IX. Immunoprécipitation 71
X. Transfection 71
XI. Mesure de l'activité enzymatique désacétylase 72
XII. Quantification des cellules ayant une expression d'ALDH élevée 73
XIII. Test clonogénique 74
XIV. Xénogreffes de cellules tumorales chez le poisson zèbre 74
XV. Analyses statistiques 75

Résultats 76

Partie 1 : Étude du composé 7b en tant qu'inhibiteur d'HDAC6 sélectif en combinaison avec l'imatinib pour le traitement de la leucémie myéloïde chronique 76
I. Évaluation *in silico* des propriétés pharmacologiques des inhibiteurs d'HDAC6, le composé 7b et la tubacine 76
II. Effet du co-traitement de l'imatinib et des inhibiteurs d'HDAC6 sur la viabilité des cellules K-562 77
1. Effet des inhibiteurs d'HDAC6 sur l'acétylation de la tubuline α et des histones H4 77
2. Effet de l'imatinib et des inhibiteurs d'HDAC6 sur la prolifération et la viabilité cellulaire 79
3. Effet des co-traitements sur la prolifération et la viabilité cellulaire 81
4. Caractérisation du type de mort cellulaire induit par les co-traitements 82
5. Effet des co-traitements sur les cellules souches leucémiques 87
a. Effet des inhibiteurs de tyrosine kinase sur des cellules $CD34^+$ $CD38^-$ isolées à partir de cellules primaires obtenues de patients atteints de LMC 88
b. Effet des co-traitements sur les cellules K-562 $ALDH^+$ 88
III. Effet du co-traitement de l'imatinib et des inhibiteurs d'HDAC6 sur la viabilité des cellules KBM-5 et MEG-01 93
1. Effet du composé 7b sur l'acétylation de la tubuline α et des histones H4 93
2. Effet de l'imatinib et des inhibiteurs d'HDAC6 sur la prolifération et la viabilité cellulaire et caractérisation du type de mort cellulaire induit 95
3. Effet des co-traitements sur la prolifération et la viabilité cellulaire et caractérisation du type de mort cellulaire induit 105
IV. Effet du co-traitement de l'imatinib et des inhibiteurs d'HDAC6 sur la viabilité de cellules saines 108
V. Détermination du mécanisme d'action du co-traitement à l'imatinib et aux inhibiteurs d'HDAC6 110
1. Effet du composé 7b sur l'expression de la protéine BCR-ABL dans les cellules K-562. 110

VI. Évaluation de l'effet anti-cancéreux du co-traitement imatinib-7b en milieu semi-solide 115
VII. Evaluation de l'effet anti-cancéreux du co-traitement imatinib-7b *in vivo* 116

Partie 2 : Étude du composé MAKV-15 en tant qu'inhibiteur sélectif d'HDAC6 en combinaison avec le bortezomib et l'imatinib pour le traitement de la leucémie myéloïde chronique 118
I. Évaluation *in silico* des propriétés pharmacologiques du MAKV-15 118
II. Effet de la combinaison d'inhibiteur d'HDAC6, d'un inhibiteur du protéasome et de l'imatinib sur la viabilité des cellules KBM-5 sensibles et résistantes à l'imatinib 119
1. Effet du MAKV-15 sur l'acétylation de la tubuline α et des histones H4 dans les cellules KBM-5 119
2. Effet de l'imatinib, du MAKV-15 et du bortezomib sur la prolifération et la viabilité des cellules KBM-5 sensibles et résistantes à l'imatinib 120
3. Détermination d'un protocole de traitement avec le bortezomib, l'imatinib et le MAKV-15 123
4. Effet du traitement BM+I sur la prolifération et la viabilité de cellules KBM-5 sensibles et résistantes à l'imatinib 125
5. Caractérisation du type de mort induit par le traitement BM+I dans les cellules KBM-5 sensibles et résistantes à l'imatinib 128
III. Effet du traitement BM+I sur la viabilité de cellules saines 133
IV. Détermination du mécanisme d'action du traitement BM+I 136
1. Effet du MAKV-15 sur l'expression de la protéine BCR-ABL dans les cellules KBM-5 136

Partie 3 : Détermination du site catalytique ciblé par les inhibiteurs d'HDAC6 137
I. Détermination du site catalytique ciblé par le composé 7b et le MAKV-15 137
1. Etude *in silico* de l'interaction du composé 7b avec la protéine HDAC6 137
2. Étude *in cellulo* de l'interaction du composé 7b et du MAKV-15 avec le/les site(s) catalytique(s) de la protéine HDAC6 138

Discussion 142

Conclusions et perspectives 149
I. Conclusions et perspectives de l'étude du composé 7b 149
II. Conclusions et perspectives de l'étude du MAKV-15 152

Annexes 156

Références 171

Liste des abréviations

ABL : *Abelson*

AGP : alpha-1-glycoprotéine acide

ALDH : aldéhyde déshydrogénase

ASB : albumine sérique bovine

Bax : *Bcl-2-associated X*

Bcl-x_L : *B-cell lymphoma-extra large*

BCR : *breakpoint cluster region*

BID : *BH3 interacting-domain death agonist*

BUZ : *binding-of-ubiquitin zinc* - domaine de liaison à l'ubiquitine

CD : cluster de différenciation

CI_{50} : concentration inhibant 50% de la viabilité cellulaire

CrkL : *Crk like protein*

CSL : cellule souche leucémique

Ct : *Cycle threshold*

CYP : cytochrome P450

DEAB : diéthylaminobenzaldéhyde

DPBS : *Dulbecco's phosphate buffered saline*

EDTA : acide éthylène diamine tétraacétique

EGFR : *epidermal growth factor receptor* - récepteur du facteur de croissance épidermique

ELN : *european leukemia net*

ERK : *extracellular signal-regulated kinase* - kinase régulée par signaux extracellulaires

EUTOS : *european treatment and outcome study*

FDA : *food drug administration* - agence américaine des produits alimentaires et médicamenteux

FITC : *fluorescein isothiocyanate* - isothiocyanate de fluorescéine

Gab : *Grb2-associated binding protein* - protéine de liaison associée à Grb2

GAP : *GTPase activating protein*

GDP : guanosine diphosphate

Grb : *growth factor receptor-bound protein* - protéine liée au récepteur du facteur de croissance

GTP : guanosine triphosphate

HAT : *histone acetyltransferase* - acétyltransférase d'histone

HDAC : *histone deacetylase* - désacétylase d'histone

HER : *human epidermal growth factor receptor* - récepteur du facteur de croissance épidermique humain

HMGB1 : *high-mobility group box 1*

HSF : *heat shock factor* - facteur de choc thermique

HSP : *heat shock protein* - protéine de choc thermique

IC_{50} : concentration inhibant 50% de la croissance cellulaire

IL-2 : interleukine 2

ITK : inhibiteur de tyrosine kinase

KBM-5R : cellules KBM-5 résistantes à l'imatinib

K-562R : cellules K-562 résistantes à l'imatinib

LC3B-II : *microtubule-associated protein 1 light chain 3*

LMC : leucémie myéloïde chronique

MACS : *magnetic cell sorting*

Mcl-1 : *myeloid cell leukemia 1*

MDR1 : *multi-drug resistance protein 1*

MPER : *mammalian protein extraction reagent*

MTOC : *microtubule-organizing center* - centre organisateur des microtubules

MTT : sel de tétrazolium bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl

MUSK : *muscle-associated receptor tyrosine kinase* - récepteur tyrosine kinase spécifique du muscle

NAD^+ : nicotinamide adénine dinucléotide

NES : *nuclear export signal* - séquence d'export nucléaire

NLS : *nuclear localization signal* - séquence de localisation nucléaire

PARP : poly(ADP-ribose) polymérase

PBMC : *peripheral blood mononuclear cell* - cellule mononucléaire du sang périphérique

PBS : *phosphate-buffered saline* - tampon phosphate salin

PDGFRB : *platelet derived growth factor receptor beta* - récepteur de la chaîne bêta du facteur de croissance dérivé des plaquettes

PHA : phytohémagglutinine

PI3K : phosphoinositide 3-kinase

PSA : persulfate d'ammonium

PTU : phénylthiourée

RPMI : *Roswell park memorial institute*

SAHA : acide suberoylanilide hydroxamique

SC : site catalytique

SDS : dodécylsulfate de sodium

SH : *Src homology*

SIRT : sirtuine

SOS : *son of sevenless*

SSC : *side scatter*

STAT : *signal transducer and activator of transcription* – transducteur du signal et activateur de la transcription

TEMED : tetramethylethylenediamine

VCP : *valosin-containing protein/ATPase*

Liste des illustrations

Figure 1 : Schéma simplifié de la voie hématopoïétique touchée lors de la leucémie myéloïde chronique. 8
Figure 2 : Évolution de la leucémie myéloïde chronique. 10
Figure 3 : Translocation chromosomique réciproque t(9;22). 11
Figure 4 : Des points de cassure dans les gènes *ABL1* et *BCR* entrainent la formation de différents transcrits codant pour la protéine chimère BCR-ABL. 13
Figure 5 : Schéma représentant les conformations inactive et active des protéines ABL et BCR-ABL. 14
Figure 6 : Voies de signalisation activées par la protéine BCR-ABL qui sont impliquées dans la survie et la prolifération des cellules de leucémie myéloïde chronique. 21
Figure 7 : Liaison de l'imatinib à la protéine BCR-ABL. 23
Figure 8 : Structures chimiques des inhibiteurs de tyrosine kinase approuvés par l'agence américaine des produits alimentaires et médicamenteux pour le traitement de la leucémie myéloïde chronique. 27
Figure 9 : Principales résistances à l'imatinib dépendantes et indépendantes de BCR-ABL. 28
Figure 10 : La réaction d'acétylation et désacétylation des lysines. 33
Figure 11 : Structure moléculaire des enzymes HDAC humaines. 34
Figure 12 : Structures protéiques d'HDAC6 sauvage ou mutants. 37
Figure 13 : La protéine HDAC6 est impliquée dans de nombreux phénomènes cellulaires. 44
Figure 14 : Schéma simplifié des voies apoptotiques extrinsèque et intrinsèque. 45
Figure 15 : Structures chimiques d'inhibiteurs d'HDAC6. 52
Figure 16 : Principe de la mesure de l'activité HDAC in vitro. 73
Figure 17 : Effet de la tubacine sur l'acétylation de la tubuline α et de l'histone H4 dans les cellules K-562. 78
Figure 18 : Effet de l'imatinib, du composé 7b et de la tubacine sur la prolifération et la viabilité des cellules K-562. 80
Figure 19 : Effet des co-traitements imatinib-inhibiteurs d'HDAC6 sur la prolifération et la viabilité des cellules K-562. 82
Figure 20 : Effet des co-traitements imatinib-inhibiteurs d'HDAC6 sur la morphologie nucléaire des cellules K-562. 84
Figure 21 : Effet de l'inhibiteur des caspases z-VAD sur l'apoptose induite par les co-traitements imatinib-inhibiteurs d'HDAC6 dans les cellules K-562. 85
Figure 22 : Effet des co-traitements imatinib-inhibiteurs d'HDAC6 sur les voies apoptotiques intrinsèque et extrinsèque dans les cellules K-562. 86
Figure 23 : Effet des co-traitements imatinib-inhibiteurs d'HDAC6 sur l'activité des caspases dans les cellules K-562. 87
Figure 24 : Analyse en composante principale du jeu de données transcriptomique E-MTAB-2594. 89
Figure 25 : Effet d'inhibiteurs de tyrosine kinase sur le niveau d'expression de l'ARNm d'HDAC6 dans des cellules souches de patients atteints de leucémie myéloïde chronique. 90
Figure 26 : Effet des co-traitements imatinib-inhibiteurs d'HDAC6 sur l'activité ALDH dans les cellules K-562. 91
Figure 27 : Effet du composé 7b sur l'acétylation de la tubuline α dans les lignées KBM-5 et MEG-01. 94
Figure 28 : Effet de l'imatinib, du composé 7b et de la tubacine sur la prolifération et la viabilité des cellules KBM-5 et MEG-01. 97

Figure 29 : Effet de l'imatinib, du composé 7b et de la tubacine sur la morphologie nucléaire des cellules KBM-5. 101
Figure 30 : Effet de l'imatinib, du composé 7b et de la tubacine sur la morphologie nucléaire des cellules MEG-01. 104
Figure 31 : Effet des co-traitements imatinib-inhibiteurs d'HDAC6 sur la prolifération et la viabilité des cellules KBM5 et MEG-01. 106
Figure 32 : Effet des co-traitements imatinib-inhibiteurs d'HDAC6 sur la morphologie nucléaire de cellules KBM-5 et MEG-01. 107
Figure 33 : Effet des composés imatinib et 7b seuls ou en co-traitement sur différents modèles de cellules saines. 109
Figure 34 : Effet de l'inhibiteur d'HDAC6 7b sur l'ubiquitination et l'expression de BCR-ABL. 113
Figure 35 : Effet des co-traitements imatinib-inhibiteurs d'HDAC6 sur des protéines impliquées dans les voies de survie et prolifération cellulaires dépendantes de BCR-ABL. 114
Figure 36 : Effet de la combinaison imatinib-7b sur les propriétés clonogéniques des cellules K-562. 115
Figure 37 : Effet du co-traitement imatinib-7b sur des xénogreffes de cellules K-562 sensibles et résistantes à l'imatinib chez le poisson zèbre. 117
Figure 38 : Effet du composé MAKV-15 sur l'acétylation de la tubuline α et de l'histone H4 dans les cellules KBM-5. 120
Figure 39 : Effet du MAKV-15, du bortezomib et de l'imatinib sur la prolifération et la viabilité des cellules KBM-5 sensibles et résistantes à l'imatinib 123
Figure 40 : Protocoles expérimentaux de traitement des cellules KBM-5 avec le bortezomib, le MAKV-15 et l'imatinib. 125
Figure 41 : Effet du traitement BM+I sur la prolifération et la viabilité de cellules KBM-5 sensibles et résistantes à l'imatinib. 127
Figure 42 : Effet du traitement BM+I sur la morphologie nucléaire des cellules KBM-5 sensibles et résistantes à l'imatinib. 129
Figure 43 : Effet du traitement BM+I sur l'exposition des phosphatidylsérines dans les cellules KBM-5. 130
Figure 44 : Effet du traitement BM+I sur les voies apoptotiques intrinsèque et extrinsèque dans les cellules KBM-5. 131
Figure 45 : Effet du traitement BM+I sur l'activité des caspases dans les cellules KBM-5. . 132
Figure 46 : Effet du MAKV-15, de l'imatinib et du bortezomib seuls ou en combinaison sur la prolifération, la viabilité et la morphologie nucléaire de cellules saines non prolifératives et prolifératives. 134
Figure 47 : Effet du MAKV-15 sur l'expression de la protéine BCR-ABL dans les cellules KBM-5. 136
Figure 48 : Le composé 7b pourrait cibler spécifiquement le deuxième site catalytique de la protéine HDAC6. 138
Figure 49 : Mesure de l'activité désacetylase des différentes formes de protéines HDAC6 sauvages et mutées surexprimées dans les cellules K-562. 140
Figure 50 : Schéma récapitulatif des effets de la combinaison imatinib-7b dans les cellules K-562. 150
Figure 51 : Schéma récapitulatif des effets du traitement BM+I dans les cellules KBM-5 sensibles et résistantes à l'imatinib. 153

Liste des tableaux

Tableau 1 : Transcrits et protéines BCR-ABL humains. 16
Tableau 2 : Substrats de BCR-ABL. 18
Tableau 3 : Inhibiteurs de tyrosine kinase approuvés par l'agence américaine des produits alimentaires et médicamenteux pour le traitement de la leucémie myéloïde chronique. . 25
Tableau 4 : Classification, localisation cellulaire et fonctions physiologiques des enzymes HDAC humaines. 35
Tableau 5 : Liste de substrats spécifiquement désacétylés par la protéine HDAC6. 38
Tableau 6 : Modifications post-traductionnelles régulant l'activité d'HDAC6. 46
Tableau 7 : Protéines qui interagissent directement avec la protéine HDAC6. 48
Tableau 8 : Dérégulation de l'expression d'HDAC6 dans différents types de cancers. 50
Tableau 9 : Inhibiteurs d'HDAC6 en essais cliniques dans le cadre du cancer. 53
Tableau 10 : Composés utilisés pour le traitement des cellules. 63
Tableau 11 : Conditions d'utilisation des anticorps pour les Western Blots. 66
Tableau 12 : Évaluation *in silico* des propriétés pharmacologiques du composé 7b et de la tubacine. 77
Tableau 13 : IC_{50} et CI_{50} des composés 7b et tubacine dans les cellules de leucémie myéloïde chronique. 98
Tableau 14 : Ratio de sélectivité de la combinaison imatinib-7b pour les cellules K-562 par rapport à plusieurs modèles de cellules saines. 110
Tableau 15 : Évaluation *in silico* des propriétés pharmacologiques du MAKV-15. 119
Tableau 16 : Composés et concentrations utilisées en combinaison dans les lignées KBM-5 et KBM-5R. 124
Tableau 17 : Ratio de sélectivité du traitement BM+I pour les cellules KBM-5 sensibles et résistantes à l'imatinib par rapport à plusieurs modèles de cellules saines. 135

Préambule

Il y a maintenant une vingtaine d'années que l'imatinib, un inhibiteur de tyrosine kinase (ITK), devint le traitement de référence des patients atteints de leucémie myéloïde chronique (LMC) présentant une anomalie chromosomique, la translocation t(9;22). Cette translocation induit *in fine* l'expression de l'oncoprotéine *breakpoint cluster region-Abelson* (BCR-ABL) qui possède une activité tyrosine kinase constitutive et qui conduit à une prolifération excessive de blastes dans la moelle osseuse puis le sang. L'imatinib a représenté une avancée majeure en permettant une stabilisation de la pathologie et en améliorant la qualité de vie des patients grâce à une administration du traitement par voie orale. Cependant l'émergence de résistances à l'imatinib et aux autres ITK, et notamment la présence de cellules souches leucémiques (CSL) non affectées par ces traitements et responsables de la rechute de la maladie, font que le développement de nouveaux traitements occupe toujours une place importante dans la recherche contre la LMC. L'administration simultanée de plusieurs médicaments permettant donc de multiplier les cibles et ainsi de palier au problème de résistances, semble être une approche prometteuse pour le traitement de la LMC.

Les désacétylases d'histone (HDAC) représentent des cibles thérapeutiques à fort potentiel pour le traitement de la LMC et ont montré des résultats prometteurs en combinaison avec des ITK. Cependant la forte toxicité des inhibiteurs pan-HDAC entrainant de nombreux effets secondaires amène aujourd'hui les chercheurs à vouloir cibler certaines HDAC de manière plus sélective.

Plusieurs études ont mis en évidence l'implication de la protéine HDAC6 dans le développement de nombreuses pathologies et notamment les cancers. Cette protéine intervient effectivement dans de nombreux phénomènes cellulaires de par sa localisation principalement cytoplasmique et pourrait potentiellement induire la dégradation de la protéine BCR-ABL *via* la désacétylation de la chaperonne dite protéine de choc thermique (HSP)90α. De ce fait, la combinaison d'un ITK et d'un inhibiteur d'HDAC6 apparaît être une approche intéressante pour prévenir l'apparition de résistances aux ITK.

Dans cette étude notre hypothèse de travail est que des inhibiteurs d'HDAC6 en combinaison d'ITK pourraient être efficaces pour le traitement de la LMC.

Introduction

I. Leucémie myéloïde chronique

La LMC est un syndrome myéloprolifératif touchant les progéniteurs myéloïdes (Figure 1). Elle est caractérisée par une prolifération excessive de leucocytes dans la moelle osseuse, qui sont pour la plupart encore immatures, et alors appelés blastes, lorsqu'ils passent dans le sang (Apperley, 2007).

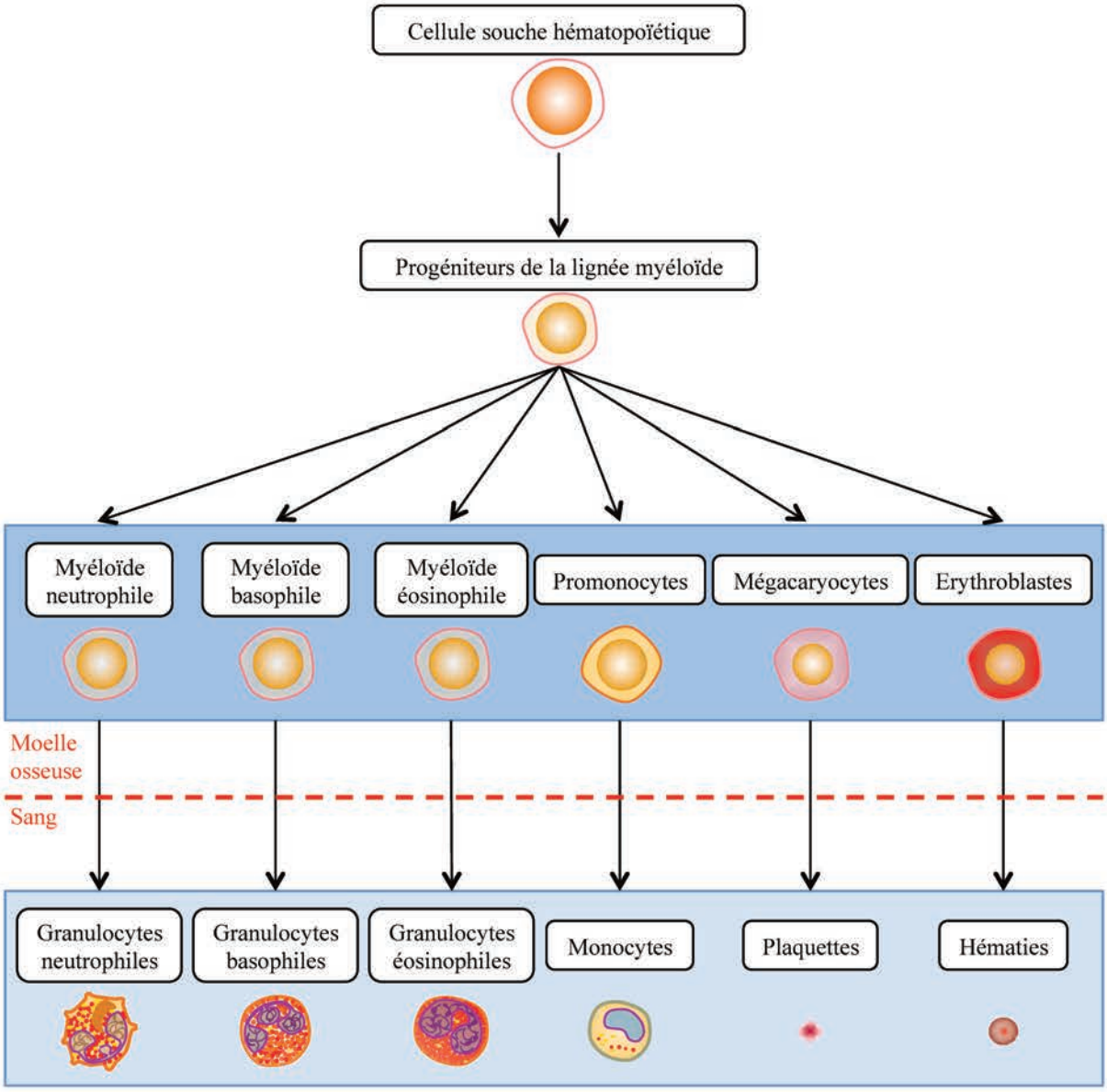


Figure 1 : Schéma simplifié de la voie hématopoïétique touchée lors de la leucémie myéloïde chronique.

La leucémie myéloïde chronique ne touche que les progéniteurs de la lignée myéloïde de l'hématopoïèse dans la moelle osseuse, qui vont se différencier en différents précurseurs (bleu foncé) qui vont eux-mêmes se différencier en cellules matures (bleu clair).

1. Épidémiologie

La LMC est considérée comme une maladie rare avec une incidence d'environ 1 cas sur 100000 chaque année en Europe et aux États-Unis (Hoffmann *et al.*, 2017 ; Siegel *et al.*, 2018). On estime à 6370 nouveaux cas chaque année en Europe (Hoffmann *et al.*, 2015) et 8430 nouveaux cas ont été recensés en 2018 aux États-Unis (Siegel *et al.*, 2018). Les résultats d'une étude prospective européenne appelée EUTOS (*european treatment and outcome study)* sur des patients diagnostiqués entre 2002 et 2006 et traités à l'imatinib, montrent que parmi les 2904 personnes inclues dans l'étude, 53,7% sont des hommes dont l'âge médian est de 55 ans contre 57 ans pour les femmes. Au diagnostic 94,3% des patients étaient en phase chronique, 3,5% en phase accélérée et 2,2% en phase blastique. Il a également été montré que 18% des patients de l'étude étaient fumeurs au moment du diagnostic et 16% étaient d'anciens fumeurs (Hoffmann *et al.*, 2015).

En 2012, 807 nouveaux cas de LMC ont été recensés en France, dont 59 % chez l'homme. L'âge médian de survenue chez l'homme est de 62 ans, et 64 ans chez la femme (www.invs.sante.fr).

2. Évolution de la leucémie myéloïde chronique

Cette pathologie comprend trois phases distinctes qui sont les phases chronique, accélérée et blastique. Le diagnostic se fait la plupart du temps de façon fortuite lors de la phase chronique qui reste généralement asymptomatique. Durant cette phase moins de 5% de blastes sont présents dans la circulation sanguine. En absence de traitement la maladie évolue lentement et n'atteint la phase accélérée qu'après quelques années. Pendant cette phase intermédiaire, entre 5 et 20% de blastes sont retrouvés dans la circulation sanguine et les symptômes tels que la fatigue, la perte d'appétit et de poids par exemple, apparaissent chez les patients. Sans traitement la phase accélérée évolue rapidement vers la phase blastique. Durant cette dernière phase, plus de 20% de cellules blastiques sont retrouvées dans la circulation sanguine, provoquant une altération rapide de l'état général du patient et son décès après seulement quelques mois sans prise en charge (Apperley, 2015) (Figure 2).

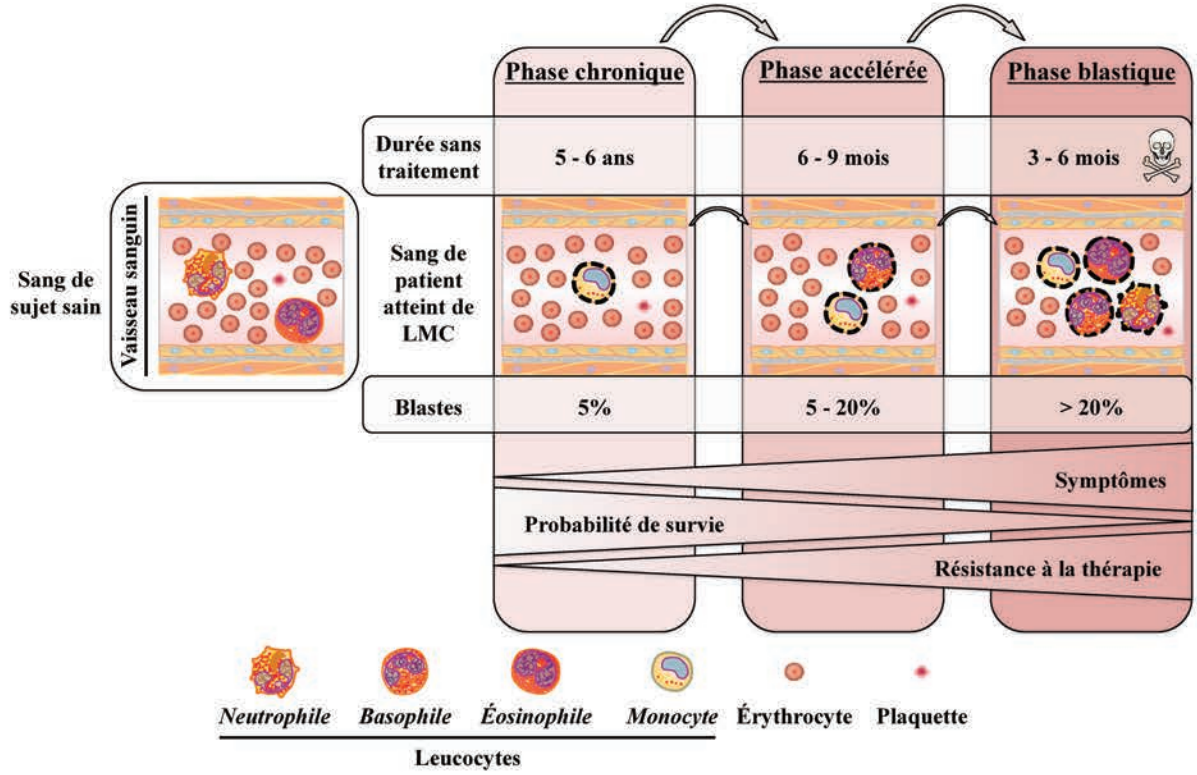


Figure 2 : Évolution de la leucémie myéloïde chronique.

La leucémie myéloïde chronique est caractérisée par une prolifération excessive de leucocytes non fonctionnels (en pointillés) ou blastes dans la moelle osseuse puis le sang. Elle comprend la phase chronique pendant laquelle 5% blastes sont retrouvés dans la circulation sanguine. Après 5 à 6 ans sans traitement la pathologie évolue vers la phase accélérée (5 à 20% de blastes), puis après 6 à 9 mois sans traitement vers la phase blastique (plus de 20% de blastes). Les symptômes ainsi que la résistance à la thérapie augmentent lors de l'évolution de la leucémie myéloïde chronique tandis que la probabilité de survie diminue.

3. Réarrangement chromosomique de la leucémie myéloïde chronique

Une anomalie chromosomique, la translocation t(9;22)(q34;q11) entre le chromosome 9, porteur du gène *ABL* (*Abelson*) , et le chromosome 22, porteur du gène *BCR* (*breakpoint cluster region*), est retrouvée chez 95% des patients atteints de LMC. Cette translocation conduit à la formation du chromosome de Philadelphie porteur du gène chimère *BCR-ABL* (Figure 3), et ainsi à l'expression de l'oncoprotéine de fusion correspondante qui possède une activité tyrosine kinase constitutive. Le chromosome de Philadelphie ou Ph^+ a été identifié pour la première fois en 1960 par les chercheurs Hungerford et Nowell dans la ville de Philadelphie qui lui a valu son nom (Nowell, 2007; Kang *et al.*, 2016).

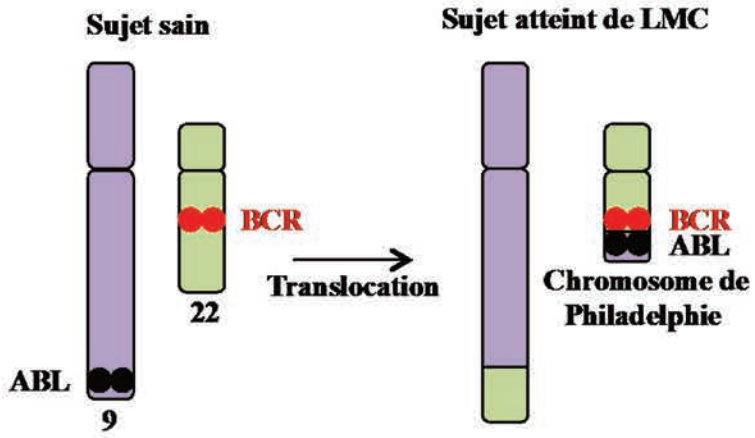


Figure 3 : Translocation chromosomique réciproque t(9;22).

Les chromosomes 9 et 22 portent respectivement les gènes *ABL* (*Abelson*) et *BCR* (*breakpoint cluster region*). Suite à la translocation réciproque de ces chromosomes, il y a formation du chromosome de Philadelphie, porteur du gène chimère BCR-ABL, présent chez 95% des patients atteints de leucémie myéloïde chronique (LMC).

4. Diagnostic

Plusieurs examens sont nécessaires afin de valider le diagnostic de la LMC. Dans un premier temps la numération formule sanguine va permettre de mettre en évidence une augmentation du nombre de leucocytes au-dessus des valeurs normales en fonction du sexe, de l'âge et de l'état physiologique, également appelée hyperleucocytose ; mais aussi la présence dans le sang de cellules immatures de la lignée granulocytaire, également appelée myélémie (Sorel *et al.*, 2017). Dans un second temps, des analyses cytogénétiques pourront être réalisées telles que la réalisation d'un caryotype permettant de mettre en évidence en environ deux semaines la translocation t(9;22) par la présence du chromosome de Philadelphie. L'hybridation *in situ* en fluorescence, quant à elle, permet de détecter la co-localisation des gènes *BCR* et *ABL* en cas de LMC en un à deux jours (Egan *et al.*, 2016). Enfin, une analyse moléculaire est réalisée par transcription inverse et amplification par PCR en temps réel, afin de pouvoir détecter et quantifier l'ARNm de BCR-ABL (Sorel *et al.*, 2017).

5. Gène et protéine ABL

Le gène *ABL1,* composé de 11 exons, conduit à la formation d'un transcrit de 1130 acides aminés, codant pour une protéine ABL de 145 kDa (Figure 4).

La protéine ABL a été découverte sous la forme *v*-ABL exprimée par le virus de la leucémie murine d'Abelson (Hantschel, 2012), elle possède une activité tyrosine kinase et une

localisation principalement nucléaire. Au niveau de son domaine N-terminal la protéine ABL possède une longue chaine lipidique (*i.e.* myristate), conférant à la protéine une capacité d'auto-inhibition. Les domaines d'homologie à la protéine Src (SH)2 et SH3, permettent respectivement des interactions avec des régions riches en proline et avec des tyrosines phosphorylées (Hantschel, 2012). La protéine ABL possède également un domaine tyrosine kinase qui lui confère son activité. Enfin, en position C-terminale se trouve un domaine ABD de liaison à l'ADN et à l'actine β.

La capacité d'auto-inhibition de la protéine ABL est due à l'interaction du myristate avec une poche hydrophobe située dans le lobe C du domaine kinase, ce qui va maintenir la protéine dans une conformation inactive dite « fermée ». Lors de la libération du myristate au moment de sa liaison à une protéine, la liaison de ligands phosphorylés aux domaines SH2 et SH3 devient possible et ainsi la protéine ABL passe en conformation inactive « ouverte » permettant ainsi l'autophosphorylation de la tyrosine 416 située sur la boucle d'activation ou boucle A. La conformation de la protéine ABL est alors appelée conformation active « ouverte » (Figure 5) (Hantschel, 2012; Sorel *et al.*, 2017).

La protéine ABL intervient dans la dynamique du cytosquelette (adhésion, polarité, migration cellulaire, protrusions cellulaires), et est impliquée dans la prolifération et la survie cellulaire, dans le transport membranaire (endocytose, macropinocytose, phagocytose, formation de cavéoles) en phosphorylant des récepteurs et facteurs endocytaires comme le récepteur du facteur de croissance épidermique (EGFR), le récepteur de la chaîne bêta du facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGFRB) et le récepteur tyrosine kinase spécifique du muscle (MUSK) (Colicelli, 2010), et enfin dans l'autophagie (Wang, 2014; Khatri *et al.*, 2016).

La protéine ABL est notamment impliquée dans les maladies neurodégénératives et la neuro-inflammation (Wang, 2014; Khatri *et al.*, 2016).

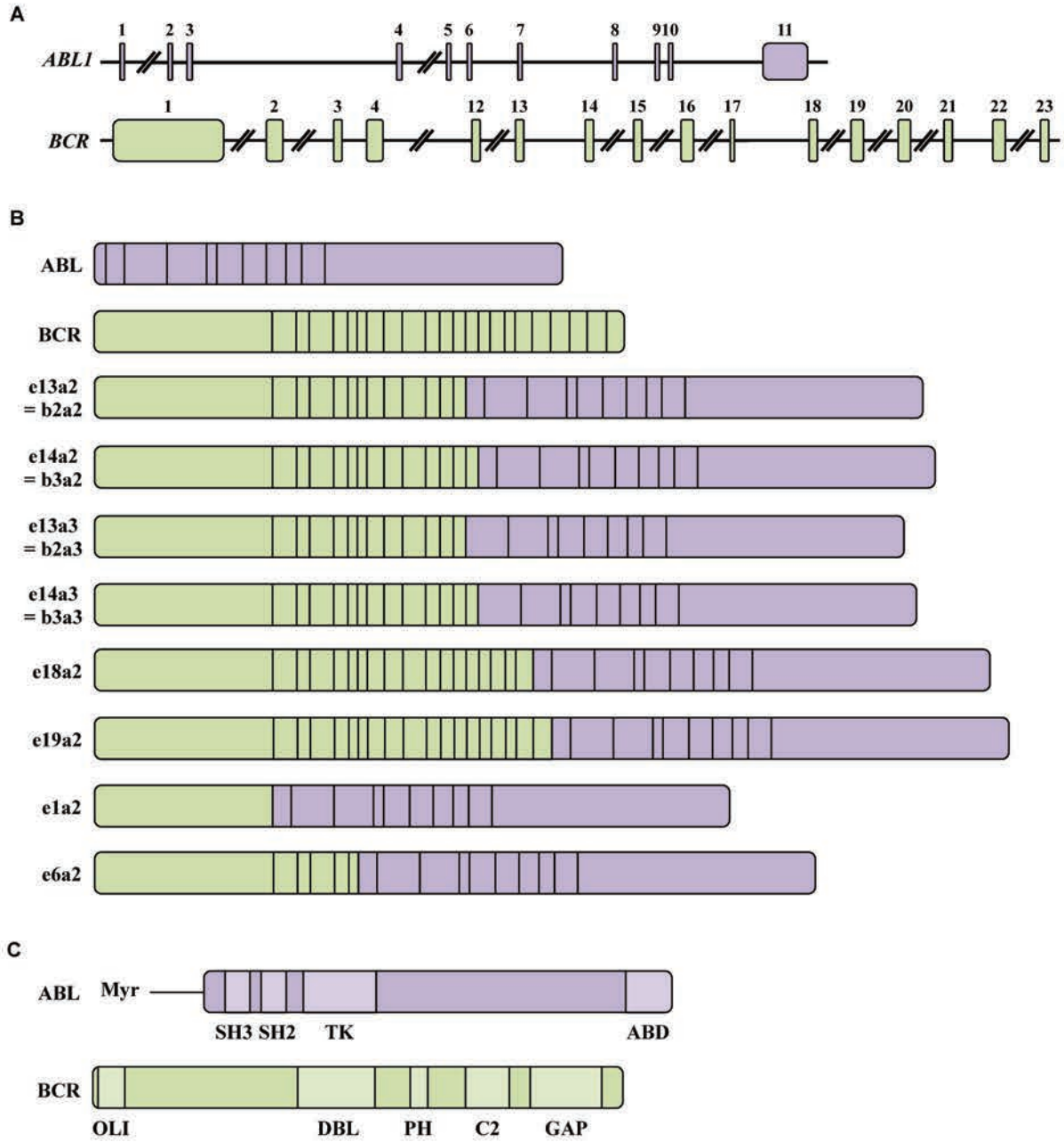


Figure 4 : Des points de cassure dans les gènes *ABL1* et *BCR* entrainent la formation de différents transcrits codant pour la protéine chimère BCR-ABL.

(A) Structure des gènes *Abelson (ABL)1* et *breakpoint cluster region (BCR)* composés respectivement de 11 et 23 exons. (B) Schéma des transcrits ABL, BCR et hybrides BCR-ABL. Le nom de l'ARNm hybride eXaY signifie qu'une coupure a eu lieu après l'exon X de BCR et avant l'exon Y de ABL. (C) La protéine ABL comprend une longue chaine lipidique, myristate (Myr), des domaines SH2 et SH3 d'homologie à la protéine Src, un domaine tyrosine kinase (TK) et enfin un domaine ABD de liaison à l'ADN et à l'actine β. La protéine BCR comprend un domaine d'oligomérisation (OLI), un domaine d'homologie à la protéine DBL [facteur d'échange de la guanosine diphosphate (GDP) en guanosine triphosphate (GTP)], un domaine d'homologie à la pleckstrine (PH), un domaine C2 de liaison de phospholipides dépendants du calcium et enfin un domaine GAP (*GTPase activating protein*) à activité GTPase (hydrolyse de la GTP en GDP et ion phosphate) pour les protéines Rac.

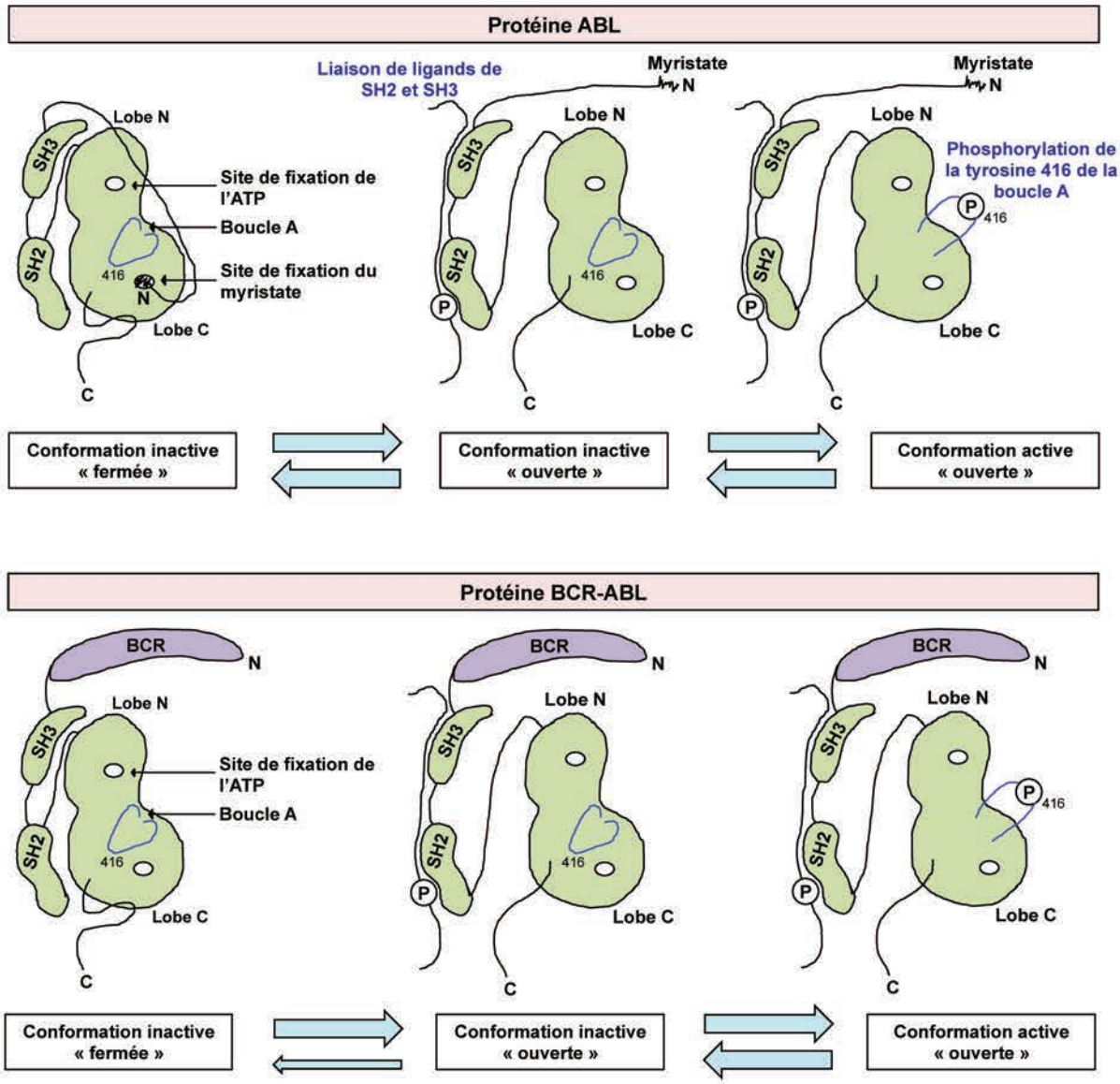


Figure 5 : Schéma représentant les conformations inactive et active des protéines ABL et BCR-ABL.

La protéine *Abelson (ABL)* a une capacité d'auto-inhibition grâce au myristate se fixant sur le lobe C du domaine kinase, ce qui maintient la protéine dans une conformation inactive « fermée ». Lorsque le myristate est libéré, la liaison de ligands phosphorylés peut avoir lieu avec les domaines SH2 et SH3, la protéine passe alors en conformation inactive « ouverte », rendant possible l'autophosphorylation de la tyrosine 416 ; la protéine passe alors en conformation active « ouverte ». Pour la protéine BCR-ABL, le myristate étant remplacé par BCR après réarrangement chromosomique, sa conformation inactive « fermée » est moins stable donc l'équilibre se déplace vers la conformation inactive « ouverte », puis vers la conformation active « ouverte ». D'après (Sorel *et al.*, 2017).

6. Gène et protéine BCR

Le gène *BCR* est composé de 23 exons et conduit à la formation d'un transcrit de 1271 acides aminés, et ainsi à une protéine BCR de 160 kDa (Figure 4) qui possède une activité sérine/thréonine kinase et une localisation essentiellement cytoplasmique (Laurent *et al.*, 2001).

En position N-terminale la protéine BCR possède un domaine d'oligomérisation. Des mutations de ce domaines entrainent une diminution de l'activité tyrosine kinase de la protéine BCR-ABL et empêchent l'interaction des protéines BCR et BCR-ABL. La protéine BCR possède également un domaine d'homologie à la protéine DBL, un facteur d'échange de la guanosine diphosphate (GDP) en guanosine triphosphate (GTP ; GDP/GTP), un domaine d'homologie à la pleckstrine (PH), un domaine C2 de liaison de phospholipides dépendants du calcium et enfin un domaine *GTPase activating protein* (GAP) à activité GTPase pour les protéines Rac en position C-terminale (Park *et al.*, 2012).

7. Transcrits et protéines BCR-ABL

Il existe de multiples points de cassure sur les gènes *BCR* et *ABL* qui conduisent à la formation de différents transcrits (Figure 4). Ces transcrits codent pour des protéines BCR-ABL de tailles différentes qui sont retrouvées chez les patients (Tableau 1) (Apperley, 2007).

Tableau 1 : Transcrits et protéines BCR-ABL humains.

Le nom et la composition des différents transcrits hybrides BCR-ABL humains identifiés chez les patients sont décrits. La taille des protéines correspondantes, leur fréquence chez les patients et les lignées cellulaires les exprimant sont aussi indiquées.

Transcrit *BCR-ABL*			**Taille de la protéine correspondante (kDa)**	**Exemples de lignées cellulaires de LMC**	**Références**
Nom de l'ARNm hybride	**Composition**				
	Exons *BCR*[$]	**Exons *ABL*[£]**			
e13a2 ou b2a2	1 à 13	2 à 11	210	MEG-01, KBM-7, KYO-1, CML-T1, KCL-22	(Drummond *et al.*, 2003; Schultheis *et al.*, 2003; Withey *et al.*, 2005; Vergilio *et al.*, 2007)
e14a2 ou b3a2	1 à 14	2 à 11	210	K-562, KBM-5, LAMA-84, EM-3, TK-6, EM-2	(Beran *et al.*, 1993; Drummond *et al.*, 2003; Schultheis *et al.*, 2003; Withey *et al.*, 2005)
e13a3 ou b2a3	1 à 13	3 à 11	210	NA	(Yaghmaie *et al.*, 2008)
e14a3 ou b3a3	1 à 14	3 à 11	210	NA	(Yaghmaie *et al.*, 2008)

e18a2	1 à 18	2 à 11	225	AR-230	(Schultheis *et al.*, 2003; van der Velden *et al.*, 2007)
e19a2	1 à 19	2 à 11	230	AR-230	(Schultheis *et al.*, 2003; Yaghmaie *et al.*, 2008)
e1a2	1	2 à 11	190	SUP-B15*, Z-33*, SD-1*, TOM-1*, Z-119*	(Schultheis *et al.*, 2003; Vergilio *et al.*, 2007)
e6a2	1 à 6	2 à 11	185	NA	(Hochhaus *et al.*, 1996)

[$]Sur les 23 exons qui composent le gène *BCR*. [£]Sur les 11 exons qui composent le gène *ABL*.
*Lignées de leucémie lymphocytaire aiguë.
ABL : *Abelson* ; BCR : *breakpoint cluster region* ; NA : non applicable.

La protéine BCR-ABL active de nombreux substrats (Tableau 2) et voies de signalisation, et notamment certaines impliquées dans la prolifération et la survie cellulaire, par l'intermédiaire de l'augmentation de l'activité ou de l'expression d'une série de protéines anti-apoptotiques telles que le transducteur de signaux et activateur de la transcription (STAT)5, Akt, phosphoinositide 3-kinase (PI3K), *myeloid cell leukemia 1* (Mcl-1), ou *B-cell lymphoma-extra large* (Bcl-X_L) (Figure 6).

Tableau 2 : Substrats de BCR-ABL.

Substrats	Site de phosphorylation	Fonction	Références
Abi 1 et 2	ND	Prolifération cellulaire	(Dai *et al.*, 1998)
BAP-1	Résidus sérines et tyrosines	Prolifération cellulaire	(Reuther *et al.*, 1994; Los, 2009)
Cbl	Tyr674	Inconnue	(Goldman *et al.*, 2003; Goss *et al.*, 2006; Los, 2009)
CK2	ND	Cycle cellulaire, apoptose, transcription, infection virale	(Shin *et al.*, 2005; St-Denis *et al.*, 2009; Morotti *et al.*, 2015)
Crk	Tyr221	Migration et adhésion cellulaire	(Feller, 2001; Los, 2009)
CrkL	Tyr207	Migration et adhésion cellulaire	(Feller, 2001; Los, 2009)
Dok1	Tyr361	Régulation négative des voies de signalisation médiées par les protéines tyrosine kinase	(Los, 2009; Mashima *et al.*, 2009; Colicelli, 2010)
Fes	ND	Différenciation myéloïde	(Lionberger *et al.*, 2000; Los, 2009)
GAP-associated proteins	ND	Activation de Ras	(Los, 2009)
GCKR	ND	Activation de SAPK	(Shi *et al.*, 2000; Goldman *et al.*, 2003)
Grb2	Tyr209	Activation de Ras	(Puil *et al.*, 1994; Li *et al.*, 2001; Goldman *et al.*, 2003)
LASP1	Tyr171	Interaction avec le cytosquelette, migration et survie cellulaire	(Frietsch *et al.*, 2014; Orth *et al.*, 2015)
Lyn	ND	Survie cellulaire	(Liang *et al.*, 2006)
Paxilline	ND	Adhésion focale, signalisation et	(Los, 2009; Lopez-

		migration cellulaire	Colome *et al.*, 2017)
PLCγ	Tyr69/Tyr74	Réorganisation de l'actine β et migration cellulaire	(Wang *et al.*, 2007; Los, 2009)
PI3-K p85	ND	Prolifération, survie et motilité cellulaire	(Los, 2009; Kuchay *et al.*, 2013)
PKD	Tyr463	Prolifération, migration et survie cellulaire, angiogenèse, régulation de l'expression des gènes	(Los, 2009; Roy *et al.*, 2017)
P27Kip1	Tyr88	Prolifération cellulaire	(Grimmler *et al.*, 2007)
p73	ND	Activation de la transcription	(Los, 2009)
Rad9	Tyr28	Réparation de dommages à l'ADN	(Los, 2009)
Rad51	Tyr54	Réparation de dommages à l'ADN	(Los, 2009)
Ras-GAP	ND	Apoptose, prolifération et migration cellulaire	(Los, 2009; Pamonsinlapatham *et al.*, 2009)
RNA-Polymerase II	C-terminal	Transcription	(Los, 2009)
RAFT1	ND	Prolifération cellulaire, autophagie, réorganisation du cytosquelette	(Kim *et al.*, 2002; Los, 2009)
Shc	Tyr427	Migration, angiogenèse	(Audero *et al.*, 2004; Goss *et al.*, 2006; Los, 2009)
SHIP1, SHIP2	Tyr986 et Tyr1135 (SHIP2)	Transduction du signal, programmation des macrophages, phagocytose, migration	(Freeburn *et al.*, 2002; Goldman *et al.*, 2003; Goss *et al.*, 2006)
STAT5	Tyr694	Transduction du signal, activation de la transcription	(Berger *et al.*, 2014)

Syp	ND	Inconnue	(Los, 2009)
Taline	ND	Transmission de signaux entre la matrice extracellulaire et le cytosquelette	(Los, 2009; Rahikainen *et al.*, 2017)
TERT	ND	Intégrité génomique	(Los, 2009; La *et al.*, 2016)
VAV p95	ND	Différenciation hématopoïétique	(Los, 2009)

Abi : *Abelson interactor* ; BAP-1 : *breakpoint cluster region-associated protein 1* ; Cbl : *Casitas-B-lineage protein* ; CK : *casein kinase* ; CrkL : *Crk like protein* ; Dok : *docking protein* ; GAP : *guanosine triphosphate* (*GTP)ase-activating proteins* ; GCKR : *germinal-center kinase related protein* ; Grb2 : *growth factor receptor-bound protein 2* ; LASP1 : *LIM and Src homology (SH)3 protein 1* ; ND : non determiné ; PLCγ : phospholipase C-γ ; PI3-K : *phosphatidylinositol 3-kinase* ; PKD : *protein kinase D* ; RAFT1 : *rapamycin and FK506-binding protein (FKBP)-target 1* ; Ras-GAP : RAS GTPase activating proteins ; Shc : *Src homology 2 domain containing* ; SHIP : *SH2-containing inositol polyphosphate 5-phosphatase* ; Syp : *SH2-containing phosphotyrosine phosphatase* ; TERT : *telomerase reverse transcriptase* ; *Tyr : tyrosine*.

Parmi les substrats de BCR-ABL, les protéines Lyn et *Crk like protein* (CrkL) sont fréquemment étudiées. En effet, la protéine Lyn est particulièrement intéressante car elle est un substrat de BCR-ABL, mais elle est également capable de phosphoryler la tyrosine 177 de BCR-ABL par rétrocontrôle et ainsi permettre le recrutement de la protéine de liaison associée à la protéine liée au récepteur du facteur de croissance (Grb)2 (Gab2), un des principaux activateurs de la voie de signalisation PI3K (Ingley, 2012) (Figure 6). De plus, la phosphorylation de la tyrosine 207 de la protéine adaptatrice CrkL est généralement utilisée comme indicateur de l'activité de BCR-ABL (Jilani *et al.*, 2008) (Figure 6).

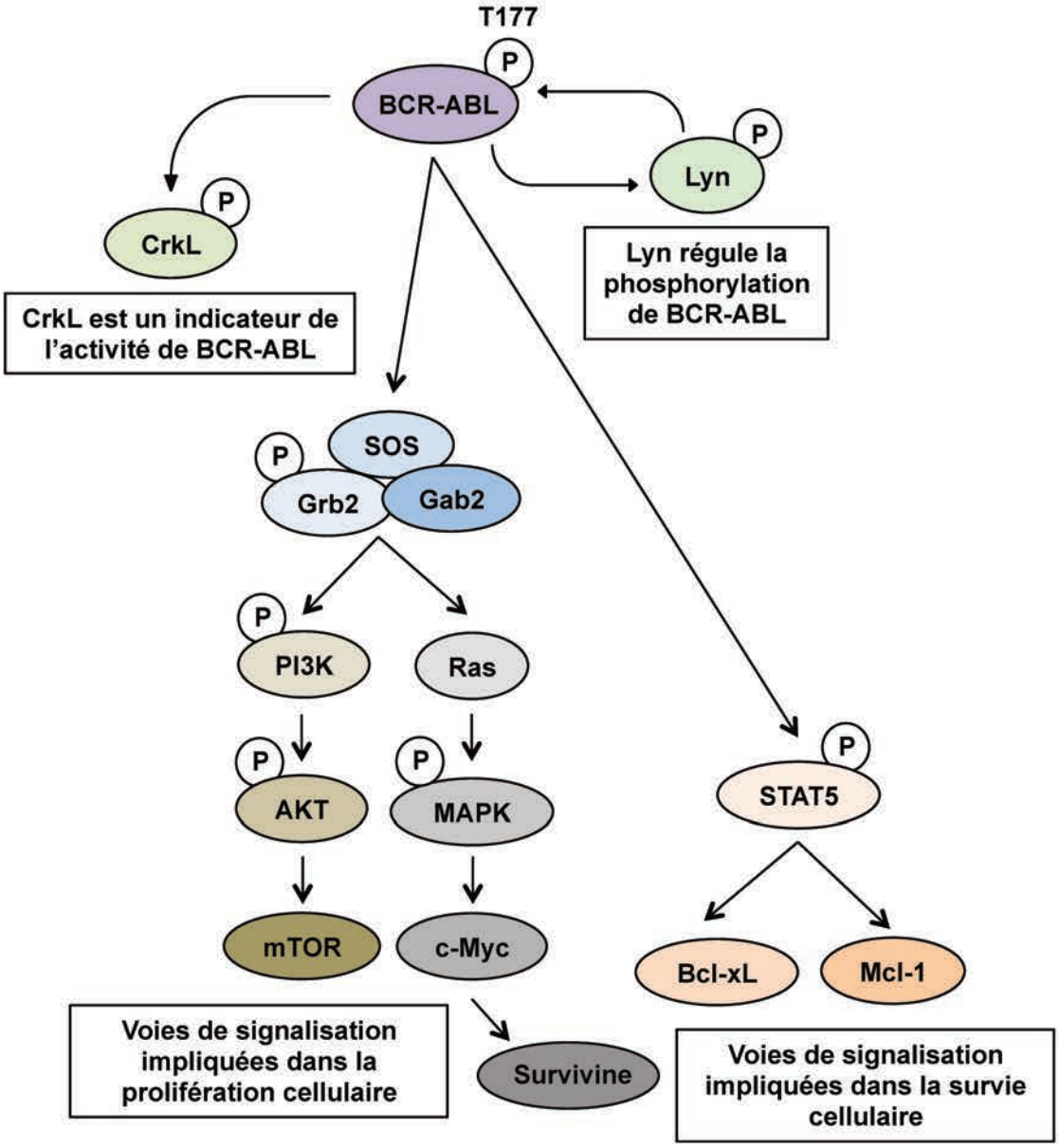


Figure 6 : Voies de signalisation activées par la protéine BCR-ABL qui sont impliquées dans la survie et la prolifération des cellules de leucémie myéloïde chronique.

La protéine BCR-ABL induit la phosphorylation de nombreuses protéines dont *Crk like protein* (CrkL) qui est utilisée comme indicateur de l'activité de BCR-ABL et Lyn qui régule la phosphorylation de la tyrosine (T) 177 de BCR-ABL par rétrocontrôle permettant ainsi l'activation des voies de signalisation dépendantes de BCR-ABL. La protéine liée au récepteur du facteur de croissance (Grb)2 phosphorylée par BCR-ABL est associée à la protéine *son of sevenless* (SOS) et à la protéine de liaison associée à Grb2 (Gab2), et active les voies de signalisation phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) et Ras qui est responsable de l'expression du gène c-Myc *via* MAPK. La survivine, une protéine inhibitrice de l'apoptose, est régulée par c-Myc. BCR-ABL induit la phosphorylation des protéines transductrices du signal et activatrices de la transcription (STAT)5. STAT5 est responsable de l'expression des gènes *B-cell lymphoma-extra large* (Bcl-x_L) et *myeloid cell leukemia 1* (Mcl-1). Ces voies de signalisation par BCR-ABL sont impliquées dans la survie et la prolifération cellulaire.

II. Traitements de la leucémie myéloïde chronique et résistances associées

1. Historique des thérapies

Dans les années soixante, après la découverte du chromosome de Philadelphie, la LMC était traitée par chimiothérapie avec le busulfan, un agent alkylant, qui a permis une amélioration de la survie des patients mais qui a été reconnu plus tard comme étant potentiellement mutagène ; puis traitée avec l'hydroxyurée, empêchant la synthèse de l'ADN en agissant sur la ribonucléotide réductase, dans les années soixante-dix. Malgré une normalisation de la numération formule sanguine, ces traitements n'empêchaient pas l'évolution de la pathologie (Sorel *et al.*, 2017). Deux stratégies thérapeutiques différentes firent leur apparition dans les années soixante-dix, la greffe de cellules souches allogéniques et l'utilisation de l'interféron α (Apperley, 2015).

L'interféron α, une protéine jouant un rôle dans la réponse immunitaire, va avoir une action antiproliférative dans le cas de la LMC. Il est généralement utilisé en combinaison avec une molécule chimiothérapeutique pour de meilleurs résultats. Du fait de son implication dans de nombreuses voies cellulaires, le traitement par l'interféron α entraine de nombreux effets secondaires (Apperley, 2015).

La greffe de cellules souches allogéniques consiste à éliminer toute cellule de la moelle osseuse par irradiation ou chimiothérapie afin de les remplacer par des cellules saines provenant d'un donneur compatible. Ce traitement n'est envisagé que chez les sujets de moins de trente ans en phase accélérée ou blastique et reste une procédure risquée et lourde bien qu'elle soit potentiellement curative (Apperley, 2015).

2. Thérapie ciblée par un inhibiteur de tyrosine kinase

Une nouvelle thérapie voit le jour en 2001 avec l'autorisation de mise sur marché par l'agence américaine des produits alimentaires et médicamenteux (*Food Drug Administration*, FDA) de l'imatinib (Glivec®), un ITK. Les ITK représentent une avancée majeure pour la prise en charge des patients atteints de LMC en permettant une thérapie ciblée qui n'existait pas auparavant.

Il existe deux types d'ITK. Les ITK de type I ont pour cible la conformation active et inactive de la protéine BCR-ABL et se fixent sur le site de fixation de l'ATP situé sur le domaine tyrosine kinase de la protéine, tandis que les inhibiteurs de type II ont pour cible la conformation inactive de la protéine et se fixent sur un site adjacent au site de liaison de

l'ATP disponible uniquement lorsque la boucle d'activation n'est pas phosphorylée (Hantschel *et al.*, 2012; Sorel *et al.*, 2017) (Figure 5).

L'imatinib, un ITK de première génération, est de type II. Son action va donc empêcher la liaison de l'ATP et ainsi bloquer la protéine sous sa forme inactive et prévenir son autophosphorylation et par conséquent la phosphorylation de ses substrats (Apperley, 2015) (Figure 7). L'imatinib est aujourd'hui devenu le traitement de première intention de la LMC avec une prise orale quotidienne et non plus injectable, apportant un réel confort au patient. D'après l'étude IRIS, incluant 1106 nouveaux patients atteints de LMC, il est observé chez 76% des patients traités par imatinib la disparition du chromosome de Philadelphie également appelée réponse cytogénétique complète (Apperley, 2015). Ce nouveau traitement par ITK permet donc une stabilisation de la pathologie en phase chronique, permettant aux patients de pouvoir vivre normalement tout en suivant un traitement à vie bien qu'il soit responsable de nombreux effets secondaires dont la fatigue, les maux de tête, l'anémie et les myalgies qui sont les plus fréquents, et allant parfois même jusqu'à provoquer une toxicité sur des organes tels que le foie ou le cœur tel qu'un allongement de l'intervalle QT associé à un risque élevé de troubles du rythme ventriculaire graves chez moins de 1% des patients traités à l'imatinib (Apperley, 2015).

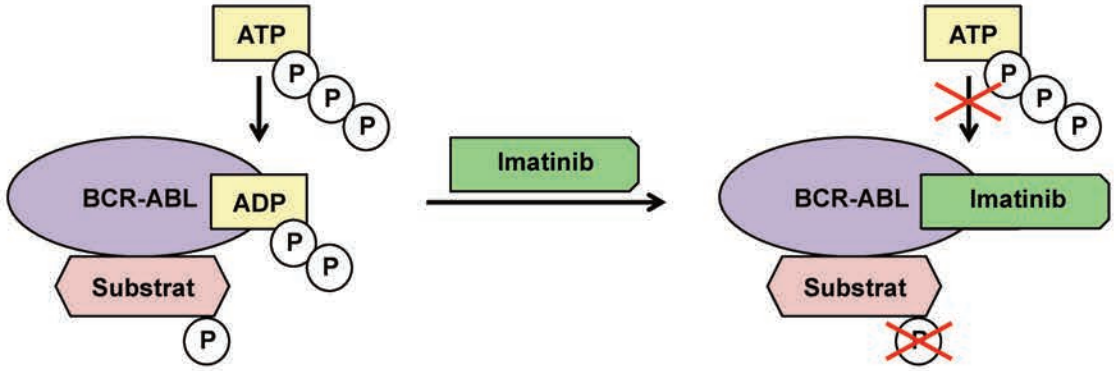


Figure 7 : Liaison de l'imatinib à la protéine BCR-ABL.

L'imatinib occupe un site adjacent à la poche permettant la liaison à l'ATP située sur le domaine tyrosine kinase de *breakpoint cluster region-Abelson* (BCR-ABL), empêche la liaison de l'ATP et ainsi bloque la protéine sous sa forme inactive et prévient son autophosphorylation ainsi que la phosphorylation de ses substrats.

Les patients traités à l'imatinib doivent être étroitement suivis afin d'évaluer leur réponse au traitement. Il existe trois types de réponses qui correspondent aux réponses hématologique, cytogénétique et moléculaire. Une réponse hématologique complète correspond à une normalisation des taux sanguins et de la taille de la rate. Un examen est

réalisé toutes les deux semaines jusqu'à atteindre une réponse hématologique complète suivi d'un contrôle tous les trois mois. Puis un examen est réalisé tous les 6 mois jusqu'à atteindre une réponse cytogénétique complète, définie précédemment, puis tous les 12 à 18 mois. Enfin, une réponse moléculaire complète correspond à la disparition totale du transcrit de BCR-ABL mesuré par transcription inverse suivie d'une amplification par PCR en temps réel. Ce test est effectué tous les 3 mois selon les recommandations de l'*european leukemia net* (ELN) (An *et al.*, 2010).

3. Résistances à l'imatinib

Bien que l'imatinib soit le traitement de référence pour la LMC, 35 à 40% des patients développent des résistances à ce médicament (Ankathil *et al.*, 2018). Il est possible de distinguer les résistances primaires, définies comme une absence de réponse hématologique complète après 3 mois, de réponse cytogénétique après 6 mois ou enfin de réponse cytogénétique majeure après un an de traitement, des résistances secondaires, également appelées résistances acquises lorsque la réponse hématologique ou cytologique complète précédemment acquise est perdue. Les résistances peuvent également être classées en fonction de leur dépendance ou non à BCR-ABL (Danisz *et al.*, 2013; Alikian *et al.*, 2017). L'émergence de résistances a conduit au développement de nouveaux ITK présentés dans le Tableau 3 et la Figure 8 (Yang *et al.*, 2015; Ault *et al.*, 2016; Emole *et al.*, 2016; Keskin *et al.*, 2016; Soverini *et al.*, 2018).

Tableau 3 : Inhibiteurs de tyrosine kinase approuvés par l'agence américaine des produits alimentaires et médicamenteux pour le traitement de la leucémie myéloïde chronique.

Les inhibiteurs de tyrosine kinase sont regroupés en fonction de la génération à laquelle ils appartiennent, et leurs autres noms, la compagnie pharmaceutique ainsi que l'année de leur autorisation de mise sur le marché par l'agence américaine des produits alimentaires et médicamenteux (*food and drug administration*, FDA), leurs cibles sont présentées, ainsi que leur dosage quotidien lors d'un traitement de première intention chez l'adulte. Les structures sont présentées dans la Figure 8.

Génération	Nom (et autres)	Compagnie pharmaceutique et année d'autorisation de mise sur le marché par la FDA	Cibles	Dosage quotidien chez l'adulte	Références
1ère	Imatinib° (Gleevec, STI571, CGP57148B)	Novartis, 2001	BCR-ABL, c-KIT, PDGFR	400 mg en une prise	(Yang *et al.*, 2015 ; Soverini *et al.*, 2018)
2ème	Dasatinib* (Sprycel, BMS-354825)	Bristol-Myers Squibb, 2006	BCR-ABL, famille Src, c-KIT, PDGFR	100 mg en une prise	(Yang *et al.*, 2015 ; Keskin *et al.*, 2016 ; Soverini *et al.*, 2018)
	Nilotinib° (Tasigna, AMN107)	Novartis, 2007	BCR-ABL, c-KIT, PDGFR	300 mg en deux prises	(Yang *et al.*, 2015 ; Emole *et al.*, 2016 ; Soverini *et al.*, 2018)
	Bosutinib* (Bosulif, SKI-606)	Pfizer, 2012	BCR-ABL, famille	500 mg en une prise	(Yang *et al.*, 2015 ; Ault *et al.*,

			Src		2016 ; Soverini *et al.*, 2018)
3ème	Ponatinib° (Iclusig, AP24534)	ARIAD Pharmaceuticals, 2012	BCR-ABL, FTL3, famille Src, RET	45 mg en une prise	(Yang *et al.*, 2015 ; Soverini *et al.*, 2018)

° Inhibiteur de type II se liant à la conformation inactive de BCR-ABL.

* Inhibiteur de type I se liant à la conformation active et inactive de BCR-ABL.

BCR-ABL : *breakpoint cluster region-Abelson* ; FTL3 : *Fms-like tyrosine kinase 3* ; PDGFR : *platelet-derived growth factor receptor* ; RET : *rearranged during transfection*.

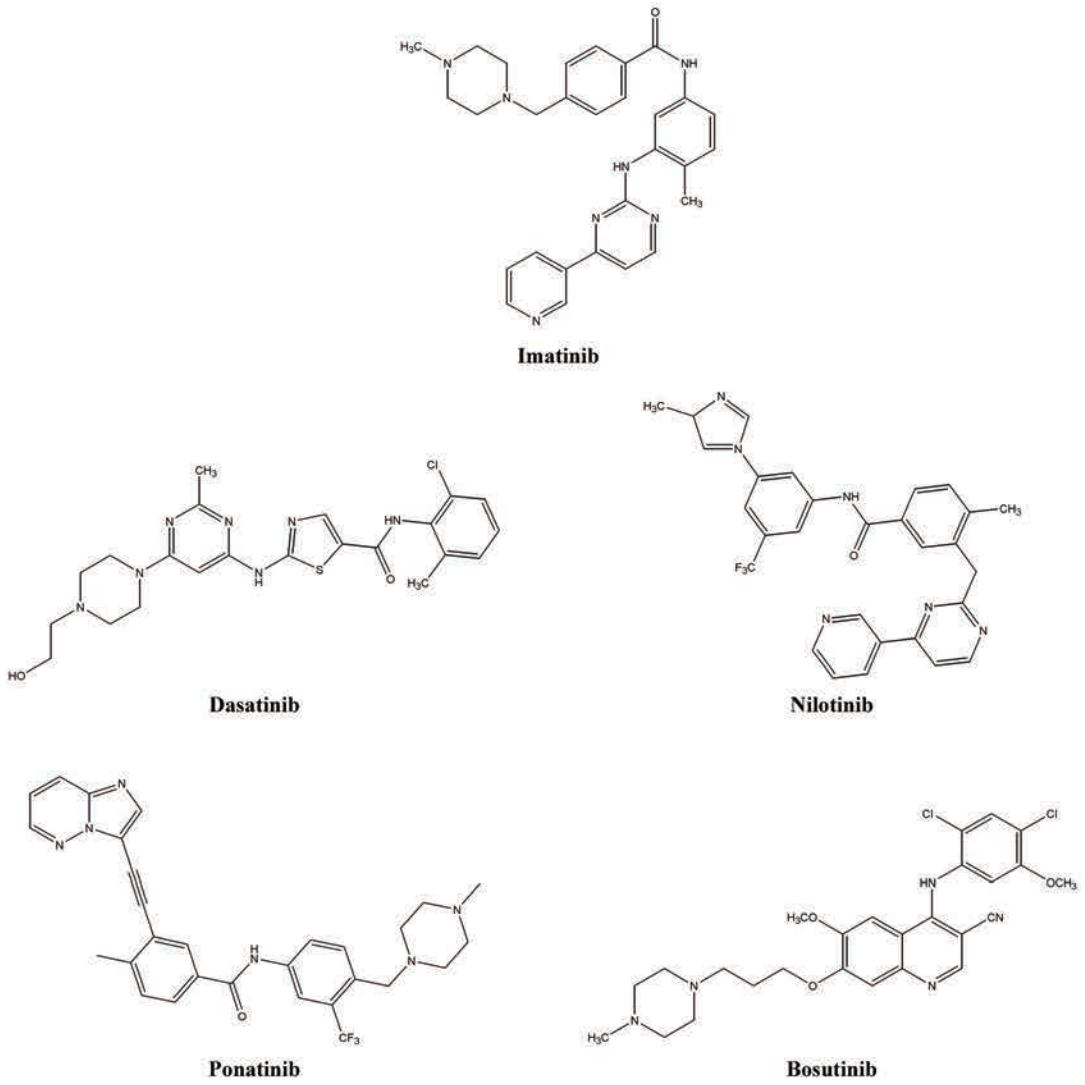


Figure 8 : Structures chimiques des inhibiteurs de tyrosine kinase approuvés par l'agence américaine des produits alimentaires et médicamenteux pour le traitement de la leucémie myéloïde chronique.

L'imatinib est un inhibiteur de tyrosine kinase (ITK) de première génération, le dasatinib, le nilotinib et le bosutinib sont des ITK de deuxième génération et le ponatinib est un ITK de troisième génération.

a. Résistances dépendantes de BCR-ABL

Parmi les résistances dépendantes de BCR-ABL on retrouve la duplication ainsi que la mutation du gène *BCR-ABL* (Figure 9). En effet, une duplication du gène a été découverte à partir de cellules de patients résistants à l'imatinib et pourrait être une source possible de résistance au médicament (Bu *et al.*, 2014). Bien qu'une surexpression de BCR-ABL ait été reportée chez les patients atteints de LMC en phase accélérée et blastique devenus résistants à l'imatinib, plusieurs études ont montré que seuls 3% des patients résistants à l'imatinib possèdent une amplification du gène *BCR-ABL* (Jabbour *et al.*, 2013).

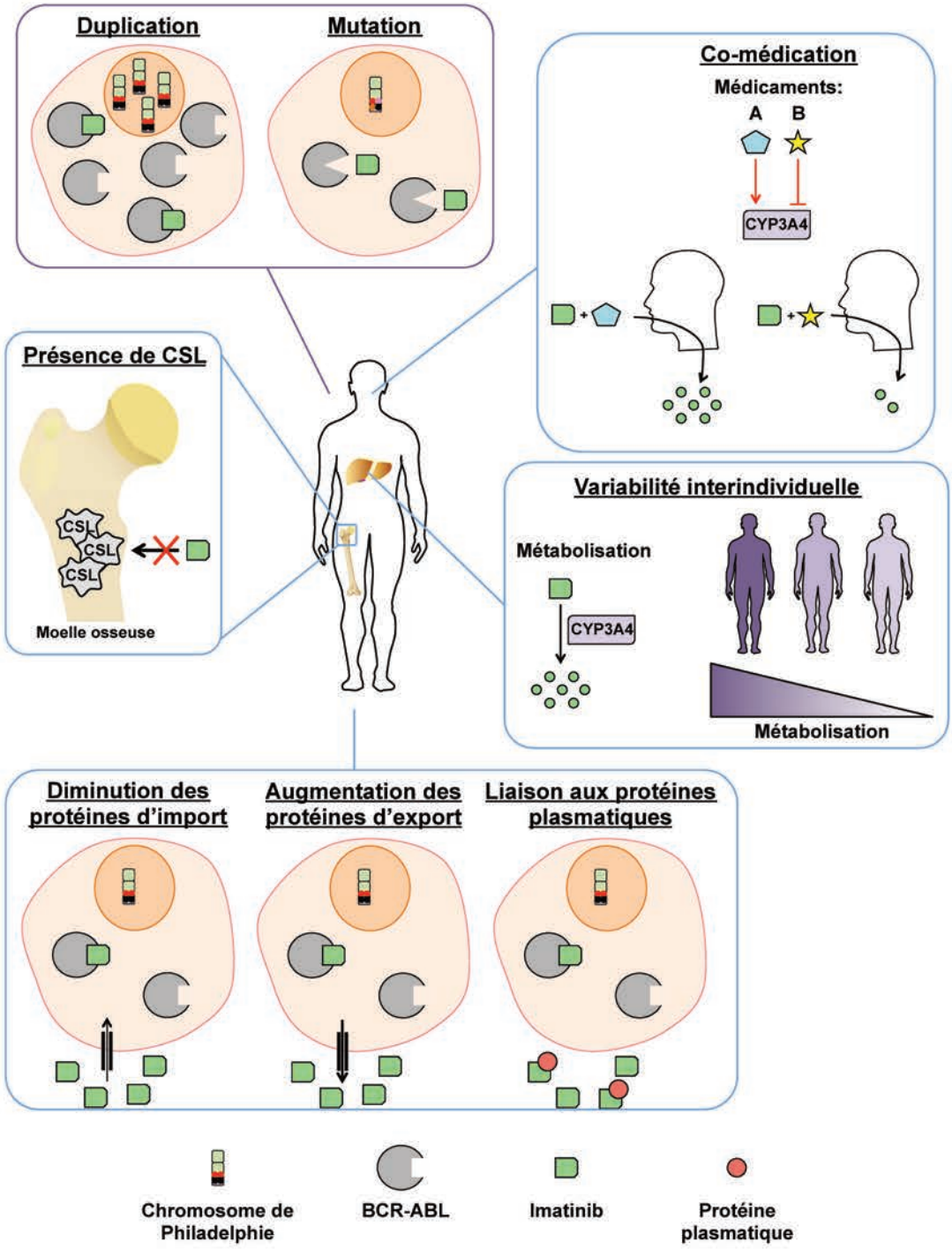


Figure 9 : Principales résistances à l'imatinib dépendantes et indépendantes de BCR-ABL.

Les phénomènes de duplication et de mutation de *BCR-ABL* d'une part, ainsi que la co-médication, la variété interindividuelle, la diminution des protéines d'import, l'augmentation des protéines d'export, la liaison de l'imatinib aux protéines plasmatiques et la présence de cellules souches leucémiques (CSL) insensibles à l'imatinib d'autre part, peuvent expliquer respectivement les résistances dépendantes (entourées de violet) et indépendantes (entourées de bleu) de BCR-ABL. CYP : cytochrome P450.

Les mutations de *BCR-ABL* sont présentes chez 40 à 90% des patients résistants à l'imatinib, selon la sensibilité de la méthode de détection et le stade de la LMC (Balabanov *et al.*, 2014). A ce jour plus d'une centaine ont été découvertes (Etienne *et al.*, 2019), pouvant expliquer la baisse de l'efficacité du traitement et ainsi la survenue de phénomène de résistance (Bu *et al.*, 2014). La première mutation décrite, qui est également la plus fréquente, représente 14% des mutations détectées (Jabbour *et al.*, 2013), et correspond à la substitution nucléotidique d'une cytosine par une thymine en position 944 du gène *ABL*. Cette mutation entraine la substitution de l'acide aminé 315 de la protéine ABL initialement thréonine, par une isoleucine (T315I). Cela a pour conséquence la perte d'une molécule d'oxygène nécessaire à la liaison hydrogène entre l'imatinib et le domaine tyrosine kinase, mais aussi la création d'un encombrement stérique empêchant cette liaison, ce qui explique la perte d'efficacité du traitement (Bixby *et al.*, 2009 ; Seidel *et al.*, 2015 ; Linev *et al.*, 2018).

Les sept mutations les plus communes sont : G250A/E, Y253F/H et E255D/K/R/V situées dans la boucle P de liaison à l'ATP, T315I située au niveau du site de liaison à l'imatinib, M351T et F359C/L/V/R situées dans la boucle catalytique et enfin H396P située au niveau de la boucle A d'activation, et représentent environ 66% de toutes les mutations trouvées à ce jour (Jabbour *et al.*, 2013). Les mutations ayant lieu au niveau de la boucle P représentent 38 à 46% des mutations et entrainent un changement de conformation empêchant alors l'imatinib de se lier à BCR-ABL (An *et al.*, 2010). Les mutations ayant lieu au niveau de la boucle A bloquent BCR-ABL en conformation active, empêchant alors également la liaison à l'imatinib (Jabbour *et al.*, 2013).

Il est intéressant de noter que la fréquence des mutations semble plus importante chez les patients ayant développé une résistance secondaire et que le type de mutations varie en fonction de l'évolution de la pathologie. En effet, les mutations des acides aminés en position 244, 250 et 351 sont plus fréquentes chez les patients en phase chronique tandis que les mutations des acides aminés en position 253, 255 et 315 sont plus fréquemment rencontrées chez les patients en phase accélérée ou blastique (Jabbour *et al.*, 2013).

b. Résistances indépendantes de BCR-ABL

Les résistances indépendantes de BCR-ABL peuvent être expliquées par la variabilité interindividuelle, par l'augmentation de protéines d'export, par la diminution de protéines d'import, par la liaison de l'imatinib à des protéines plasmatiques, mais encore par la présence de CSL (Bixby *et al.*, 2009).

La variabilité interindividuelle peut expliquer une métabolisation différente du médicament et ainsi une réponse au médicament différente selon les patients. En effet, la métabolisation de l'imatinib en son principal métabolite circulant, le dérivé pipérazine N-déméthylé (Ankathil *et al.*, 2018), est due au cytochrome P450 (CYP), et en particulier à l'isoforme CYP3A4 dont l'activité est variable en fonction des individus, pouvant ainsi expliquer des taux d'imatinib moins importants chez certains patients malgré une dose ingérée similaire. De plus, le cytochrome CYP3A4 peut être activé ou inhibé par de nombreux médicaments. La métabolisation de l'imatinib par CYP3A4 peut donc être plus ou moins importante lors d'une co-médication (Balabanov *et al.*, 2014).

Une faible concentration cellulaire d'imatinib peut être expliquée par la diminution de protéines d'import ou par l'augmentation de protéines d'export (Figure 9). En effet, il a été montré que le transporteur de cations organiques OCT1 est responsable de l'influx de l'imatinib dans les cellules leucémiques et qu'un polymorphisme de ce transporteur est associé à une résistance des cellules de LMC K-562 à l'imatinib (Jabbour *et al.*, 2013). De plus, la glycoprotéine P également appelée *multi-drug resistance protein 1* (MDR1) est une protéine d'export dont la surexpression a été associée à l'échec du traitement des leucémies par chimiothérapie. Des études ont de plus montré que l'imatinib était également un des substrats de la glycoprotéine P (Holohan *et al.*, 2013).

Bien que cette hypothèse soit controversée dans la littérature, la liaison de l'imatinib aux protéines plasmatiques telles que l'alpha-1-glycoprotéine acide (AGP) pourrait expliquer la diminution de concentration libre d'imatinib décrite chez certains patients et ainsi une réponse faible voire inexistante au traitement (An *et al.*, 2010; Jabbour *et al.*, 2013).

Enfin, l'existence de CSL quiescentes non affectées par les thérapies médicamenteuses actuelles (Figure 9) et caractérisées par une forte activité de l'enzyme aldéhyde déshydrogénase (ALDH) (Zhang *et al.*, 2014a), responsable de la détoxification d'aldéhydes cytotoxiques (Marcato *et al.*, 2011), expliquerait également l'apparition de résistances à l'imatinib. En effet, les CSL sont issues d'un groupe de progéniteurs myéloïdes gagnant la capacité de s'auto-renouveler, de devenir quiescent et enfin de survivre dans des microenvironnements spécifiques appelés niches hématopoïétiques. (Apperley, 2007). Ces dernières permettent des interactions entre les CSL et les cellules du microenvironnement, ce qui peut favoriser le développement de résistances. De plus, la persistance des CSL aux ITK pourrait être la cause de la maladie résiduelle moléculaire minimale pouvant favoriser à long

terme l'apparition de résistances et qui en fait des cellules potentiellement responsables de l'évolution clonale et de la progression de la LMC (Loscocco *et al.*, 2019).

4. Développement de nouveaux inhibiteurs de tyrosine kinase

L'apparition de résistances à l'imatinib a conduit au développement de nouveaux ITK ayant une activité sur les mutations spécifiques de la protéine BCR-ABL. Les molécules dasatinib et nilotinib, sur le marché respectivement depuis 2006 et 2007, sont des ITK de seconde génération utilisés en cas d'apparition de résistances à l'imatinib permettant une réponse cytogénétique complète durable dans environ 40% des cas. Malgré des résultats prometteurs, ces nouvelles molécules ne sont néanmoins pas efficaces chez les patients porteurs de la mutation T315I, et conduisent à l'apparition de nouvelles mutations menant à l'apparition de phénomènes de résistances et par conséquent à une baisse de leur efficacité. De plus, le rapport bénéfice risque est important à prendre en compte car les effets secondaires générés par les ITK de seconde génération sont nombreux et pour la plupart similaires à ceux générés par l'imatinib (Apperley, 2015). Selon les recommandations de l'ELN, en fonction de la détection de certaines mutations de BCR-ABL, un traitement spécifique doit être mis en place. Par exemple, en cas de mutations V299L, T315A ou F317L/V/I/C, le nilotinib sera certainement plus efficace que le dasatinib. En cas de mutations Y253H, E255K/V ou F359V/C/I, le dasatinib sera certainement plus efficace que le nilotinib. (Linev *et al.*, 2018).

Le ponatinib est considéré comme un ITK de troisième génération car il est le seul à être efficace chez les patients présentant des résistances à l'imatinib associées à la mutation T315I. Une réponse cytogénétique complète a été observée chez 46% des patients en phase chronique ayant déjà été traités avec d'autres ITK. Les données d'une étude de phase II ont suggéré une augmentation de l'incidence des événements thrombotiques artériels chez les patients recevant du ponatinib, mettant ainsi fin à une étude en phase III. De plus, cet ITK de troisième génération n'échappe pas à l'apparition de phénomènes de résistances (Apperley, 2015).

Plusieurs molécules sont donc utilisées en monothérapie pour le traitement des LMC. Cependant l'apparition de résistances nous amène à penser qu'elle intervient spécifiquement après l'atténuation de la fonction d'une cible unique. De ce fait, un ciblage unique n'est probablement pas suffisant pour éradiquer toutes les cellules cancéreuses, amenant les chercheurs à envisager de nouvelles stratégies thérapeutiques. L'administration simultanée de

plusieurs molécules permettrait de générer une activité anti-cancéreuse plus importante et de surmonter les problèmes de résistances aux médicaments (Bu *et al.*, 2014).

La combinaison de l'imatinib avec un inhibiteur d'HDAC paraît être particulièrement prometteuse. En effet, une équipe de chercheurs a décrit le développement de résistances à l'imatinib dans une lignée cellulaire de LMC par la surexpression simultanée des HDAC et la diminution d'expression de plusieurs acétyltransférases d'histones (HAT) (Bixby *et al.*, 2009). De plus, il a été montré que la combinaison d'inhibiteurs d'HDAC et d'imatinib induit l'apoptose des CSL quiescentes qui ne sont pas éliminées lors d'un traitement avec l'imatinib seul (Zhang *et al.*, 2010; O'Hare *et al.*, 2011).

Il est cependant important de prendre en compte la toxicité des inhibiteurs pan-HDAC. De ce fait, le ciblage d'un HDAC spécifique serait plus adéquat. Le ciblage de la protéine HDAC6 semble prometteur car cette enzyme intervient dans de nombreux phénomènes cellulaires et est surexprimée dans de nombreux types de cancers dont certaines leucémies. De plus, HDAC6 est indirectement lié à la protéine BCR-ABL et peut potentiellement entrainer sa dégradation (Seidel *et al.*, 2015).

III. Inhibiteurs d'HDAC6 en co-traitement

1. Les protéines HDAC

Les HDAC sont des enzymes catalysant la réaction de désacétylation des protéines (Figure 10), ce qui correspond à l'élimination d'un groupement acétyle des résidus lysine (Losson *et al.*, 2016). Les 18 HDAC retrouvées chez les mammifères sont divisées en quatre classes selon leur homologie de séquence (Figure 11 et Tableau 4). Pour les classes I (HDAC1, 2, 3 et 8), IIa (HDAC4, 5, 7 et 9), IIb (HDAC6 et 10) et IV (HDAC11), la désacétylation de la lysine se fait grâce à un système de transfert de charge dont le composant essentiel est un ion zinc (Zn^{2+}), présent au fond de la poche catalytique des enzymes HDAC (Finnin *et al.*, 1999). Pour la classe III [sirtuines (SIRT)1 à 7] la présence d'un cofacteur, le nicotinamide adénine dinucléotide (NAD^{+}), est indispensable à la réaction. Malgré la fonction désacétylase bien connue des enzymes HDAC, certaines sirtuines présentent également d'autres activités enzymatiques telles que SIRT4 qui possède une activité mono-ADP-ribosyltransférase et lipoamidase, SIRT5 possédant une activité démalonylase, désuccinylase et déglutarylase, et enfin SIRT6 qui possède une activité désacétylase et mono-ADP-ribosyltransférase (Carafa *et al.*, 2016; Mei *et al.*, 2016).

Les HDAC de classe I sont présentes de façon ubiquitaire dans de nombreuses lignées cellulaires et tissus humains tandis que les membres de la classe II présentent un profil d'expression spécifique de certains tissus humains tels que le cœur (HDAC5), le sein (HDAC6), l'ovaire (HDAC7 et 9) et le rein (HDAC10) (de Ruijter *et al.*, 2003; Thiagalingam *et al.*, 2003).

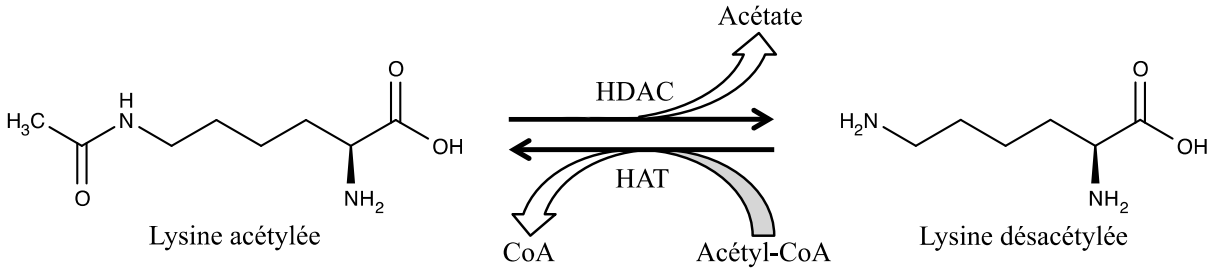


Figure 10 : La réaction d'acétylation et désacétylation des lysines.

La réaction d'acétylation est catalysée par les acétyltransférases d'histones (HAT) utilisant l'acétyl-coenzyme A (acétyl-CoA) comme donneur de groupement acétyle. La réaction inverse est catalysée par les désacétylases d'histones (HDAC).

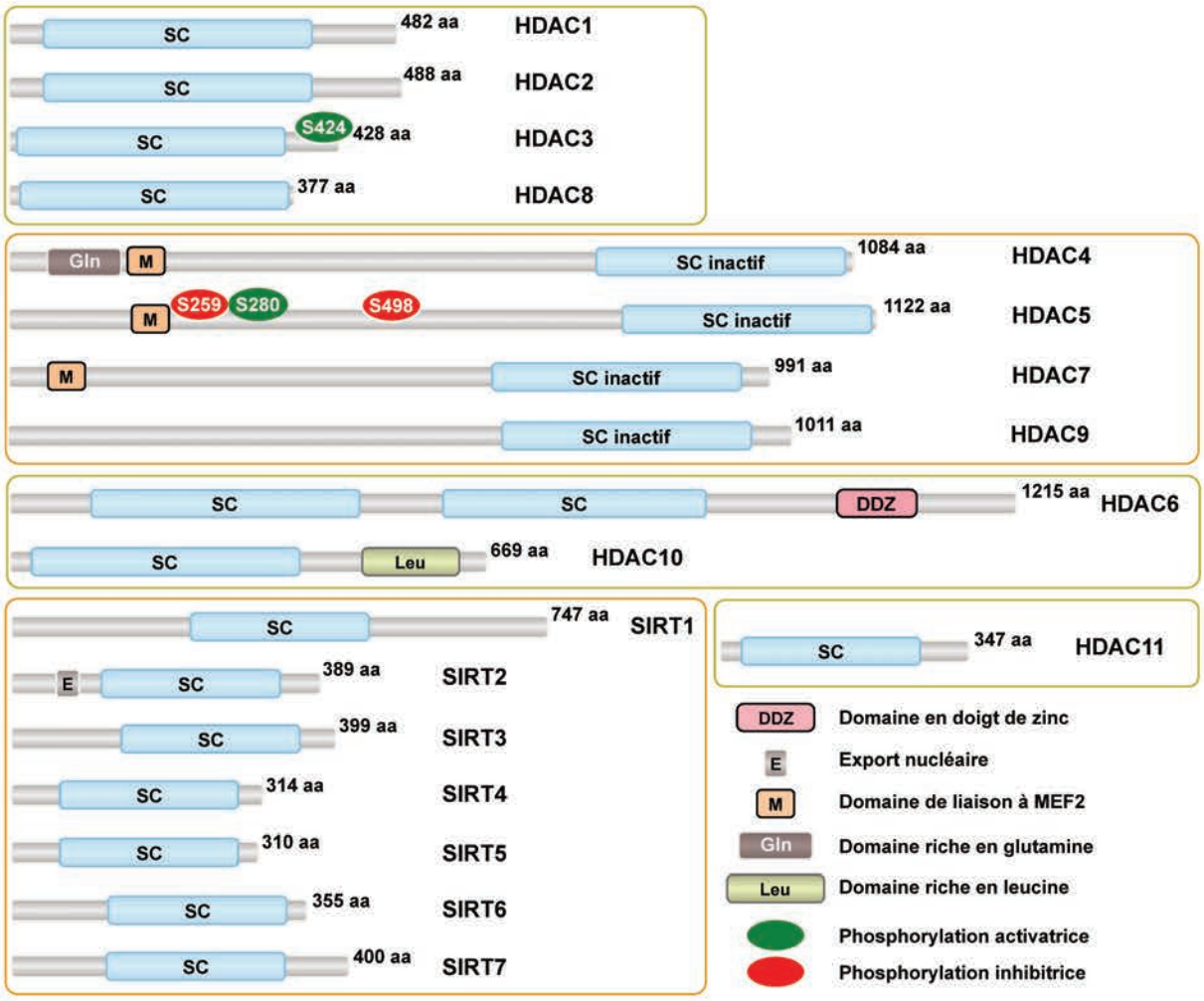


Figure 11 : Structure moléculaire des enzymes HDAC humaines.

Les structures moléculaires et la taille des enzymes HDAC humaines en acide aminés (aa) sont représentées ainsi que les sites catalytiques (SC), les domaines en doigts de zinc (DDZ) pour la liaison à l'ubiquitine, les séquences d'export nucléaire (E), les domaines de liaison à MEF2 (*myocyte enhancer factor*)2 (M), les domaines riches en glutamine (Gln) et en leucine (Leu), ainsi que certaines phosphorylations de sérines (S) de manière non exhaustive.

Tableau 4 : Classification, localisation cellulaire et fonctions physiologiques des enzymes HDAC humaines.

Adapté de (Losson *et al.*, 2016).

HDAC		Localisation cellulaire	Fonction physiologique
Classe	**Membre**		
I	HDAC1	Noyau	Prolifération et survie cellulaire
	HDAC2	Noyau	Prolifération cellulaire, résistance à l'insuline
	HDAC3	Noyau	Prolifération et survie cellulaire
	HDAC8	Noyau	Prolifération cellulaire
IIa	HDAC4	Noyau/cytoplasme	Contrôle du dynamisme du cytosquelette, mobilité cellulaire
	HDAC5	Noyau/cytoplasme	Gluconéogenèse, fonction et croissance cardiovasculaire, myocytes cardiaques, fonction des cellules endothéliales
	HDAC7	Noyau/cytoplasme	Glucogenèse, fonction endothéliale et différenciation des thymocytes
	HDAC9	Noyau/cytoplasme	Fonction et croissance cardiovasculaire, recombinaison homologue et différenciation des thymocytes
IIb	HDAC6	Cytoplasme	Contrôle du dynamisme du cytosquelette et mobilité cellulaire
	HDAC10	Cytoplasme	Survie cellulaire médiée par autophagie et recombinaison homologue
III	SIRT1	Noyau/cytoplasme	Régulation du système auto-immun, survie cellulaire, vieillissement, régulation redox
	SIRT2	Noyau	Survie cellulaire, migration et invasion cellulaire
	SIRT3	Mitochondrie	Équilibre redox, régulation de l'ATP, cycle métabolique de l'urée, apoptose et signalisation cellulaire
	SIRT4	Mitochondrie	Régulation de l'ATP, métabolisme énergétique, apoptose et signalisation cellulaire
	SIRT5	Mitochondrie	Régulation de l'ATP, cycle métabolique de l'urée,

			métabolisme énergétique, apoptose et signalisation cellulaire
	SIRT6	Noyau	Régulation métabolique
	SIRT7	Noyau	Apoptose
IV	HDAC11	Noyau	Immunomodulateurs, réplication de l'ADN

2. La protéine HDAC6

a. Structure

Dans cette étude, nous nous intéresserons plus spécifiquement à HDAC6 appartenant à la classe IIb. Cette enzyme est la seule HDAC à posséder deux sites catalytiques (SC) actifs fonctionnels et possède une séquence de localisation nucléaire (NLS), une séquence d'export nucléaire (NES), ainsi qu'une région répétitive de huit tétradécapeptides sérine-acide glutamique consécutifs, signal de rétention cytoplasmique, ce qui explique que l'enzyme soit principalement présente au niveau du cytoplasme (Bertos *et al.*, 2004). HDAC6 possède également un domaine de liaison à l'ubiquitine (BUZ) en C-terminal nécessaire lors de la liaison d'HDAC6 aux protéines poly-ubiquitinées (Figure 12A).

Le rôle du SC1 compris entre les acides aminés 40 et 418 et du SC2 compris entre les acides aminés 441 et 831 parmi les 1215 acides aminés de la protéine HDAC6 reste encore aujourd'hui mal défini. Une étude a montré que les ions zinc présents dans les poches catalytiques sont coordonnés par les acides aminés en position 230, 232 et 323 dans le SC1 et par les acides aminés en position 612, 614 et 705 dans le SC2 (Miyake *et al.*, 2016). Plusieurs études ont démontré que le SC2 était responsable de la désacétylation de la tubuline α, son principal substrat (Haggarty *et al.*, 2003 ; Miyake *et al.*, 2016), tandis que d'autres ont montré que les deux SC étaient nécessaires à sa désacétylation (Zhang *et al.*, 2006). Ces contradictions confortent le fait que de nouvelles études doivent être réalisées pour clarifier le rôle des SC d'HDAC6 et notamment celui du premier SC.

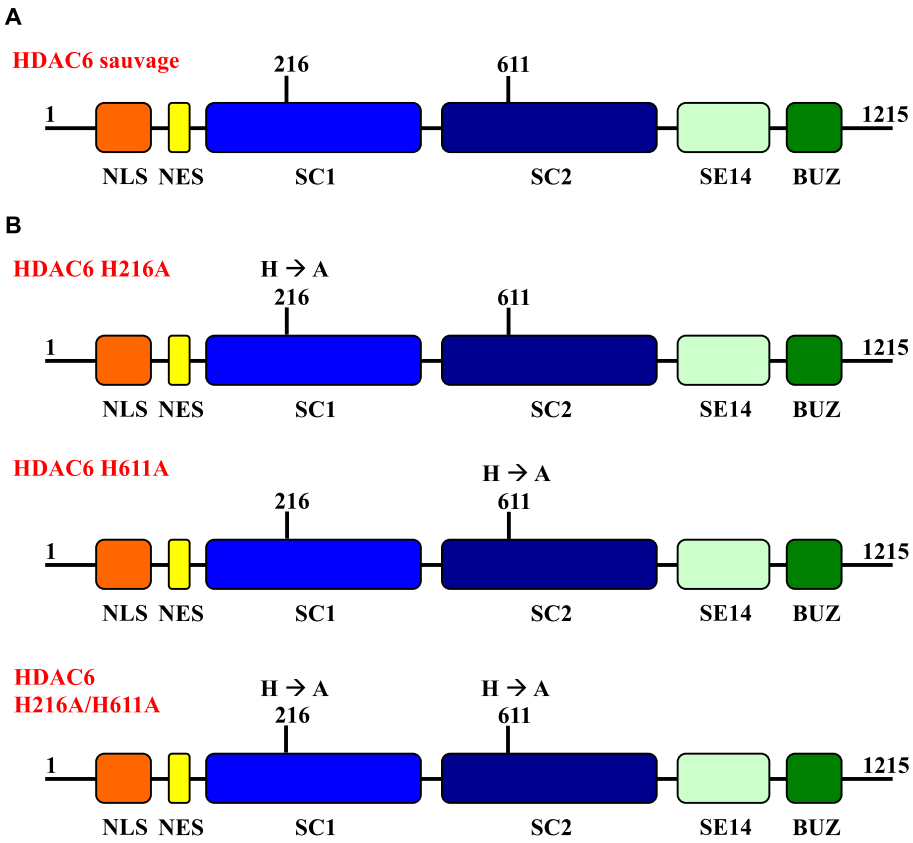


Figure 12 : Structures protéiques d'HDAC6 sauvage ou mutants.

(A) La protéine HDAC6 sauvage est constituée de 1215 acides aminés. Elle possède une séquence de localisation nucléaire (NLS), une séquence d'export nucléaire (NES), deux sites catalytiques (SC) actifs fonctionnels, une région répétitive de huit tétradécapeptides sérine-acide glutamique consécutifs (SE14), signal de rétention cytoplasmique et un domaine de liaison à l'ubiquitine (BUZ) en C-terminal. (B) Les structures protéiques de différents mutants obtenus par transfection de cellules K-562 avec des plasmides d'expression sont indiquées. Les protéines HDAC6 H216A, H611A et H216A/H611A ont subi une mutation respectivement en position 216 (dans le SC1), 611 (dans le SC2) et en position 216 et 611, conduisant sur chacune d'elle au remplacement de l'acide aminé histidine (H) par une alanine (A).

b. Fonction

La protéine HDAC6 désacétyle de nombreux substrats (Li *et al.*, 2013) (Tableau 5) tels que la tubuline α, la cortactine et la protéine HSP90α, et de ce fait intervient dans de nombreux phénomènes cellulaires dont certains sont décrits ci-dessous (Figure 13) (Zheng *et al.*, 2017).

Tableau 5 : Liste de substrats spécifiquement désacétylés par la protéine HDAC6.

Substrats	Localisation du substrat	Lysine(s) désacétylée(s)	Fonction du substrat désacétylé	Domaines d'interaction de la protéine HDAC6	Références
14-3-3ζ	Cytoplasme et noyau	49, 120	Régulation de la liaison aux protéines Bad et AS160	ND	(Mortenson *et al.*, 2015)
β caténine	Cytoplasme et noyau	49	Localisation nucléaire induite par le facteur de croissance épidermique et diminution de l'expression de c-Myc	ND	(Li *et al.*, 2013)
Cortactine*	Cytoplasme	87, 124, 161, 189, 198, 235, 272, 309, 319	Régulation de la migration cellulaire et de la liaison aux filaments d'actine	SC1 et SC2	(Li *et al.*, 2013)
DNAJA1	Cytoplasme	ND	Repliement des protéines	ND	(Zhang *et al.*, 2015)
ERK1	Cytoplasme et noyau	72	Prolifération, mobilité et survie cellulaire		(Wu *et al.*, 2018)
Foxp3*	Noyau	ND	ND	ND	(Beier *et al.*, 2012)

HDAC9	Cytoplasme et noyau	ND	Modulation de la survie cellulaire et arrêt du mouvement cellulaire	SC2	(Salian-Mehta *et al.*, 2015)
HDAC11	Noyau	ND	Activation transcriptionnelle de l'interleukine 10	ND	(Gao *et al.*, 2002)
HMGN2	Noyau	2	Augmentation de la transcription de STAT5	ND	(Medler *et al.*, 2016)
HSC70	Cytoplasme	ND	Repliement des protéines	ND	(Zhang *et al.*, 2015)
HSPA5	Cytoplasme	353	Ubiquitination d'HSPA5 médiée par GP78 facilitée	ND	(Chang *et al.*, 2016)
HSP90α	Cytoplasme	294	Dégradation et élimination des protéines mal repliées et régulation des récepteurs aux glucocorticoïdes	SC1, SC2 et BUZ	(Li *et al.*, 2013)
K-RAS*	Cytoplasme	104	Prolifération cellulaire	ND	(Yang *et al.*, 2013)
Ku70	Cytoplasme	539, 542	Suppression de l'apoptose	ND	(Li *et al.*, 2013)

LC3B-II*	Cytoplasme	ND	Régulation de l'autophagie	ND	(Liu *et al.*, 2013)
MSH2	Cytoplasme et noyau	845, 847, 871, 892	Réduction de la sensibilité cellulaire aux agents endommageant l'ADN et réduction des activités de réparation de mésappariement d'ADN par régulation négative de MSH2	SC1	(Zhang *et al.*, 2014b)
MYH9	Cytoplasme	ND	Régulation de la liaison aux filaments d'actine	ND	(Zhang *et al.*, 2015)
PrxI	Cytoplasme et noyau	197	Activité antioxydante	ND	(Parmigiani *et al.*, 2008; Perkins *et al.*, 2015)
PrxII	Cytoplasme et noyau	196	Activité antioxydante	ND	(Parmigiani *et al.*, 2008; Perkins *et al.*, 2015)
RIG-I	Cytoplasme	858, 909	Reconnaissance de l'ARN viral	ND	(Moreno-Gonzalo *et al.*, 2018)
Sam68	Noyau	ND	Épissage alternatif	ND	(Nakka *et al.*, 2015)

Survivine	Noyau	129	Fonction anti-apoptotique	SC2	(Li *et al.*, 2013)
Tat	Cytoplasme	28	Suppression de la transactivation du VIH	SC2 et BUZ	(Huo *et al.*, 2011)
Tubuline α*	Cytoplasme	40	Formation de synapses immunitaires, infection virale, migration cellulaire et chimiotaxie	SC1 ou SC2	(Matsuyama *et al.*, 2002 ; Li *et al.*, 2013)

*La cortactine et LC3B-II sont également désacétylées par SIRT1, K-RAS et la tubuline α sont également désacétylées par SIRT2 et Foxp3 est également désacétylé par HDAC9 et SIRT1.

AS160 : *Akt substrate of 160 kDa* ; Bad : *Bcl-2 associated agonist of cell death* ; BUZ : *binding-of-ubiquitin zinc* ; DNAJA1 : *dnaJ homolog subfamily A member 1* ; ERK1 : *extracellular signal-regulated kinase 1* ; Foxp3: *forkhead box P3* ; GP : glycoprotéine ; HDAC : désacétylase d'histone ; HMGN2 : *high mobility group nucleosomal binding domain 2* ; HSC : *heat-shock cognate* ; HSP (A) : *heat shock protein [family A (HSP70) member 5]* ; LC3B-II : *microtubule-associated protein 1 light chain 3* ; MSH2 : *MutS protein homolog 2* ; MYH9 : *myosin heavy chain 9* ; ND : non déterminé ; Prx : péroxirédoxine ; RIG-I : *retinoic acid-inducible gene I protein* ; Sam : *Src-associated substrate in mitosis* ; SC : site catalytique ; Tat : *twin-arginine translocation protein* ; VIH : virus de l'immunodéficience humaine.

La protéine HDAC6 est impliquée dans la mobilité et la division cellulaire de par son rôle important dans le dynamisme de deux constituants du cytosquelette, les filaments d'actine (ou actine-F) et les microtubules, polymères de tubuline α et β. En effet, la cortactine, améliorant la polymérisation des filaments d'actine, et la tubuline α, un constituant des microtubules, sont des substrats d'HDAC6. La désacétylation de la cortactine par HDAC6 et SIRT1 entraine sa liaison à l'actine-F, améliore sa polymérisation et participe ainsi à sa dynamique.

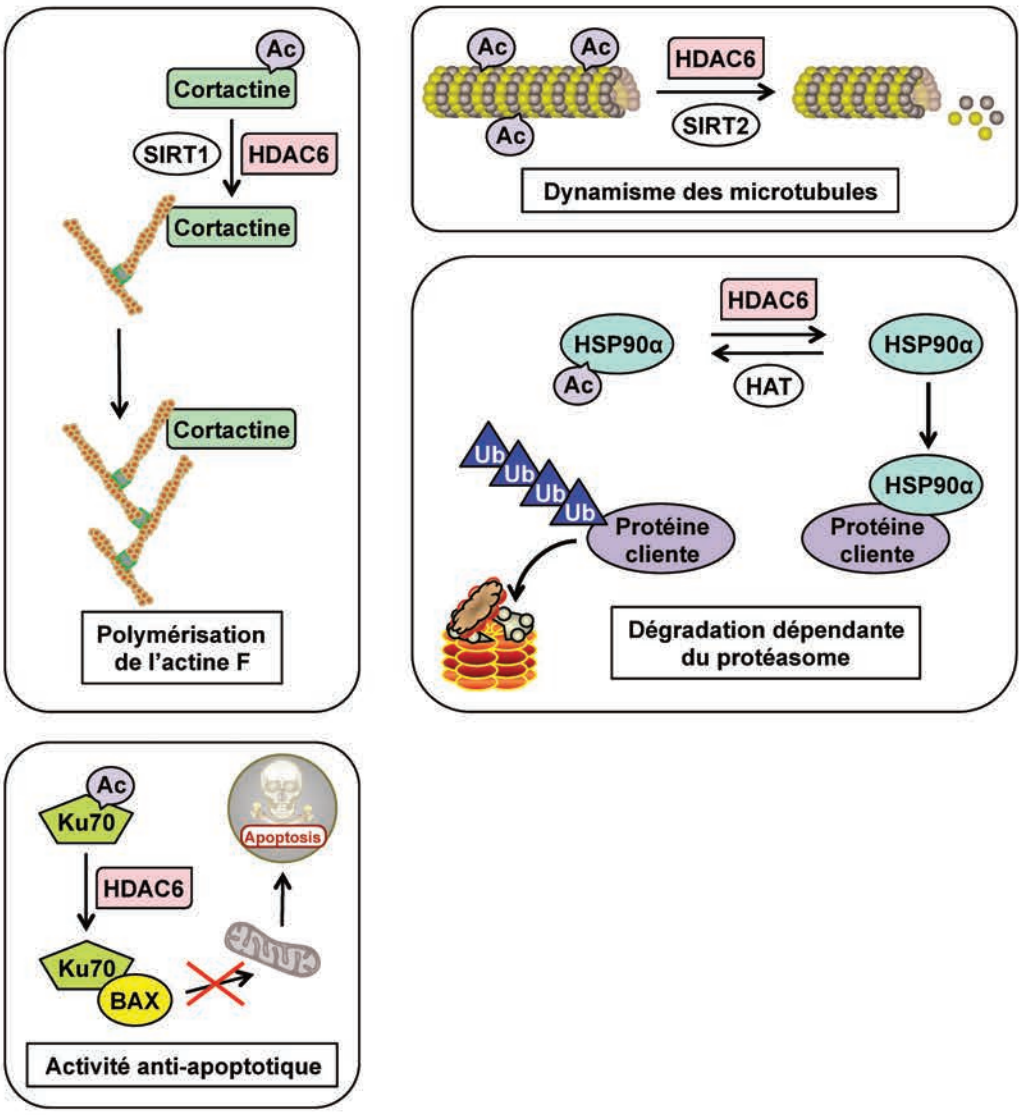
La désacétylation de la tubuline α par HDAC6 et SIRT2 est associée à une dépolymérisation des microtubules, et participe ainsi au dynamisme des microtubules, mais

également à la dégradation protéique indépendante du protéasome. En effet, lorsque le protéasome est dégradé, les protéines mal repliées polyubiquitinées sont transportées au centre organisateur des microtubules (MTOC) et sont prises en charge par HDAC6 grâce à son domaine de liaison à l'ubiquitine. Enfin, la formation d'aggrésomes autour des protéines polyubiquitinées grâce à la désacétylation de la cortactine va mener à la dégradation des protéines après fusion avec autophagosomes puis des lysosomes.

La protéine HDAC6 est également impliquée dans la dégradation protéique dépendante du protéasome de par son interaction avec HSP90α, une protéine chaperonne qui lorsqu'elle est désacétylée par HDAC6, est impliquée dans la stabilisation de nombreuses protéines telles que BCR-ABL, les récepteurs aux androgènes, le récepteur du facteur de croissance épidermique humain (HER)2, Akt ou Bcl-2 par exemple (Mahalingam *et al.*, 2009 ; Oh *et al.*, 2017). Sous forme acétylée HSP90α perd sa fonction chaperonne ce qui entraine la dégradation de ses protéines clientes par le protéasome. L'implication d'HDAC6 dans la dégradation protéique de BCR-ABL *via* HSP90α, fait des inhibiteurs d'HDAC6 des molécules potentiellement prometteuses pour le traitement de la LMC. De plus, une accumulation de protéines mal repliées entraine la dissociation du complexe dans lequel est également impliqué HSP90α avec le facteur de choc thermique 1 (HSF)1, la chaperonne VCP/p97 (*valosin-containing protein/ATPase*) et HDAC6. En complexe sous forme inactive, lors de la dissociation, la libération d'HSF1 va induire la transcription de nombreuses HSP, et celle d'HDAC6 va permettre sa liaison aux protéines mal repliées. De plus, HDAC6 joue un rôle dans la régulation de la dégradation autophagique. En effet une diminution de l'acétylation de *microtubule-associated protein 1 light chain 3* (LC3B-II) par HDAC6 a été observée lors de la dégradation autophagique. HDAC6 participe également à la régulation des vésicules d'endocytose et d'exocytose. Lorsque le récepteur EGFR est lié à son ligand, il interagit avec HDAC6 et l'inactive par phosphorylation, ce qui entraine alors l'hyperacétylation des microtubules et enfin l'internalisation du récepteur. De plus, HDAC6 est impliquée dans le phénomène d'apoptose en désacétylant la protéine Ku70 qui va alors se complexer avec la protéine proapoptotique *Bcl-2–associated X* (Bax) et donc permettre l'inhibition de l'apoptose (Figure 14).

De la même manière, l'inhibition de l'activité catalytique d'HDAC6 favorise la déphosphorylation de AKT et de la kinase régulée par signaux extracellulaires (ERK), s'associant à la diminution de la prolifération cellulaire et à la mort des cellules cancéreuses. Concernant l'implication de la protéine dans les mécanismes antioxydants et de répression

transcriptionnelle. L'inhibition d'HDAC6 induit l'augmentation de l'acétylation des peroxirédoxines I et II, des enzymes anti-oxydantes, renforçant ainsi leur activité, ce qui peut induire une réduction de la résistance des cellules à la chimiothérapie (Seidel *et al.*, 2015). Il a également été montré que la protéine HDAC6 était impliquée dans le processus d'autophosphorylation de la protéine tau lui donnant la capacité de former des aggrégats appelés enchevêtrements neurofibrillaires provoquant une neurotoxicité (Fan *et al.*, 2018).



Légende à la suite de la figure.

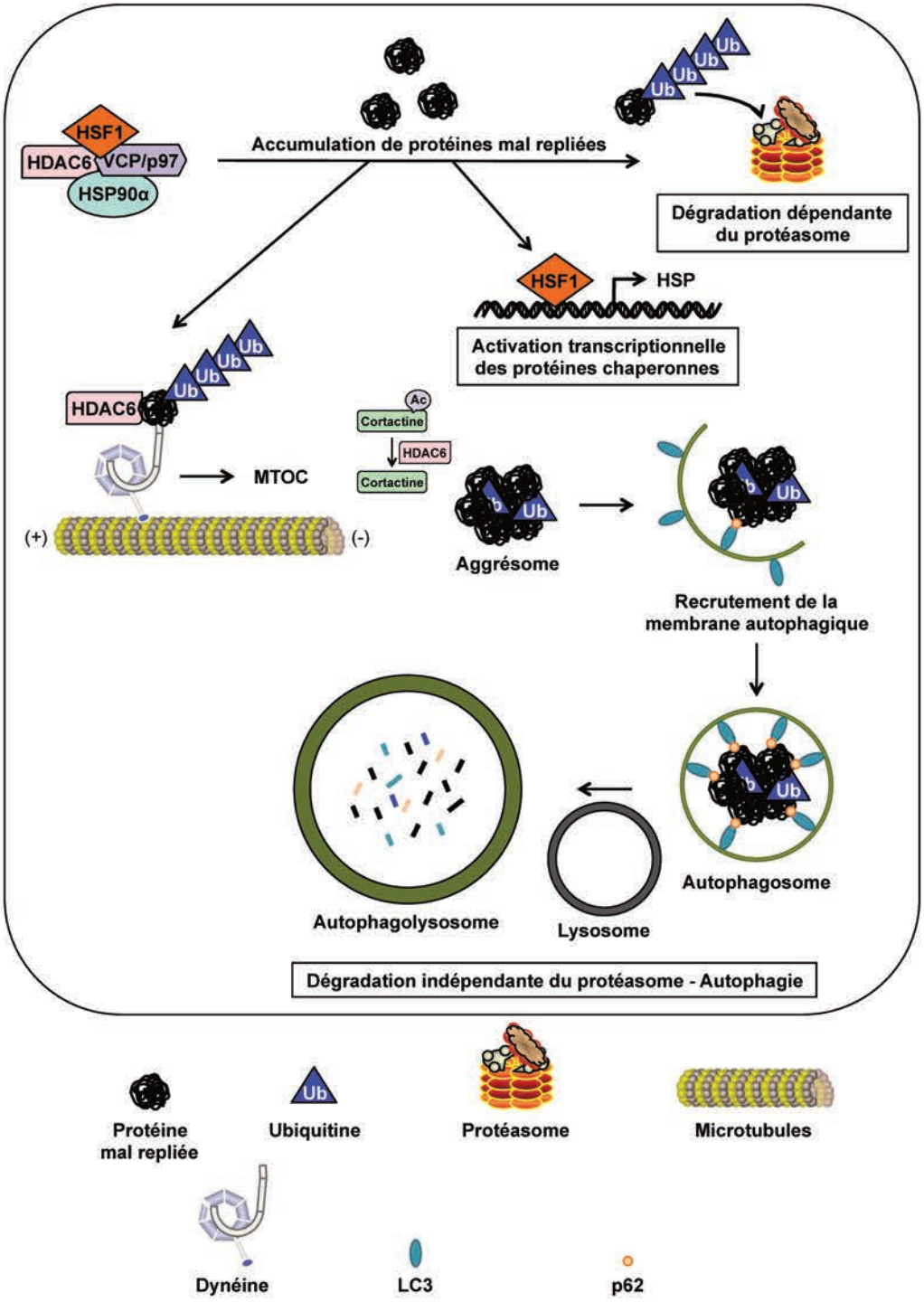


Figure 13 : La protéine HDAC6 est impliquée dans de nombreux phénomènes cellulaires.

HDAC6 intervient dans les phénomènes de polymérisation de l'actine F, le dynamisme des microtubules, l'activité anti-apoptotique, la dégradation dépendante et indépendante du protéasome ainsi que d'activation transcriptionnelle des protéines chaperonnes et enfin dans l'autophagie. Les symboles (+) et (-) représentent la polarité des microtubules qui sont orientés le (-) vers le centre organisateur des microtubules (MTOC) et le (+) vers la membrane cellulaire. Ac : acétyl ; HAT : acétyltransférase d'histone ; HDAC : désacétylase d'histone ; HSF : facteur de choc thermique ; HSP : protéine de choc thermique ; SIRT : sirtuine ; VCP : *valosin-containing protein/ATPase.*

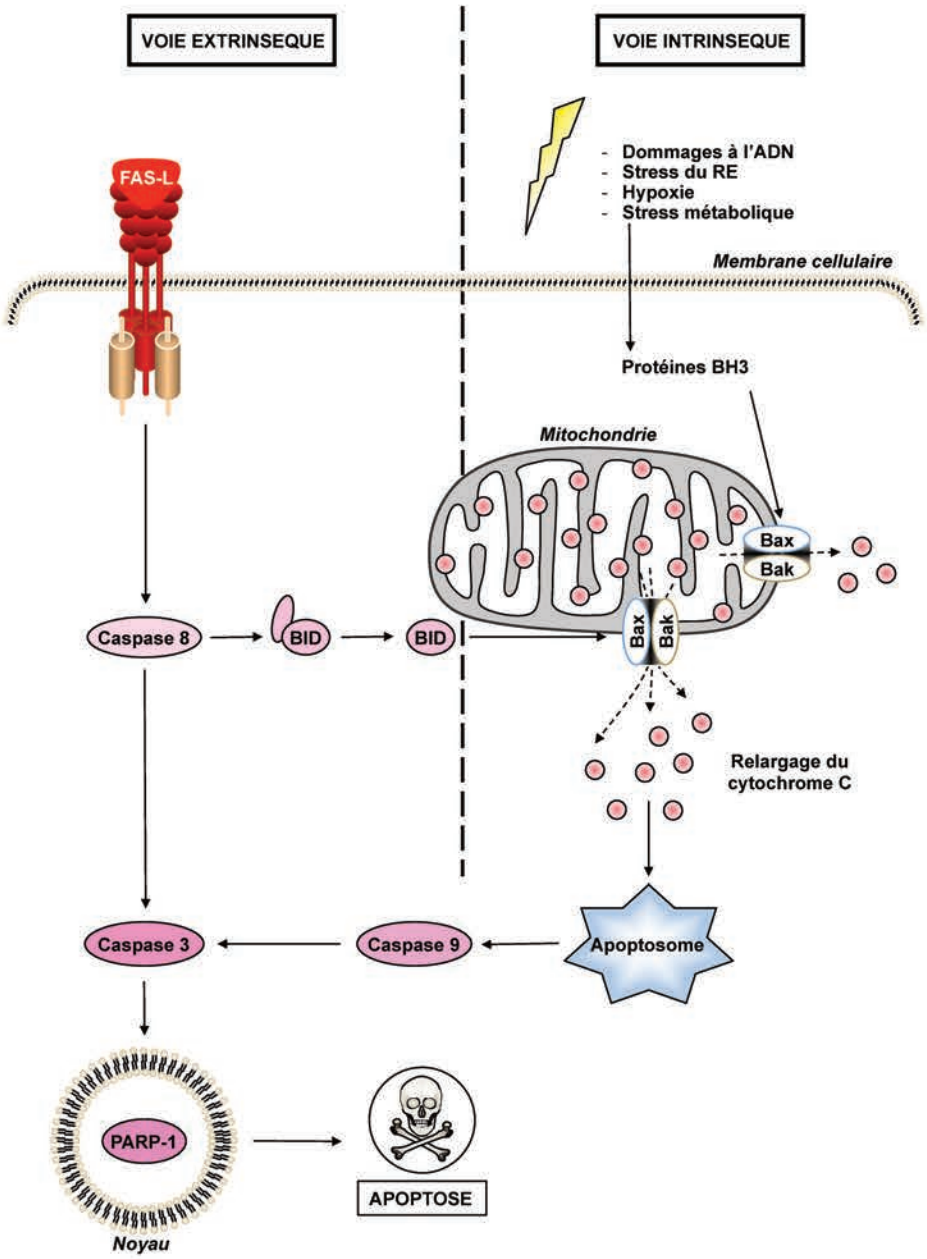


Figure 14 : Schéma simplifié des voies apoptotiques extrinsèque et intrinsèque.

Les deux voies d'activation de l'apoptose sont les voies extrinsèque et intrinsèque. La voie extrinsèque est initiée par les récepteurs de mort cellulaire comme Fas-L et induit l'activation en cascade des caspases initiatrice et effectrice, respectivement 8 et 3 puis de la poly(ADP-ribose) polymérase (PARP)-1, et enfin induit l'apoptose. La voie intrinsèque est initiée par des signaux tels que des dommages à l'ADN, un stress du réticulum endoplasmique (RE), une hypoxie ou encore un stress métabolique. Ces signaux vont permettre l'activation de protéines BH3 qui vont induire la perméabilisation de la membrane mitochondriale en induisant la perte d'interaction entre les protéines pro-apoptotiques *Bcl-2-associated X* (Bax) et *Bcl-2 antagonist killer 1* (Bak) formant un pore et permettant ainsi le relargage du cytochrome C. Le cytochrome C va par la suite former avec d'autres protéines un complexe appelé apoptosome, puis induire l'activation en cascade des caspases initiatrice et effectrice, respectivement 9 et 3 puis de PARP-1, pour enfin induire l'apoptose. La voie apoptotique extrinsèque active la voie intrinsèque lorsque la caspase 8 tronque la protéine BID qui va alors agir sur les protéines Bax et Bak.

c. Régulation post-transcriptionnelle

Peu de données existent concernant la régulation post-transcriptionnelle de la protéine HDAC6. Néanmoins certains microARN, de petits ARN non codant (Kusenda *et al.*, 2006), induisant une augmentation de la prolifération des cellules tumorales et la formation de métastases (miR-22, miR-221, miR-433 et miR-548) (Zheng *et al.*, 2017) et la différenciation des cellules souches (miR-26a) (Lee *et al.*, 2015b), ont été prédit comme pouvant interagir avec la protéine HDAC6 induisant ainsi une déstabilisation ou un répression de la traduction de son ARNm.

d. Régulation post-traductionnelle

Les modifications post-traductionnelles telles que la phosphorylation et l'acétylation ont un impact important sur les fonctions d'HDAC6. En effet, bien que le récepteur EGFR induise une phosphorylation inhibitrice d'HDAC6, dans la majorité des cas il est établi que la phosphorylation d'HDAC6 améliore son activité désacétylase tandis que son acétylation diminue son activité enzymatique, empêchant par exemple la désacétylation de la tubuline α. Des exemples de modifications post-traductionnelles de la protéine HDAC6 influençant son activité sont présentés dans le Tableau 6 (Zheng *et al.*, 2017).

Tableau 6 : Modifications post-traductionnelles régulant l'activité d'HDAC6.

Modification post-traductionnelle	Enzyme	Site d'action	Conséquences	Références
Phosphorylation	GSK3β	Ser22	Augmentation de l'activité de désacétylation de la tubuline α	(Zheng *et al.*, 2017)
	ERK1	Thr1031, Ser1035	Régulation de la motilité cellulaire	(Zheng *et al.*, 2017)
	GRK2	Proche ou dans le SC2	Augmentation de l'activité de désacétylation de la tubuline α	(Lafarga *et al.*, 2012)
	Aurora	ND	Augmentation de	(Zheng *et al.*, 2017)

			l'activité de désacétylation de la tubuline α	
	PKCζ	ND	Augmentation de l'activité de désacétylation de la tubuline α	(Zheng *et al.*, 2017)
	CK2	Ser458	Amélioration de la formation et de l'élimination des aggrésomes	(Zheng *et al.*, 2017)
	EGFR	Tyr570	Inhibition de l'activité de désacétylation	(Williams *et al.*, 2013)
Acétylation	p300	Lys16	Inhibition de l'activité de désacétylation	(Zheng *et al.*, 2017)

CK2 : *casein kinase 2* ; EGFR : *epidermal growth factor receptor* ; ERK1 : *extracellular signal-regulated kinase* ; GRK2 : *G protein-coupled receptor kinase 2* ; GSK3 : *glycogen synthase kinase 3* ; Lys : lysine ; ND : non déterminé ; PKCζ : *protein kinase C isoform ζ* ; SC : site catalytique ; Ser : sérine ; Thr : thréonine.

Outre les modifications post-traductionnelles, il existe des protéines interagissant directement avec la protéine HDAC6 et qui induisent son inhibition par interaction directe (Tableau 7).

Tableau 7 : Protéines qui interagissent directement avec la protéine HDAC6.

Protéine inhibant HDAC6 par interaction directe	Fonction de la protéine	Région de la protéine requise pour l'interaction avec HDAC6	Région d'HDAC6 en interaction avec la protéine	Impact cellulaire	Références
CYLD	Déubiquitinase	ND	SC1 et SC2	Prolifération cellulaire, ciliogenèse	(Zheng *et al.*, 2017)
Dysferline	Réparation de la membrane du muscle squelettique, adhésion cellulaire, signalisation intercellulaire du calcium	Domaine C2	ND	Myogenèse	(Di Fulvio *et al.*, 2011)
Md-p3	Stabilisation des microtubules	Région amino-terminale	ND	Motilité cellulaire	(Tala *et al.*, 2014)
Paxilline	Régulation de l'acétylation des microtubules	Région riche en proline	ND	Polarisation et migration cellulaire	(Deakin *et al.*, 2014; Zheng *et al.*, 2017)
p62	Transport des protéines mal repliées	Entre le domaine ZZ et la région de liaison à TRAF6	SC2	Formation de l'aggrésome	(Yan *et al.*, 2013)
RanBPM	Pro-apoptotique, régulation de la	Domaine LisH/CTLH	ND	Formation de l'aggrésome	(Salemi *et al.*, 2014)

	transcription et inhibe la migration chimiotactique				
Tau	Stabilisation des microtubules	Région de liaison à la tubuline α	Domaine SE14	Formation de l'aggrésome	(Perez *et al.*, 2009; Yan *et al.*, 2013)
TPPP1	Favorise la polymérisation des microtubules	ND	ND	Régulation de l'acétylation des microtubules et de l'expression de la β caténine	(Schofield *et al.*, 2013)

CTLH : *C-terminal to LisH* ; CYLD : cylindromatosis ; LisH : *lissencephaly-1 homology* ; Md-p3 : *microtubule associated protein (MAP)7 domain-containing protein 3* ; ND : non determiné ; RanBPM : *Ran-binding protein microtubule-organizing center* ; tau : *tubulin-associated unit* ; SC : site catalytique ; TPPP1 : *tubulin polymerization-promoting protein-1.*

3. Inhibiteurs d'HDAC6

Il a été montré que la protéine HDAC6 est surexprimée dans de nombreux types de cancers (Tableau 8) et peut être impliquée dans la progression de la maladie.

Tableau 8 : Dérégulation de l'expression d'HDAC6 dans différents types de cancers.

Catégorie de cancers	Cancers	Expression d'HDAC6 - Commentaires	Références
Solides	Vessie	Surexprimée	(Li *et al.*, 2018b)
	Mélanome	Surexprimée	(Li *et al.*, 2018b)
	Poumon	Surexprimée	(Li *et al.*, 2018b)
	Carcinome épidermoïde buccal	Surexprimée - Expression augmentée à un stade avancé	(Seidel *et al.*, 2015 ; Maharaj *et al.*, 2018)
	Carcinome ovarien	Surexprimée - Expression augmentée à un stade avancé	(Seidel *et al.*, 2015; Maharaj *et al.*, 2018)
	Sein	Surexprimée - Prédiction d'un bon ou mauvais pronostic	(Seidel *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2018a)
	Carcinome hépatocytaire	Surexprimée - Expression augmentée à un stade avancé	(Seidel *et al.*, 2015)
		Sous-exprimée - HDAC6 suggérée comme étant un suppresseur de tumeur	(Seidel *et al.*, 2015 ; Qian *et al.*, 2017)
	Urothélial	Surexprimée	(Seidel *et al.*, 2015)
Liquides	Leucémie lymphoïde chronique	Surexprimée - Observation sur des échantillons de patients, des lignées cellulaires et sur un modèle de souris transgénique	(Maharaj *et al.*, 2018)
	Leucémie myéloïde aiguë	Surexprimée	(Seidel *et al.*, 2015 ; Maharaj *et al.*, 2018)
	Leucémie lymphoblastique aiguë	Surexprimée - Expression augmentée à un stade avancé	(Seidel *et al.*, 2015)
	Leucémie	Surexprimée - En corrélation avec	(Seidel *et al.*,

lymphocytaire chronique	une survie plus longue	2015)
Lymphome cutané à cellules T	Surexprimée - En corrélation avec une survie plus longue	(Seidel *et al.*, 2015)
Leucémie myéloïde chronique	Surexprimée - Expression augmentée dans des cellules $CD34^+$	(Bamodu *et al.*, 2018)
Myélome multiple	Surexprimée	(Cosenza *et al.*, 2018)
Lymphome à cellules du manteau	Surexprimée	(Cosenza *et al.*, 2018)
Lymphome diffus à grandes cellules B	Surexprimée	(Cosenza *et al.*, 2018)
Lymphome à cellules T périphérique	Surexprimée	(Cosenza *et al.*, 2018)

CD : cluster de différenciation ; HDAC6 : histone désacétylase 6.

Il apparait donc important de pouvoir cibler de manière spécifique HDAC6. Cependant malgré un nombre important d'inhibiteurs pan-HDAC, très peu de composés sont capables d'inhiber sélectivement HDAC6. Ce type d'inhibiteurs se répartit principalement en deux groupes selon leur structure chimique : les benzamides et les hydroxamates (Annexe 1) (Seidel *et al.*, 2015).

L'inhibiteur spécifique d'HDAC6 le mieux caractérisé est la tubacine qui est un dérivé de l'acide hydroxamique (Figure 15). La tubacine induit l'acétylation de la tubuline α associée à la stabilisation des microtubules et à une diminution de la mobilité cellulaire. De plus, la tubacine induit l'apoptose et une amélioration de l'inhibition de la prolifération et de la viabilité de lignées de cellules cancéreuses est observée lorsqu'elle est combinée à des agents chimiothérapeutiques tels que la doxorubicine (Seidel *et al.*, 2015) ou le témozolomide (Yin *et al.*, 2018). En prenant en compte le fait qu'HDAC6 possède deux SC, Haggarty *et al.* ont démontré la sélectivité de la tubacine pour le deuxième SC d'HDAC6, situé en C-terminal (Haggarty *et al.*, 2003). Bien que la tubacine soit un composé prometteur, sa synthèse laborieuse ainsi que sa lipophilie élevée limite fortement son utilisation *in vivo* mais en font un très bon inhibiteur d'HDAC6 de référence *in vitro* (Seidel *et al.*, 2015).

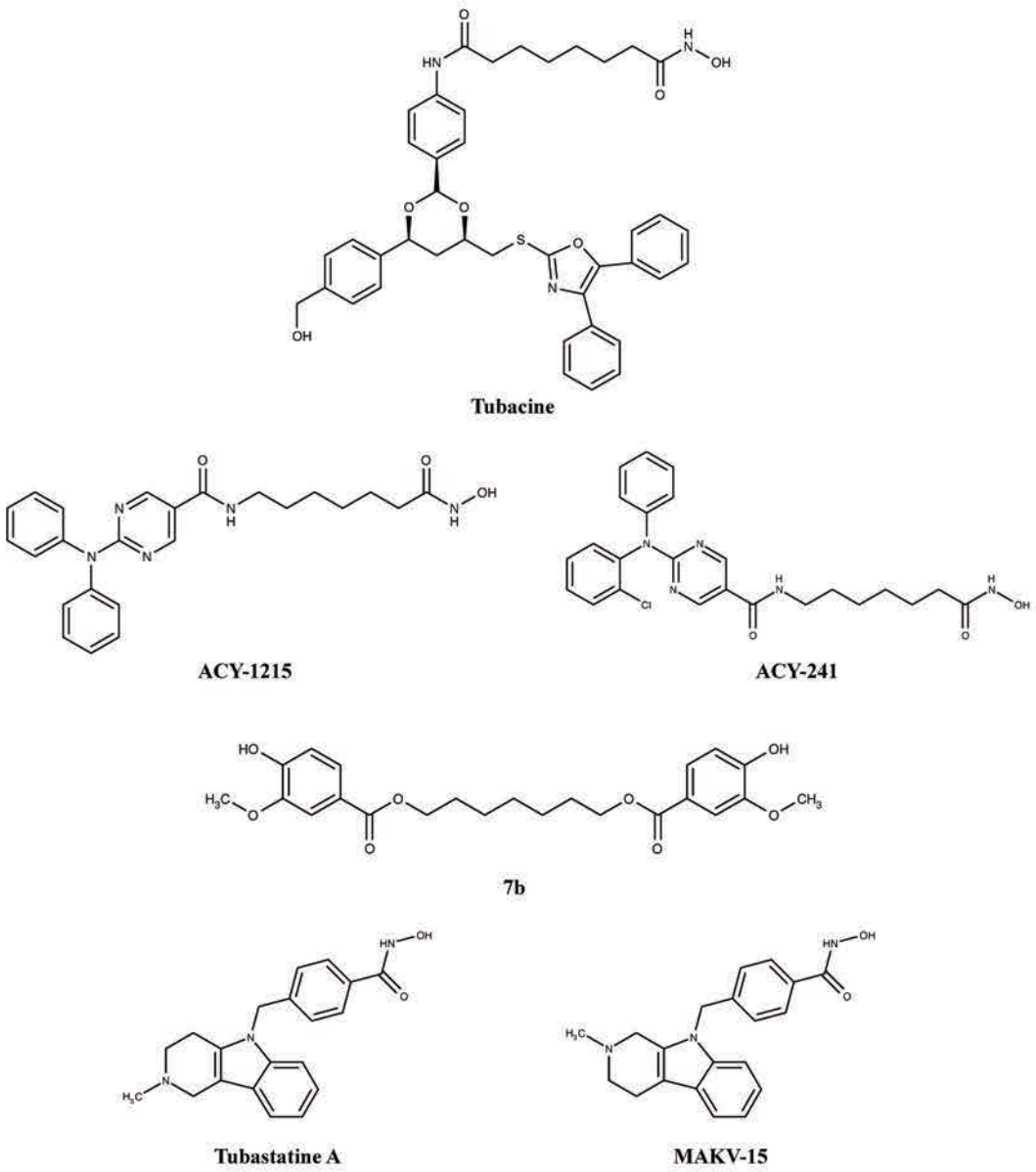


Figure 15 : Structures chimiques d'inhibiteurs d'HDAC6.

Les composés tubacine, ACY-1215 et ACY-241 sont des dérivés de l'acide hydroxamique, le composé 7b est un di-vanillate dérivé de l'acide 4-hydroxybenzoïque et le composé MAKV-15 est un tétrahydro-carboline dérivé de la tubastatine A.

La tubastatine A (Figure 15) synthétisée par Butler *et al.* est également considérée comme un inhibiteur d'HDAC6 de référence *in vitro* avec une concentration inhibant 50% de la viabilité cellulaire (CI_{50}) de 15 nM (Butler *et al.*, 2010).

Les composés ACY-1215 (Ricolinostat) et ACY-241 (Citarinostat) sont également des dérivés de l'acide hydroxamique qui ont montré une activité inhibitrice spécifique d'HDAC6 avec des CI_{50} respectives de 4,7 et 2,6 nM. Ils sont les seuls inhibiteurs d'HDAC6 en essai clinique (Tableau 9) (Santo *et al.*, 2012; Huang *et al.*, 2017). A ce jour aucun inhibiteur

d'HDAC6 n'a encore été approuvé par la FDA contrairement aux inhibiteurs pan HDAC tels que la romidepsine, le SAHA, PXD101 et LBH589 (Schnekenburger *et al.*, 2016).

Tableau 9 : Inhibiteurs d'HDAC6 en essais cliniques dans le cadre du cancer.

Les études cliniques comprennent quatre phases. La phase I est réalisée sur des volontaires sains afin de déterminer la dose maximale tolérée chez l'Homme. La phase II est réalisée sur une population limitée de patients afin de déterminer la posologie optimale. La phase III est réalisée sur plusieurs milliers de patients et va permettre de démontrer l'intérêt thérapeutique du médicament et d'évaluer son rapport bénéfice/risque. La phase IV est réalisée une fois le médicament commercialisé et permet de mieux caractériser ses effets indésirables. Données obtenues sur le site internet « clinicaltrials.gov ».

Inhibiteur d'HDAC6	**Numéro d'identification de l'essai clinique**	**Titre de l'essai**	**Phase de l'essai clinique**	**Pathologie des patients**
ACY-241	NCT02400242	*Study of ACY-241 alone and in combination with Pomalidomide and Dexamethasone in multiple myeloma*	Ia/Ib	Myélome multiple
	NCT02935790	*Selective HDAC6 inhibitor ACY-241 in combination with Ipilimumab and Nivolumab*	Ib	Mélanome de stade III et IV non résécable
	NCT02551185	*ACY 241 in combination with Paclitaxel in patients with advanced solid tumors*	Ib	Tumeurs solides avancées
	NCT02635061	*Selective HDAC6 inhibitor ACY 241 in combination with Nivolumab in patients with unresectable non small cell lung cancer*	Ib	Cancer du poumon non à petites cellules non résécable

ACY-1215	NCT02632071	*ACY-1215 + Nab-paclitaxel in metastatic breast cancer*	Ib	Cancer du sein non résécable ou métastatique
	NCT02787369	*ACY-1215 in combination with BCR pathway inhibitors in relapsed CLL*	Ib	Leucémie lymphocytaire chronique en rechute
	NCT02091063	*ACY-1215 for relapsed/refractory lymphoid malignancies*	Ib/II	tumeurs malignes lymphoïdes en rechute ou réfractaires
	NCT01997840	*ACY-1215 (Ricolinostat) in combination with Pomalidomide and low-dose Dex in relapsed-and-refractory multiple myeloma*	Ib/II	Myélome multiple récidivant et réfractaire
	NCT01583283	*Study of ACY-1215 in combination with Lenalidomide, and Dexamethasone in multiple myeloma*	I/II	Myélome multiple récidivant ou récidivant et réfractaire
	NCT02189343	*Phase Ib study evaluating ACY-1215 (Ricolinostat) in combination with Pomalidomide and Dexamethasone in relapsed or relapsed-and-refractory multiple myeloma*	Ib	Myélome multiple récidivant et réfractaire
	NCT01323751	*Study of ACY-1215 alone and in combination with*	I/II	Myélome multiple récidivant ou récidivant et

	Bortezomib and Dexamethasone in multiple myeloma (ACY-1215)		réfractaire
NCT02856568	*Ricolinostat, Gemcitabine Hydrochloride, and Cisplatin in treating patients with unresectable or metastatic cholangiocarcinoma*	Ib	Cholangiocarcinome non résécable ou métastatique
NCT02661815	*A phase Ib study of Paclitaxel and Ricolinostat for the treatment of gynecological cancer*	Ib	Cancer de l'ovaire, du péritonéal primaire ou des trompes de Fallope résistants au platine

Il est important de souligner que l'inactivation de la protéine HDAC6 chez la souris n'engendre pas un développement anormal ni de problème dans les organes vitaux majeurs, suggérant que l'inhibition d'HDAC6 n'engendrerait que peu d'effets secondaires contrairement aux inhibiteurs pan-HDAC, et en particuliers ceux de la classe I. De ce fait, leur utilisation en co-traitement avec des ITK induisant habituellement de nombreux effets secondaires, permettrait d'en réduire les concentrations, réduisant ainsi les effets secondaires liés au traitement, mais apporterait également un ciblage double des cellules cancéreuses.

4. Nouveaux inhibiteurs d'HDAC6

Parmi les molécules synthétisées par Lamoral-Theis *et al*., le composé appelé 7b (Figure 15) est un di-vanillate dérivé de l'acide 4-hydroxybenzoïque dont la synthèse chimique est le résultat de l'alkylation d'acides benzoïques substitués (Lamoral-Theys *et al.*, 2010). D'après Lamoral-Theis *et al*., le composé 7b a une CI_{50} de 49 ± 2 µM dans les lignées cellulaires cancéreuses humaines. Des études préalables réalisées au laboratoire ont montré que le composé 7b était un inhibiteur d'HDAC6 *in vitro* et *in cellulo* (Annexe 1). De plus, le

composé 7b induit une diminution de la prolifération et de la viabilité de différents modèles cellulaires de cancer de la prostate et du sein accompagnée d'une cytotoxicité différentielle favorable par rapport à des cellules de patients sains [cellules mononucléaires du sang périphérique (PBMC)]. Le composé 7b entraîne aussi une modulation de l'architecture des microtubules *via* une augmentation de l'acétylation de la tubuline α. Ces effets sont associés à une modification de la distribution du cycle cellulaire et d'une diminution du potentiel de migration des cellules cancéreuses de prostate. Finalement, le composé 7b induit une hyperacétylation de la protéine chaperonne HSP90α en corrélation avec une diminution de l'interaction du récepteur de l'androgène avec HSP90α et du niveau d'expression du récepteur de l'androgène (Seidel *et al.*, 2016).

Une des molécules synthétisées par Butler *et al.* est un tétrahydro-carboline appelé composé 7 (MAKV-15 dans cette étude ; Figure 15). Le composé MAKV-15, un dérivé de la tubastatine A dont la position du groupement N-méthyle a été modifiée de la position γ à β, a montré des résultats prometteurs avec une CI_{50} de 1,4 nM contre l'activité de HDAC6 et une sélectivité d'environ 3700 fois par rapport à celle d'HDAC1 (Butler *et al.*, 2010). De plus, des données préliminaires réalisées au laboratoire ont confirmé que le composé MAKV-15 est un inhibiteur d'HDAC6 *in vitro*.

Hypothèses et objectifs

La LMC est traitée par monothérapie que ce soit par imatinib ou par un ITK de seconde ou troisième génération. Cependant ces traitements ne permettent pas une rémission complète de la pathologie de part l'existence de résistances intrinsèques ou acquises aux causes multiples et sont responsables de nombreux effets secondaires affectant la qualité de vie des patients pouvant aller jusqu'à une toxicité de certains organes (Apperley, 2015). De ce fait, l'administration simultanée de plusieurs médicaments, permettant donc de multiplier les cibles et ainsi de palier au problème de résistances, semble être une approche prometteuse pour le traitement de la LMC. L'implication d'HDAC6 dans la dégradation dépendante et indépendante du protéasome fait que son inhibition combinée à celle de BCR-ABL pourrait potentiellement permettre la dégradation protéique de BCR ABL dépendante de l'hyperacétylation d'HSP90α, et en combinaison avec un inhibiteur du protéasome, sensibiliser les cellules en bloquant la dégradation des protéines. En outre la combinaison de l'imatinib et d'un inhibiteur d'HDAC6 a montré engendrer l'apoptose des CSL non ciblées par l'imatinib seul (O'Hare *et al.*, 2011).

Notre hypothèse générale de travail est que des inhibiteurs d'HDAC6 en combinaison d'ITK pourraient être efficaces pour le traitement de la LMC. Afin de tester notre hypothèse, nous avons pour objectif de tester deux protocoles de traitement :

- Dans une première partie, nous déterminerons l'effet anti-LMC de combinaisons inhibiteur d'HDAC6-imatinib.

- Dans une deuxième partie, nous déterminerons le potentiel anti-LMC de l'imatinib sur des cellules sensibilisées par un pré-traitement inhibiteur d'HDAC6-inhibiteur du protéasome permettant l'inhibition directe et indirecte de la dégradation protéique par le protéasome,

Afin de répondre à ces objectifs nous étudierons :

1. Les propriétés pharmacologiques d'inhibiteurs d'HDAC6 par analyse *in silico*, puis leurs effets sur l'acétylation de la tubuline α et des histones H4, ainsi que sur la prolifération et la viabilité de plusieurs lignées de LMC

2. Le potentiel anti-cancéreux *in cellulo* et *in vivo* des combinaisons sur plusieurs lignées de LMC au travers de l'analyse de la prolifération et de la viabilité de cellules de

LMC et en comparaison avec des cellules saines, puis nous caractériserons le type de mort cellulaire induit. Nous évaluerons également les effets des combinaisons sur des CSL, en milieu semi-solide ainsi que sur un modèle de xénogreffe de cellules tumorales chez le poisson zèbre.

3. Le mécanisme d'action des combinaisons par l'analyse de leurs effets sur l'expression de protéines impliquées dans les voies de mort cellulaire ainsi que sur l'expression de la protéine BCR-ABL et l'expression de protéines impliquées dans les voies de signalisation dépendantes de BCR-ABL .

4. Le mécanisme d'interaction des inhibiteurs d'HDAC6 avec la protéine HDAC6 *via* analyse *in silico* de *docking* et analyse *in cellulo* d'activité HDAC de cellules transfectées avec des plasmides d'expression de protéines HDAC6 sauvage et mutées au niveaux des SC.

.

Matériel et méthodes

I. Études *in silico*

1. Propriétés pharmacologiques des composés

Les données concernant les propriétés pharmacologiques des composés ont été obtenues après analyse de leurs structures chimiques grâce au site internet PreADMET version 2.0 (https://preadmet.bmdrc.kr) et Molinspiration (www.molinspiration.com).

2. *Docking*

Le *docking* a été réalisée grâce au logiciel AutoDock Vina 19 (The Scripps Research Institute). Les structures initiales du SC2 de la protéine HDAC6 chez l'Homme et le poisson zèbre disponibles ont été obtenues à partir de la banque de données sur les protéines (www.rcsb.org/) et la structure du composé 7b a été générée *via* le logiciel Marvin Sketch version 17.6.0 (ChemAxon). Afin de préparer la structure pour le *docking*, le ligand et les molécules d'eau ont été enlevés. La taille de la grille de *docking* a été de 40 Å × 40 Å × 40 Å, englobant la plupart des structures entières des SC d'HDAC6. Le programme AutoDock Vina a été exécuté avec la fonction « *multithreading* » à quatre voies et les autres paramètres étaient ceux par défaut du programme. Les figures ont été générées à l'aide de PyMol (The PyMOL Molecular Graphics System, version 2.0 Schrödinger, LLC).

3. Analyse de données transcriptomiques de bases de données publiques

Le jeu de données transcriptomiques E-MTAB-2594 issu de micropuces à ARN réalisées sur des cellules cluster de différenciation (CD)34^+ $CD38^-$ isolées à partir de cellules primaires obtenues de 6 patients atteints de LMC en phase chronique n'ayant pas encore reçu de traitement (Scott *et al.*, 2016), ont été téléchargées de la base de données publique ArrayExpress (Kolesnikov *et al.*, 2015). L'algorithme « *Robust Multi-array Average* » du package oligo R version 1.48.0 (Carvalho *et al.*, 2010) a été utilisé pour normaliser le jeu de données et enfin la fonction « *removeBatchEffect* » du package limma R version 3.40.2 (Ritchie *et al.*, 2015) a été utilisée pour corriger les variations inter-lots. L'analyse de la variance des données entre quatre groupes : cellules $CD34^+$ $CD38^-$ non traitées ou traitées avec le dasatinib, l'imatinib ou le nilotinib a été soumis à l'analyse en composantes principales réalisée grâce à la fonction dédiée du package FactoMineR (Lê, 2008) dans le logiciel R 2010 version 3.6.0 (R Development Core Team, 2010). Cette analyse nous a permis

de combiner les données des trois groupes de cellules traitées avec les différents ITK en un seul groupe de données de cellules traitées avec des ITK. Les boîtes à moustaches ont été dessinées à l'aide de la fonction « *ggboxplot* » du paquet « *ggpubr* » version 0.2.1 (Kassambara, 2018) dans les logiciels R 2010 version 3.6.0 et RStudio (RStudio Team, 2015).

II. Culture cellulaire

1. Modèles cellulaires

Les cellules utilisées dans cette étude sont les K-562, les KBM-5 et les MEG-01, des lignées établies à partir des cellules de patients souffrant de LMC en phase blastique. Les cellules K-562R nous ont été généreusement données par l'université catholique de Séoul (Corée du sud). Les cellules KBM-5R sont des cellules KBM-5 dont la résistance à l'imatinib a été induite par des traitements progressifs à des concentrations croissantes d'imatinib allant de 0,25 à 1 µM. Les cellules $CD34^+$ extraites de sang de cordon ombilical, ainsi que les PBMC de donneurs sains, sont utilisées en tant que modèles cellulaires sains. La lignée U-937, établie à partir des cellules d'un patient atteint d'un lymphome histiocytaire, a été traitée avec de l'étoposide (VP-16) (Sigma) et utilisée en tant que contrôle positif d'induction de l'apoptose.

2. Purification des cellules $CD34^+$ de sang de cordon ombilical

Le sang de cordon ombilical de donneurs sains est fourni par la maternité de la clinique E. Bohler (Hôpitaux Robert Schuman, Luxembourg) avec le consentement des parents et en respectant leur anonymat. La procédure est approuvée par le conseil d'administration de la clinique et le comité national d'éthique de recherche de Luxembourg. Le sang est d'abord dilué au tiers dans du DPBS 1X (*Dulbecco's phosphate buffered saline* ; Lonza) contenant 2 mM d'éthylène diamine tetra-acétique (EDTA ; MP Biomedicals). Le sang dilué est déposé dans des tubes Leucosep (Greiner) possédant une membrane poreuse de polyéthylène prévenant le mélange des différentes fractions cellulaires après séparation, préalablement centrifugés à 1000 *g* pendant 2 minutes avec 15 mL de Ficoll® se retrouvant donc sous la membrane. Après une centrifugation à 800 *g* pendant 16 minutes, les cellules mononucléées sont récupérées au niveau de l'interphase, lavées à deux reprises avec du DPBS 1X contenant 2mM d'EDTA, centrifugées à 340 *g* pendant 7 minutes, puis comptées. Les cellules sont resuspendues dans du tampon *magnetic cell sorting* [MACS ; DPBS 1X ; albumine sérique bovine (ASB) 5% ; EDTA 2 mM] à raison de 300 µL de tampon par 10^8

cellules. Les cellules sont ensuite immunomarquées avec un anticorps anti-CD34 humain couplé avec des billes magnétiques en présence d'agents bloquant les fragments constants d'anticorps, empêchant ainsi les liaisons aspécifiques (CD34 microbead kit, Miltenyi Biotec, 100 µL pour 10^8 cellules). Après 30 minutes d'incubation à 4°C les cellules sont lavées avec 10 mL de tampon MACS, puis déposées sur la colonne de purification magnétique (LS MACS separation column, Miltenyi Biotec) préalablement équilibrée avec 2 mL de tampon MACS et surmontée d'un filtre (Pre-separation filters, Miltenyi Biotec) afin d'éviter le passage d'agrégats dans la colonne. Après trois lavages successifs avec 3 mL de tampon MACS, l'éluat est déposé dans une nouvelle colonne équilibrée comme précédemment et soumis à la même procédure de lavage. Après l'élution finale les cellules sont comptées et mises en culture à une concentration de 2.10^5 cellules/mL. Après trois jours les cellules sont traitées à une concentration de 3.10^5 cellules/mL puis comptées après 24 et 48 heures de traitement.

3. Isolement de cellules mononucléées du sang périphérique de donneurs sains et induction de leur prolifération

Les PBMC ont été isolées à partir de sang de patients sains par la méthode au Ficoll® permettant la séparation des constituants sanguins selon un gradient de densité. Le sang obtenu auprès de la Croix Rouge Luxembourgeoise, après accord des patients et en respectant leur anonymat, est dilué par un facteur 8 dans du tampon DPBS puis 35 mL sont ajoutés délicatement sur 15 mL de Ficoll®. Après une centrifugation à 400 *g* pendant 30 minutes, les érythrocytes se trouvent au fond du tube, puis au-dessus le Ficoll® sur lequel repose les PBMC et enfin le plasma. Les PBMC sont collectées, lavées dans du DPBS, puis mises en culture à une concentration de 5.10^6 cellules/mL. Après 24 heures les cellules sont traitées à une concentration de 1.10^6 cellules/mL puis comptées après 48 heures de traitement.

La prolifération de certaines a été induite grâce à un mitogène, la phytohémagglutinine (PHA ; Gentaur) et à l'interleukine 2 (IL-2 ; Roche). Après isolement les PBMC stimulées par la PHA et l'IL-2 sont placées à 37°C sous atmosphère humide et équilibrée à 5% de CO_2 à une concentration de 2.10^6 cellules/mL dans du milieu RPMI-1640 supplémenté de 1% d'une solution d'antibiotiques et d'antifongiques et de 10% d'AB sérum humain (Lonza) décomplémenté dans une flasque qui a était préalablement incubé à 37°C avec de l'AB sérum humain décomplémenté. Après 1h d'incubation, seules les cellules en suspension sont collectées par centrifugation à 350 *g* pendant 5 minutes et suspendues dans du milieu RPMI-

1640 supplémenté de 1% d'une solution d'antibiotiques et d'antifongiques, 1% d'acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique (Invitrogen), 1% de sodium pyruvate (Invitrogen), 0,1% de β-mercaptoéthanol (Invitrogen), de 1% d'acides aminés non essentiels (Invitrogen), 5% de sérum de veau fœtal (Lonza) et 10% d'AB sérum humain décomplémentés. Après 1 heure d'incubation à 37°C sous atmosphère humide et équilibrée à 5% de CO_2 1 µg/mL de PHA et 50 U/mL d'IL-2 sont ajoutés. Après 3 jours, les cellules sont comptées puis suspendues à 1.10^6 cellules/mL dans le même milieu, également supplémenté de PHA et IL-2, selon le même protocole, puis traitées et enfin comptées après 48 heures de traitement.

4. Milieux de culture et maintenance cellulaire

Les cellules K-562, K-562R, MEG-01 et PBMC sont cultivées dans du milieu *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI) 1640 (Lonza) supplémenté de 10% de sérum de veau fœtal (Lonza) décomplémenté et de 1% d'une solution d'antibiotiques et d'antifongiques (Lonza). Les cellules KBM-5 et KBM-5R sont cultivées dans du milieu IMDM (Gibco ; Thermo Fisher Scientific) supplémenté de 10% de sérum de veau fœtal (Lonza) décomplémenté et de 1% d'une solution d'antibiotiques et d'antifongiques (Lonza). Les cellules $CD34^+$ sont cultivées dans du milieu *stem line medium II* (Sigma) supplémenté d'interleukine 3 (10 ng/mL, ReliaTech), de facteur de croissance des cellules souches (50 ng/mL, ReliaTech), de glutamine (20 µL/mL, Lonza) et d'antibiotiques (10 µL/mL, Lonza). Les cultures cellulaires sont maintenues à 37°C sous atmosphère humide et équilibrée à 5% de CO_2. La maintenance des lignées cellulaires (ensemencement à 2.10^5 cellules/mL) est réalisée trois fois par semaine.

5. Traitement des cellules

Les cellules sont traitées en phase exponentielle de croissance. Les composés utilisés sont décrits dans le Tableau 10.

Tableau 10 : Composés utilisés pour le traitement des cellules.

Composés	Fournisseurs	Diluant	Concentration de la solution mère	Température de stockage
7b	Non disponible commercialement[$]	DMSO	100 mM	-80°C
Bortezomib	Selleck Bioconnect	DMSO	50 µM	-80°C
Cisplatine	Teva	DMSO	3,3 mM	Température ambiante
Imatinib	Sigma	DMSO	10 mM	-20°C
MAKV-15	Non disponible commercialement[£]	DMSO	100 mM	-20°C
SAHA	Cayman Bioconnect	DMSO	10 mM	-20°C
Tubacine	Sigma	DMSO	20 mM	-20°C
Tubastatine A	Sigma	DMSO	20 mM	-20°C
VP-16	Sigma	DMSO	50 mM	4°C
z-VAD	Millipore	DMSO	50 mM	-20°C

[$]Synthétisé par l'équipe du Pr. Kirsch (Université de Lorraine, Metz, France) comme décrit par (Lamoral-Theys *et al.*, 2010).

[£]Synthétisé par l'équipe du Pr. Bormans (Université catholique de Louvain, Belgique) comme décrit par (Butler *et al.*, 2010).

DMSO : diméthylsulfoxyde ; SAHA : acide suberoylanilide hydroxamique ; VP-16 : etoposide ; z-VAD: N-benzyloxycarbonyl-valyl-alanyl-aspartyl-fluoromethylkétone.

6. Viabilité et comptages cellulaires

La viabilité des cellules est évaluée par la méthode d'exclusion au bleu Trypan. Le bleu Trypan traverse la membrane des cellules mais est rejeté activement par les cellules vivantes, les cellules mortes restent donc bleues et sont ainsi différentiables au microscope. Le comptage cellulaire est effectué grâce à une cellule de Malassez.

Les indices de combinaison ont été calculés grâce au logiciel CompuSyn d'après la méthode décrite par Chou *et al.* (Chou, 2006), après marquage au Hoechst et à l'iodure de

propidium. Un indice de combinaison inférieur à un, égal à un ou supérieur à un, correspond respectivement à un effet synergique, additionnel ou antagoniste.

III. Extractions protéiques

1. Extraction des protéines totales

Des culots cellulaires sont suspendus dans une solution contenant un tampon de lyse (MPER®, Mammalian Protein Extraction Reagent, Thermo Scientific), un cocktail d'inhibiteur de protéases 1X (Complete EDTA-free, Roche), d'inhibiteur de phosphatases 1X (PhosSTOP, Roche), ainsi que de l'acide suberoylanilide hydroxamique (SAHA) à 10 µM. Les échantillons sont ensuite vortexés à température ambiante pendant 10 minutes puis centrifugés à 14000 *g* pendant 15 minutes à 4°C. Les protéines totales contenues dans le surnageant sont ensuite dosées puis conservés à -80°C.

2. Extraction des histones

Des culots cellulaires sont suspendus dans un tampon hypotonique (Tris-HCl 10mM pH 8 ; KCl 1mM ; $MgCl_2$ 1,5 mM ; DTT 1mM ; Complete EDTA-free 1X) puis incubés 30 minutes sous agitation douce à 4°C. Après une centrifugation à 10000 *g* pendant 10 minutes à 4°C, les culots sont suspendus dans 400 µL d'acide sulfurique à 0,5 M puis incubés 30 minutes sur agitateur à 4°C. Après une centrifugation à 16000 *g* pendant 10 minutes à 4°C, 132 µL d'acide trichloroacétique à 6,12 M sont ajoutés au goutte à goutte aux surnageants transférés dans de nouveaux tubes. Après incubation pendant la nuit à 4°C, les échantillons sont centrifugés 10 minutes à 13000 *g* à 4°C puis les culots sont lavés deux fois à l'acétone froid. Les culots sont ensuite suspendus dans de d'eau milliQ, dosés puis conservés à -80°C.

3. Dosage protéique

Le dosage protéique est réalisé grâce à la méthode de Bradford. A 160 µL d'échantillons protéiques dilués sont ajoutés 40 µL de réactif de Bradford (Biorad). Le mélange est incubé 5 minutes à température ambiante puis les échantillons sont analysés par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 590 nm grâce à l'appareil SpectraCountTM (Canberra Packard) piloté par le logiciel Plate-reader. Les concentrations protéiques des échantillons sont déterminées grâce à l'équation de la droite de la gamme étalon réalisée avec de l'ASB.

IV. Western Blot

Les protéines additionnées de tampon de Laemmli (Tris-HCl 60 mM pH 6,8 ; dodécylsulfate de sodium (SDS) 2% ; bleu de bromophénol 0,0025% ; 2-β-mercapto-éthanol 2,5% ; glycérol 10%), sont chauffées à 100°C pendant 5 minutes pour permettre leur dénaturation. Les échantillons sont ensuite chargés ainsi qu'un marqueur de taille (Precision Plus Protein™ Kaleidoscope™ Standards, Biorad), sur un gel de polyacrylamide constitué d'un gel de concentration (acrylamide-bisacrylamide 37:1 4% ; Tris-HCl 125,2 mM pH 6,8 ; SDS 0,1% ; persulfate d'ammonium (PSA) 0,1% ; tetramethylethylenediamine (TEMED) 0,1%) et d'un gel de séparation (acrylamide-bisacrylamide 37:1 ; Tris-HCl 373,3 mM pH 8,8 ; SDS 0,1% ; PSA 0,1% ; TEMED 0,1%) dont le pourcentage est déterminé selon la taille de la protéine d'intérêt. La migration des échantillons est effectuée à 25 volts/cm^2 dans du tampon d'électrophorèse (Tris 2,5 mM ; glycine 19,2 mM; SDS 0,1%). Le transfert des protéines sur une membrane de polyvinylidene fluoride activée pendant 10 secondes dans du méthanol, est réalisé à 12,5 volts/cm^2 pendant 30 minutes dans du tampon de transfert (Tris 2,5 mM; glycine 19,2 mM; méthanol 5%). Le blocage des membranes et leurs incubations avec les anticorps primaires et secondaires sont réalisés selon les conditions décrites dans le Tableau 11. Le signal est révélé par chimioluminescence grâce au kit ECL Prime (GE Healthcare) et l'acquisition est réalisée grâce au logiciel ImageQuant TL.

La quantification des blots est réalisée grâce au logiciel ImageQuant TL. Les rapports d'intensités entre la protéine d'intérêt et la protéine de référence sont rapportés par rapport au contrôle solvant.

Tableau 11 : Conditions d'utilisation des anticorps pour les Western Blots.

Le lait et l'albumine sérique bovine (ABS) sont préparés à 5% dans du tampon phosphate salin (PBS ; NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na_2HPO_4 10 mM, KH_2PO_4, 1,8 mM pH 7) 1X-0.1 % Tween 20® (Sigma). Le blocage des membranes s'effectue pendant 1 heure à température ambiante. L'incubation des membranes avec les anticorps primaires est réalisée pendant la nuit à 4°C. L'incubation avec les anticorps secondaires (Santa Cruz et Abcam) est réalisée dans du lait pendant 1 heure à température ambiante.

Cible	**Anticorps primaire**				**Anticorps secondaire**	
Nom	**Taille (kDa)**	**Fournisseur (référence)**	**Saturation de la membrane**	**Dilution (agent bloquant)**	**Hôte**	**Dilution**
Actine β	42	Sigma (A5441)	Lait	1/20000 (lait)	Souris	1/10000
BID	22 (forme clivée : 15)	Cell Signaling (2002)	Lait	1/1000 (lait)	Lapin	1/2000
Caspase 3	35 (forme clivée : 17)	Santa Cruz (sc-56053)	Lait	1/1000 (lait)	Souris	1/1000
Caspase 8	57 (formes clivées : 43 et 41)	Cell Signaling (9746)	Lait	1/1000 (ABS)	Souris	1/4000
Caspase 9	47 (formes clivées : 37 et 35)	Cell Signaling (9502)	Lait	1/1000 (lait)	Lapin	1/10000
c-Abl	120 (BCR-	Santa Cruz (sc-23)	Lait	1/1000 (ABS)	Souris	1/2500

	ABL : 210)					
c-Myc	62	BD Biosciences (51-1485GR)	Lait	1/250 (lait)	Souris	1/1000
CrkL	39	Cell Signaling (3182)	Lait	1/1000 (lait)	Souris	1/4000
HDAC6	160	Santa Cruz (sc-11420)	Lait	1/2500 (lait)	Lapin	1/10000
Histone H1	30	Millipore (05-457)	Lait	1/2000 (ABS)	Souris	1/2500
Histone H4 acétylée (K5, K8, K12 et K16)	14	Millipore (06-866)	ABS	1/50000 (lait)	Lapin	1/10000
Lyn	56	Cell Signaling (2732)	Lait	1/1000 (ABS)	Lapin	1/10000
Mcl-1	40	Cell Signaling (4572)	Lait	1/1000 (ABS)	Lapin	1/10000
PARP-1	57 (forme clivée : 43)	Cell Signaling (9542)	Lait	1/1000 (lait)	Lapin	1/10000
Phospho-	160	Cell	Lait	1/1000	Lapin	1/10000

BCR (Y177)	(BCR-ABL : 210)	Signaling (3901)		(ABS)		
Phospho-CrkL (Y207)	39	Cell Signaling (3181)	Lait	1/1000 (lait)	Lapin	1/10000
Phospho-Lyn (Y507)	53, 56	Cell Signaling (2731)	ABS	1/1000 (ABS)	Lapin	1/10000
Phospho-STAT5 (Y694)	90	Cell Signaling (9351)	Lait	1/1000 (lait)	Lapin	1/10000
STAT5	90	Cell Signaling (9363)	ABS	1/5000 (ABS)	Lapin	1/10000
Survivine	19	R&D systems (AF886)	Lait	1/2000 (lait)	Lapin	1/2000
Tubuline α	55	Calbiochem (CP06)	Lait	1/5000 (lait)	Souris	1/5000
Tubuline α acétylée (K40)	55	Santa Cruz (sc-23950)	Lait	1/1000 (lait)	Souris	1/5000

BCR : *breakpoint cluster region* ; c-Abl : *c-Abelson* ; CrkL : *Crk like protein* ; HDAC : désacétylase d'histone ; K : lysine ; Mcl-1 : *myeloid cell leukemia 1* ; PARP : poly(ADP-ribose) polymérase ; STAT : transducteur du signal et activateur de la transcription ; Y : tyrosine.

V. Analyse de l'expression génique

1. Extraction de l'ARN

L'extraction des ARN totaux est réalisée grâce au kit NucleoSpin® RNA (Macherey-Nagel). Des culots de maximum 5 millions de cellules sont suspendus dans le tampon de lyse. Les lysats ainsi obtenus sont filtrés puis homogénéisés dans de l'éthanol à 70% afin de dissoudre les sels. Les acides nucléiques sont ensuite retenus sur une colonne de silice. L'ADN est ensuite dégradé par incubation avec de la DNAse et les ARN sont lavés et élués. Le dosage de l'ARN est réalisé grâce au spectrophotomètre NanoDrop ND-1000.

2. Transcription inverse

La transcription inverse est réalisée dans un thermocycleur (Mastercycler gradient, Eppendorf). Un mélange de un µg d'ARN et de 0,5 µg d'oligo dT (Promega) est incubé à 70°C pendant 10 minutes afin de permettre la dénaturation de l'ARN et l'hybridation des oligo dT, puis à 4°C pendant 5 minutes. La réaction de transcription inverse est réalisée à 42°C pendant une heure et demi après ajout d'un mélange constitué de tampon de transcriptase inverse 1X (Promega), 50 unités de transcriptase inverse (M-MLV RT RNase (H-), Promega), 0,5 mM de dNTP (Promega), 10 mM de DTT (Invitrogen) et de 40 unités d'inhbiteur de ARNase (Recombinant RNasin®; Promega). L'enzyme est ensuite inactivée à 70°C pendant 15 minutes, puis les ARN sont digérés par 2,2 unités de ARNase H (Promega) à 37°C pendant 20 minutes. Les ADNc sont conservés à -20°C.

3. Amplification par PCR en temps réel

La réaction de PCR est réalisée à partir de 8 ng d'ADNc, de 0,1 µM d'amorces sens et anti-sens spécifique du gène d'intérêt, ainsi que de Power SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems). Les amorces (toutes données dans le sens 5'→3') sens (AAGATGATGAGTCTCCGGGG) et anti-sens (CGCTGAAGGGCTTTTGAACT) permettent le ciblage du transcrit b3a2 du gène BCR-ABL et les amorces sens (CTCTTCCAGCCTTCCTTCCT) et antisens (AGCACTGTGTTGGCGTACAG) permettent le ciblage du gène codant pour l'actine β, correspondant au gène rapporteur. L'amplification est effectuée grâce au dispositif 7300 Real Time PCR System (Applied Biosystems) piloté par le logiciel 7300 System selon le programme suivant : 40 cycles composés de deux étapes : la dénaturation à 95°C pendant 15 secondes puis l'hybridation et l'amplification à 60°C pendant 60 secondes. Une courbe de dissociation est réalisée afin de s'assurer de la spécificité de

l'amplification. Les données sont obtenues sous forme de *cycle threshold* (Ct) correspondant au nombre de cycles nécessaires à la détection des produits de PCR. L'équation : $2^{-\Delta Ct} = 2^{-(Ct\ gène\ cible\ -\ Ct\ gène\ rapporteur)}$ permet d'analyser les résultats.

VI. Analyse de la morphologie nucléaire par microscopie de fluorescence

Des cellules sont marquées au Hoechst 33342 (Calbiochem) qui va pénétrer et marquer l'ADN en bleu après incubation pendant 15 minutes à 37°C, permettant ainsi d'observer la morphologie nucléaire. Après avoir été centrifugées, les cellules sont suspendues dans une solution à 1 µg/mL d'iodure de propidium (Sigma) qui est un agent intercalant des acides nucléiques ne pénétrant que dans les cellules ayant perdu leur intégrité membranaire. L'analyse est réalisée par microscopie de fluorescence (Olympus, Aartselaar, Belgique) en utilisant le logiciel pilote cell^M (Olympus).

VII. Mesure de l'activité enzymatique des caspases 3/7, 8 et 9

La mesure de l'activité enzymatique des caspases est réalisée avec le kit Caspase-Glo® Assay (Promega). Après 24 heures de traitement, 2.10^4 cellules sont transférées dans une plaque 96 puits blanche à fond transparent. Après avoir été mis à température ambiante, le substrat (aminoluciférine, Promega) couplé à une séquence tétrapeptidique spécifique à la caspase ciblée, est ajouté dans les puits. Pendant une période d'incubation d'une heure, le substrat va être clivé par les caspases présentes, et ainsi pris en charge par la luciférase, qui va produire un signal lumineux proportionnel à l'activité des caspases. La mesure du signal lumineux est réalisée grâce au luminomètre (Berthold) et au logiciel Simplicity.

VIII. Marquage à l'annexine V-fluorochrome isothiocyanate de fluorescéine (FITC) et à l'iodure de propidium

La détection de l'exposition des phosphatidylsérines est réalisée grâce au kit annexine V-FITC (BD Pharmingen). Des culots de 1 million de cellules sont suspendus dans une solution tampon fournie par le kit auquel sont ajoutés l'annexine V couplée au FITC et l'iodure de propidium. Après 15 minutes d'incubation à température ambiante dans l'obscurité les cellules sont analysées par cytométrie de flux grâce à un cytomètre de flux (FACS Calibur, BD Biosciences) piloté par le logiciel Cell Quest Pro (BD). L'analyse se fait à l'aide du logiciel FlowJo (Treestar) et est basée sur l'analyse de 10000 évènements par échantillon.

La phosphatidylsérine normalement présente du coté interne de la membrane cellulaire va être externalisée lors de l'apoptose. L'annexine V est une protéine ayant une forte affinité pour la phosphatidylsérine. Son couplage au FITC va ainsi permettre la détection de la phosphatidylsérine. L'iodure de propidium étant un agent intercalant des acides nucléiques ne pénétrant que dans les cellules ayant perdu leur intégrité membranaire, son utilisation nous permettra de différencier les cellules apoptotiques précoces des cellules apoptotiques tardives ou nécrotiques. En effet les cellules vivantes seront annexine V (-)/iodure de propidium (-), les cellules en apoptose précoce seront annexine V (+)/iodure de propidium (-) car leur intégrité membranaire sera préservée, et enfin les cellules en apoptose tardive ou en nécrose seront annexine V (+)/iodure de propidium (+) car elles auront perdu leur intégrité membranaire.

IX. Immunoprécipitation

Des culots de cellules sont suspendus dans un tampon de lyse (Tris-HCl 50 mM pH 7,4 ; Igepal 1% ; sodium déoxycholate 0,25% ; NaCl 0,15 M ; EDTA 1 mM ; Complete EDTA-free 1X; SAHA 0,01 mM) puis incubés pendant 15 minutes à 4°C sur agitateur. Une centrifugation à 14000 *g* pendant 10 minutes à 4°C est ensuite réalisée afin d'éliminer les débris cellulaires. Après avoir enlevé le surnageant, 30 µL de billes d'agarose conjuguées à des protéines A ou G (Millipore) sont ajoutés dans le but de réduire le bruit de fond en captant les immunoglobulines non spécifiques. Les échantillons sont incubés 30 minutes à 4°C puis centrifugés. Les surnageants sont ensuite dosés. A 250 µg de protéines sont ajoutés 5 µg d'anticorps correspondants puis incubés sur la nuit à 4°C. Après l'incubation, sont ajoutés 30 µL billes d'agarose conjuguées à des protéines A ou G afin de capter les anticorps. Les échantillons sont incubés pendant 1 heure à 4°C puis centrifugés à 350 *g* pendant 2 minutes à 4°C, puis deux lavages sont effectués dans le tampon de lyse. Au culot est ensuite ajouté du bleu de Laemmeli 2x. Les échantillons sont chauffés puis centrifugés à 2300 *g* pendant 1 minute à 4°C. Le surnageant est transféré dans de nouveaux tubes.

X. Transfection

Des plasmides d'expression de la protéine HDAC6 sauvage ou mutée pour le premier SC (H216A), le deuxième SC (H611A) ou les deux (H216A/H611A), et possédant une séquence de reconnaissance tag-FLAG ont été utilisés. Les protéines HDAC6 H216A et H611A correspondent à des protéines HDAC6 possédant une mutation respectivement en

position 216 et 611, entrainant le remplacement d'une histidine par une alanine ; et la forme H216A/H611A correspond à une protéine HDAC6 ayant subi une double mutation en position 216 et 611 (Figure 12B). L'ADN à transfecter (1 µg/mL) est incubé pendant 10 minutes à température ambiante dans du milieu RPMI supplémenté de réactif Plus™ Reagent (Invitrogen) (0,5% v/v). Puis ce mélange est incubé pendant 25 minutes à température ambiante avec la Lipofectamine® LTX Reagent (Invitrogen) (1,25% v/v) puis ajouté aux cellules K-562 au goutte à goutte. La concentration cellulaire finale est de 200000 cellules par mL.

XI. Mesure de l'activité enzymatique désacétylase

Des protéines sont incubées avec un substrat possédant des groupements acétyles, un fluorophore et un quencher (Enzo), et un tampon (TrisHCl 50 mM pH 8 ; KCl 2,7 mM ; NaCl 137 mM ; $MgCl_2$ 1 mM ; ASB 1 mg/mL) à 37°C pendant 1 heure. Deux substrats ont été utilisés dans cette étude, Fluor de Lys SIRT1 et Fluor de Lys H4-AcK16 (Enzo). Une solution de « développeur » additionnée de SAHA est ensuite ajoutée afin d'arrêter la réaction et de permettre le clivage du substrat seulement s'il a été désacétylé par l'enzyme (Figure 16). Après une incubation de 30 minutes à 37°C, la fluorescence émise est mesurée grâce à l'appareil Spectra MAX Gemini (Molecular Devices) piloté par le logiciel Soft Max Pro avec une longueur d'onde d'excitation à 360 nm et d'émission à 460 nm.

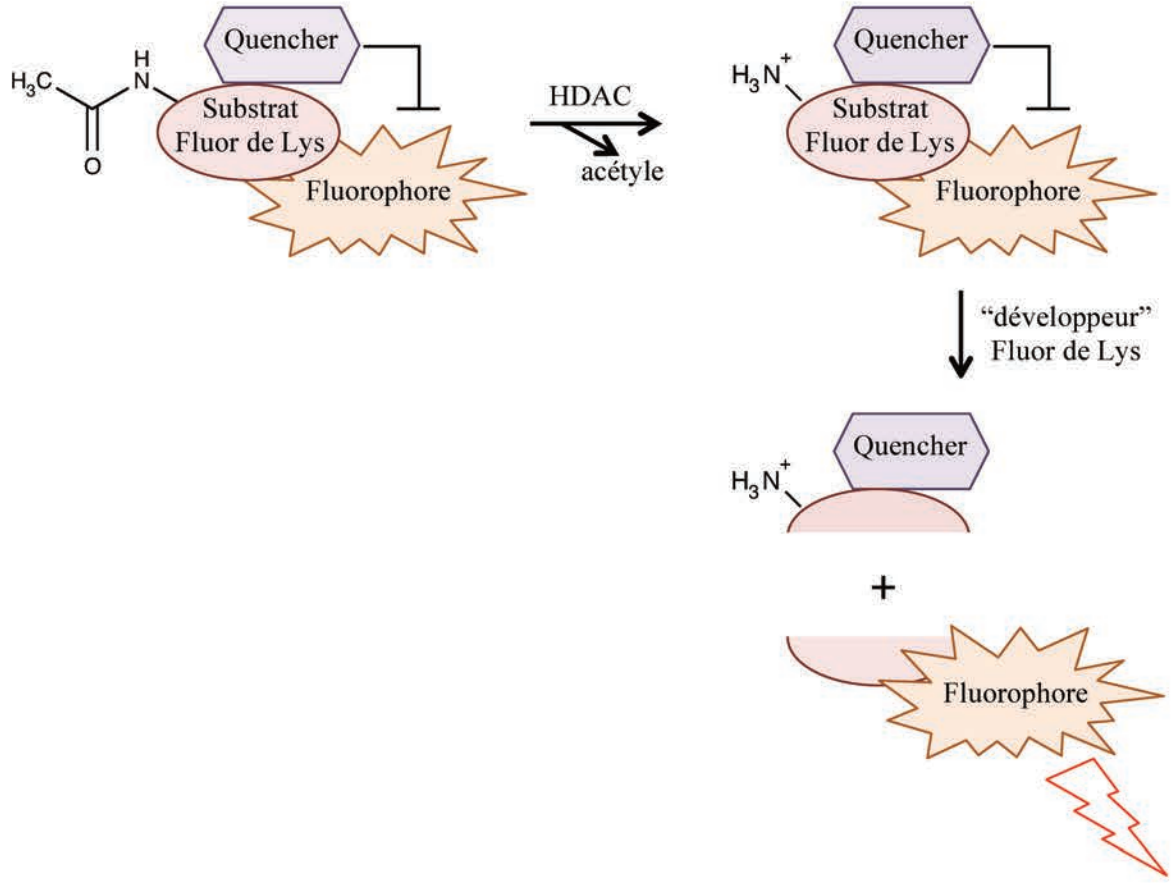


Figure 16 : Principe de la mesure de l'activité HDAC in vitro.

Un substrat Fluor de Lys conjugué à un fluorophore et à un quencher est incubé en présence d'une source d'activité HDAC. La réaction est ensuite arrêtée par la solution de « développeur » Fluor de Lys contenant un inhibiteur d'HDAC. Le « développeur » clive le substrat uniquement s'il est désacétylé, permettant de lever l'inhibition du quencher sur le fluorophore. La fluorescence émise est alors mesurée.

XII. Quantification des cellules ayant une expression d'ALDH élevée

La détection de cellules exprimant l'ALDH est réalisée avec le kit ALDEFLUOR™ (Stemcell Technologies). Après 24 heures de traitement, 10^6 cellules sont suspendues dans 1 mL de tampon de réaction (Stemcell Technologies). Après avoir été mis à température ambiante, un volume de 5 µL de réactif fluorescent ALDEFLUOR également appelé BODIPY-aminoacétaldéhyde (Stemcell Technologies), est ajouté. Pour chaque échantillon, un contrôle est réalisé, grâce à l'ajout de 5 µL de diéthylaminobenzaldéhyde (DEAB), inhibiteur spécifique de l'ALDH, afin d'évaluer la fluorescence de base des cellules marquées. Pendant une période d'incubation de 40 minutes à 37°C, le réactif ALDEFLUOR diffuse librement dans les cellules vivantes et va produire en présence d'ALDH, du BODIPY-aminoacetate retenu dans les cellules, qui va émettre un signal fluorescent proportionnel à

l'activité ALDH. Après une centrifugation à 350 *g* pendant 5 minutes les cellules sont suspendues dans 300 µL de tampon de réaction puis conservées dans la glace. La mesure de fluorescence est réalisée grâce à un cytomètre de flux (FACS Calibur, BD Biosciences) piloté par le logiciel Cell Quest Pro (BD) basé sur les paramètres de granularité (SSC, *Side Scatter*) et de fluorescence (FL1). L'analyse des résultats est réalisée grâce au logiciel FlowJo (Treestar).

XIII. Test clonogénique

Des cellules (10^3 cellules/ml) sont ensemencées dans un milieu de méthylcellulose semi-solide (Methocult H4230, StemCell Technologies) supplémenté de 10% de sérum de veau fœtal et traitées avec les composés indiqués. Les colonies sont maintenues à 37°C sous atmosphère humide et équilibrée à 5% de CO_2 pendant 10 jours, puis détectées après ajout de 1 mg/mL de sel de tétrazolium bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl (MTT ; Sigma-Aldrich) en utilisant le système Gel Doc XR^+ (Bio-Rad). Le nombre de colonies, leur aire totale et l'intensité du signal MTT sont déterminés grâce au logiciel ImageJ (Institut National Américain de la santé).

XIV. Xénogreffes de cellules tumorales chez le poisson zèbre

Les poissons zèbres (*Danio rerio*) utilisés sont sains et ont été élevés selon les directives données par l'Université Nationale de Séoul. Après l'accouplement, les œufs fertilisés sont incubés dans une solution Danieau à 0,003% de phénylthiourée (PTU) à 28,5°C pendant 48 heures. Les poissons zèbres sont ensuite anesthésiés dans 0,02% de tricaïne (Sigma-Aldrich) et immobilisés dans de l'agar. Pour chaque condition, environ 150 cellules tumorales traitées tel qu'indiqué dans les figures sont marquées pendant 2 heures avec 2 µM de fluorophore Cell tracker CM-Dil (Invitrogen) et sont injectées (PV820 microinjector; World Precision Instruments, USA) dans le sac vitellin de 10 poissons zèbre qui sont ensuite placés dans des plaques 24 puits contenant de la solution Danieau à 0,003% de PTU. Après 72 heures d'incubation à 28,5°C, les poissons sont immobilisés dans une goutte de solution Danieau à 3% de méthylcellulose sur une lame de verre et sont observés sous un microscope à fluorescence (Leica DE/DM 5000B). Les photographies des échantillons ont été prises grâce au logiciel Leica Application Suite V4.2 et l'intensité de fluorescence de la tumeur a été quantifiée en utilisant le logiciel ImageJ (Institut National Américain de la santé).

XV. Analyses statistiques

La significativité des variations entre les échantillons a été évaluée grâce au logiciel Prism 6 (Graph Pad) en réalisant une analyse de la variance (ANOVA) à un ou deux facteurs, suivie d'un test Holm-Sidak. Le seuil de significativité utilisé est de $p<0,05$.

Les CI_{50} ont été calculées en utilisant la régression non linéaire du logiciel Prism 6 (Graph Pad).

Résultats

Partie 1 : Étude du composé 7b en tant qu'inhibiteur d'HDAC6 sélectif en combinaison avec l'imatinib pour le traitement de la leucémie myéloïde chronique

L'objectif de cette partie est de déterminer le potentiel anti-cancéreux des combinaisons d'ITK et d'inhibiteurs d'HDAC6 tels que la tubacine, l'inhibiteur d'HDAC6 de référence et du composé 7b, un nouvel inhibiteur sélectif d'HDAC6 récemment identifié au laboratoire (Seidel *et al.*, 2016), sur des cellules de LMC telles que les K-562, les KBM-5 et les MEG-01, sensibles ou résistantes aux ITK. Nous analyserons dans un premier temps les données *in silico* concernant l'activité biologique de ces inhibiteurs d'HDAC6, dans un second temps nous évaluerons le potentiel anti-cancéreux *in vitro* des co-traitements d'ITK avec les inhibiteurs d'HDAC6, puis nous déterminerons le mécanisme d'action des combinaisons, et enfin nous évaluerons le potentiel anti-cancéreux des combinaisons les plus prometteuses *in vivo*.

I. Évaluation *in silico* des propriétés pharmacologiques des inhibiteurs d'HDAC6, le composé 7b et la tubacine

Afin de déterminer *in silico* si l'absorption par voie orale des composés sera optimale, leurs structures chimiques ont été soumises au principe de la règle de Lipinski se basant sur cinq propriétés physico-chimiques. Les paramètres pharmacocinétiques et la potentielle toxicité des composés ont également été étudiés. Les résultats (Tableau 12) montrent que le composé 7b remplit les conditions nécessaires pour une bonne administration par voie orale contrairement à la tubacine qui possède une masse moléculaire ainsi qu'une valeur de log P, correspondant à la lipophilie de la molécule, trop élevées, signifiant que le composé est peu soluble en solution aqueuse et qu'il ne traversera probablement pas les membranes cellulaires. De plus, les composés ont de bonnes prédispositions à l'absorption intestinale mais pourraient se lier aux protéines plasmatiques. Enfin, bien que le composé 7b pourrait présenter un risque de toxicité cardiaque contrairement à la tubacine, et les composés ne seraient pas carcinogènes.

Tableau 12 : Évaluation *in silico* des propriétés pharmacologiques du composé 7b et de la tubacine.

Prédiction	Paramètres (valeurs théoriques)	7b	Tubacine
Règles de Lipinski	Masse moléculaire (Da ; ≤ 500)	432,47	721,88
	Nombre d'atomes (20 ≤…≤ 70)	31	52
	Donneurs de liaisons hydrogène (≤ 5)	2	4
	Accepteurs de liaisons hydrogène (≤ 10)	8	10
	Lipophilie/Hydrophilie (log P ; ≤ 5)	4,64	7,65
Pharmaco-cinétique	Perméabilité intestinale (4 ≤…≤ 70)	23,6	24,6
	Absorption intestinale (% ; ≥ 70)	93,8	94,4
	Liaison aux protéines plasmatiques (% ; ≤ 90)	93,8	94,4
Toxicité	Carcinogénicité	Négative	Négative
	Toxicité cardiaque	Risque moyen	Non déterminé

Les données ont été obtenues après analyse des structures chimiques des composés grâce au site internet https://preadmet.bmdrc.kr/.

En conclusion de cette partie :

Le composé 7b remplit les conditions nécessaires pour une bonne administration par voie orale contrairement à la tubacine mais pourrait présenter un risque de toxicité cardiaque.

II. Effet du co-traitement de l'imatinib et des inhibiteurs d'HDAC6 sur la viabilité des cellules K-562

1. Effet des inhibiteurs d'HDAC6 sur l'acétylation de la tubuline α et des histones H4

Après avoir caractérisé les propriétés pharmacologiques *in silico* des inhibiteurs d'HDAC6, nous avons choisi d'étudier dans un premier temps l'effet des inhibiteurs d'HDAC6 en combinaison avec l'imatinib sur la lignée cellulaire cancéreuse K-562 de LMC exprimant constitutivement des niveaux élevées de la protéine BCR-ABL (Annexe 2). En ce sens, nous avons tout d'abord comparé l'effet du composé 7b et de la tubacine sur le niveau d'acétylation de la tubuline α ciblée par HDAC6, et de l'histone H4, non ciblé par HDAC6,

afin de déterminer la concentration à laquelle ils agissent en tant qu'inhibiteurs sélectifs d'HDAC6 dans ce modèle cellulaire.

Des résultats préliminaires au laboratoire ont montré que 50 µM de composé 7b induisait une augmentation de l'acétylation de la tubuline α après 24 heures de traitement sans induire l'acétylation des histones H4 (Annexe 3).

Les cellules K-562 ont été traitées avec des concentrations croissantes de tubacine pendant 24 heures puis l'acétylation de la tubuline α et de l'histone H4 a été étudiée par Western Blot. Les résultats indiquent que la tubacine entraine une augmentation de l'acétylation de la tubuline α dès 0,5 µM à 24 heures sans induire l'acétylation des histones H4 (Figure 17). Afin de garantir une inhibition sélective d'HDAC6 nous avons choisi d'utiliser la tubacine à une concentration de 1,5 µM et le 7b à une concentration de 50 µM pour les co-traitements.

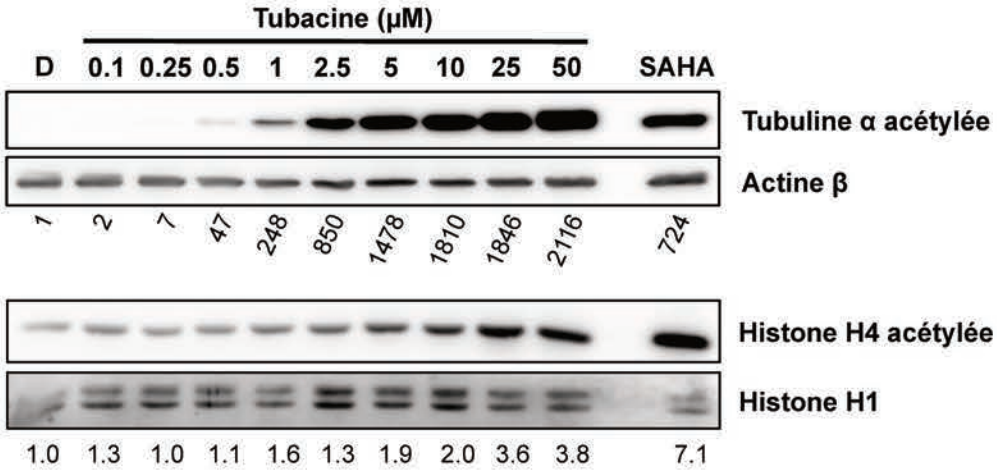


Figure 17 : Effet de la tubacine sur l'acétylation de la tubuline α et de l'histone H4 dans les cellules K-562.

Les cellules K-562 ont été traitées avec des concentrations croissantes de tubacine pendant 8 heures et l'acétylation de la tubuline α et de l'histone H4 a été étudiée par Western Blot. L'actine β et l'histone H1 ont été utilisées comme contrôle de chargement. Le DMSO (D) est utilisé en tant que contrôle solvant et le SAHA (2 µM, 8 heures) en tant qu'inhibiteur d'HDAC de référence. Le ratio d'intensité de la protéine d'intérêt sur le contrôle de charge est présenté sous les blots. Les blots présentés sont représentatifs de trois expériences indépendantes.

2. Effet de l'imatinib et des inhibiteurs d'HDAC6 sur la prolifération et la viabilité cellulaire

Après avoir confirmé que le composé 7b avait également un potentiel inhibiteur d'HDAC6 dans un modèle cellulaire de LMC, et avoir déterminé les concentrations auxquelles le composé 7b et la tubacine induisent une inhibition sélective d'HDAC6 dans ce même modèle, leur effet sur la prolifération et la viabilité cellulaire, ainsi que celui de l'imatinib a été testé. Pour cela les cellules K-562 ont été traitées avec l'imatinib, le composé 7b et la tubacine pendant 24, 48 et 72 heures à des concentrations allant de 0,1 à 25 µM pour l'imatinib, de 1 à 100 µM pour le composé 7b, et de 0,5 à 50 µM pour la tubacine. L'effet des composés a été évalué avec le test d'exclusion au bleu Trypan et l'effet sur la prolifération cellulaire a été déterminé par comptage du nombre de cellules (Figure 18). Les résultats indiquent que l'imatinib induit une diminution de la prolifération cellulaire dès 0,1 µM à 48 heures passant de $11,5.10^5$ cellules dans le contrôle à $8,9.10^5$ cellules, ainsi qu'une diminution de la viabilité de 19,8% dès 0,25 µM à 72 heures. Le composé 7b induit une diminution de la prolifération cellulaire dès 5 µM passant de $11,1.10^5$ cellules dans le contrôle à 9.10^5 cellules à 48 heures et une diminution de la viabilité de 18,7% dès 100 µM à 24 heures. La tubacine induit une diminution de la prolifération cellulaire dès 5 µM à 48 heures passant de $10,3.10^5$ cellules dans le contrôle à $7,2.10^5$ cellules et une diminution de la viabilité de 25,2 et 21,3% dès 10 µM à respectivement 48 et 72 heures.

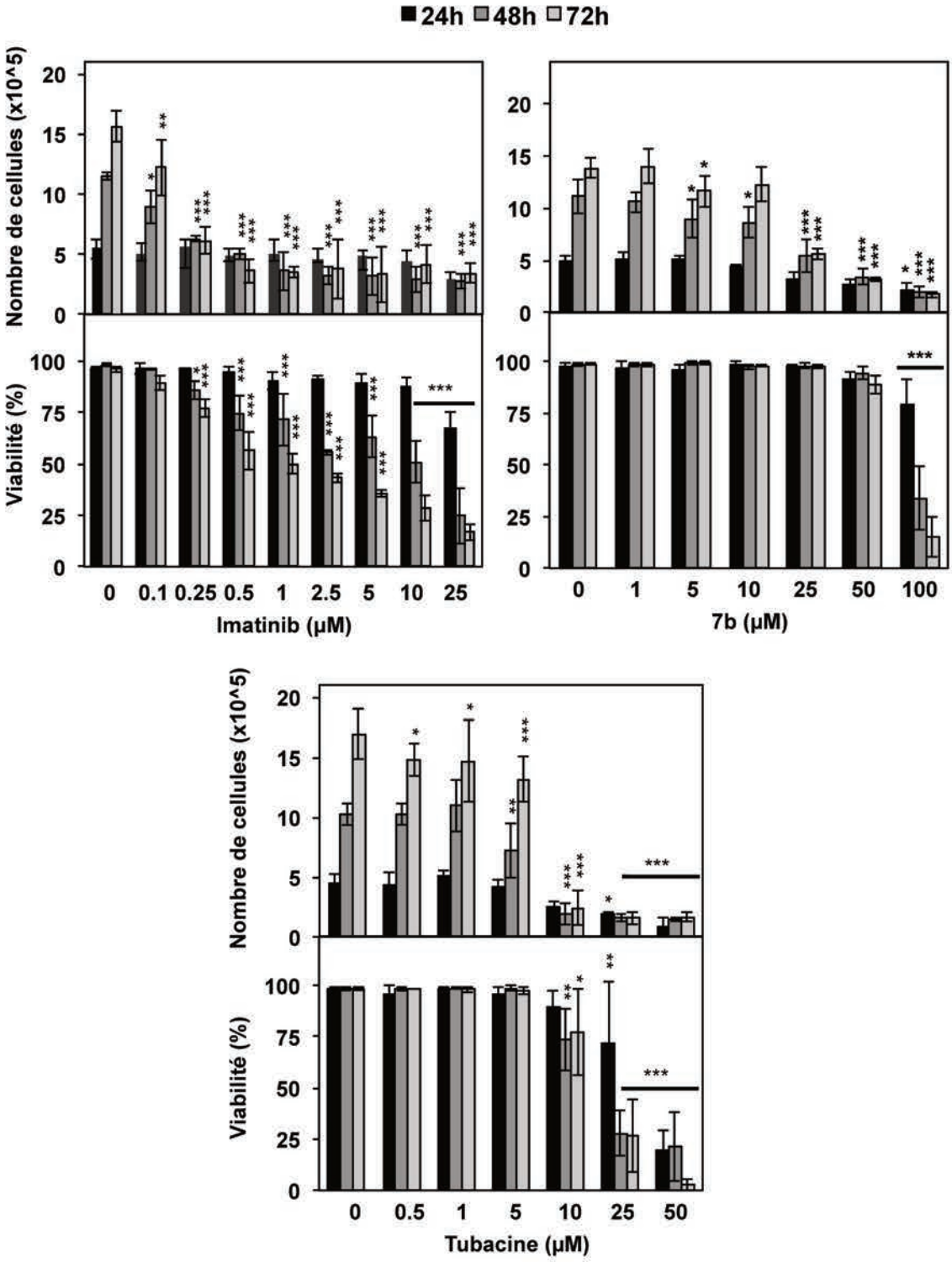


Figure 18 : Effet de l'imatinib, du composé 7b et de la tubacine sur la prolifération et la viabilité des cellules K-562.

Les cellules K-562 ont été traitées avec des concentrations croissantes d'imatinib, de composé 7b et de tubacine. Après 24, 48 et 72 heures de traitement la prolifération et la viabilité cellulaire ont été évaluées. Les données représentent la moyenne ± l'écart type de trois expériences indépendantes et l'analyse statistique a été réalisée par rapport au contrôle avec *p<0,05, **p<0,01 et ***p<0,001.

3. Effet des co-traitements sur la prolifération et la viabilité cellulaire

Les concentrations choisies pour les co-traitements, induisant moins de 20% de mortalité cellulaire pour l'imatinib (0,25 µM) et induisant une inhibition sélective d'HDAC6 pour le composé 7b (50 µM) et tubacine (1,5 µM) ayant été déterminées, leur effet en co-traitement sur la prolifération et la viabilité des cellules K-562 a été étudié. Différents protocoles de traitements ont été testés tels que des traitements séquentiels avec prétraitement des cellules avec le composé 7b pendant 6 heures [*i.e.* temps à partir duquel le composé agit en tant qu'inhibiteur d'HDAC6 (Annexe 3)] suivi d'un traitement de 24 heures à l'imatinib ou inversement avec un prétraitement à l'imatinib pendant 24 heures suivi d'un traitement avec le composé 7b pendant 24 heures. Enfin, un traitement simultané imatinib-7b pendant 48 heures a été testé. Après avoir évalué l'effet anti-cancéreux des différentes protocoles de traitements avec le test d'exclusion au bleu Trypan, le traitement simultané des cellules s'est révélé être plus efficace que les traitements séquentiels et sera donc utilisé par la suite.

Les cellules K-562 ont donc été traitées simultanément avec l'imatinib (0,25 µM) et les inhibiteurs d'HDAC6 7b (50 µM) ou tubacine (1,5 µM) pendant 48 heures. L'effet des composés a été évalué avec le test d'exclusion au bleu Trypan et l'effet sur la prolifération cellulaire a été déterminé par comptage du nombre de cellules (Figure 19). Les résultats indiquent que le co-traitement imatinib-7b induit une diminution de la prolifération passant de $8{,}4.10^5$ cellules dans le contrôle à $1{,}8.10^5$ cellules à 48 heures, plus importante que celle induite par les composés seuls, l'imatinib passant à $6{,}1.10^5$ cellules et le 7b à $3{,}3.10^5$ cellules. La combinaison induit également une diminution très importante de la viabilité (64,3%) par rapport aux traitements à l'imatinib (11,5%) et au 7b (10,8%) seuls. La combinaison imatinib-tubacine induit une diminution de prolifération similaire à celle induite par l'imatinib seul, passant de $11{,}8.10^5$ cellules dans le contrôle à $4{,}6.10^5$ cellules pour la combinaison et à $4{,}5.10^5$ cellules pour l'imatinib. De la même manière, la combinaison imatinib-tubacine diminue la viabilité (17,9%) de manière similaire à l'imatinib seul (18,2%).

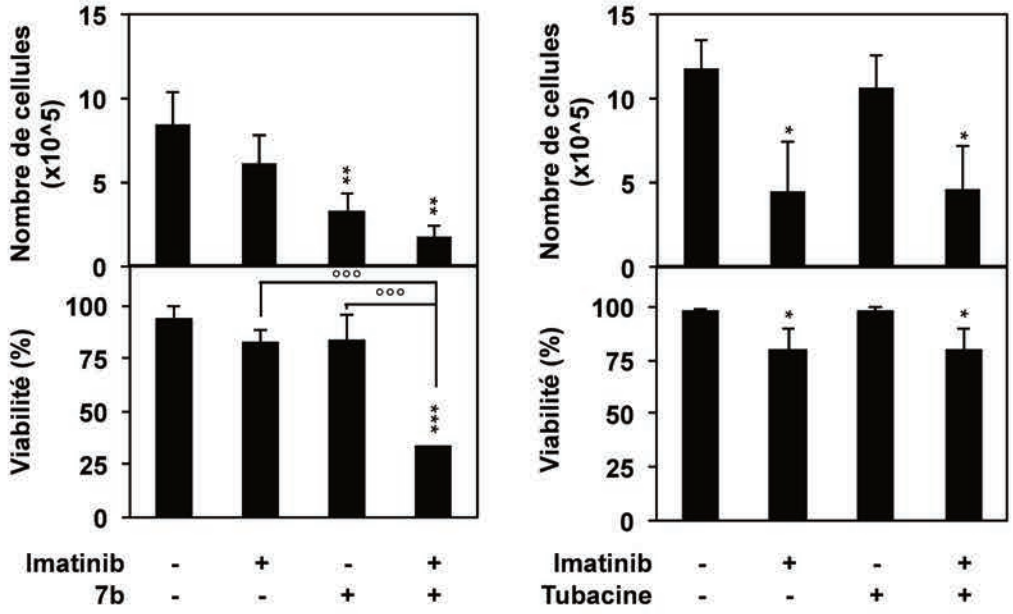


Figure 19 : Effet des co-traitements imatinib-inhibiteurs d'HDAC6 sur la prolifération et la viabilité des cellules K-562.

Les cellules K-562 ont été traitées avec l'imatinib (0,25 µM), le composé 7b (50 µM) et la tubacine (1,5 µM) seuls ou en combinaison. Après 48 heures de traitement, la prolifération et la viabilité ont été évaluées. Les données représentent la moyenne ± l'écart type de trois expériences indépendantes et l'analyse statistique a été réalisée par rapport au contrôle avec *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 ou par rapport à la combinaison °°°p<0,001.

4. Caractérisation du type de mort cellulaire induit par les co-traitements

La diminution de la viabilité observée lors du traitement des cellules K-562 avec les molécules seules ou en co-traitement nous a amené à étudier le type de mort cellulaire induit par analyse de la morphologie nucléaire. Cette étude (Figure 20) montre une augmentation de la condensation et fragmentation des noyaux cellulaires, caractéristique des cellules apoptotiques sans augmentation significative du nombre de cellules nécrotiques lors des co-traitements. Les résultats montrent une forte augmentation des cellules apoptotiques lors du co-traitement des molécules imatinib et 7b passant de 0,8% dans le contrôle à 85,2%, par rapport au co-traitement des molécules imatinib-tubacine atteignant 34,4% de cellules apoptotiques à 48 heures. De plus, la mort cellulaire par apoptose observée pour les co-traitements de l'imatinib avec les inhibiteurs d'HDAC6 est bien supérieure aux traitements avec l'imatinib (15%), le 7b (6,8%) et la tubacine (7,9%) seuls à 48 heures. Les indices d'association ou « combination index » sont de 0,2 ± 0,15 pour la combinaison de l'imatinib et du composé 7b et de 1,89 ± 0,8 pour la combinaison de l'imatinib et de la tubacine. Le co-

traitement imatinib-7b entraine donc un effet synergique sur la viabilité cellulaire plus important que le co-traitement imatinib-tubacine. Ces résultats confirment les données obtenues avec la coloration au bleu Trypan, tout en donnant une précision du type de mort cellulaire impliqué qui est ici l'apoptose.

Afin de déterminer si l'apoptose induite par les traitements est dépendante ou non des caspases, les cellules K-562 ont été prétraitées pendant une heure avec un pan-inhibiteur des caspases, le z-VAD puis traitées avec l'imatinib, le composé 7b et la tubacine pendant 48 heures (Figure 21). Les résultats indiquent que l'inhibition de l'activité des caspases prévient l'induction de la mort cellulaire déclenchée par les co-traitements avec des viabilités respectives de 97,4 et 89,9 % pour les combinaisons imatinib-7b et imatinib-tubacine. Ces résultats indiquent donc que la mort cellulaire par apoptose provoquée par les combinaisons imatinib-HDAC6i est dépendante des caspases.

Afin de caractériser la voie apoptotique induite par les co-traitements, le clivage des caspases a été étudié. L'analyse par Western Blot indique que le co-traitement imatinib-7b induit le clivage de la poly(ADP-ribose) polymérase (PARP)-1, un substrat des caspases, de la caspase effectrice 3 et enfin des caspases initiatrices 8 et 9 après 24 heures de traitement, temps auquel la combinaison imatinib-7b induit un effet moindre sur la viabilité des cellules K-562, ce qui confirme l'induction de l'apoptose. L'effet de la combinaison imatinib-tubacine sur le clivage des caspases est comparable à celui des composés seuls sur le clivage de PARP-1 et des caspases. Le clivage concomitant des caspases 8 et 9 dans le cas du co-traitement imatinib-7b nous a amené à étudier le clivage de la protéine *BH3 interacting-domain death agonist* (BID), membre de la famille Bcl-2, faisant le lien entre les voies intrinsèques et extrinsèques. La Figure 22 montre que le co-traitement imatinib-7b induit également le clivage de BID. Le co-traitement imatinib-7b permet donc d'activer la voie extrinsèque induisant le clivage de BID qui va alors entraîner l'activation de la voie intrinsèque.

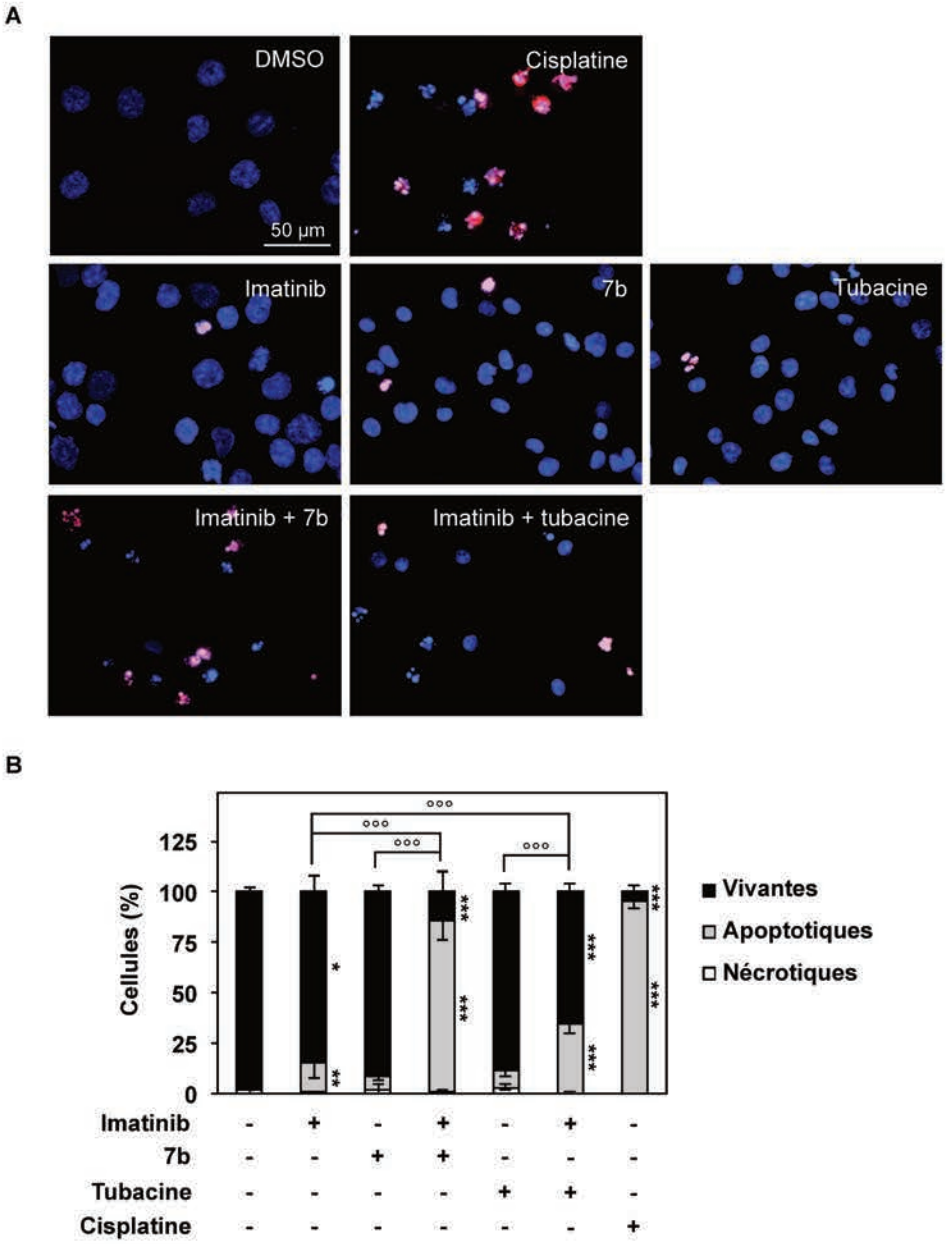


Figure 20 : Effet des co-traitements imatinib-inhibiteurs d'HDAC6 sur la morphologie nucléaire des cellules K-562.

Les cellules K-562 ont été traitées avec l'imatinib (0,25 µM), le composé 7b (50 µM) et la tubacine (1,5 µM) seuls ou en combinaison. Après 48 heures de traitement, l'étude de la morphologie nucléaire des cellules K-562 est réalisée par microscopie à fluorescence après marquage au Hoechst et à l'iodure de propidium. Le DMSO représente le contrôle solvant et le cisplatine (50 µM) a été utilisée en tant que contrôle positif d'apoptose. (A) Les photographies résultent d'une superposition d'une photographie des cellules marquées au Hoechst (bleu) et d'une photographie des cellules marquées à l'iodure de propidium (rouge) et sont représentatives de trois expériences indépendantes. (B) La quantification des cellules vivantes, apoptotiques et nécrotiques a été réalisée et les résultats présentés sous forme d'histogramme correspondent à la moyenne ± l'écart type de trois expériences indépendantes. L'analyse statistique a été réalisée par rapport au contrôle avec *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 ou par rapport à la combinaison avec °°° p<0,001 à considérer uniquement pour les cellules vivantes et apoptotiques.

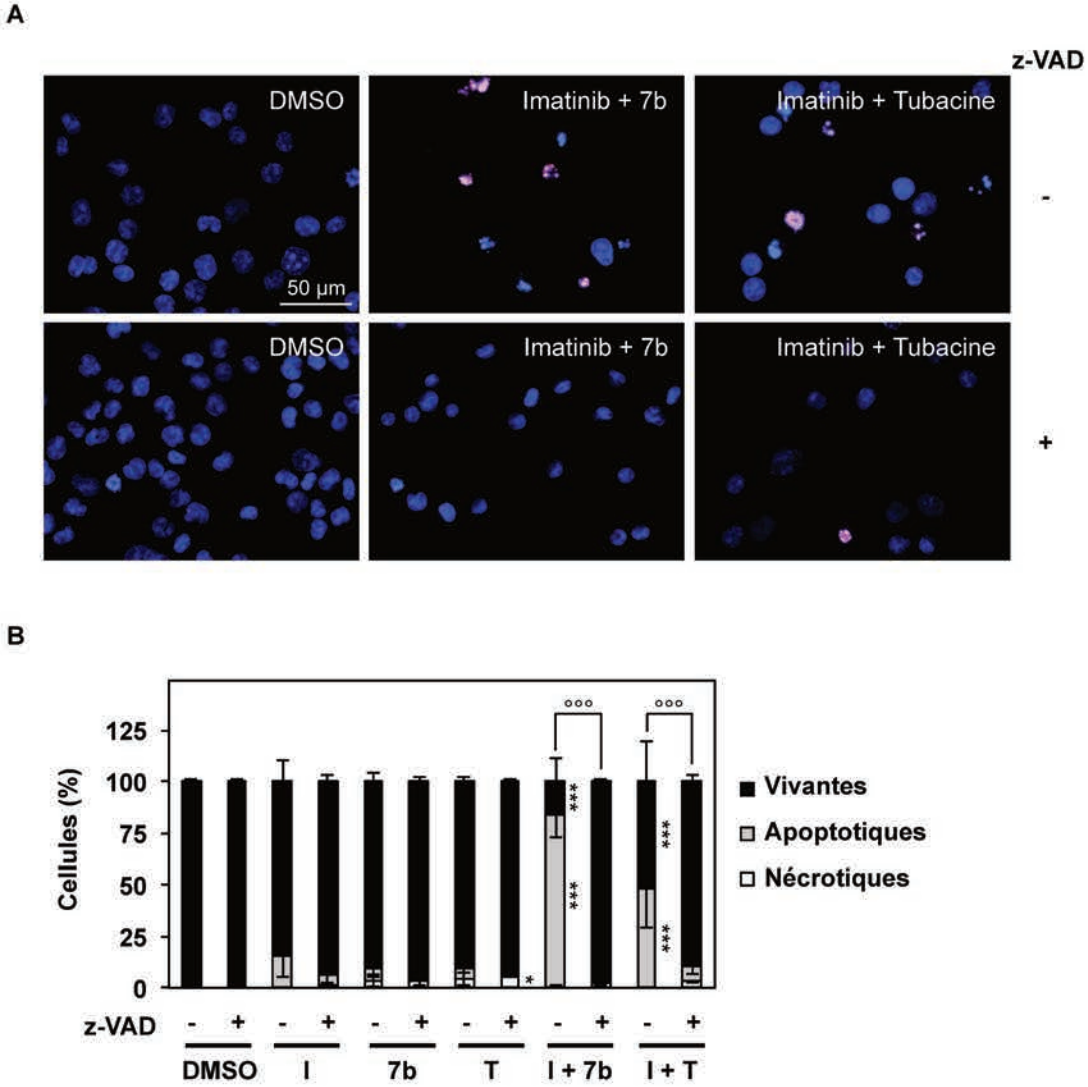


Figure 21 : Effet de l'inhibiteur des caspases z-VAD sur l'apoptose induite par les co-traitements imatinib-inhibiteurs d'HDAC6 dans les cellules K-562.

Les cellules K-562 ont été pré-traitées avec l'inhibiteur des caspases z-VAD (50 µM), pendant une heure, puis traitées avec l'imatinib (I ; 0,25 µM), le composé 7b (50 µM) et la tubacine (T ; 1,5 µM) seuls ou en combinaison pendant 48 heures. L'étude de la morphologie nucléaire des cellules K-562 est réalisée par microscopie à fluorescence après marquage au Hoechst et à l'iodure de propidium suite au traitement des cellules. Le DMSO représente le contrôle solvant. (A) Les photographies résultent d'une superposition d'une photographie des cellules marquées au Hoechst (bleu) et d'une photographie des cellules marquées à l'iodure de propidium (rouge) et sont représentatives de trois expériences indépendantes. (B) La quantification des cellules vivantes, apoptotiques et nécrotiques a été réalisée et les résultats présentés sous forme d'histogramme correspondent à la moyenne ± l'écart type de trois expériences indépendantes. L'analyse statistique a été réalisée par rapport au contrôle avec *p<0,05, ***p<0,001 ou par rapport à la combinaison avec °°° p<0,001 à considérer uniquement pour les cellules vivantes et apoptotiques.

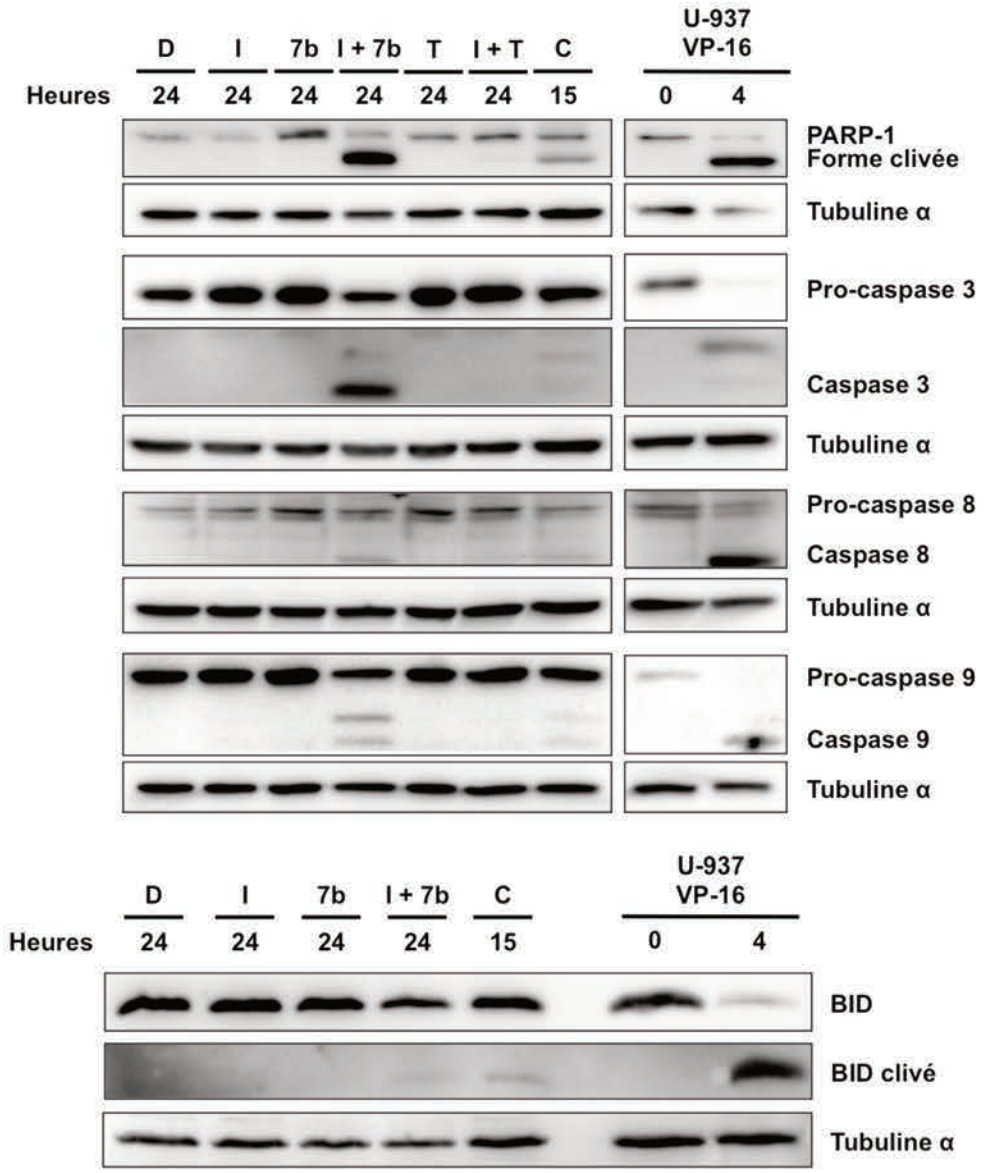


Figure 22 : Effet des co-traitements imatinib-inhibiteurs d'HDAC6 sur les voies apoptotiques intrinsèque et extrinsèque dans les cellules K-562.

Les cellules K-562 ont été traitées avec l'imatinib (I ; 0,25 µM), le composé 7b (50 µM) et la tubacine (T ; 1,5 µM) seuls ou en combinaison aux temps indiqués. Les cellules K-562 traitées avec 50 µM de cisplatine (C) et les cellules U-937 traitées avec 100 µM d'étoposide (VP-16) sont utilisées comme contrôle positif d'apoptose. Les formes entières et clivées des caspases 3, 8 et 9, de la poly(ADP-ribose) polymérase (PARP)-1 et de BID ont été étudiées par Western Blot La tubuline α est utilisée en tant que contrôle de chargement. Les blots présentés sont représentatifs de trois expériences indépendantes.

Les résultats concernant l'activité caspases 3, 8 et 9 après 24 heures de traitement confirment les résultats obtenus précédemment. En effet seul le co-traitement imatinib-7b induit une augmentation de l'activité des caspases 3, 8 et 9 de l'ordre de respectivement 6,7 ; 7,9 et 10,6 fois (Figure 23).

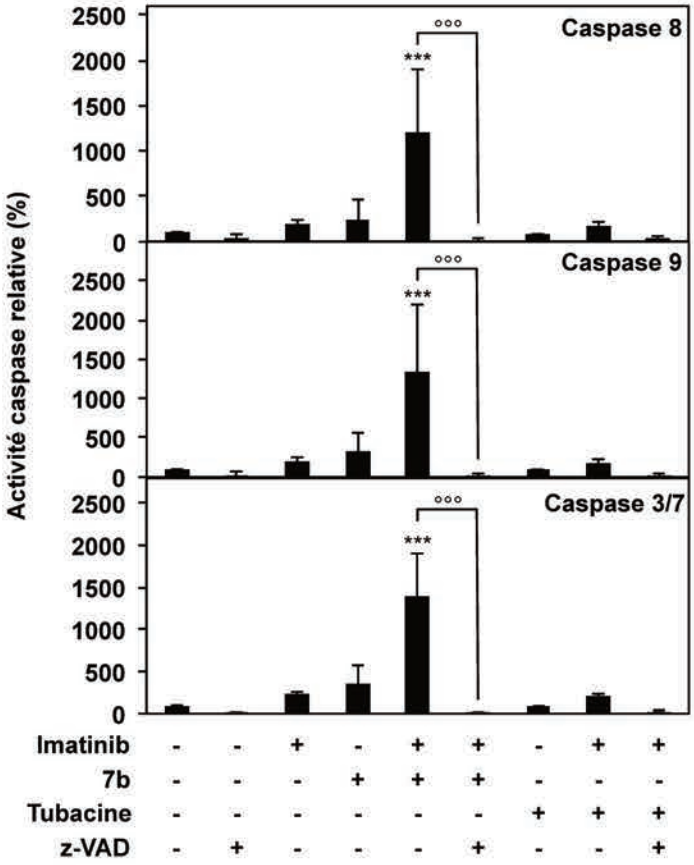


Figure 23 : Effet des co-traitements imatinib-inhibiteurs d'HDAC6 sur l'activité des caspases dans les cellules K-562.

Les cellules K-562 ont été pré-traitées avec l'inhibiteur des caspases z-VAD (50 µM), pendant une heure, puis traitées avec l'imatinib (I ; 0,25 µM), le composé 7b (50 µM) et la tubacine (T ; 1,5 µM) seuls ou en combinaison pendant 24 heures. L'évaluation de l'activité des caspases 3/7, 8 et 9 est réalisée par mesure du signal lumineux émis après une heure d'incubation des cellules avec un substrat spécifique des caspases étudiées, suite au traitement des cellules. Les données représentées sous forme d'histogramme correspondent à la moyenne ± l'écart type de trois expériences indépendantes et l'analyse statistique a été réalisée par rapport au contrôle avec ***$p<0,001$ ou par rapport à la combinaison avec °°° $p<0,001$.

5. Effet des co-traitements sur les cellules souches leucémiques

Les CSL ne sont pas affectées par les thérapies médicamenteuses actuelles et jouent un rôle important dans le développement de résistances aux ITK et dans la rechute de la LMC (Flis *et al.*, 2019) ; intensifiant la recherche de nouvelles molécules capables de les cibler de manière efficace. Dans ce contexte, nous avons étudié l'effet des co-traitements sur les CSL.

a. Effet des inhibiteurs de tyrosine kinase sur des cellules CD34$^+$ CD38$^-$ isolées à partir de cellules primaires obtenues de patients atteints de LMC

Une surexpression de plusieurs isozymes d'HDAC et notamment d'HDAC6 a été observée dans des CSL (CD34$^+$ CD38$^-$) isolées de patients atteints de LMC (Bamodu *et al.*, 2018). Afin de déterminer si un traitement par des ITKs aurait le potentiel de moduler l'expression de ces isoenzymes, nous avons réalisé une étude informatique de jeux de données de transcriptomique correspondants à des cellules CD34$^+$ CD38$^-$ isolées à partir de cellules primaires de patient souffrant de LMC qui ont ensuite été traitées ou non avec de l'imatinib (5 µM), du dasatinib (150 nM) et du nilotinib (5 µM) jusqu'à 7 jours. L'analyse en composantes principales n'ayant pas révélé de changements de réponse majeurs relatifs aux traitements des cellules par les différents ITK, les données ont été regroupées et considérées comme un seul et unique groupe traité aux ITK (Figure 24). L'analyse ultérieure a montré une diminution significative bien que modérée du niveau d'ARNm d'HDAC6 dans les cellules CD34$^+$ CD38$^-$ après 7 jours de traitement avec les ITK par rapport aux cellules non traitées (Figure 25).

b. Effet des co-traitements sur les cellules K-562 ALDH$^+$

Les CSL étant caractérisées par une forte expression d'ALDH par rapport aux cellules différenciées l'effet des co-traitements sur une sous-population de cellules K-562 supposée contenir des CSL et étant détectable grâce à son importante activité ALDH a donc été évalué. Les cellules K-562 ont été traitées simultanément avec l'imatinib (0,25 µM) et les inhibiteurs d'HDAC6 7b (50 µM) et tubacine (1,5 µM) pendant 24 heures. Les résultats indiquent que seule la combinaison imatinib-7b induit une diminution significative du pourcentage de cellules ALDH$^+$ (33%) par rapport aux composés imatinib (5%) et 7b (28%) seuls (Figure 26).

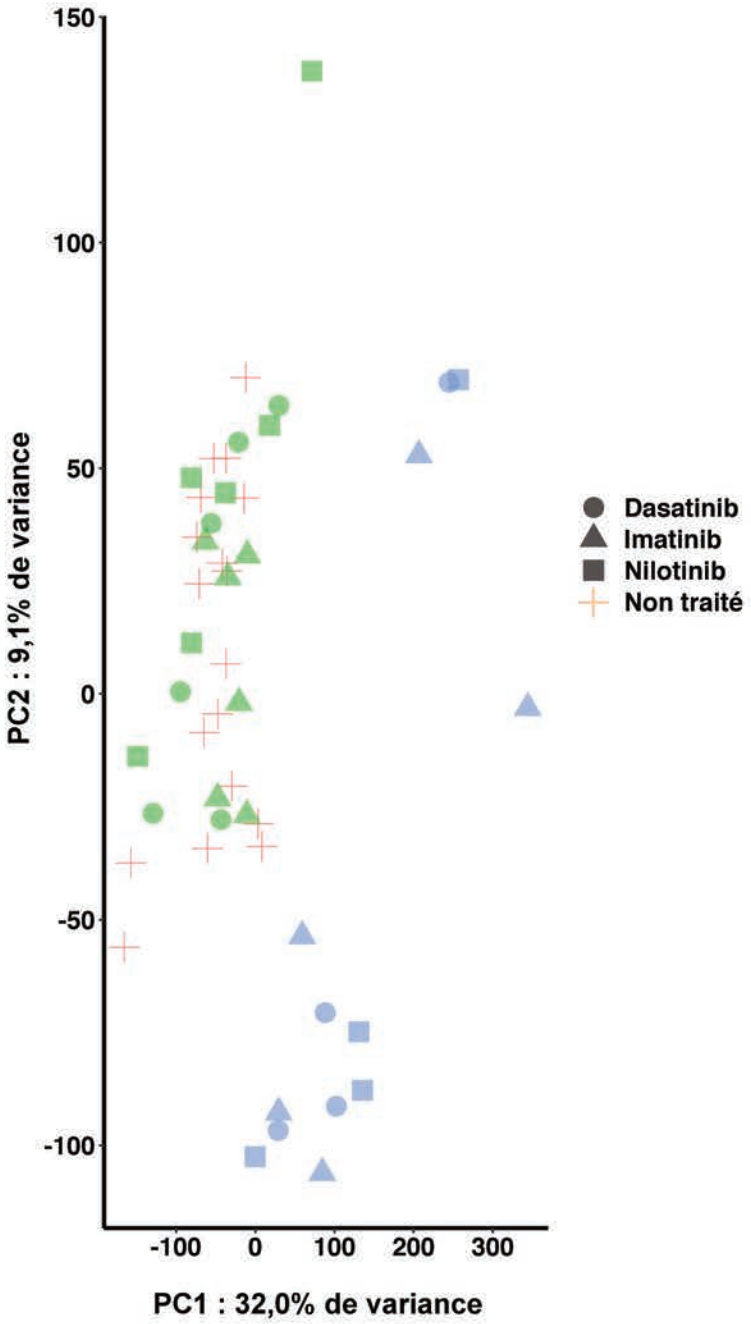


Figure 24 : Analyse en composante principale du jeu de données transcriptomique E-MTAB-2594.

Les cercles, triangles, carrés et croix représentent respectivement les cellules $CD34^+$ $CD38^-$ traitées au dasatinib (150 nM), à l'imatinib (5 µM), au nilotinib (5 µM) et non traitées, pendant 8 heures (en vert) et 7 jours (en bleu).

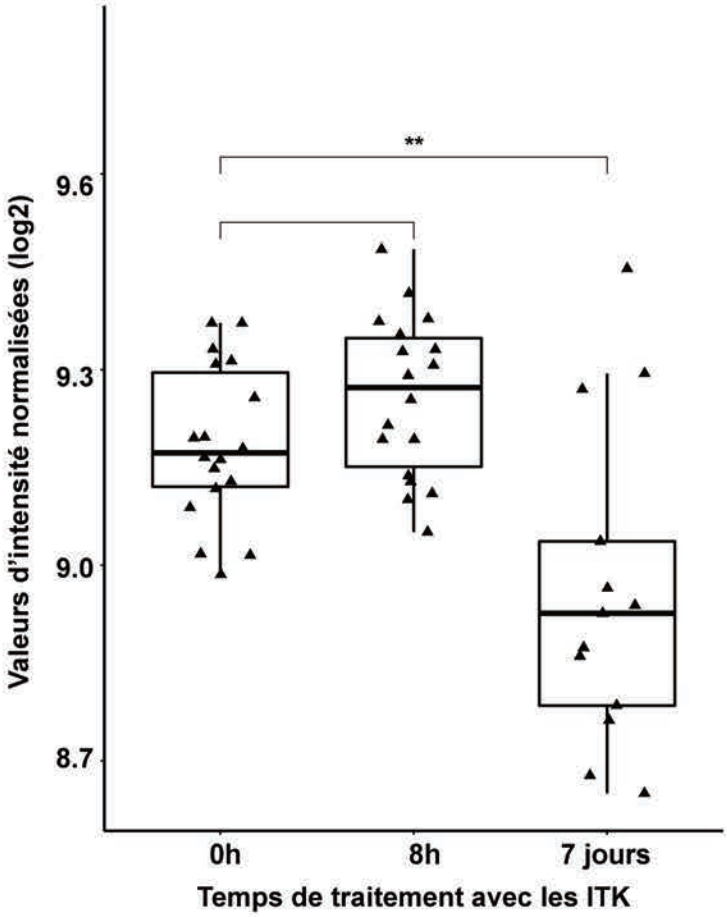
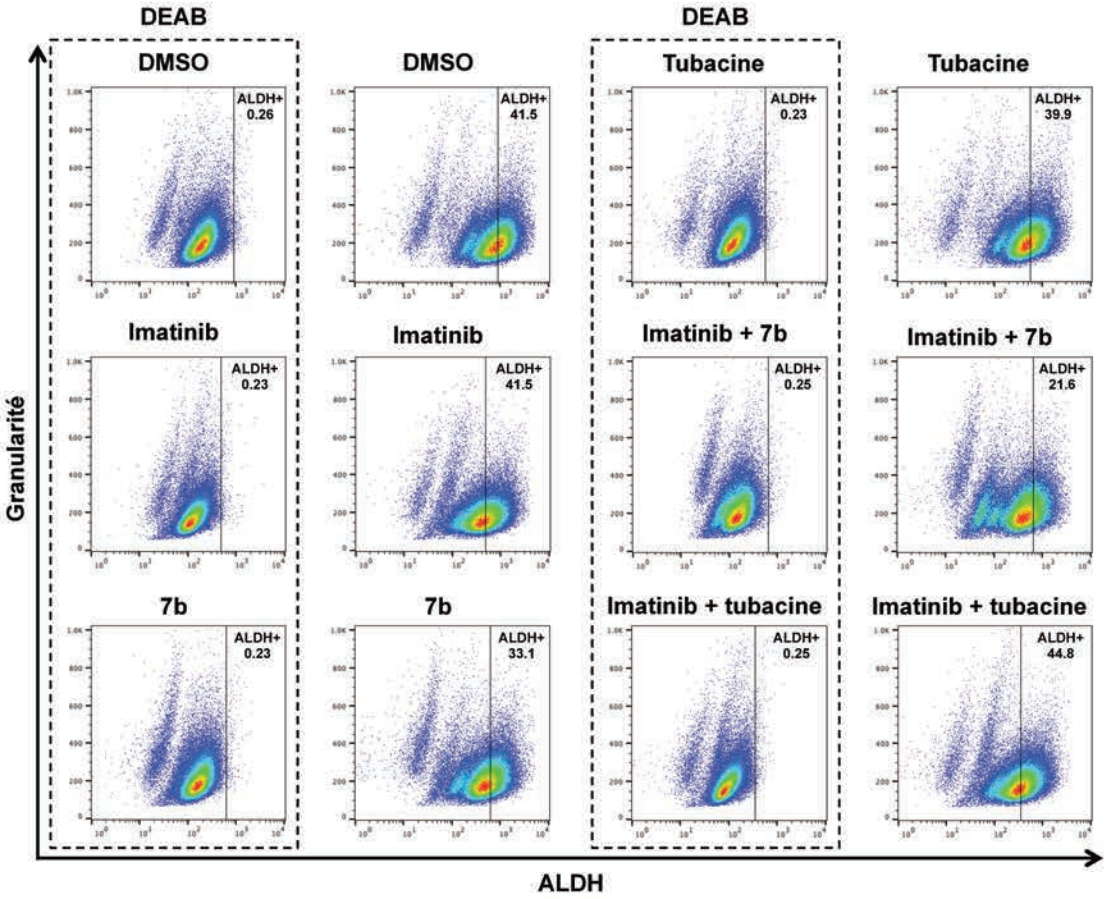


Figure 25 : Effet d'inhibiteurs de tyrosine kinase sur le niveau d'expression de l'ARNm d'HDAC6 dans des cellules souches de patients atteints de leucémie myéloïde chronique.

Les données présentées sous forme de boîtes à moustaches représentent les niveaux d'expression de l'ARNm d'HDAC6 dans des cellules $CD34^+$ $CD38^-$ isolées de cellules primaires issues de 6 patients atteints de LMC. Chaque triangle représente un lot de cellules non traité (N = 18) ou traité avec trois ITK différents pendant 8 heures (N = 18) et 7 jours (N = 13).



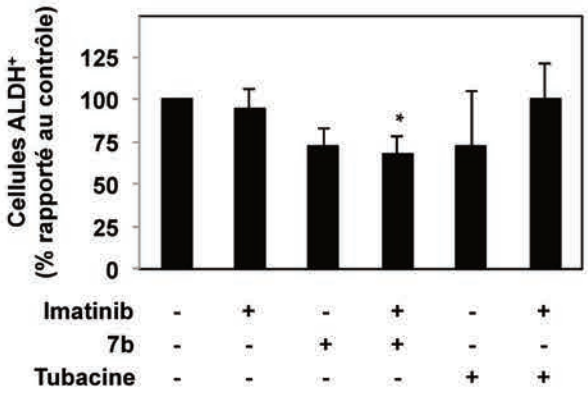


Figure 26 : Effet des co-traitements imatinib-inhibiteurs d'HDAC6 sur l'activité ALDH dans les cellules K-562.

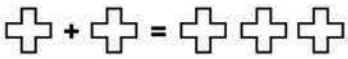
Les cellules K-562 ont été traitées avec l'imatinib (0,25 µM), le composé 7b (50 µM) et la tubacine (1,5 µM) seuls ou en combinaison. Après 24 heures de traitement, les cellules ont été marquées à l'ALDEFLUOR™ et l'activité aldéhyde déshydrogénase (ALDH) a été évaluée par cytométrie de flux en présence ou en absence de diéthylaminobenzaldéhyde (DEAB). Les graphiques en nuages de points sont représentatifs de quatre expériences indépendantes sur lesquelles est indiqué le pourcentage de cellules ALDH+ dans le cadran de droite. Les données représentées sous forme d'histogramme correspondent à la moyenne ± l'écart type de quatre expériences indépendantes et l'analyse statistique a été réalisée par rapport au contrôle avec *$p<0,05$.

En conclusion de cette partie :

Dans les cellules K-562 :

Le composé 7b et la tubacine sont des inhibiteurs sélectifs d'HDAC6.

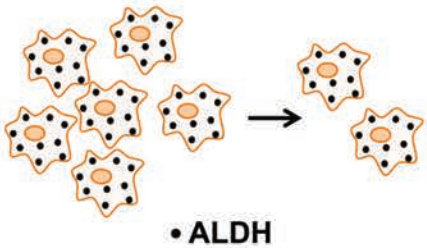
La combinaison imatinib-7b induit un effet synergique sur la réduction de la viabilité des cellules K-562 plus important que celui induit par la combinaison imatinib-tubacine.



La combinaison imatinib-7b induit une mort apoptotique dépendante des caspases et active les voies extrinsèque et intrinsèque.

Apoptose

Seule la combinaison imatinib-7b induit une diminution du pourcentage de cellules $ALDH^+$.



• ALDH

III. Effet du co-traitement de l'imatinib et des inhibiteurs d'HDAC6 sur la viabilité des cellules KBM-5 et MEG-01

Dans le but de déterminer les effets des combinaisons imatinib-inhibiteurs d'HDAC6 dans d'autres lignées de LMC, nous avons également étudié l'effet des co-traitements dans les lignées KBM-5 et MEG-01.

1. Effet du composé 7b sur l'acétylation de la tubuline α et des histones H4

En vue de déterminer la concentration du composé 7b entrainant une inhibition sélective d'HDAC6 dans les cellules KBM-5 et MEG-01, ces dernières ont été traitées avec des concentrations croissantes de composé 7b pendant 6 heures puis l'acétylation de la tubuline α et des histones H4 ont été étudiées par Western Blot. Les résultats indiquent que le composé 7b entraine une augmentation marquée de l'acétylation de la tubuline α dès 75 µM dans les cellules KBM-5 et dès 50 µM dans les cellules MEG-01 à 6 heures sans augmenter l'acétylation des histones H4 (Figure 27). Afin de garantir une acétylation de tubuline α suffisamment importante sans affecter l'acétylation des histones, et ainsi une inhibition sélective d'HDAC6, des concentrations de 75 µM de 7b seront utilisées dans les lignées MEG-01 et KBM-5 pour les co-traitements.

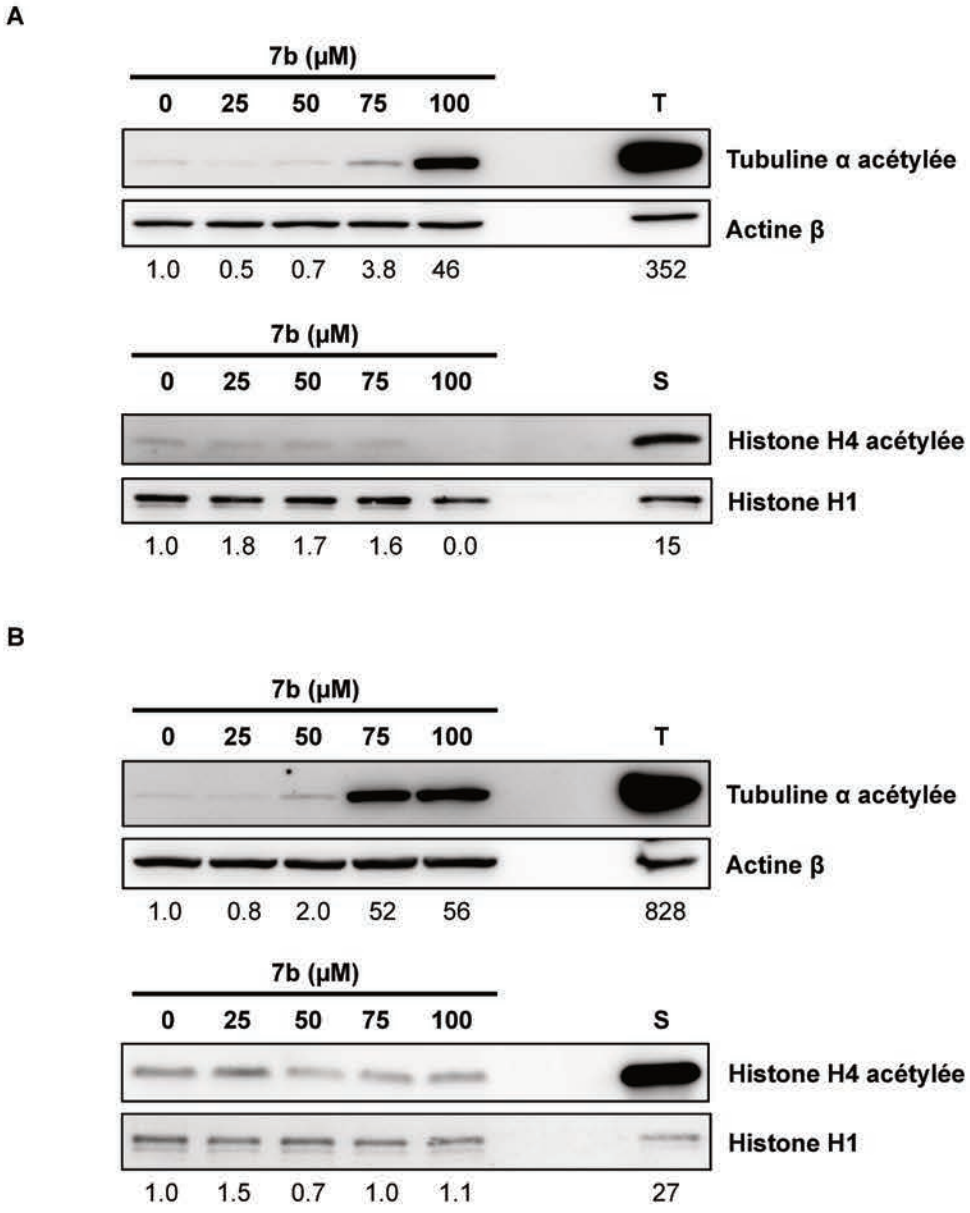
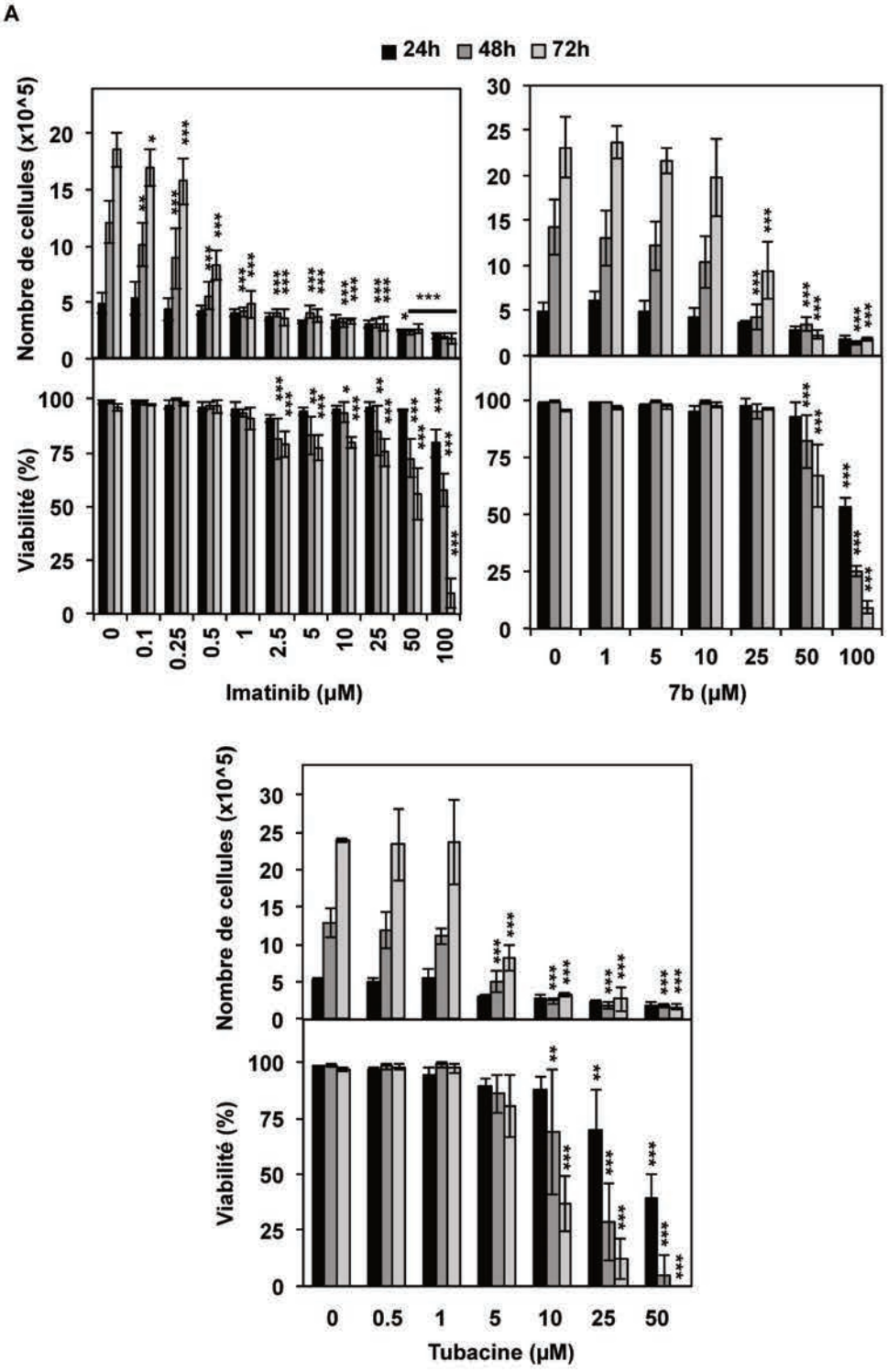


Figure 27 : Effet du composé 7b sur l'acétylation de la tubuline α dans les lignées KBM-5 et MEG-01.

(A) Les cellules KBM-5 et (B) MEG-01 ont été traitées avec des concentrations croissantes de composé 7b pendant 6 heures et l'acétylation de la tubuline α et de l'histone H4 a été étudiée par Western Blot. L'actine β et l'histone H1 ont été utilisées comme contrôle de chargement. La tubacine (T, 2 µM, 6 heures) a été utilisée en tant que contrôle positif pour l'acétylation de la tubuline α et le SAHA (S, 2 µM, 6 heures) en tant que contrôle positif pour l'acétylation de l'histone H4. Le ratio d'intensité de la protéine d'intérêt sur le contrôle de charge est présenté sous les blots. Les blots présentés sont représentatifs de trois expériences indépendantes.

2. Effet de l'imatinib et des inhibiteurs d'HDAC6 sur la prolifération et la viabilité cellulaire et caractérisation du type de mort cellulaire induit

Après avoir déterminé les concentrations auxquelles le composé 7b induit une inhibition sélective d'HDAC6 dans les cellules KBM-5 et MEG-01, leur effet sur la prolifération et la viabilité cellulaire, ainsi que celui de l'imatinib a été testé. Les cellules KBM-5 et MEG-01 ont été traitées avec l'imatinib, le composé 7b et la tubacine pendant 24, 48 et 72 heures à des concentrations allant de 1 à 100 µM pour l'imatinib et pour le composé 7b dans les cellules KBM-5 et de 1 à 10 µM pour l'imatinib, de 1 à 100 µM pour le composé 7b et de 0,5 à 50 µM pour la tubacine dans les cellules MEG-01. L'effet des composés a été évalué avec le test d'exclusion au bleu Trypan et l'effet sur la prolifération cellulaire a été déterminé par comptage du nombre de cellules (Figure 28). Les résultats indiquent que l'imatinib induit une importante diminution de la prolifération cellulaire à 1 µM à 48 heures, passant de $12{,}1.10^5$ cellules dans le contrôle à $4{,}2.10^5$ cellules et une diminution de la viabilité de 17,6% dès 2,5 µM à 48 heures dans les cellules KBM-5. Une importante diminution de la prolifération des cellules MEG-01 est observée dès 0,1 µM à 72 heures passant de 11.10^5 cellules dans le contrôle à $6{,}7.10^5$ cellules ainsi qu'une diminution de la viabilité de 14,1% dès 0,25 µM à 72 heures. Le composé 7b induit une diminution de la prolifération des cellules KBM-5 dès 25 µM à 48 heures passant de $14{,}3.10^5$ cellules dans le contrôle à $4{,}3.10^5$ cellules et une diminution de la viabilité de 17,6% dès 50 µM à 48 heures. Une diminution de la prolifération des cellules MEG-01 est observée dès 25 µM à 48 heures passant de $9{,}5.10^5$ cellules dans le contrôle à $4{,}2.10^5$ cellules ainsi qu'une diminution de la viabilité de 13,2% dès 50 µM à 48 heures. La tubacine induit une diminution de la prolifération des cellules KBM-5 dès 5 µM à 48 heures passant de $12{,}9.10^5$ cellules dans le contrôle à 5.10^5 cellules et une diminution de la viabilité de 30% dès 10 µM à 48 heures. Une diminution de la prolifération des cellules MEG-01 est observée dès 5 µM à 48 heures passant de 8.10^5 cellules dans le contrôle à $4{,}7.10^5$ cellules ainsi qu'une diminution de la viabilité de 14% dès 5 µM à 48 heures.



Légende à la suite de la figure.

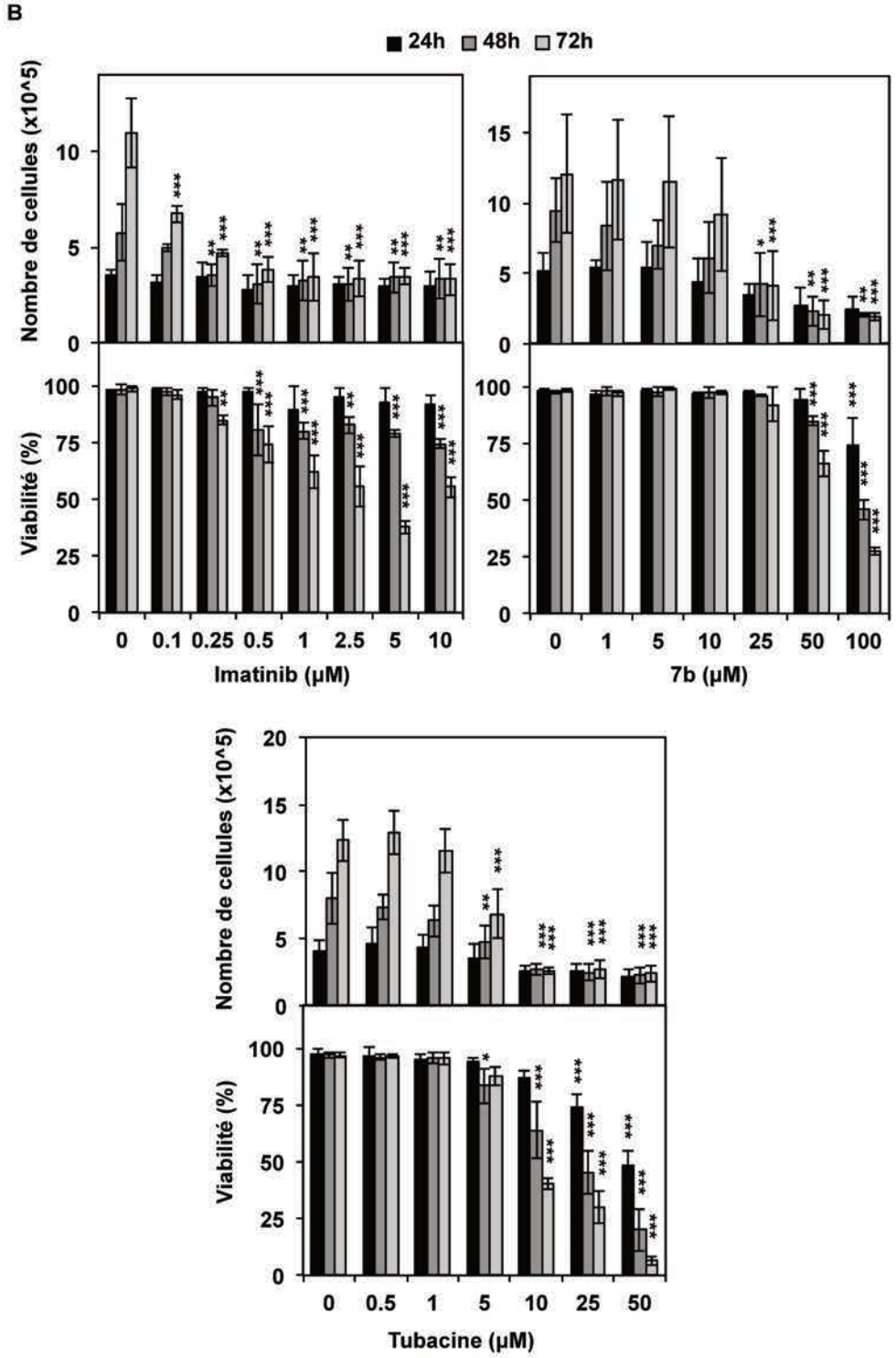


Figure 28 : Effet de l'imatinib, du composé 7b et de la tubacine sur la prolifération et la viabilité des cellules KBM-5 et MEG-01.

(A) Les cellules KBM-5 et (B) les cellules MEG-01 ont été traitées avec l'imatinib, le composé 7b et la tubacine aux concentrations indiquées. Après 24, 48 et 72 heures de traitement la prolifération et la viabilité cellulaire ont été évaluées. Les données représentent la moyenne ± l'écart type de trois expériences indépendantes et l'analyse statistique a été réalisée par rapport au contrôle avec *p<0,05, **p<0,01 et ***p<0,001.

Pour plus de clarté, les concentrations inhibant 50% de la croissance cellulaire (IC_{50}) et les CI_{50} ont été calculées à partir des données des Figure 18 et Figure 28 et sont présentés dans le Tableau 13.

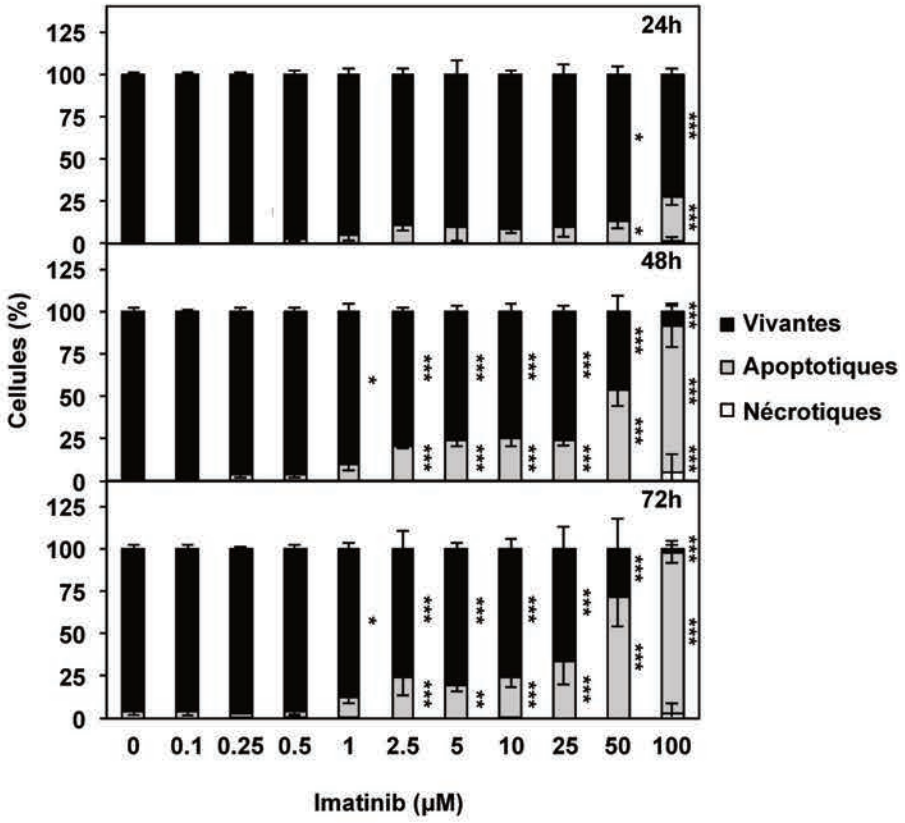
Tableau 13 : IC_{50} et CI_{50} des composés 7b et tubacine dans les cellules de leucémie myéloïde chronique.

Composés	K-562		KBM-5		MEG-01	
	IC_{50} (µM)	CI_{50} (µM)	IC_{50} (µM)	CI_{50} (µM)	IC_{50} (µM)	CI_{50} (µM)
7b						
24 heures	26,1 ± 7,5	>100,0	21,8 ± 11,4	>100,0	17,7 ± 13,4	>100,0
48 heures	16,3 ± 3,1	90,1 ± 8,6	13 ± 3,3	75,3 ± 6,8	8,4 ± 5,6	96,4 ± 5,0
72 heures	18,2 ± 2,2	73,3 ± 6,6	19,1 ± 3,2	60,3 ± 6,4	13,7 ± 6,0	67,2 ± 4,7
Tubacine						
24 heures	7,6 ± 2,5	33,8 ± 10,6	4,1 ± 1,0	41,0 ± 12,4	8,7 ± 4,7	50,6 ± 9,5
48 heures	5,7 ± 0,8	19,6 ± 8	2,6 ± 0,7	16,6 ± 7,2	3,1 ± 1,0	19,4 ± 1,4
72 heures	5,0 ± 2,2	17,4 ± 6,1	3,5 ± 1,2	8,9 ± 2,1	4,8 ± 0,6	11,4 ± 1,2

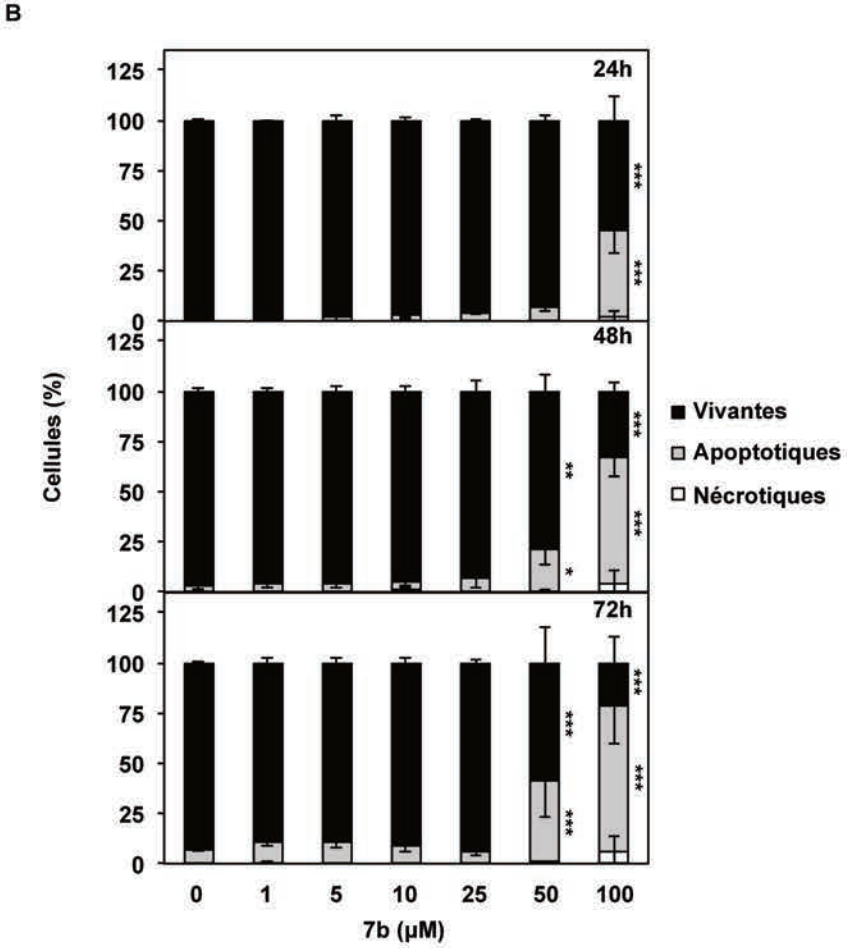
Les concentrations inhibant 50% de la croissance cellulaire (IC_{50}) et 50% de la viabilité cellulaire (CI_{50}) correspondent à la moyenne ± l'écart type de trois expériences indépendantes.

Afin de caractériser le type de mort cellulaire induit par les composés, l'analyse de la morphologie nucléaire a été réalisée. Les résultats montrent que l'imatinib, le composé 7b et la tubacine induisent une mort apoptotique dans les cellules KBM-5 respectivement dès 2,5 µM passant de 2,3% cellules apoptotiques dans le contrôle à 21,2%, 50 µM passant de 2,6% cellules apoptotiques dans le contrôle à 20,7% et 10 µM passant de 1,5% cellules apoptotiques dans le contrôle à 53,2% après 48 heures de traitement (Figure 29). Dans les cellules MEG-01, l'imatinib, le composé 7b et la tubacine induisent une mort apoptotique respectivement dès 0,25 µM passant de 3,9% cellules apoptotiques dans le contrôle à 16,6%, 50 µM passant de 0,6% cellules apoptotiques dans le contrôle à 25,3% et 10 µM passant de 4,3% cellules apoptotiques dans le contrôle à 37,1% à 48 heures. De plus, le composé 7b induit une mort par nécrose à 100 µM atteignant 26,2% cellules nécrotiques dès 24 heures de traitement (Figure 30).

A



Légende à la suite de la figure.



Légende à la suite de la figure.

C

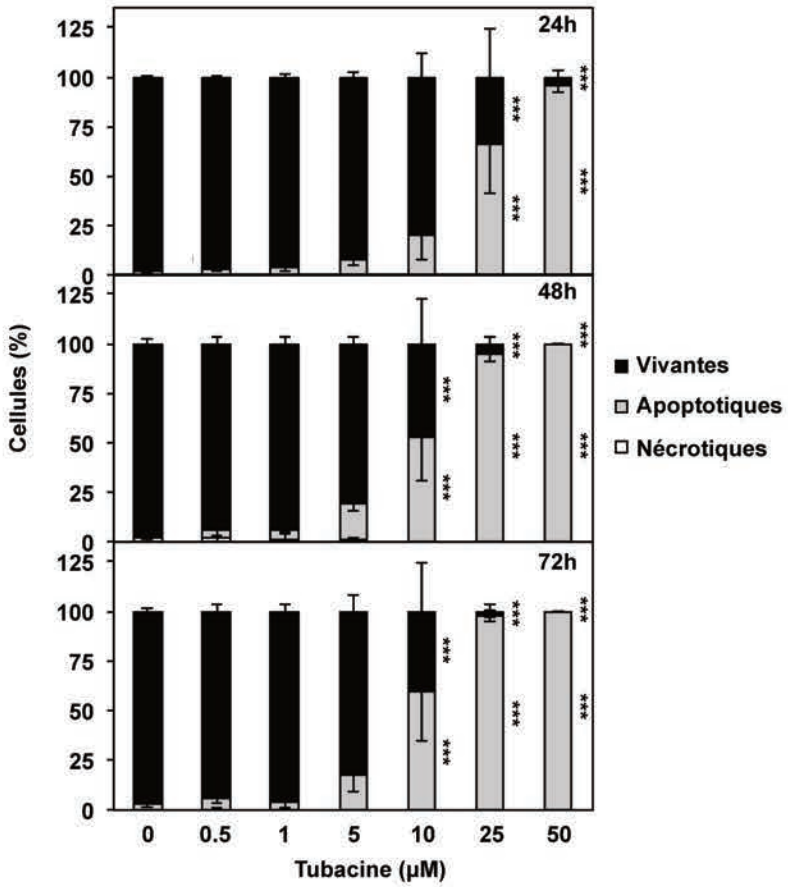
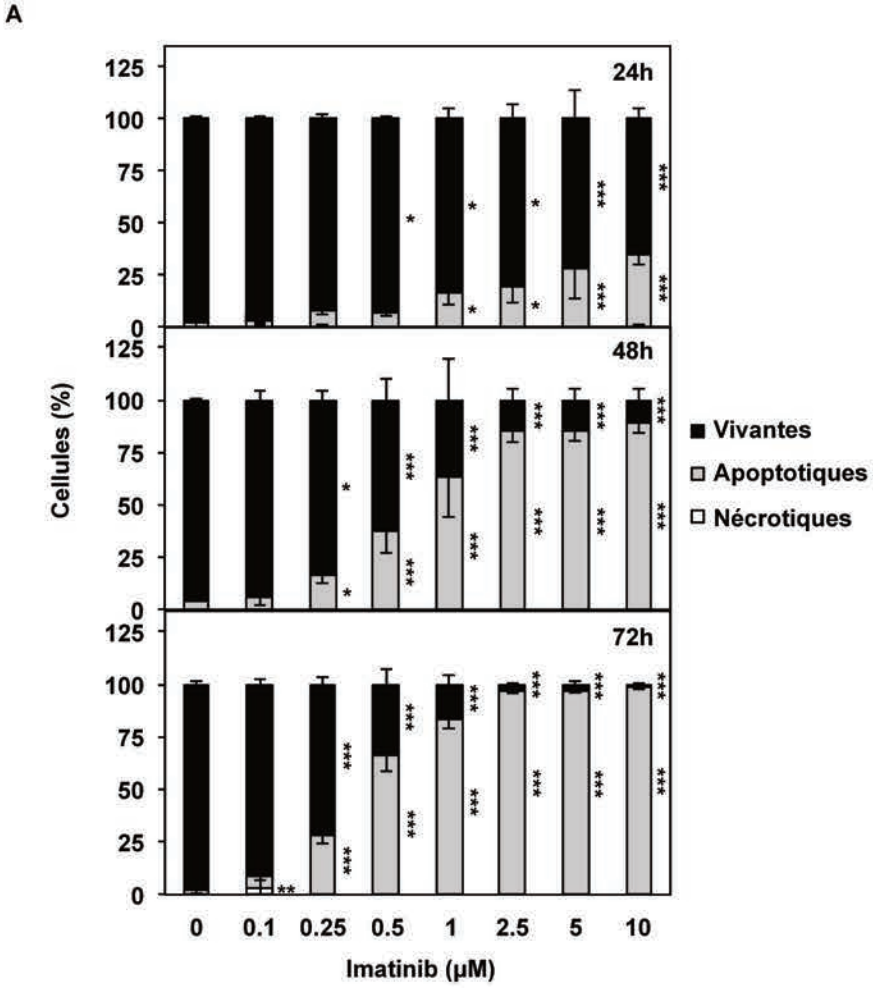
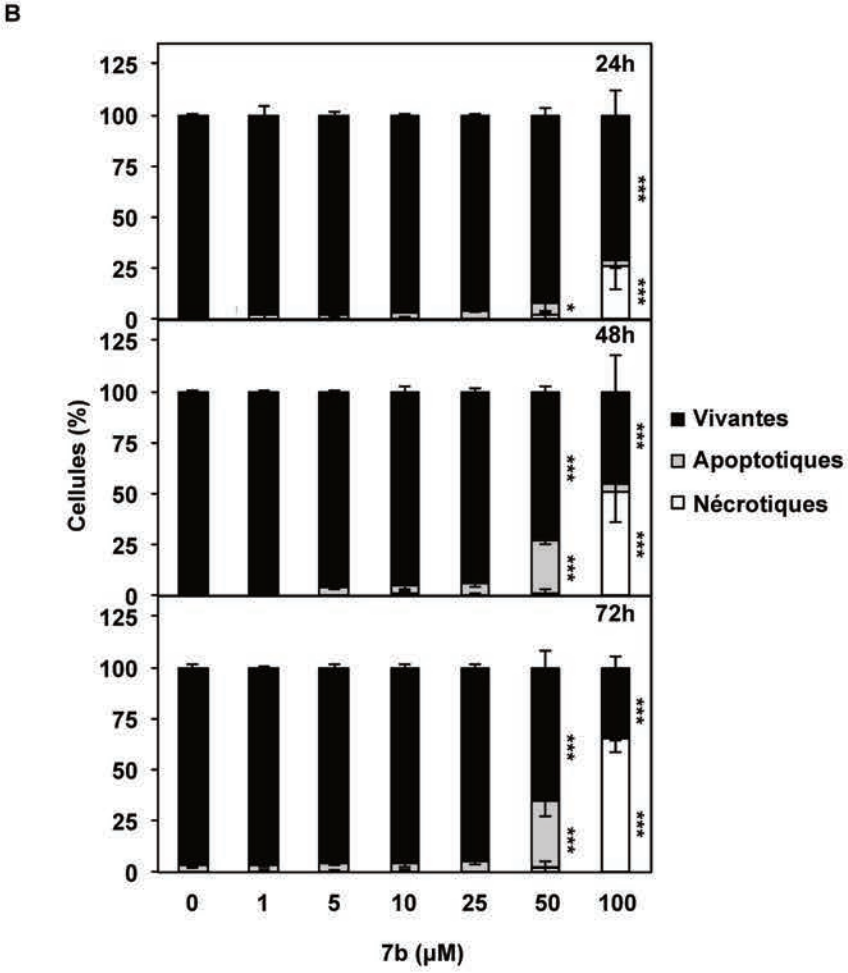


Figure 29 : Effet de l'imatinib, du composé 7b et de la tubacine sur la morphologie nucléaire des cellules KBM-5.

Les cellules KBM-5 ont été traitées avec l'imatinib (A), le composé 7b (B) et la tubacine (C) aux concentrations indiquées. Après 24, 48 et 72 heures de traitement, l'étude de la morphologie nucléaire des cellules KBM-5 est réalisée par microscopie à fluorescence après marquage au Hoechst et à l'iodure de propidium. (A-C) La quantification des cellules vivantes, apoptotiques et nécrotiques a été réalisée et les résultats présentés sous forme d'histogramme correspondent à la moyenne ± l'écart type de trois expériences indépendantes. L'analyse statistique a été réalisée par rapport au contrôle avec *$p<0,05$, **$p<0,01$ et ***$p<0,001$.



Légende à la suite de la figure.



Légende à la suite de la figure.

C

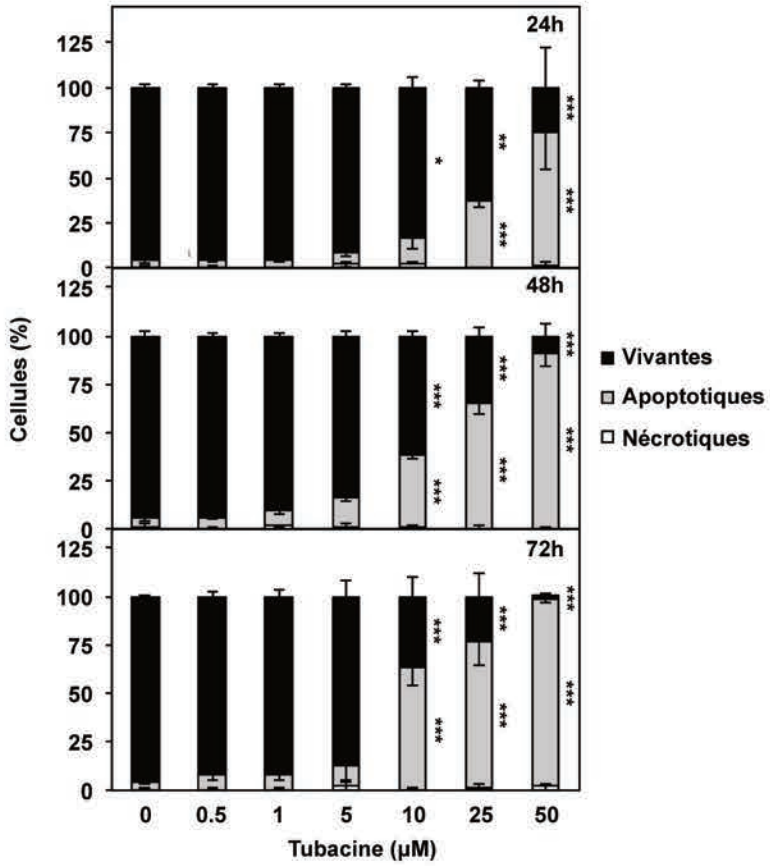


Figure 30 : Effet de l'imatinib, du composé 7b et de la tubacine sur la morphologie nucléaire des cellules MEG-01.

Les cellules MEG-01 ont été traitées avec l'imatinib (A), le composé 7b (B) et la tubacine (C) aux concentrations indiquées. Après 24, 48 et 72 heures de traitement, l'étude de la morphologie nucléaire des cellules MEG-01 est réalisée par microscopie à fluorescence après marquage au Hoechst et à l'iodure de propidium. (A-C) La quantification des cellules vivantes, apoptotiques et nécrotiques a été réalisée et les résultats présentés sous forme d'histogramme correspondent à la moyenne ± l'écart type de trois expériences indépendantes. L'analyse statistique a été réalisée par rapport au contrôle avec *p<0,05, **p<0,01 et ***p<0,001.

3. Effet des co-traitements sur la prolifération et la viabilité cellulaire et caractérisation du type de mort cellulaire induit

De manière à déterminer l'effet des co-traitements inhibiteurs d'HDAC6-ITK, les cellules KBM-5 et MEG-01 ont été traitées simultanément avec l'imatinib à des concentrations induisant moins de 20% de mortalité cellulaire (2,5 µM dans les KBM-5 et 0,25 µM dans les MEG-01), et les inhibiteurs d'HDAC6 à des concentrations induisant une inhibition sélective d'HDAC6 [le composé 7b (75 µM) ou la tubacine (1,5 µM)]. Après 48 heures de traitement l'effet des co-traitements sur la prolifération et la viabilité cellulaire a été étudié respectivement par comptage du nombre de cellules et test d'exclusion au bleu Trypan.

Les résultats indiquent que la combinaison imatinib-7b induit dans les cellules KBM-5 une diminution de prolifération similaire à celle induite par le 7b seul, passant de $9{,}7.10^5$ cellules dans le contrôle à $1{,}7.10^5$ cellules pour la combinaison et pour le 7b et diminue la viabilité (38,2%) de manière similaire au 7b seul (46%). La combinaison de imatinib-tubacine induit quant à elle une diminution de prolifération similaire à celle induite par l'imatinib seul, atteignant $3{,}6.10^5$ cellules pour la combinaison et pour l'imatinib. Enfin, la combinaison imatinib-tubacine diminue la viabilité (18,5%) de manière comparable à l'imatinib seul (9% ; Figure 31A).

La combinaison imatinib-7b induit dans les cellules MEG-01 une diminution de prolifération similaire à celle induite par le 7b, passant de $7{,}5.10^5$ cellules dans le contrôle à 3.10^5 cellules pour la combinaison imatinib-7b et à $2{,}6.10^5$ cellules pour le 7b et diminue leur viabilité (45,2%) de manière similaire au 7b seul (60,4%). La combinaison imatinib-tubacine induit quant à elle dans ce modèle cellulaire une diminution de prolifération comparable à celle induite par l'imatinib seul, atteignant $3{,}9.10^5$ cellules pour la combinaison et $4{,}7.10^5$ cellules pour l'imatinib, ainsi qu'une diminution de la viabilité (14,8%) de manière similaire à l'imatinib seul (8,5% ; Figure 31B).

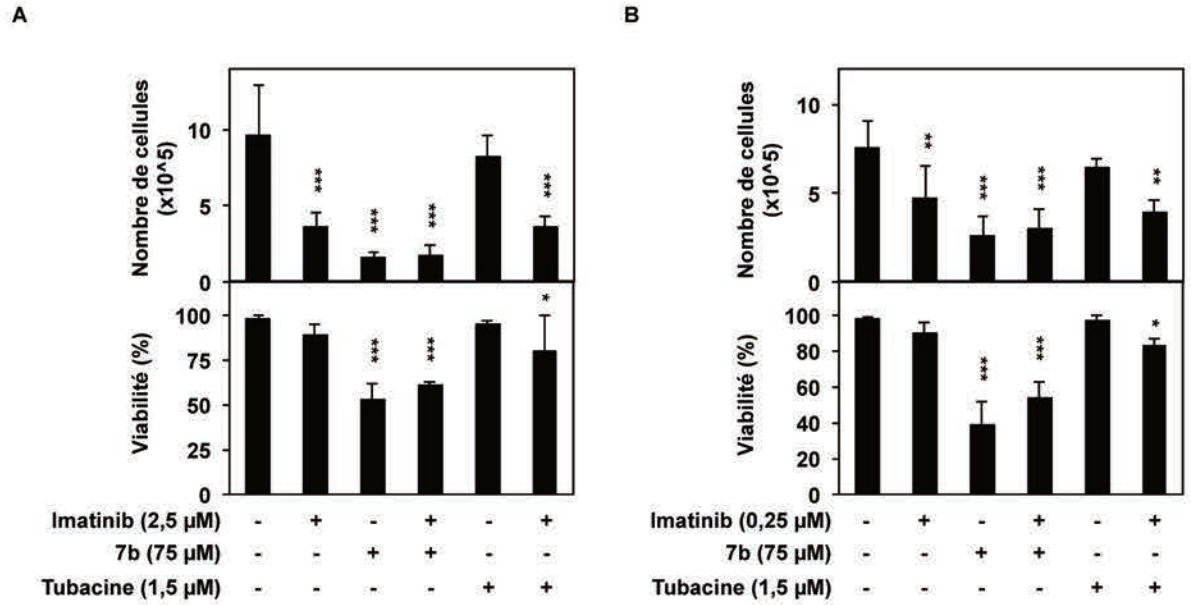


Figure 31 : Effet des co-traitements imatinib-inhibiteurs d'HDAC6 sur la prolifération et la viabilité des cellules KBM5 et MEG-01.

(A) Les cellules KBM-5 et (B) les cellules MEG-01 ont été traitées avec l'imatinib, le composé 7b et la tubacine seuls ou en combinaison. Après 48 heures de traitement, la prolifération et la viabilité ont été évaluées. Les données représentent la moyenne ± l'écart type d'au moins trois expériences indépendantes et l'analyse statistique a été réalisée par rapport au contrôle avec *p<0,05, **p<0,01 et ***p<0,001.

Afin de déterminer le type de mort cellulaire induit par les différents traitements, l'analyse de la morphologie nucléaire a été réalisée. Les résultats montrent une augmentation du nombre de cellules KBM-5 apoptotiques lors du co-traitement imatinib-7b passant de 3,1% dans le contrôle à 53,1%, qui est similaire à celle induite par le composé 7b atteignant 42,6% de cellules apoptotiques à 48 heures. De manière similaire, la mort cellulaire par apoptose observée lors du traitement par la combinaison imatinib-tubacine (15,8%) est comparable à celle observée après traitement par l'imatinib seul (20,8% ; Figure 32A).

Une augmentation du nombre de cellules MEG-01 nécrotiques a été montré lors du co-traitement imatinib-7b passant de 0,4% dans le contrôle à 50,5%, qui est similaire à celle induite par le composé 7b atteignant 49% de cellules nécrotiques à 48 heures. De même que dans les cellules KBM-5, dans les cellules MEG-01 la combinaison imatinib-tubacine n'induit qu'une faible augmentation du nombre de cellules apoptotiques (29,4%) qui est comparable à celle induite par l'imatinib seul (17,8% ; Figure 32B).

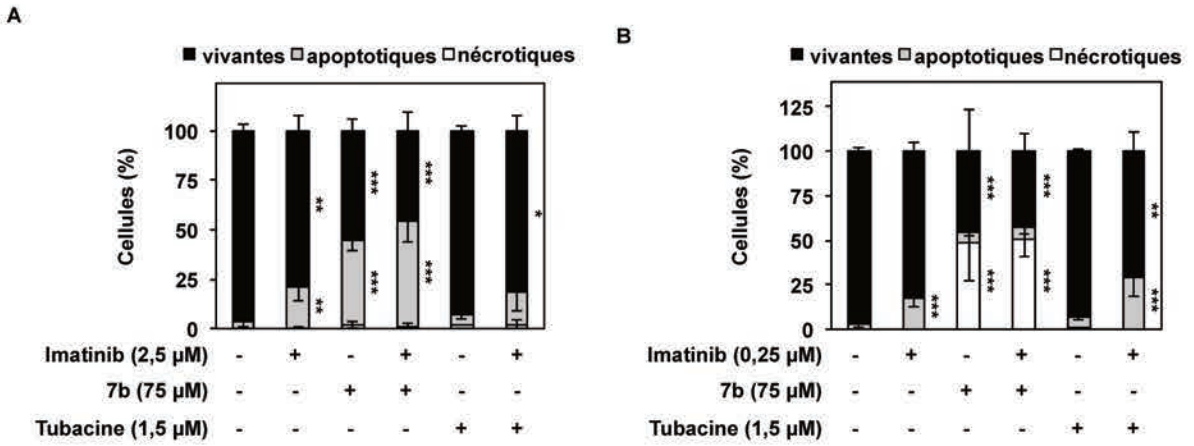


Figure 32 : Effet des co-traitements imatinib-inhibiteurs d'HDAC6 sur la morphologie nucléaire de cellules KBM-5 et MEG-01.

(A) Les cellules KBM-5 et (B) les cellules MEG-01 ont été traitées avec l'imatinib, le composé 7b, et la tubacine seuls ou en combinaison. Après 48 heures de traitement, l'étude de la morphologie nucléaire des cellules est réalisée par microscopie à fluorescence après marquage au Hoechst et à l'iodure de propidium. La quantification des cellules vivantes, apoptotiques et nécrotiques a été réalisée et les résultats présentés sous forme d'histogramme correspondent à la moyenne ± l'écart type d'au moins trois expériences indépendantes. L'analyse statistique a été réalisée par rapport au contrôle avec *p<0,05, **p<0,01 et ***p<0,001.

En conclusion de cette partie :

Le composé 7b et la tubacine sont des inhibiteurs sélectifs d'HDAC6 dans les cellules KBM-5 et MEG-01.

La combinaison imatinib-7b induit une mort de type apoptotique dans les cellules KBM-5 et une mort de type nécrotique dans les cellules MEG-01.

La combinaison imatinib-7b n'induit pas de réduction de la viabilité synergique dans les cellules KBM-5 et MEG-01 mais un effet similaire au composé 7b seul.

IV. Effet du co-traitement de l'imatinib et des inhibiteurs d'HDAC6 sur la viabilité de cellules saines

Afin de déterminer l'effet du co-traitement imatinib-7b sur des cellules saines, plusieurs modèles de cellules saines non prolifératives (PBMC et plaquettes) et prolifératives (PBMC stimulées par la PHA et l'IL-2 et cellules souches hématopoïétiques $CD34^+$) ont été traités avec le composé 7b à des concentrations allant de 1 à 100 µM, à l'imatinib à une concentration de 0,25 µM et simultanément avec les composés imatinib et 7b à des concentrations respectives de 0,25 et 50 µM. Après 48 heures de traitement l'effet des composés sur la viabilité cellulaire a été évalué dans les PBMC par un test d'exclusion au bleu Trypan et dans les plaquettes par analyse de l'exposition des phosphatidylsérines. Dans les cellules prolifératives l'effet sur la viabilité a été déterminé par analyse de la morphologie nucléaire et l'effet sur la prolifération cellulaire par comptage du nombre de cellules.

Les résultats concernant les cellules saines non prolifératives indiquent que le composé 7b diminue la viabilité des PBMC de 40,9% qu'à 100 µM et seulement de 23,1% en combinaison avec l'imatinib (Figure 33A) et qu'aucun effet n'est observé sur l'exposition des phosphatidylsérines dans les plaquettes après 48 heures de traitement (Figure 33B). Dans les cellules saines prolifératives, la combinaison imatinib-7b n'a pas d'effet sur la prolifération et la viabilité des PBMC stimulées par la PHA et l'IL-2 (Figure 33C), et bien que le composé 7b induise une diminution de la prolifération passant de $15{,}1.10^5$ cellules dans le contrôle à $7{,}7.10^5$ cellules dès 50 µM de 7b et à $7{,}2.10^5$ cellules en combinaison avec l'imatinib après 48 heures de traitement, le co-traitement n'a pas d'effet sur la viabilité des cellules $CD34^+$ (Figure 33D).

De manière générale le composé 7b, l'imatinib et la combinaison induisent un effet modéré sur les cellules saines et présentent une sélectivité pour les cellules K-562 (Tableau 14).

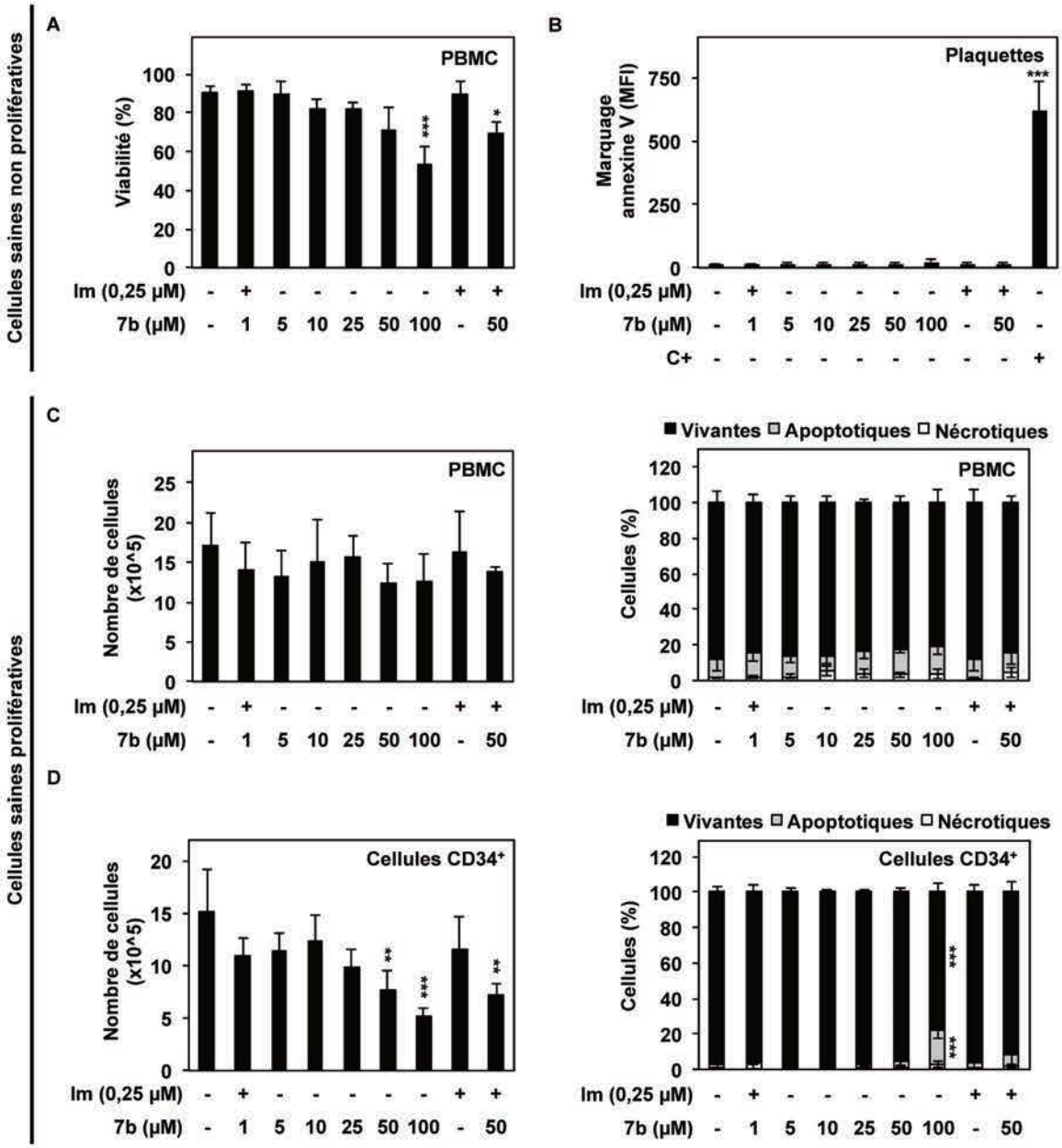


Figure 33 : Effet des composés imatinib et 7b seuls ou en co-traitement sur différents modèles de cellules saines.

Les cellules saines non prolifératives (PBMC et les plaquettes) et prolifératives (PBMC stimulées par la PHA et l'IL-2 et cellules $CD34^+$) ont été traitées avec le composé 7b et l'imatinib (Im) seuls ou en combinaison. Après 48 heures de traitement (A) la viabilité des PBMC, (B) l'exposition des phosphatidylsérines dans les plaquettes et (C) la prolifération et la morphologie nucléaire (C) des PBMC stimulées par la PHA et l'IL-2 et (D) des cellules $CD34^+$ ont été évalués. C+ : contrôle positif d'exposition des phosphatidylsérines obtenu après 5 minutes d'incubation des plaquettes avec du DMSO (50%). Les données représentent la moyenne ± l'écart type de trois expériences indépendantes et l'analyse statistique a été réalisée par rapport au contrôle avec *p<0,05, **p<0,01 et ***p<0,001.

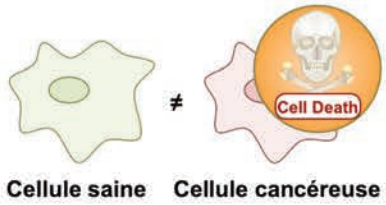
Tableau 14 : Ratio de sélectivité de la combinaison imatinib-7b pour les cellules K-562 par rapport à plusieurs modèles de cellules saines.

Modèles de cellules saines		Ratio de sélectivité
Non prolifératives	PBMC	3,7
	Plaquettes	122,2
Prolifératives	PBMC stimulées par la PHA et l'IL-2	20,3
	Cellules $CD34^+$	14,3

Le ratio de sélectivité a été calculé comme suit : % de mort cellulaire dans les cellules K-562 rapporté au contrôle / % de mort cellulaire dans les cellules saines rapporté au contrôle.

En conclusion de cette partie :

La combinaison imatinib-7b présente une sélectivité pour les cellules cancéreuses K-562 par rapport à plusieurs modèles de cellules saines (PBMC, PBMC stimulées par la PHA et l'IL-2, plaquettes et cellules $CD34^+$).



V. Détermination du mécanisme d'action du co-traitement à l'imatinib et aux inhibiteurs d'HDAC6

1. Effet du composé 7b sur l'expression de la protéine BCR-ABL dans les cellules K-562

Après avoir déterminé l'effet du composé 7b sur différents modèles cellulaires, son mécanisme d'action est étudié. Comme expliqué précédemment l'inhibition d'HDAC6, désacétylant HSP90α et ainsi pouvant provoquer l'ubiquitination puis la dégradation de ses protéines clientes tel que BCR-ABL nous amène à évaluer l'effet du composé 7b sur l'ubiquitination et les niveaux d'expression de BCR-ABL. Les cellules K-562 ont dans un premier temps été traitées avec le composé 7b à une concentration de 50 µM aux temps indiqués puis immunoprécipitées grâce à l'anticorps anti-ubiquitine et enfin l'analyse de l'expression de la protéine BCR-ABL a été réalisée. Les résultats montrent que le composé 7b induit une augmentation de l'ubiquitination de la protéine BCR-ABL dès 30 minutes (Figure

34A). Dans un second temps, une étude cinétique de l'effet du composé 7b (50 µM) sur le niveau d'expression de la protéine BCR-ABL a été réalisée. Les résultats indiquent que le composé 7b diminue l'expression de BCR-ABL à partir de 2 heures de traitement (Figure 34B).

Dans le but d'analyser si cette diminution d'expression de la protéine BCR-ABL est également présente au niveau transcriptionnel, des primers du transcrit b3a2 présent dans les cellules K-562 (Tableau 1) ont été mis au point afin d'étudier l'expression du transcrit codant pour la protéine BCR-ABL. Les résultats montrent qu'il n'y a pas de variation significative de l'expression de ce transcrit (Figure 34C).

De manière à déterminer l'effet du composé 7b sur le niveau d'expression de la protéine BCR-ABL dans d'autres lignées de LMC, une étude cinétique a été réalisée dans les cellules KBM-5 et MEG-01. Les résultats indiquent que le composé 7b diminue l'expression de BCR-ABL à partir de 30 minutes de traitement dans les cellules KBM-5 (Figure 34D), et à partir de 2 heures dans les cellules MEG-01 (Figure 34E).

Afin de mieux comprendre le mécanisme d'action des combinaisons imatinib-HDAC6i induisant une diminution de viabilité synergique des cellules K-562, leurs effets sur l'activation et l'expression de la protéine BCR-ABL et de protéines impliquées dans des voies de signalisation dépendantes de celle-ci a été étudié par Western Blot (Figure 35). Cette analyse est réalisée après 8 heures de traitement, soit bien avant l'induction de l'apoptose évitant ainsi toute modification induite par le processus de mort cellulaire lui-même. Les résultats montrent une importante diminution du niveau de phosphorylation de la protéine BCR-ABL lors du co-traitement des cellules avec les composés imatinib et 7b par rapport au co-traitement des cellules avec les composés imatinib et tubacine et par rapport aux traitements avec les composés seuls, essentiellement due à une forte diminution de l'expression de BCR-ABL. L'effet de la combinaison imatinib-tubacine sur le niveau de phosphorylation de BCR-ABL est similaire à l'effet induit par le composé 7b. De plus, la combinaison imatinib-7b diminue de façon plus importante le niveau de phosphorylation de la protéine Lyn, un régulateur de la phosphorylation de la protéine BCR-ABL, par rapport à la combinaison imatinib-tubacine et aux composés seuls. Finalement la combinaison imatinib-7b réduit le niveau de phosphorylation de la protéine CrkL de manière similaire à l'imatinib seul mais de façon moins importante que la combinaison imatinib-tubacine.

Concernant l'expression de protéines dépendantes de BCR-ABL impliquées dans la prolifération et la survie cellulaire, le co-traitement imatinib-7b diminue le niveau de phosphorylation de STAT5 de manière similaire au co.-traitement imatinib-tubacine, mais réduit drastiquement l'expression de Mcl-1 par rapport au co-traitement imatinib-tubacine et aux composés seuls. Enfin, la combinaison imatinib-7b diminue l'expression de la survivine de manière similaire au composé 7b seul et l'expression de c-Myc plus efficacement que la combinaison imatinib-tubacine ou que chacun des composés seuls. La combinaison imatinib-tubacine quant à elle provoque une diminution de l'expression de c-Myc similaire à celle induite par le composé 7b seul et une faible diminution de l'expression de la survivine.

En conclusion de cette partie :

L'inhibition d'HDAC6 induite par le composé 7b dans les cellules K-562 stimule l'ubiquitination de BCR-ABL dès 30 minutes de traitement qui est suivie de la diminution de son niveau d'expression protéique après 2 heures sans affecter son expression d'ARNm.

HDAC6 diminue également l'expression de BCR-ABL dans les lignées KBM-5 et MEG-01 respectivement à partir de 30 minutes et 2 heures de traitement.

La combinaison imatinib-7b induit une diminution de l'expression des protéines Mcl-1, c-Myc, STAT5 et de la phosphorylation de la protéine BCR-ABL par rapport aux traitements avec les composés seuls.

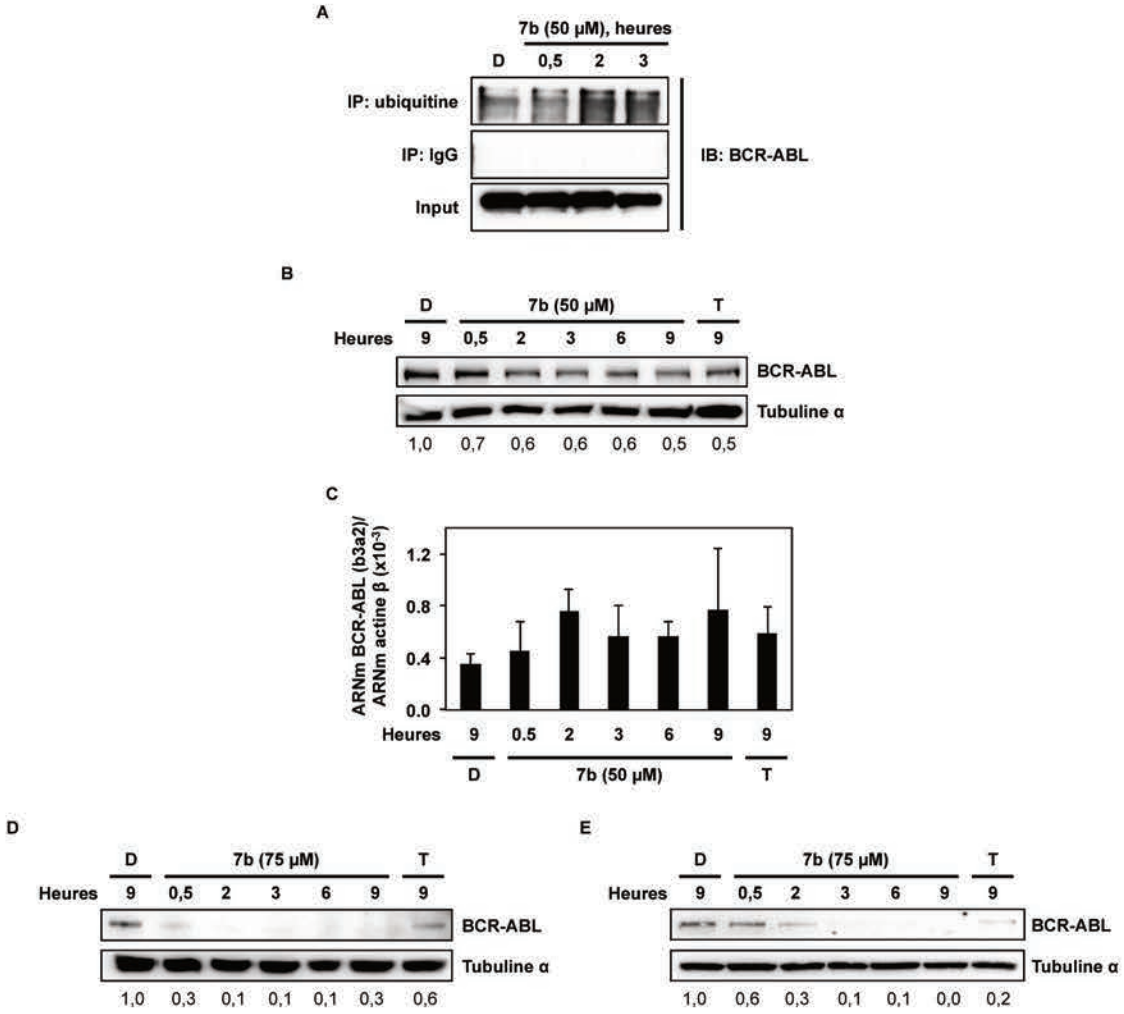


Figure 34 : Effet de l'inhibiteur d'HDAC6 7b sur l'ubiquitination et l'expression de BCR-ABL.

(A, B, C) Les cellules K-562 ont été traitées avec le composé 7b (50 µM) aux temps indiqués. (A) Les cellules ont été immunoprécipitées (IP) grâce à l'anticorps anti-ubiquitine et le niveau d'expression de BCR-ABL a été étudié par Western Blot (IB). Pour chaque échantillon, un input est utilisé comme contrôle positif et une IgG de l'hôte de l'anticorps servant à l'immunoprécipitation est utilisé comme contrôle négatif. (B) Le niveau d'expression de BCR-ABL a été étudié par Western Blot. La tubuline α a été utilisée en tant que contrôle de chargement. Le ratio d'intensité de la protéine d'intérêt sur le contrôle de charge est présenté sous les blots. Les blots présentés sont représentatifs de trois expériences indépendantes. (C) L'évaluation du niveau d'expression du transcrit b3a2 du gène *BCR-ABL* a été étudié par PCR en temps réel. L'actine β est utilisée en tant que contrôle de chargement. Les données représentées sous forme d'histogramme correspondent à la moyenne ± l'écart type de trois expériences indépendantes. (D) Les cellules KBM-5 et (E) MEG-01 ont été traitées avec le composé 7b (75 µM) aux temps indiqués. Le niveau d'expression de BCR-ABL a été étudié par Western Blot. La tubuline α a été utilisée en tant que contrôle de chargement. Le ratio d'intensité de la protéine d'intérêt sur le contrôle de charge est présenté sous les blots. Les blots présentés sont représentatifs de trois expériences indépendantes. Le DMSO (D) a été utilisé en tant que contrôle solvant et la tubacine (T, 2 µM) en tant qu'inhibiteur d'HDAC6 de référence.

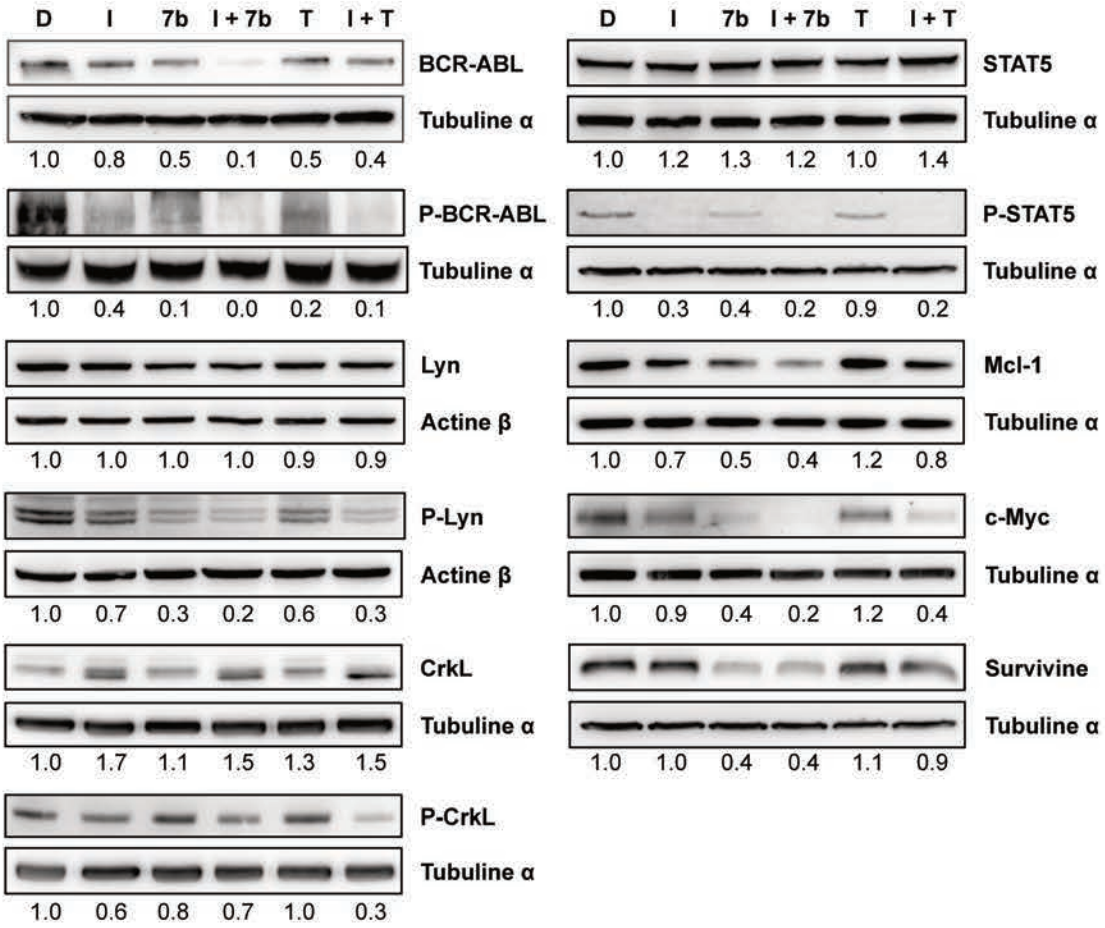


Figure 35 : Effet des co-traitements imatinib-inhibiteurs d'HDAC6 sur des protéines impliquées dans les voies de survie et prolifération cellulaires dépendantes de BCR-ABL.

Les cellules K-562 ont été traitées avec l'imatinib (I ; 0,25 µM), le composé 7b (50 µM) et la tubacine (T ; 1,5 µM) seuls ou en combinaison pendant 8 heures. L'évaluation du niveau d'expression des protéines est réalisée par Western Blot. Le DMSO (D) a été utilisé en tant que contrôle solvant et la tubuline α et l'actine β sont utilisées en tant que contrôles de chargement. Les blots présentés sont représentatifs de trois expériences indépendantes. Le ratio d'intensité de la protéine d'intérêt sur le contrôle de charge est présenté sous les blots.

VI. Évaluation de l'effet anti-cancéreux du co-traitement imatinib-7b en milieu semi-solide

En raison des propriétés anti-cancéreuses prometteuses de la combinaison imatinib-7b *in vitro*, son effet sur la formation de colonies en milieu semi-solide a été testé (Figure 36). Après 10 jours d'incubation les résultats montrent que la combinaison imatinib-7b induit une réduction du nombre de colonies, de la surface du puits couverte par les colonies, ainsi que de l'intensité du signal MTT plus importante que celle induite par les composés seuls. A titre d'exemple, la combinaison, l'imatinib et le 7b induisent une diminution respective de 53,5%, 22,3% et 21,3% de l'intensité du signal MTT.

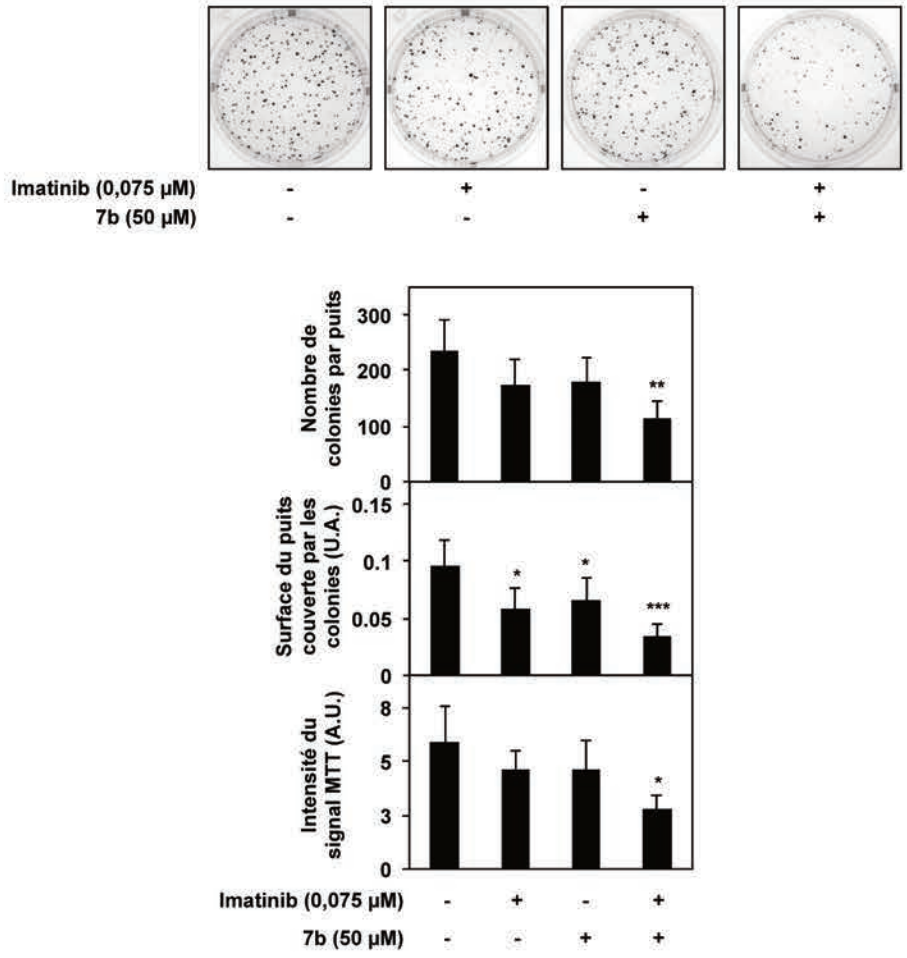


Figure 36 : Effet de la combinaison imatinib-7b sur les propriétés clonogéniques des cellules K-562.

Les cellules K-562 ont été incubées en milieu semi-solide avec l'imatinib (I ; 0,075 µM) et le composé 7b (50 µM) seuls ou en combinaison pendant 10 jours puis le nombre de colonies par puits, la surface du puits couverte par les colonies ainsi que l'intensité du signal du sel de tétrazolium bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl (MTT) ont été quantifiés. Les photographies et les données représentées sous forme d'histogramme correspondent à la moyenne ± l'écart type de trois expériences indépendantes. L'analyse statistique a été réalisée par rapport au contrôle avec *$p<0,05$, **$p<0,01$ et ***$p<0,001$.

VII. Evaluation de l'effet anti-cancéreux du co-traitement imatinib-7b *in vivo*

En raison des propriétés anti-cancéreuses prometteuses de la combinaison imatinib-7b *in vitro* et en milieu semi-solide, nous avons évalué son effet sur un modèle de xénogreffe de cellules tumorales chez le poisson zèbre. Des cellules K-562 et K-562R ont été traitées avec les composés imatinib et 7b pendant 24 heures afin d'exposer les cellules aux composés sans engager la mort cellulaire. Les cellules ont ensuite été colorées avec le fluorophore CellTracker CM-dil, un colorant fluorescent permettant de distinguer les cellules tumorales, avant injection dans le sac vitellin d'embryons de poissons zèbre. Après 72 heures la masse tumorale de la xénogreffe a été évaluée par microscopie de fluorescence. Les résultats montrent que la combinaison imatinib-7b induit une diminution significative de la masse tumorale de xénogreffes de cellules K-562 de 63,7% par rapport aux composés imatinib (10,3%) et 7b (2,2%) seuls qui n'ont qu'un faible effet. La combinaison imatinib-7b induit également une diminution significative de la masse tumorale de xénogreffes de cellules K-562R de 61,6% par rapport aux composés imatinib (33,3%) et 7b (27,3%) seuls qui n'ont qu'un effet modéré (Figure 37).

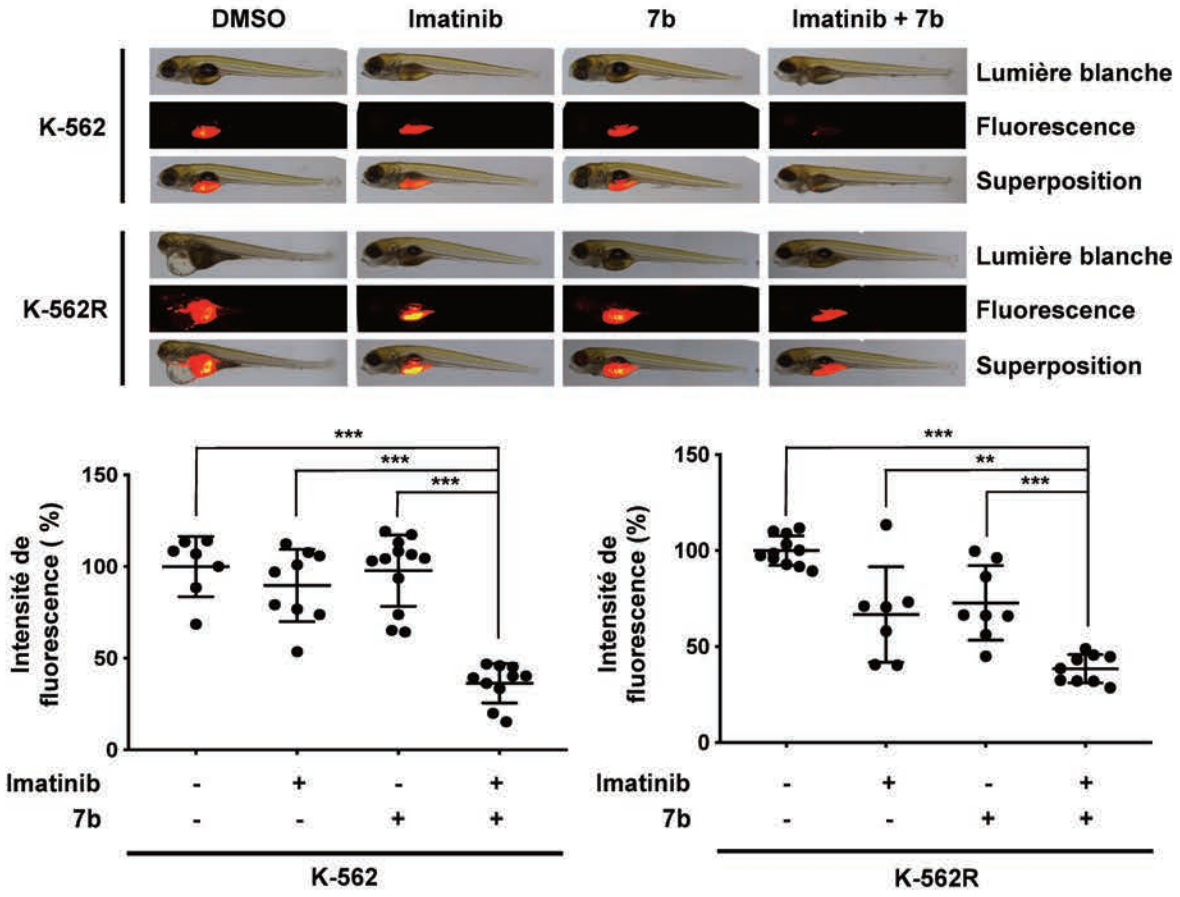


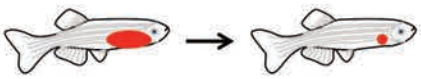
Figure 37 : Effet du co-traitement imatinib-7b sur des xénogreffes de cellules K-562 sensibles et résistantes à l'imatinib chez le poisson zèbre.

Les cellules K-562 et K-562R ont été traitées avec respectivement 0,25 et 10 µM d'imatinib et le composé 7b (50 µM) seuls ou en combinaison pendant 24 heures et colorées avec le fluorophore CellTracker CM-dil avant d'être injectées dans le sac vitellin d'embryons de poissons zèbre. Après 72 heures d'incubation les photographies ont été prises en lumière blanche d'une part et par microscopie de fluorescence d'autre part permettant de superposer les photographies et l'évaluation de la masse tumorale de la xénogreffe a été réalisée. Les photographies et les données représentées sous forme d'histogramme correspondent à la moyenne ± l'écart type d'expériences réalisées chez minimum 7 poissons représentés chacun par un point. L'analyse statistique a été réalisée avec **p<0,01 et ***p<0,001.

En conclusion de cette partie :

La combinaison imatinib-7b diminue les propriétés clonogéniques des cellules K-562.

La combinaison imatinib-7b réduit la formation tumorale *in vivo*.



Partie 2 : Étude du composé MAKV-15 en tant qu'inhibiteur sélectif d'HDAC6 en combinaison avec le bortezomib et l'imatinib pour le traitement de la leucémie myéloïde chronique

La différence de résultats obtenus entre différentes lignées de LMC traitées avec une combinaison imatinib-inhibiteur d'HDAC6 dans la première partie de ce manuscrit nous amène à penser que la recherche d'une approche thérapeutique différente serait à envisager. Les domaines de la protéine HDAC6 lui confèrent une localisation principalement cytoplasmique, une activité désacétylase mais également une activité non catalytique *via* son domaine en doigts de zinc en C-terminal lui permettant de se lier aux protéines mal repliées polyubiquitinées et ainsi de participer à leur dégradation lorsque le protéasome n'exerce plus sa fonction. Ainsi, l'inhibition d'HDAC6 couplée à celle du protéasome permettrait de saturer la dégradation des protéines et pourrait ainsi sensibiliser les cellules cancéreuses avant un traitement classique à l'imatinib.

Dans ce contexte, dans cette deuxième partie, l'objectif sera de déterminer le potentiel anti-cancéreux de l'imatinib sur des cellules sensibilisées par un pré-traitement inhibiteur d'HDAC6-inhibiteur du protéasome permettant l'inhibition directe et indirecte de la dégradation protéique par le protéasome, sur des cellules KBM-5 de LMC sensibles ou résistantes aux ITK.

Le composé MAKV-15 (Butler *et al.*, 2010) utilisé pour cette étude est un dérivé d'un inhibiteur d'HDAC6, la tubastatine A, qui a montré également agir en tant qu'inhibiteur d'HDAC6 *in cellulo* selon des études préliminaires menées au laboratoire. Nous évaluerons dans un premier temps les données *in silico* concernant l'activité biologique du MAKV-15, dans un second temps nous le potentiel anti-cancéreux de l'association de l'inhibiteur d'HDAC6, de l'inhibiteur du protéasome et de l'imatinib *in vitro* et enfin nous déterminerons son mécanisme d'action .

I. Évaluation *in silico* des propriétés pharmacologiques du MAKV-15

Afin de déterminer *in silico* si l'absorption par voie orale du composé sera optimale, sa structure chimique a été soumise au principe de la règle de Lipinski se basant sur cinq propriétés physico-chimiques. Les paramètres pharmacocinétiques et la potentielle toxicité du composé ont également été étudiés (Tableau 15). Les résultats montrent que le MAKV-15 remplit les conditions nécessaires pour une bonne administration par voie orale et a de bonnes

prédispositions à l'absorption intestinale. Enfin, bien qu'il pourrait présenter un risque de toxicité cardiaque, il ne serait pas carcinogène.

Tableau 15 : Évaluation *in silico* des propriétés pharmacologiques du MAKV-15.

Prédiction	Paramètres (Valeurs théoriques)	MAKV-15
Règles de Lipinski	Masse moléculaire (Da ; ≤ 500)	335,41
	Nombre d'atomes (20 ≤…≤ 70)	25
	Donneurs de liaisons hydrogène (≤ 5)	2
	Accepteurs de liaisons hydrogène (≤ 10)	5
	Lipophilie/hydrophilie (log P ; ≤ 5)	2,71
Pharmaco-cinétique	Perméabilité intestinale (4 ≤…≤ 70)	21,7
	Absorption intestinale (% ; ≥ 70%)	94,5
	Liaison aux protéines plasmatiques (% ; ≤ 90%)	54,9
Toxicité	Carcinogénicité	Négative
	Toxicité cardiaque	Risque moyen

Les données ont été obtenues après analyse de la structure chimique du composé grâce au site internet https://preadmet.bmdrc.kr.

En conclusion de cette partie :

Le MAKV-15 remplit les conditions nécessaires pour une bonne administration par voie orale mais pourrait présenter un risque de toxicité cardiaque.

II. Effet de la combinaison d'inhibiteur d'HDAC6, d'un inhibiteur du protéasome et de l'imatinib sur la viabilité des cellules KBM-5 sensibles et résistantes à l'imatinib

1. Effet du MAKV-15 sur l'acétylation de la tubuline α et des histones H4 dans les cellules KBM-5

Après avoir caractérisé les propriétés *in silico* du MAKV-15, nous avons voulu déterminer la concentration de MAKV-15 à laquelle le composé induit une inhibition sélective d'HDAC6 dans les cellules KBM-5. En ce sens, son effet sur l'acétylation de la tubuline α, ciblée par HDAC6, et de l'histone H4, non ciblé par la protéine, été évalué. Les cellules ont été traitées avec des concentrations croissantes de MAKV-15 et avec deux inhibiteurs d'HDAC6 de référence, la tubastatine A (2 µM) dont dérive le MAKV-15 et la

tubacine (2 µM), ainsi qu'avec un inhibiteur pan-HDAC, le SAHA (2 µM), utilisés en tant que contrôles positifs d'acétylation, pendant 24 heures puis l'acétylation de la tubuline α et de l'histone H4 a été étudiée par Western Blot. Les résultats indiquent que le composé MAKV-15 induit une augmentation de l'acétylation de la tubuline α dès 0,5 µM après 24 heures de traitement sans induire l'acétylation des histones H4 (Figure 38). Une concentration de 2 µM de MAKV-15, induisant une forte augmentation de l'acétylation de la tubuline α après 24 heures de traitement sans induire l'acétylation des histones H4, sera utilisée pour la suite des traitements.

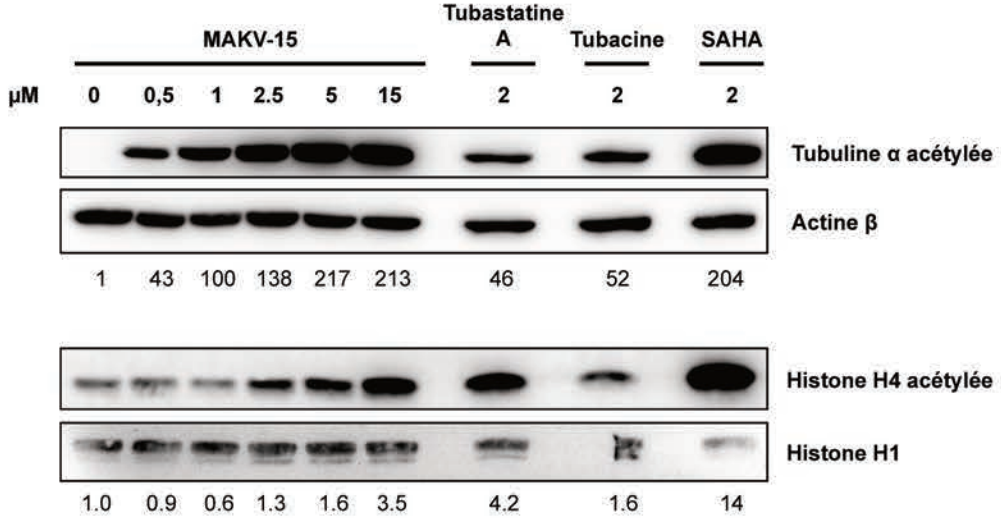


Figure 38 : Effet du composé MAKV-15 sur l'acétylation de la tubuline α et de l'histone H4 dans les cellules KBM-5.

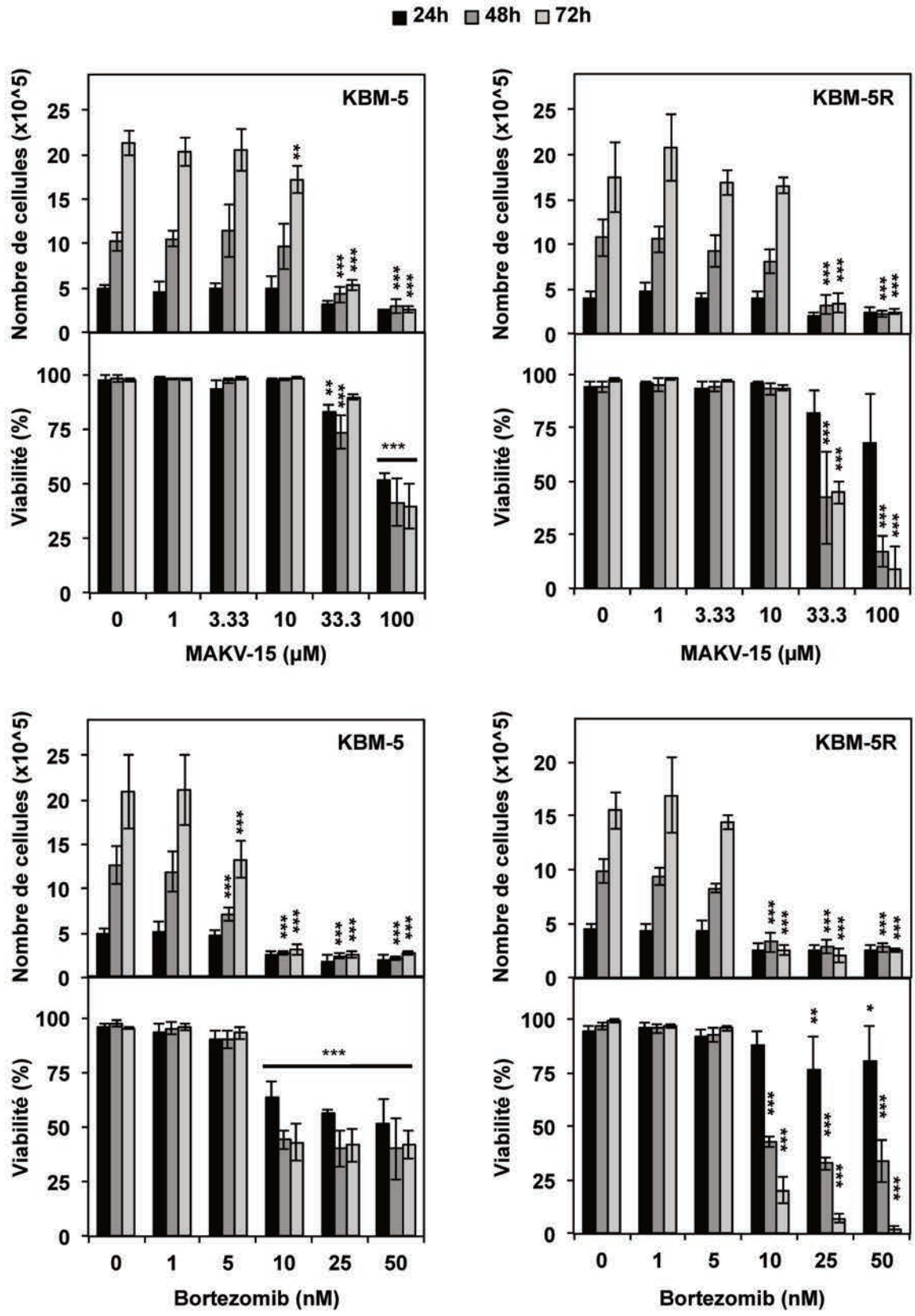
Les cellules KBM-5 ont été traitées avec des concentrations croissantes de MAKV-15 pendant 24 heures et l'acétylation de la tubuline α et de l'histone H4 a été étudiée par Western Blot. L'actine β et l'histone H1 ont été utilisées comme contrôle de chargement. La tubastatine A (2 µM, 24 heures) et la tubacine (2 µM, 24 heures) sont utilisés en tant qu'inhibiteurs de référence d'HDAC6 et le SAHA (2 µM, 24 heures) en tant que pan-inhibiteur d'HDAC. Les blots présentés sont représentatifs de trois expériences indépendantes. Le ratio d'intensité de la protéine d'intérêt sur le contrôle de charge est présenté sous les blots.

2. Effet de l'imatinib, du MAKV-15 et du bortezomib sur la prolifération et la viabilité des cellules KBM-5 sensibles et résistantes à l'imatinib

Après avoir déterminé la concentration à laquelle le MAKV-15 induit une inhibition sélective d'HDAC6 dans les cellules KBM-5, son effet sur la prolifération et la viabilité de cellules KBM-5 et KBM-5R, ainsi que celui de l'imatinib et de l'inhibiteur du protéasome a été testé.

Le choix de l'inhibiteur du protéasome utilisé dans cette étude s'est porté sur le bortezomib, un médicament approuvé pour une utilisation seule ou en combinaison en clinique pour le traitement du myélome multiple et utilisé à des concentrations de l'ordre du nanomolaire (Landgren *et al.*, 2017).

L'effet de l'imatinib sur la prolifération et la viabilité des cellules KBM-5 ayant été rapporté précédemment dans la première partie de cette étude (Figure 28), dans cette partie les cellules KBM-5 ont été traitées avec le MAKV-15 et bortezomib et les cellules KBM-5R avec le MAKV-15, le bortezomib et l'imatinib pendant 24, 48 et 72 heures à des concentrations allant respectivement de 1 à 100 µM, de 1 à 25 nM et de 1 à 100 µM. L'effet des composés a été évalué avec le test d'exclusion au bleu Trypan et l'effet sur la prolifération cellulaire a été déterminé par comptage du nombre de cellules (Figure 39). Les résultats indiquent que le MAKV-15 induit une diminution de prolifération des cellules KBM-5 à partir de 10 µM après 72 heures de traitement passant de $21{,}2.10^5$ cellules dans le contrôle à $17{,}2.10^5$ cellules et une diminution de viabilité de 14,4% à 33,3 µM dès 24 heures de traitement, ainsi qu'une diminution de prolifération passant de $17{,}5.10^5$ cellules dans le contrôle à $3{,}3.10^5$ cellules et de viabilité de 55,2% des cellules KBM-5R à partir de 33,3 µM dès 48 heures de traitement. Le bortezomib induit une diminution de prolifération des cellules KBM-5 à partir de 5 µM après 48 heures de traitement passant de $12{,}6.10^5$ cellules dans le contrôle à $7{,}1.10^5$ cellules et une diminution de viabilité de 34,1% dès 10 nM après 24 heures dans les cellules KBM-5 ainsi qu'une diminution de prolifération passant de $9{,}9.10^5$ cellules dans le contrôle à $3{,}3.10^5$ cellules et de viabilité de 55,7% des cellules KBM-5R à partir de 10 µM dès 48 heures de traitement. Enfin l'imatinib diminue la prolifération des cellules KBM-5R à partir de 1 µM après 72 heures de traitement passant de $18{,}1.10^5$ cellules dans le contrôle à $15{,}2.10^5$ cellules et la viabilité de 15,4% à 10 µM après 48 heures de traitement.



Légende à la suite de la figure.

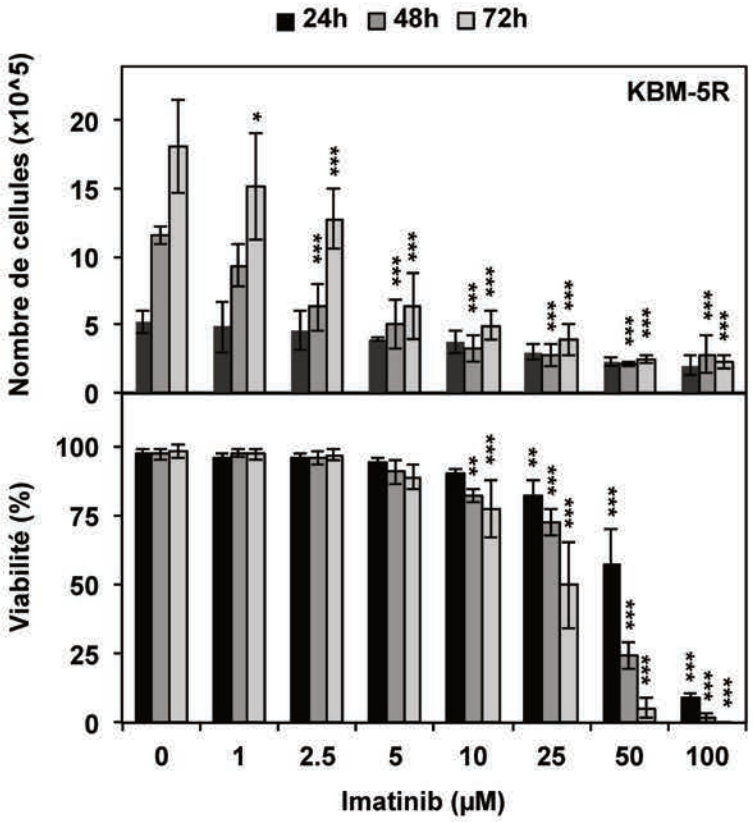


Figure 39 : Effet du MAKV-15, du bortezomib et de l'imatinib sur la prolifération et la viabilité des cellules KBM-5 sensibles et résistantes à l'imatinib

Les cellules KBM-5 et KBM-5R ont été traitées avec le composé MAKV-15, le bortezomib et l'imatinib aux concentrations indiquées. Après 24, 48 et 72 heures de traitement la prolifération et la viabilité cellulaire ont été évaluées. Les données représentent la moyenne ± l'écart type de trois expériences indépendantes et l'analyse statistique a été réalisée par rapport au contrôle avec *p<0,05, **p<0,01 et ***p<0,001.

3. Détermination d'un protocole de traitement avec le bortezomib, l'imatinib et le MAKV-15

Dans le but d'évaluer le traitement le plus efficace, plusieurs protocoles de traitement ont été testés dans les cellules KBM-5 avec le bortezomib, l'imatinib et le MAKV-15 dont les concentrations induisant moins de 20% de mortalité cellulaire dans le cas de l'imatinib et du bortezomib ainsi qu'une inhibition sélective d'HDAC6 dans le cas du MAKV-15, ont été détaillées dans le Tableau 16.

Tableau 16 : Composés et concentrations utilisées en combinaison dans les lignées KBM-5 et KBM-5R.

Le bortezomib et l'imatinib sont utilisés à des concentrations induisant moins de 20% de mortalité cellulaire et le MAKV-15 à la concentration à laquelle il agit en tant qu'inhibiteur sélectif d'HDAC6.

Composés	**Concentrations utilisées dans les cellules**	
	KBM-5	**KBM-5R**
Bortezomib	5 nM	5 nM
MAKV-15	2 µM	2 µM
Imatinib	2,5 µM	2,5 µM et 10 µM

Les trois protocoles de traitement testés sont des administrations simultanée ou séquentielles des trois molécules (Figure 40). Après avoir évalué l'effet des différents protocoles de traitement avec le test d'exclusion au bleu Trypan, le traitement séquentiel comprenant un pré-traitement bortezomib-MAKV-15 de 24 heures puis un traitement à l'imatinib de 48 heures s'est révélé être le plus efficace et sera donc celle utilisé par la suite et est dénommé traitement BM+I pour des raisons de simplicité.

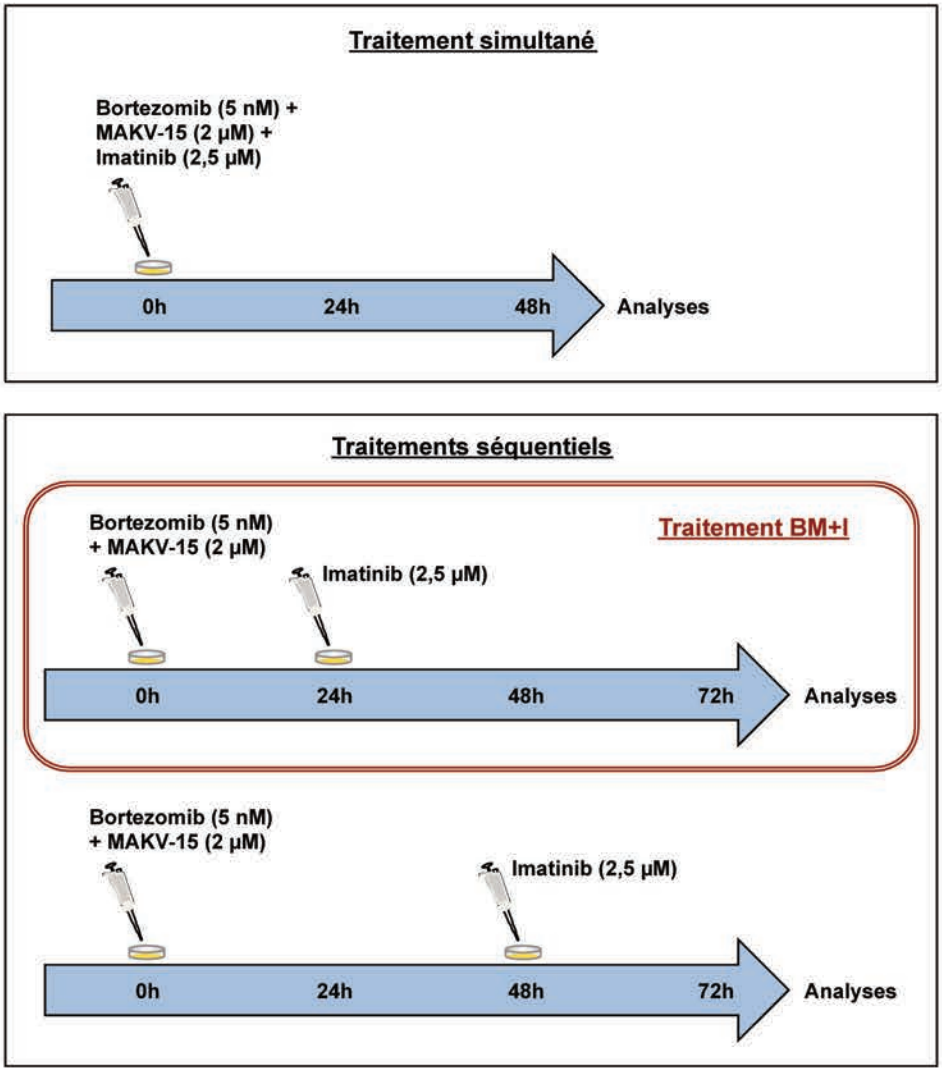


Figure 40 : Protocoles expérimentaux de traitement des cellules KBM-5 avec le bortezomib, le MAKV-15 et l'imatinib.

Dans le cadre du traitement simultané, les cellules sont co-incubées pendant 48 heures en présence de MAKV-15, de bortezomib et d'imatinib avant analyses. Dans le cadre des traitements séquentiels, les cellules sont incubées pendant 24 ou 48 heures en présence de MAKV-15 et de bortezomib puis traitées avec de l'imatinib (2,5 µM) pendant 48 ou 24 heures avant analyses. Le traitement le plus efficace est le traitement séquentiel encadré en rouge et appelé « traitement BM+I ».

4. Effet du traitement BM+I sur la prolifération et la viabilité de cellules KBM-5 sensibles et résistantes à l'imatinib

Les concentrations d'imatinib qui vont être utilisées dans les cellules KBM-5R sont de 2,5 µM et 10 µM (Tableau 16). La concentration de 10 µM d'imatinib correspond à la concentration induisant moins de 20% de mortalité des cellules KBM-5R tandis que la concentration de 2,5 µM d'imatinib correspond à celle utilisée dans les cellules KBM-5. L'utilisation de cette concentration dans les cellules KBM-5R nous permettrait de déterminer

si le traitement BM+I, noté alors traitement BM+I (2,5 µM), pourrait entrainer une re-sensibilisation des cellules KBM-5R à l'imatinib grâce à la saturation de la dégradation des protéines induite par les molécules MAKV-15 et bortezomib.

L'effet du traitement BM+I sur la viabilité des cellules KBM-5 et KBM-5R a été évalué avec le test d'exclusion au bleu Trypan et l'effet sur la prolifération cellulaire a été déterminé par comptage du nombre de cellules (Figure 41). Concernant les cellules KBM-5 les résultats indiquent que le bortezomib, l'imatinib ainsi que le traitement BM+I induisent une diminution de prolifération des cellules KBM-5 passant de $19{,}8.10^5$ cellules dans le contrôle à respectivement $11{,}8.10^5$, $6{,}8.10^5$ et $5{,}3.10^5$ cellules et que le traitement BM+I induit une importante diminution de viabilité (60,5%) par rapport à l'imatinib (2,9%), au bortezomib (6%) et au MAKV-15 (1%) seuls et à la combinaison MAKV-15-bortezomib (10,2%). Concernant les cellules KBM-5R, les résultats indiquent que l'imatinib (2,5 µM et 10 µM) ainsi que les traitements BM+I (2,5 µM et 10 µM) induisent une diminution de prolifération des cellules KBM-5R passant de $13{,}1.10^5$ cellules dans le contrôle à respectivement $6{,}2.10^5$, $4{,}3.10^5$, 7.10^5 et $4{,}1.10^5$ cellules et que le traitement BM+I (10 µM) induit diminution de viabilité plus importante que le traitement BM+I (2,5 µM) avec des diminutions respectives de 65,9% et 31,6%. De manière générale, les traitements BM+I diminuent la viabilité de façon plus importante que l'imatinib utilisé à 2,5 µM, qui n'a pas d'effet sur la viabilité, utilisé à 10 µM (10,5%), que le bortezomib (4,2%), que le MAKV-15 (0,1%) seuls et que la combinaison MAKV-15-bortezomib (11,2%).

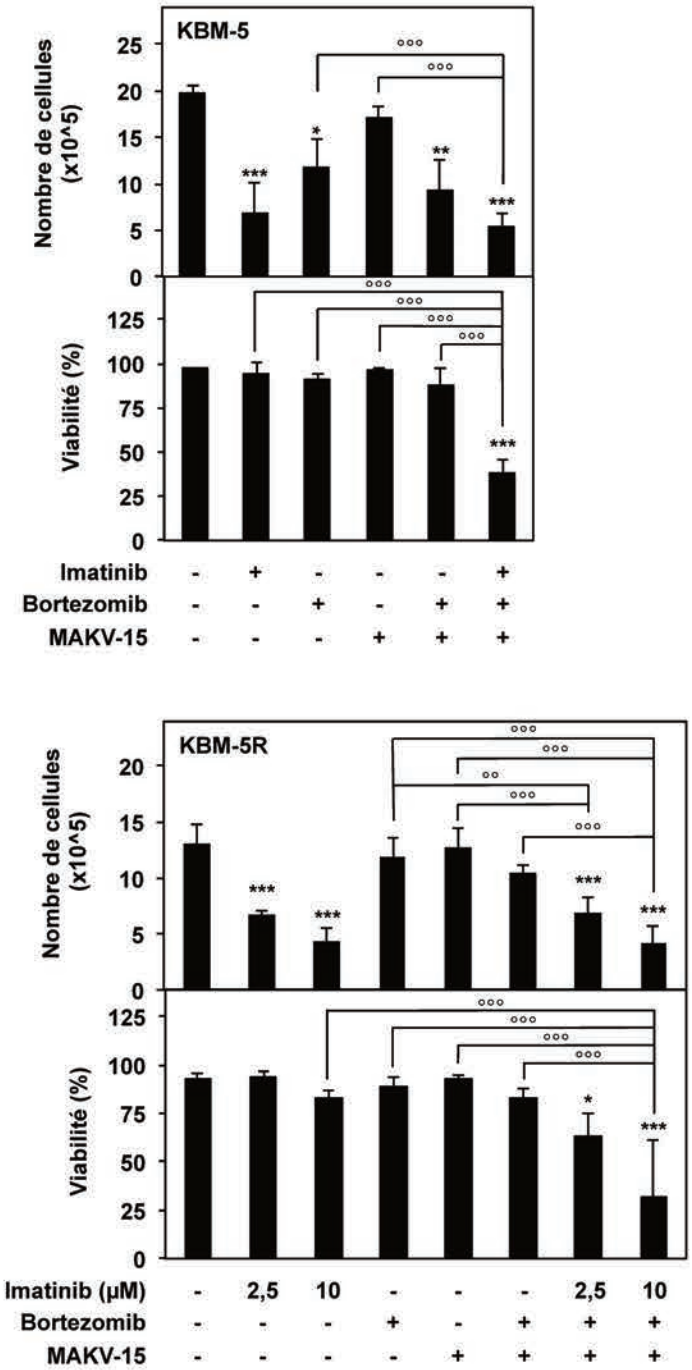


Figure 41 : Effet du traitement BM+I sur la prolifération et la viabilité de cellules KBM-5 sensibles et résistantes à l'imatinib.

Les cellules KBM-5 et KBM-5R ont été traitées avec le MAKV-15 (2 µM ; 72 heures), le bortezomib (5 nM ; 72 heures) et l'imatinib (2,5 µM pour les cellules KBM-5 et 2,5 µM ou 10 µM pour les cellules KBM-5R ; 48 heures) seuls ou en combinaison [bortezomib-MAKV-15 (72 heures) et traitement BM+I]. La prolifération et la viabilité cellulaires ont été évaluées. Les données représentent la moyenne ± l'écart type de trois expériences indépendantes et l'analyse statistique a été réalisée par rapport au contrôle avec *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 ou par rapport à la combinaison avec °° p<0,01 et °°° p<0,001.

5. Caractérisation du type de mort induit par le traitement BM+I dans les cellules KBM-5 sensibles et résistantes à l'imatinib

L'importante diminution de viabilité observée lors du traitement BM+I dans les cellules KBM-5 et KBM-5R nous a mené à étudier le type de mort cellulaire induit par l'analyse de la morphologie nucléaire (Figure 42). Concernant les cellules KBM-5, les résultats montrent qu'une forte augmentation de la mort par apoptose est observée lors du traitement BM+I passant de 5,4% dans le contrôle à 74,1% par rapport à l'imatinib (10,5%), au bortezomib (8,3%), au MAKV-15 (4,1%) seuls et à la combinaison MAKV-15-bortezomib (13,7%). Avec un indice de combinaison de 0,59 ± 0,17, le traitement BM+I réduit donc de manière synergique la viabilité des cellules KBM-5 en induisant une mort de type apoptotique. Concernant les cellules KBM-5R les résultats indiquent qu'une augmentation de la mort par apoptose est observée lors des traitements BM+I (2,5 et 10 µM) passant de 4,4% dans le contrôle à respectivement 42,3% et 50,9% par rapport à l'imatinib à 2,5 µM (5,6%) et 10 µM (11,3%), au bortezomib (12,2%) et au MAKV-15 (10,2%) seuls et à la combinaison MAKV-15-bortezomib (29,1%).

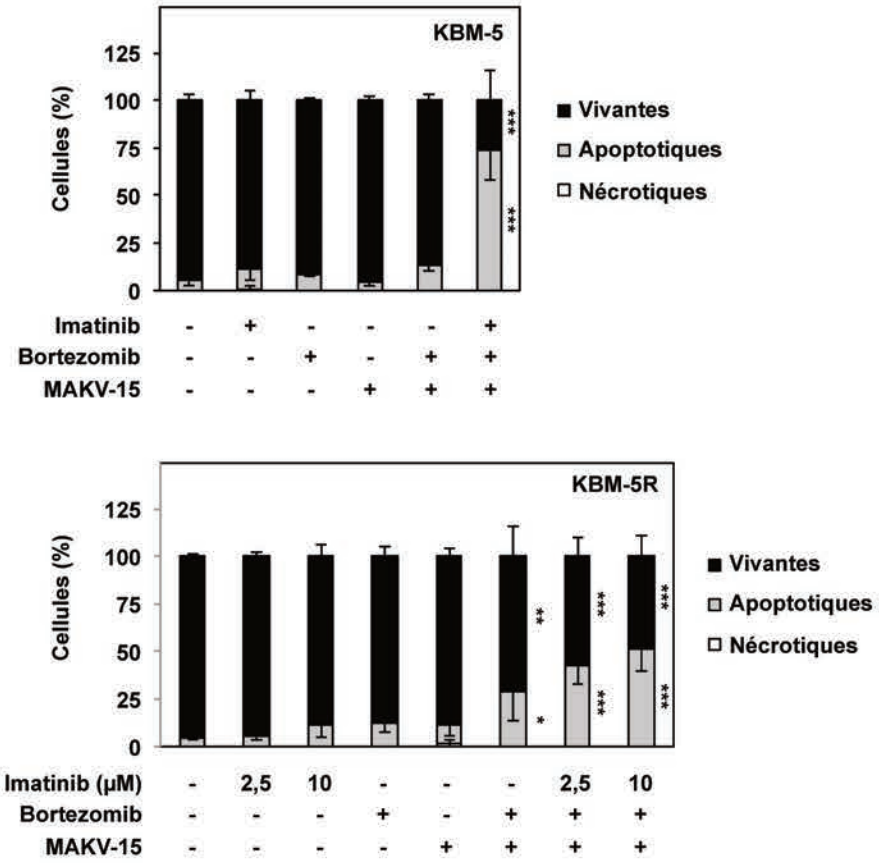


Figure 42 : Effet du traitement BM+I sur la morphologie nucléaire des cellules KBM-5 sensibles et résistantes à l'imatinib.

Les cellules KBM-5 et KBM-5R ont été traitées avec le MAKV-15 (2 µM ; 72 heures), le bortezomib (5 nM ; 72 heures) et l'imatinib (2,5 µM pour les cellules KBM-5 et 2,5 µM ou 10 µM pour les cellules KBM-5R ; 48 heures) seuls ou en combinaison bortezomib-MAKV-15 (72 heures) et traitement BM+I. L'étude de la morphologie nucléaire des cellules a été réalisée par microscopie à fluorescence. La quantification des cellules vivantes, apoptotiques et nécrotiques a été réalisée et les résultats présentés sous forme d'histogramme correspondent à la moyenne ± l'écart type de trois expériences indépendantes. L'analyse statistique a été réalisée par rapport au contrôle avec *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001.

Dans le cadre de l'étude de l'apoptose, l'effet du traitement BM+I sur l'exposition des phosphatidylsérines a également été étudié dans les cellules KBM-5 (Figure 43). Les résultats obtenus par cytométrie en flux montrent que la combinaison induit une augmentation de l'exposition des phosphatidylsérines passant de 19,4% dans le contrôle à 73,1% qui est plus importante que celle induite par l'imatinib (30,7%), le bortezomib (23,5%), et le MAKV-15 (20,3%) seuls et confirment ainsi que la mort cellulaire induite par la combinaison dans les cellules KBM-5 est de type apoptotique.

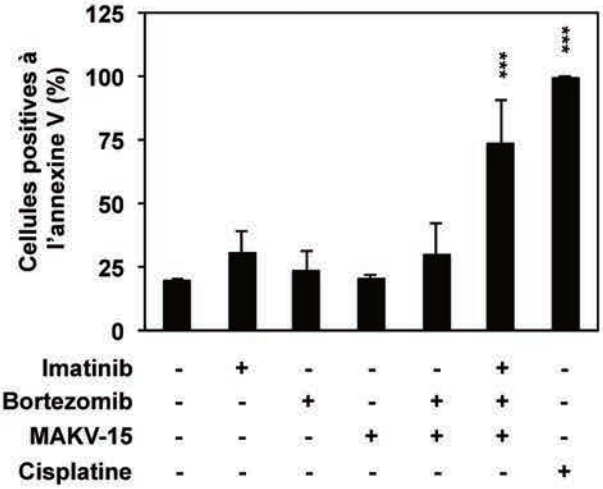


Figure 43 : Effet du traitement BM+I sur l'exposition des phosphatidylsérines dans les cellules KBM-5.

Les cellules KBM-5 ont été traitées avec le MAKV-15 (2 µM ; 72 heures), le bortezomib (5 nM ; 72 heures) et l'imatinib (2,5 µM ; 48 heures) seuls ou en combinaison bortezomib-MAKV-15 (72 heures) et traitement BM+I. Les cellules KBM-5 traitées à la cisplatine (50 µM ; 48 heures) ont été utilisées en tant que contrôle positif d'apoptose. L'exposition des phosphatidylsérines a été étudiée par cytométrie en flux. La quantification des cellules positives à l'annexine V a été réalisée et les résultats présentés sous forme d'histogramme correspondent à la moyenne ± l'écart type de trois expériences indépendantes. L'analyse statistique a été réalisée par rapport au contrôle avec ***$p<0,001$.

Afin de caractériser la voie apoptotique induite par le traitement BM+I, le clivage des caspases a été étudié (Figure 44). L'analyse par Western Blot indique que le traitement BM+I induit le clivage de PARP-1, de la caspase effectrice 3 et enfin des caspases initiatrices 8 et 9 après 48 heures de traitement, ce qui confirme l'induction de l'apoptose. Le traitement BM+I permet donc d'activer la voie extrinsèque et la voie intrinsèque.

De plus, l'analyse de l'activité des caspases 8, 9 et 3/7 dans les cellules KBM-5 traitées avec le traitement BM+I a été réalisée. Les résultats indiquent que le traitement BM+I induit une augmentation significative de l'activité des caspases 8, 9 et 3, confirmant ainsi l'implication des voies apoptotiques intrinsèque et extrinsèque dans la mort apoptotique observée dans les cellules KBM-5 après traitement BM+I (Figure 45).

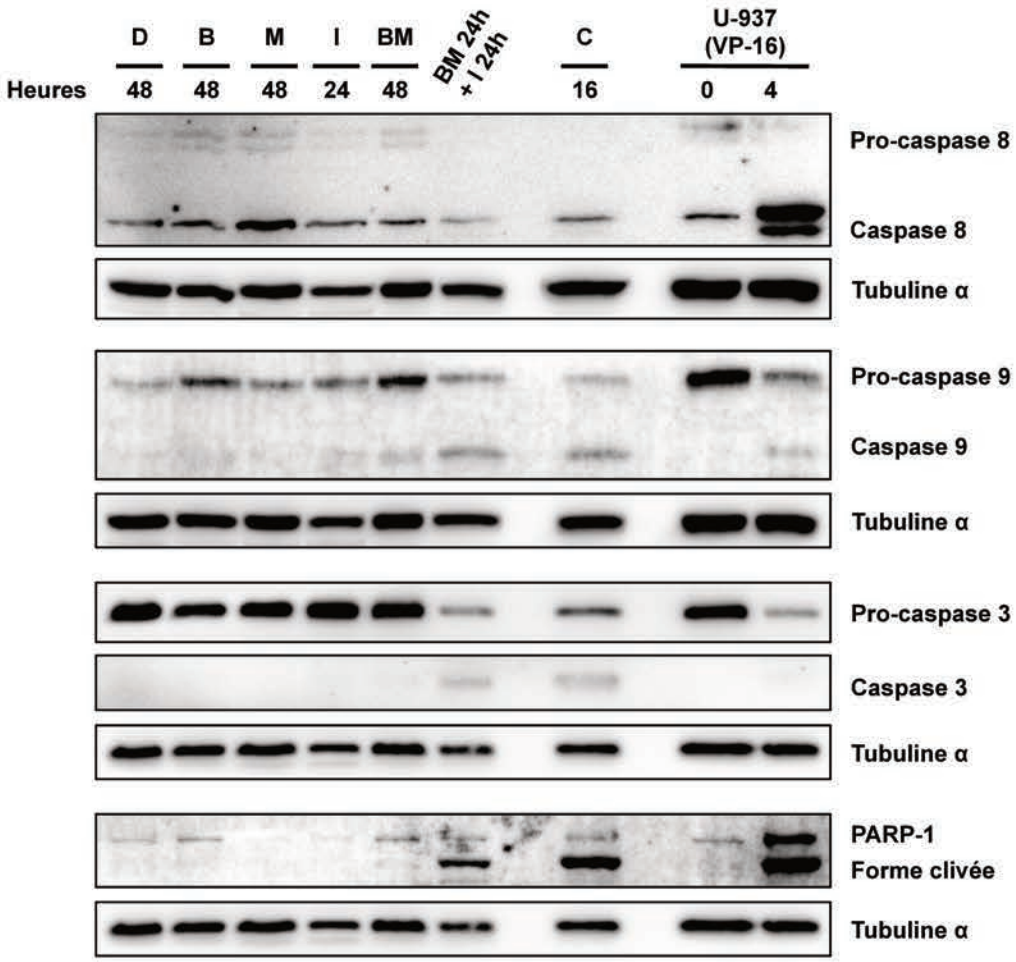


Figure 44 : Effet du traitement BM+I sur les voies apoptotiques intrinsèque et extrinsèque dans les cellules KBM-5.

Les cellules KBM-5 ont été traitées avec le MAKV-15 (2 µM), le bortezomib (5 nM) et l'imatinib (2,5 µM) seuls ou en combinaison bortezomib-MAKV-15 et traitement BM+I aux temps indiqués. Les cellules KBM-5 traitées avec 50 µM de cisplatine (C) pendant 16 heures et les cellules U-937 traitées avec 100 µM d'étoposide (VP-16) pendant 4 heures ont été utilisées comme contrôles positifs d'apoptose. Les formes entières et clivées des caspases 3, 8 et 9 et de (PARP)-1 ont été étudiées par Western Blot. La tubuline α a été utilisée en tant que contrôle de chargement. Les blots présentés sont représentatifs de trois expériences indépendantes.

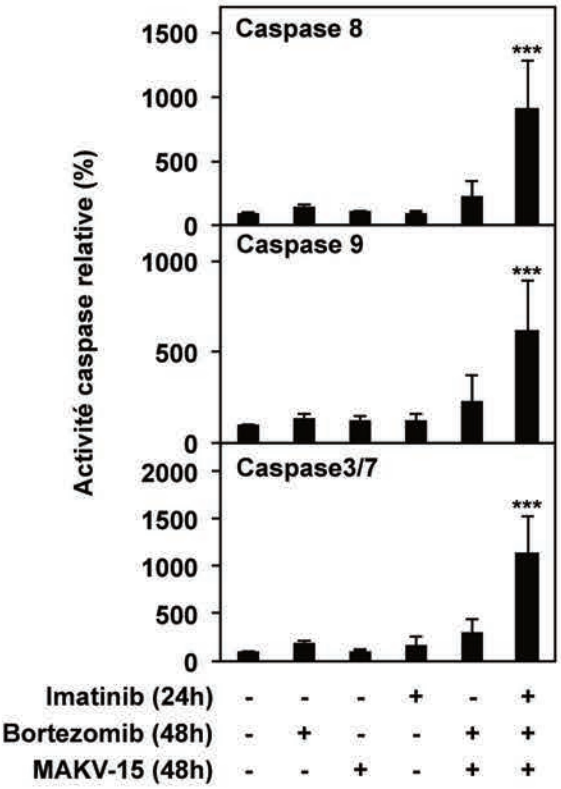


Figure 45 : Effet du traitement BM+I sur l'activité des caspases dans les cellules KBM-5.

Les cellules KBM-5 ont été traitées avec le MAKV-15 (2 µM), le bortezomib (5 nM) et l'imatinib (2,5 µM) seuls ou en combinaison bortezomib-MAKV-15 et traitement BM+I aux temps indiqués. L'évaluation de l'activité des caspases 3/7, 8 et 9 a été réalisée par mesure du signal lumineux émis après une heure d'incubation des cellules avec un substrat spécifique des caspases étudiées, suite au traitement des cellules. Les données représentées sous forme d'histogramme correspondent à la moyenne ± l'écart type de trois expériences indépendantes et l'analyse statistique a été réalisée par rapport au contrôle avec ***p<0,001.

En conclusion de cette partie :

Le MAKV-15 est un inhibiteur sélectif d'HDAC6
Le traitement BM+I induit une mort des cellules KBM-5 et KBM-5R plus importante que celle induite par les composés seuls.

Le traitement BM+I induit une mort apoptotique dans les cellules KBM-5 et KBM-5R et active les voies apoptotiques intrinsèque et extrinsèque dans les cellules KBM-5.

III. Effet du traitement BM+I sur la viabilité de cellules saines

Afin de tester l'effet du traitement BM+I sur la viabilité de cellules saines, un modèle de cellules saines non prolifératives (PBMC) et un modèle de cellules prolifératives (PBMC stimulées par la PHA et l'IL-2) ont été traités avec les composés. Les PBMC ont été traitées avec le composé MAKV-15 à des concentrations allant de 1 à 25 µM, à l'imatinib (0,25 µM),au bortezomib (10 nM), et simultanément avec le MAKV-15 (2 µM), l'imatinib (0,25 µM) et le bortezomib (10 nM). Après 48 heures de traitement l'effet des composés sur la viabilité cellulaire a été évalué avec le test d'exclusion au bleu Trypan. Les PBMC stimulées par la PHA et l'IL-2 ont été traitées avec le composé MAKV-15 à des concentrations allant de 1 à 100 µM, à l'imatinib (2,5 µM), au bortezomib (5 nM) et simultanément avec le MAKV-15 (5 µM), l'imatinib (2,5 µM) et le bortezomib (5 nM). Après 48 heures de traitement l'effet des composés sur la viabilité a été déterminé par analyse de la morphologie nucléaire et l'effet sur la prolifération cellulaire par comptage du nombre de cellules (Figure 46).

Les résultats indiquent que le MAKV-15 et l'imatinib n'ont pas d'effet sur la viabilité des PBMC tandis que le bortezomib et la combinaison n'ont qu'un faible impact sur la viabilité des PBMC induisant des diminutions respectives de 19,5 et 24,4% après 48 heures de traitement. Les composés ainsi que la combinaison n'ont pas d'effet sur la prolifération des PBMC stimulées par la PHA et l'IL-2 et bien qu'à 100 µM le composé MAKV-15 induit une forte augmentation de la mort par apoptose passant de 12,9% dans le contrôle à 75,6%, la combinaison n'a pas d'effet sur leur viabilité.

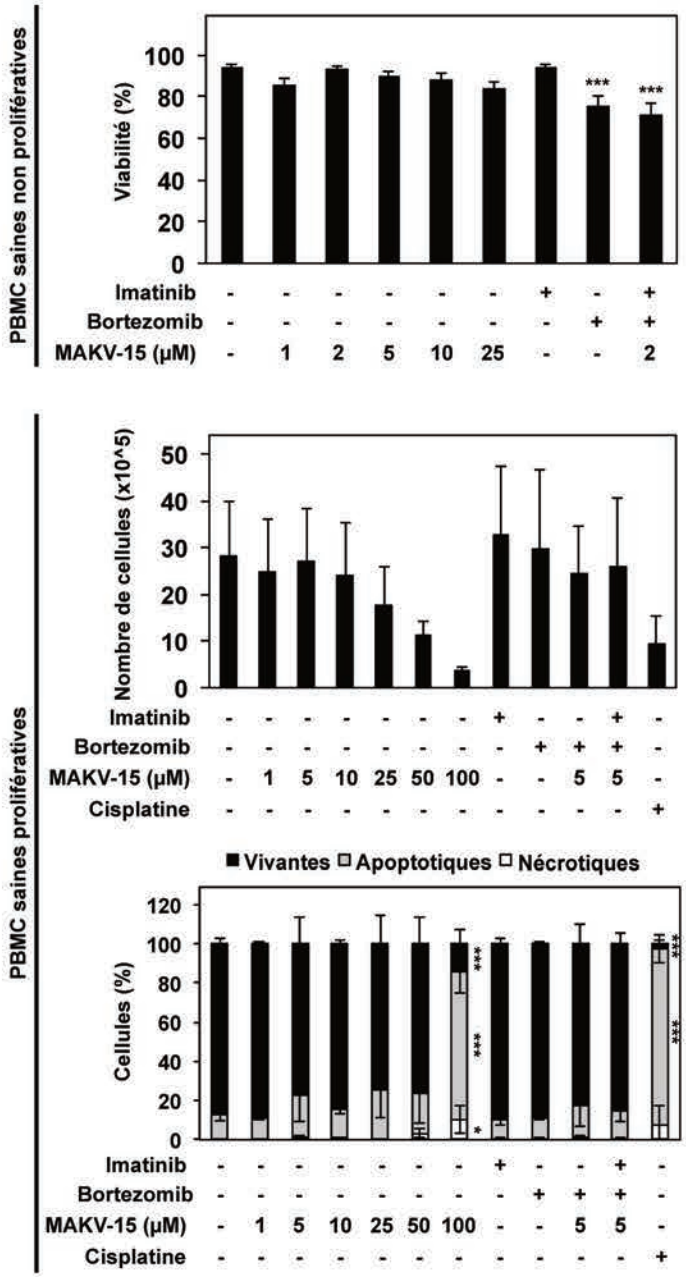


Figure 46 : Effet du MAKV-15, de l'imatinib et du bortezomib seuls ou en combinaison sur la prolifération, la viabilité et la morphologie nucléaire de cellules saines non prolifératives et prolifératives.

Les cellules saines non prolifératives (PBMC) ont été traitées avec l'imatinib (0,25 µM), le bortezomib (10 nM), le MAKV-15 aux concentrations indiquées et en combinaison MAKV-15 (2 µM)-bortezomib (10 nM)-imatinib (0,25 µM). Après 48 heures de traitement la viabilité des PBMC a été évaluée. Les PBMC stimulées par la PHA et l'IL-2 ont été traitées avec l'imatinib (2,5 µM), le bortezomib (5 nM), le MAKV-15 aux concentrations indiquées, et en combinaison MAKV-15 (5 µM)-bortezomib (5 nM)-imatinib (2,5 µM). Les cellules KBM-5 traitées avec 50 µM de cisplatine ont été utilisées comme contrôle positif d'apoptose. Après 48 heures de traitement la prolifération a été évaluée et l'étude de la morphologie nucléaire a été réalisée. Les données représentent la moyenne ± l'écart type de trois expériences indépendantes et l'analyse statistique a été réalisée par rapport au contrôle avec *$p<0,05$ et ***$p<0,001$.

De manière à comparer les résultats obtenus dans les cellules cancéreuses et dans les cellules saines, les ratios de sélectivité du traitement BM+I ont été calculés. Les résultats indiquent que le traitement BM+I présente une sélectivité pour les cellules cancéreuses KBM-5 et KBM-5R (Tableau 17).

Tableau 17 : Ratio de sélectivité du traitement BM+I pour les cellules KBM-5 sensibles et résistantes à l'imatinib par rapport à plusieurs modèles de cellules saines.

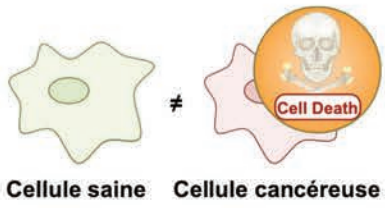
Modèles de CML	Modèles de cellules saines	Ratio de sélectivité pour le traitement BM+I*	
		2,5 µM	10 µM
KBM-5	PBMC	3,0	NA
	PBMC stimulées par la PHA et l'IL-2	31,4	NA
KBM-5R	PBMC	1,6	2
	PBMC stimulées par la PHA et l'IL-2	17,1	21

*Le ratio de sélectivité a été calculé comme suit : % de mort cellulaire dans les cellules KBM-5(R) rapporté au contrôle / % de mort cellulaire dans les cellules saines rapporté au contrôle.
IL-2 : interleukine 2 ; NA : non applicable ; PHA : phytohémagglutinine.

De manière générale le MAKV-15, le bortezomib, l'imatinib et les combinaisons induisent un effet modéré voire pas d'effet sur les cellules saines et présentent une sélectivité pour les cellules KBM-5 et KBM-5R.

En conclusion de cette partie :

Le traitement BM+I présente une sélectivité pour les cellules cancéreuses KBM-5 et KBM-5R par rapport à plusieurs modèles de cellules saines (PBMC et PBMC stimulées par la PHA et l'IL-2).



IV. Détermination du mécanisme d'action du traitement BM+I

1. Effet du MAKV-15 sur l'expression de la protéine BCR-ABL dans les cellules KBM-5

Après avoir déterminé l'effet du MAKV-15 sur différents modèles cellulaires, son mécanisme d'action est étudié. L'inhibition d'HDAC6 permettant la désacétylation d'HSP90α et ainsi pouvant provoquer la dégradation de ses protéines clientes tel que BCR-ABL nous amène à évaluer l'effet du MAKV-15 sur le niveau d'expression de BCR-ABL. Les cellules KBM-5 ont été traitées avec le MAKV-15 à une concentration de 2 µM pour une durée de 2 à 72 heures (Figure 47). Les résultats indiquent que la dégradation de BCR-ABL induite par le MAKV-15 est dépendante du temps et est marquée dès 2 heures de traitement dans les cellules KBM-5.

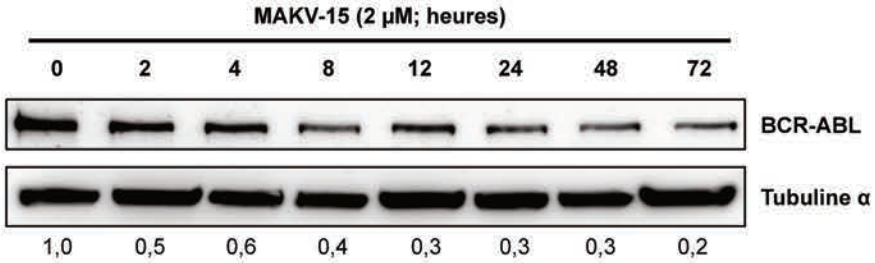


Figure 47 : Effet du MAKV-15 sur l'expression de la protéine BCR-ABL dans les cellules KBM-5.

Les cellules KBM-5 ont été traitées avec 2 µM de MAKV-15 et l'expression de BCR-ABL a été étudiée aux temps indiqués par Western Blot. La tubuline α a été utilisée comme contrôle de chargement. Les blots présentés sont représentatifs de trois expériences indépendantes. Le ratio d'intensité de la protéine d'intérêt sur le contrôle de charge est présenté sous les blots.

En conclusion de cette partie :

L'inhibition d'HDAC6 induite par le MAKV-15 dans les cellules KBM-5 induit une diminution du niveau d'expression de BCR-ABL dès 2 heures.

Partie 3 : Détermination du site catalytique ciblé par les inhibiteurs d'HDAC6

Les combinaisons incluant le composé 7b et le MAKV-15 décrites dans les parties précédentes ayant permis d'obtenir des résultats très prometteurs *in vitro*, *in cellulo* ainsi qu'*in vivo* pour le composé 7b, l'objectif de cette partie est d'étudier le mécanisme d'interaction du composé 7b et du MAKV-15 avec la protéine HDAC6. HDAC6 est le seul membre de la famille des HDAC à posséder deux sites catalytiques (SC) (Seidel *et al.*, 2015). Néanmoins, leur implication dans la désacétylation des substrats, leur sélectivité envers les substrats, ainsi que leur mécanisme d'action ne sont pas clairement déterminés. De ce fait, il semble particulièrement intéressant de déterminer si le SC1 et/ou le SC2 sont ciblés par les nouveaux inhibiteurs d'HDAC6 étudiés dans ce manuscrit.

I. Détermination du site catalytique ciblé par le composé 7b et le MAKV-15

1. Etude *in silico* de l'interaction du composé 7b avec la protéine HDAC6

Afin de mieux caractériser le composé 7b et sa capacité d'interaction avec la protéine HDAC6, une analyse *in silico* de *docking* a été réalisée entre le composé 7b et le SC2 de la protéine HDAC6 humaine. Les résultats ont montré que le composé 7b pourrait se lier à l'entrée du site de liaison du ligand avec les acides aminés Phe620 et Phe680, de manière similaire à d'autres inhibiteurs d'HDAC6 se liant au SC2 de la protéine HDAC6 du poisson zèbre (Figure 48).

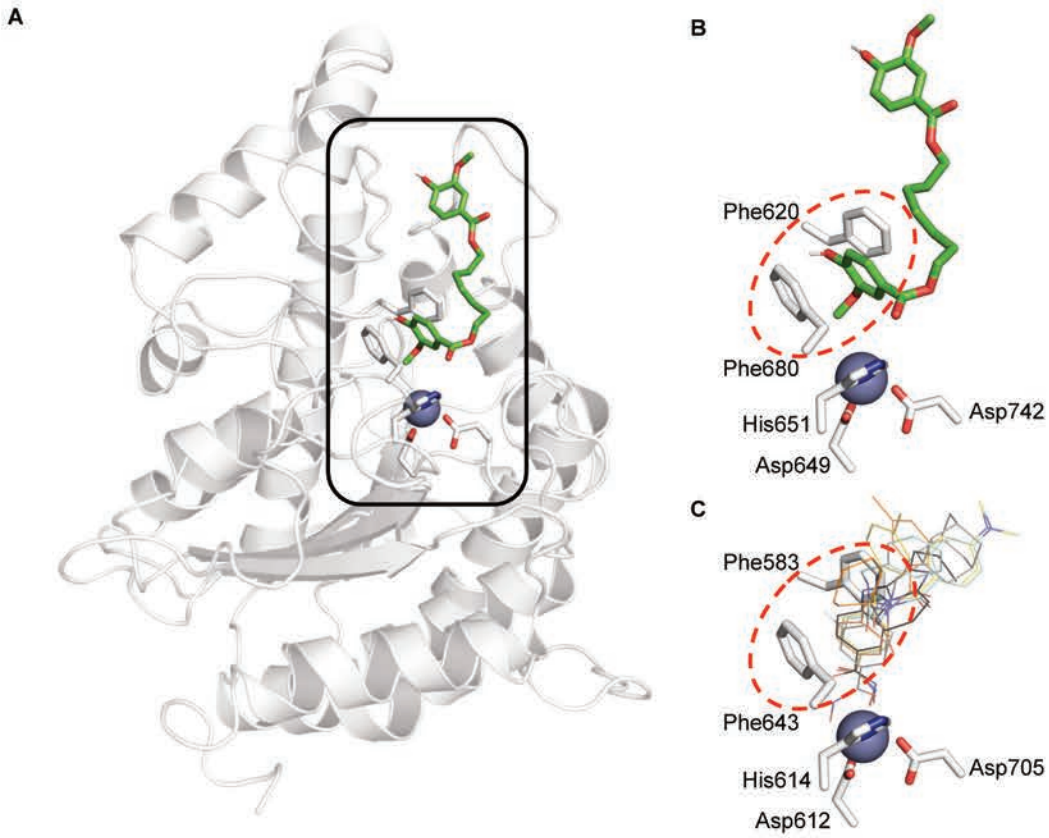


Figure 48 : Le composé 7b pourrait cibler spécifiquement le deuxième site catalytique de la protéine HDAC6.

(A) Vue globale de la protéine HDAC6 humaine (en gris clair ; code de la banque de données des protéines : 5EDU) avec le composé 7b (en vert). Le composé 7b se lie à l'entrée du site de liaison du ligand correspondant au deuxième site catalytique (SC) avec une affinité de -6,3 kcal/mol. (B) Vue rapprochée du site de liaison du ligand montrant une interaction aromatique (dans le cercle en pointillés rouges) entre les chaines latérales des acides aminés Phe620 et Phe680 et le composé 7b. Les acides aminés de l'atome de zinc (sphère violette) du SC sont également indiqués. (C) Des interactions similaires (dans le cercle en pointillés rouges) sont observées à partir de structures de la protéine HDAC6 de poisson zèbre en interaction avec des inhibiteurs d'HDAC6 de type phénylhydroxamate représentés en orange, jaune, cyan, gris et noir (codes de la banque de données des protéines respectifs : 6DVL, 6DVM, 6DVN, 6DVO et 6CGP).

2. Étude *in cellulo* de l'interaction du composé 7b et du MAKV-15 avec le/les site(s) catalytique(s) de la protéine HDAC6

Les résultats obtenus *in silico* indiquent que le composé 7b cible le SC2 de la protéine HDAC6. Pour tester cette hypothèse une étude de l'interaction du composé 7b et du MAKV-15 avec le SC1 et/ou le SC2 a été réalisée *in cellulo*. Dans ce but, nous avons voulu étudier l'activité HDAC de protéines HDAC6 sauvages et mutées (Figure 12) au niveau du SC1 (H216A), du SC2 (H611A) et des deux SC (H216A/H611A), préalablement transfectées dans

des cellules, puis immunoprécipitées et enfin traitées avec les inhibiteurs d'HDAC6, dans le but de déterminer si ces derniers peuvent inhiber l'activité d'un des SC ou des deux SC.

Dans cette optique, les cellules K-562 ont donc été transfectées avec les plasmides d'expression des protéines HDAC6 sauvage et mutées marquées par FLAG. Afin de s'assurer de la surexpression des protéines HDAC6, les protéines marquées FLAG ont été immunoprécipitées et enfin l'expression d'HDAC6 a été étudiée par Western Blot. Des protéines HDAC6 immunoprécipitées à partir de cellules non transfectées sont utilisées en tant que contrôle positif (Figure 49A).

Dans le but de déterminer l'activité désacetylase de chacun des SC d'HDAC6, les protéines HDAC6 marquées FLAG, ainsi que les protéines HDAC6 issues de cellules non transfectées, et préalablement immunoprécipitées ont été soumises à une mesure d'activité HDAC réalisée avec le substrat Fluor de Lys SIRT1 (Figure 49B). Les résultats montrent qu'une activité n'a été détectée que pour les protéines HDAC6 marquées FLAG sauvages et H216A, ainsi que pour le contrôle positif.

La mesure d'activité HDAC a également été réalisée avec un autre substrat, le Fluor de Lys H4-AcK16 (Figure 49C). De la même manière, une activité désacétylase n'a été détectée que pour les protéines HDAC6 marquées FLAG sauvages et H216A, ainsi que pour le contrôle positif.

A la vue des résultats obtenus avec les substrats Fluor de Lys SIRT1 et Fluor de Lys H4-AcK16, seul le SC2 d'HDAC6 possède une activité désacétylase dans le cadre de cette expérience et de ce fait, dans ces conditions expérimentales, le composé 7b et le MAKV-15 ne pourraient avoir une action que sur ce dernier.

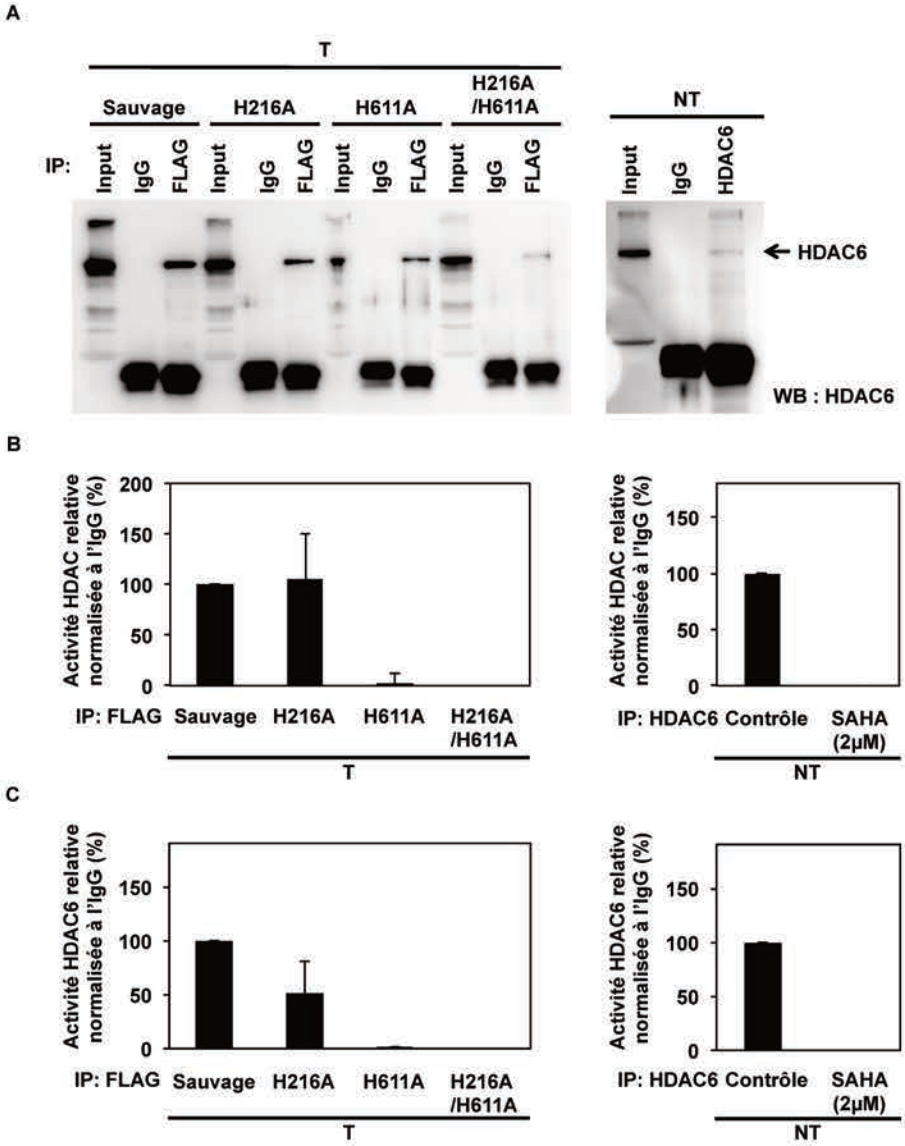


Figure 49 : Mesure de l'activité désacetylase des différentes formes de protéines HDAC6 sauvages et mutées surexprimées dans les cellules K-562.

Les cellules K-562 ont été transfectées avec les plasmides d'expression de la protéine HDAC6 sauvage ou mutée pour le premier site catalytique (H216A), le deuxième site catalytique (H611A) ou les deux (H216A/H611A). 24 heures post-transfection, les protéines HDAC6 des cellules transfectées (T) ont été immunoprécipitées (IP) grâce à un anticorps reconnaissant la séquence tag-FLAG des plasmides. Les protéines HDAC6 immunoprécipitées à partir de cellules non transfectées (NT) sont utilisées en tant que contrôle positif pour l'expression et l'activité HDAC. (A) Le niveau d'expression d'HDAC6 a été étudié par Western Blot afin de s'assurer de la surexpression des différents mutants d'HDAC6. Pour chaque échantillon, un input est utilisé comme contrôle positif et une IgG de l'hôte de l'anticorps servant à l'immunoprécipitation est utilisé comme contrôle négatif. L'activité HDAC de ces protéines immunoprécipitées a été étudiée par fluorescence avec les substrats (B) Fluor de Lys SIRT1 et (C) Fluor de Lys H4-AcK16. Le SAHA a été utilisé en tant que contrôle positif d'inhibition. Les données ont été normalisées à l'IgG. Les données représentées sous forme d'histogramme correspondent à la moyenne ± l'écart type de deux (C) et trois expériences indépendantes (B).

En conclusion de cette partie :

Selon l'étude de *docking* réalisée *in silico* le composé 7b pourrait se lier au SC2 de la protéine HDAC6.

Seul le deuxième SC est responsable de l'activité HDAC lors de l'utilisation des substrats Fluor de Lys SIRT1 et Fluor de Lys H4-AcK16.

Discussion

Nouvelles approches thérapeutiques

Depuis une quinzaine d'années les ITK sont utilisés en monothérapie pour le traitement de la LMC. Malgré un engouement pour ces nouveaux traitements permettant une thérapie ciblée par voie orale et des résultats prometteurs, ces traitements ne permettent pas une rémission complète de la pathologie. De plus, des phénomènes de résistances apparaissent chez les patients traités par les trois générations d'ITK et de nombreux effets secondaires tels que fatigue, maux de tête, anémies, myalgies y sont associés ainsi qu'une toxicité pour certains organes comme le foie ou le cœur (Apperley, 2015). C'est pourquoi l'administration simultanée de plusieurs médicaments, permettant donc de multiplier les cibles et ainsi de palier au problème de résistances, semble être une approche prometteuse pour le traitement de la LMC. Plusieurs études ont montré que la combinaison de l'imatinib et d'un inhibiteur d'HDAC pouvait être intéressant pour le traitement de la LMC car d'une part elle induit l'apoptose des CSL quiescentes non éliminées par traitement à l'imatinib seul (O'Hare *et al.*, 2011) ; d'autre part, des chercheurs ont montré que la surexpression des HDAC de classe I et III entrainait le développement de résistances à l'imatinib (Bixby *et al.*, 2009). De plus, le co-traitement, d'un inhibiteur multi-kinase, le composé KW-2449 avec l'inhibiteur pan-HDAC, le SAHA, un hydroxamate tout comme la tubacine, montre également des résultats synergiques sur la réduction de la viabilité des cellules K-562 (Nguyen *et al.*, 2011). De plus en plus de traitements combinant des inhibiteurs d'HDAC avec un inhibiteur du protéasome, le bortezomib, sont testés en essais cliniques, principalement dans le cadre du myélome multiple (Zhou *et al.*, 2015a). Cependant les inhibiteurs pan-HDAC, de par le nombre important de protéines ciblées et ainsi leur manque de spécificité, sont responsables de nombreux effets secondaires tels que thrombocytopénie, neutropénie, anémie, fatigue, diarrhée et même toxicité cardiaque (Cosenza *et al.*, 2018). De ce fait, le ciblage d'un membre spécifique de la famille des HDAC semble plus opportun en vue d'un co-traitement. L'inhibition combinée de BCR-ABL et d'HDAC6 apparait comme étant particulièrement intéressante. En effet, la protéine HDAC6 est responsable du statut d'acétylation de la protéine HSP90α. Sous sa forme acétylée, HSP90α ne peut plus exercer son rôle de protéine chaperonne et ses protéines clientes telles que BCR-ABL, sont alors dégradées. Il est important de préciser qu'aucune étude n'a, à ce jour, été publiée sur le potentiel anti-cancéreux de co-traitements imatinib-inhibiteurs d'HDAC6 dans les CML. Cette nouvelle

approche thérapeutique pourrait permettre de pallier aux problèmes de résistances rencontrés avec les ITK.

Potentiels pharmacologiques des composés 7b et MAKV-15

Le composé 7b est un di-vanillate dérivé de l'acide 4-hydroxybenzoïque synthétisé par Lamoral-Theis *et al.* (Lamoral-Theys *et al.*, 2010), et le MAKV-15 est un dérivé de la tubastatine A synthétisé par Butler *et al.* (Butler *et al.*, 2010) (Figure 15). **L'étude de leur potentiel pharmacologique *in silico* a montré que les composés avaient de bonnes prédispositions pour une administration par voie orale bien que le composé 7b pourrait se lier aux protéines plasmatiques et que les composés pourraient entrainer un risque de toxicité cardiaque** (Tableau 12 et Tableau 15).

Étude de l'effet anti-cancéreux du composé 7b en combinaison avec l'imatinib

L'étude du composé 7b *in cellulo* a montré que ce composé, qui affiche des similarités structurales avec la curcumine, un polyphénol naturel étudié pour son potentiel anti-cancéreux (Lamoral-Theys *et al.*, 2010), a en effet présenté des propriétés anti-cancéreuses sur des lignées cellulaires de cancer de la prostate (Seidel *et al.*, 2016) *via* l'inhibition sélective d'HDAC6 conduisant à la diminution de l'expression des récepteurs aux androgènes médiée par l'hyperacétylation d'HSP90α. La protéine BCR-ABL étant également une protéine cliente d'HSP90α, nous avons émis l'hypothèse que le composé 7b pouvait induire la dégradation de BCR-ABL dans les lignées de LMC en les sensibilisant à l'imatinib.

Les résultats ont effectivement montré que le composé 7b diminue fortement l'expression de la protéine BCR-ABL (Figure 34) **et induit un effet synergique sur la réduction de la viabilité des cellules de LMC en combinaison avec l'imatinib** (Figure 19 et Figure 20) **alors qu'il n'a qu'un faible impact sur différents modèles de cellules saines** (Figure 33).

L'hyperacétylation robuste et rapide de la tubuline α, un substrat cytoplasmique d'HDAC6, induite par le composé 7b sans affecter l'acétylation de l'histone H4, non ciblé par HDAC6 dans trois lignées de LMC (Annexe 3 et Figure 27) confirme les résultats précédemment obtenus dans des cellules cancéreuses de prostate (Seidel *et al.*, 2016). De plus, les résultats montrent que dans les cellules K-562 le composé 7b augmente l'ubiquitination de la protéine BCR-ABL entrainant sa dégradation suite à l'hyperacétylation d'HSP90α induite par l'inhibition d'HDAC6 par le composé 7b (Figure 34), comme

démontré précédemment dans les cellules cancéreuses de la prostate, dans lesquelles il induit la dégradation des récepteurs aux androgènes dont la régulation est également dépendante d'HSP90α. En effet, la régulation de la dégradation de BCR-ABL *via* l'acétylation d'HSP90α est bien connue et décrite pour des inhibiteurs pan-HDAC, ciblant l'activité de toutes les HDAC et notamment HDAC6, comme LBH589 (Rao *et al.*, 2008).

La diminution d'expression de la protéine BCR-ABL induite par le composé 7b est plus importante en combinaison avec l'imatinib et conduit à une importante diminution de la phosphorylation de BCR-ABL. **La combinaison imatinib-7b altère de manière cohérente l'expression ou la phosphorylation de protéines dépendantes de BCR-ABL impliquées dans la prolifération et la survie des cellules cancéreuses** (Figure 35). Par exemple, Mcl-1, un membre de la famille anti-apoptotique Bcl-2, est une cible de STAT-5 et de BCR-ABL et est connu pour être l'un des régulateurs clé de l'auto-renouvellement des cellules souches cancéreuses et de ce fait joue un rôle dans la survie cellulaire et la résistance du cancer (De Blasio *et al.*, 2018). De ce fait, la forte diminution d'expression de Mcl-1 observée après le traitement imatinib-7b (Figure 35) pourrait en partie expliquer l'augmentation synergique de la mort apoptotique observée dans les cellules K-562. De façon similaire, une réduction synergique de la viabilité a été observé dans des cellules de leucémie lymphocytaire chronique, un type de leucémie BCR-ABL$^-$ surexprimant HDAC6, après traitement avec un inhibiteur d'HDAC6 en combinaison avec l'ibrutinib, le traitement de référence pour cette pathologie (Maharaj *et al.*, 2018).

De plus, Abraham et ses collaborateurs ont montré que le ciblage simultané de c-Myc et p53 permet d'éliminer les cellules souches leucémiques de façon spécifique (Abraham *et al.*, 2016). En outre, il est maintenant bien établi dans la littérature que les cellules K-562 présentent une mutation inactivatrice du gène p53 (Law *et al.*, 1993). Ainsi, la diminution drastique de c-Myc et Mcl-1 induite après traitement avec la combinaison imatinib-7b dans les cellules K-562 (Figure 35) pourrait expliquer la diminution des cellules ALDH$^+$ observée après traitement avec la combinaison (Figure 26). **Nous avons également démontré dans cette étude que l'imatinib et plus généralement les ITK diminuent les niveaux d'expression d'ARNm de la protéine HDAC6** (Figure 25). Bien que basée sur un nombre limité de données de patients atteints de LMC dû à un nombre restreint de données publiques concernant ces patients, ces analyses informatiques sont en accord avec les résultats obtenus par Bamodu *et al.*, montrant que l'imatinib diminue l'expression de la protéine HDAC6 dans des cellules K-562 CD34$^+$ CD38$^-$ après 24 heures de traitement (Bamodu *et al.*, 2018). **Nos**

résultats ainsi que ceux de Bamodu *et al.* montrant que la protéine HDAC6 est surexprimée dans les CSL (Bamodu *et al.*, 2018) peuvent expliquer la faible diminution de la proportion de cellules $ALDH^+$ observée après traitement à l'imatinib (Figure 26). **Dans ce contexte, l'utilisation d'un inhibiteur d'HDAC6 tel que le composé 7b en combinaison avec l'imatinib peut être une stratégie intéressante pour cibler les CSL, ce qui est conforté par les résultats obtenus sur les cellules K-562 $ALDH^+$ après traitement avec la combinaison imatinib-7b** (Figure 26).

Comparaison des combinaisons imatinib-7b et imatinib-tubacine

De manière générale, la combinaison imatinib-7b induit de meilleurs résultats que la combinaison imatinib-tubacine. Bien que la tubacine soit fréquemment utilisée comme un inhibiteur d'HDAC6 de référence *in vitro* et possède une bonne sélectivité *in cellulo*, sa synthèse n'en reste pas moins laborieuse et sa taille importante ainsi que sa lipophilie élevée lui confèrent des propriétés médicamenteuses peu favorables (Tableau 12). Ces paramètres empêchent son utilisation en clinique et pourraient expliquer les divergences de résultats observées entre ces deux inhibiteurs d'HDAC6.

Effet anti-cancéreux de la combinaison imatinib-7b dépendant de la lignée de LMC étudiée

Étonnamment la combinaison imatinib-7b n'induit pas de réduction de la viabilité synergique dans deux autres lignées de LMC, les KBM-5 et les MEG-01 (Figure 31 et Figure 32), **cependant la combinaison de l'imatinib avec l'inhibiteur de référence, la tubacine, n'en induit pas non plus.** Ces différences de résultats peuvent dépendre des lignées cellulaires elles-mêmes. En effet, bien que ces trois lignées proviennent de patients atteints de LMC en phase blastique, les cellules K-562 sont engagées dans la voie de différentiation érythroïde, les cellules KBM-5 dans la voie monocytaire et enfin les cellules MEG-01 dans la voie mégacaryocytaire (Drexler *et al.*, 1999).

De plus, **il semble important de préciser que bien que les trois lignées possèdent le chromosome de Philadelphie, elles n'expriment pas le même transcrit *BCR-ABL*.** En effet, les cellules K-562 et KBM-5 possèdent le transcrit b3a2, c'est à dire un point de cassure après l'exon 14 de *BCR* et avant l'exon 2 de *ABL*, tandis que les cellules MEG-01 possèdent le transcrit b2a2, soit un point de cassure après l'exon 13 de *BCR* et avant l'exon 2 de *ABL* (Figure 4). Il a été montré que le type de transcrit exprimé ainsi que le genre du patient

pouvaient prédire la réponse à l'imatinib. En effet Lin *et al*. ont montré que les hommes traités à l'imatinib exprimant le transcrit b2a2 pouvaient avoir besoin d'une thérapie alternative du fait de leur réponse moins favorable à l'imatinib par rapport aux patients possédant le transcrit b3a2 (Lin *et al.*, 2016). En outre des résultats ont montré que les patients possédant le transcrit b3a2 obtenaient un taux de rémission plus élevé (Jain *et al.*, 2016; Claudiani *et al.*, 2017).

Ces données pourraient expliquer pourquoi la combinaison n'induit pas de réduction de viabilité synergique dans les cellules MEG-01 isolées chez un homme possédant le transcrit b2a2 par rapport aux cellules K-562 isolées chez une femme possédant le transcrit b3a2. Cependant d'autres études ont montré qu'il n'y avait pas d'implication du type de transcrit de BCR-ABL sur le pronostic (Azad *et al.*, 2018), et que les patients exprimant le transcrit b2a2 réagissaient mieux à l'imatinib que ceux exprimant b3a2 (de Lemos *et al.*, 2005). L'implication du type de transcrit sur la réponse du patient à l'imatinib reste donc incertaine et nécessite des investigations complémentaires.

Enfin, nous avons montré que les cellules KBM-5 possèdent un taux d'expression d'HDAC6 plus faible que les cellules K-562 et MEG-01, ce qui pourrait expliquer que l'effet des combinaisons dans ces cellules ne soit pas similaire à celui observé dans les cellules K-562 (Annexe 4).

D'après les données de Lee *et al*., les cellules K-562 résistantes à l'imatinib développées par son équipe présentent des niveaux d'expression de la protéine HDAC6 plus faibles que ceux des cellules K-562 sensibles à l'imatinib (Lee *et al.*, 2007). Néanmoins, en accord avec les résultats obtenus *in cellulo*, nous avons également montré que le composé 7b en combinaison avec l'imatinib est capable de réduire la formation tumorale de cellules K-562 sensibles et résistantes à l'imatinib xénogreffées sur un modèle de poisson zèbre (Figure 37), démontrant ainsi l'efficacité de l'inhibition d'HDAC6 couplée à celle de BCR-ABL dans des cellules K-562 sensibles et résistantes.

Étude de l'effet anti-cancéreux du MAKV-15 selon le protocole de traitement

L'étude du MAKV-15 *in cellulo* a montré que ce composé a une action inhibitrice d'HDAC6 par l'hyperacétylation de la tubuline α induite dès 0,5 µM sans affecter l'acétylation de l'histone H4 dans les cellules KBM-5 (Figure 38). De plus, **le MAKV-15 diminue l'expression de la protéine BCR-ABL** (Figure 47) **et lors du traitement BM+I, il induit un effet synergique sur la réduction de viabilité des cellules KBM-5 en induisant**

une mort apoptotique dépendante des caspases (Figure 44, Figure 45). **Enfin, le traitement BM+I permet également de re-sensibiliser les cellules KBM-5R à l'imatinib** (Figure 42). Le traitement BM+I (10 µM) est plus efficace que le traitement BM+I (2,5 µM) bien que ce dernier soit suffisant pour induire un effet plus important sur la viabilité des cellules KBM-5R que chacun des composés seuls (Figure 42).

Concentrations en inhibiteurs d'HDAC6 utilisées pour les traitements

Le composé 7b, le MAKV-15 et la tubacine sont utilisés en tant qu'inhibiteurs d'HDAC6 à des concentrations respectivement de 50, 2 et 1,5 µM, le composé 7b semble donc être un inhibiteur d'HDAC6 moins puissant que le MAKV-15 et que la tubacine (Figure 17). **Cependant il entraine une réduction de viabilité synergique plus importante en co-traitement avec l'imatinib dans les cellules K-562 que la tubacine** (Figure 20). Une concentration de 50 µM peut paraître haute dans le contexte actuel. En effet les industries pharmaceutiques cherchent à utiliser des molécules actives à des concentrations de l'ordre du nanomolaire, néanmoins, beaucoup de molécules actives à de fortes concentrations sont actuellement présentes sur le marché telles que l'hydroxyurée, le fluorouacil ou l'ifosfamide (Liston *et al.*, 2017). En outre, le composé 7b utilisé seul ou en combinaison présente une sélectivité pour les cellules cancéreuses par rapport aux cellules saines avec des ratios de sélectivité compris entre 4 et 122 (Tableau 14).

Détermination du site catalytique ciblé par les inhibiteurs d'HDAC6

Des contradictions existent toujours concernant le rôle spécifique de chacun des SC de la protéine HDAC6. Certaines équipes ont montré que les deux SC ainsi que leur arrangement spatial étaient nécessaires pour que la protéine HDAC6 soit active et puisse désacétyler la tubuline α, son principal substrat (Zhang *et al.*, 2006). Cependant Haggarty *et al.* ont montré que seul le deuxième SC était nécessaire à la désacétylation de la tubuline α. Ces mêmes auteurs ont montré que la tubacine ciblait spécifiquement le deuxième SC de la protéine HDAC6 (Haggarty *et al.*, 2003).

Dans ce contexte, une analyse de *docking* a été réalisée dans la troisième partie de ce manuscrit. **Les résultats montrent que bien que le composé 7b possède des extrémités imposantes vanillate pouvant créer un encombrement stérique, il pourrait se lier au SC2 de la protéine HDAC6 *via* les acides aminés Phe620 et Phe680.** Dans le même contexte il a été montré que l'inhibiteur d'HDAC6 HPOB qui possède également une extrémité imposante

se lie au zinc grâce à une liaison unique. L'affinité d'interaction du HPOB avec la protéine HDAC6 n'est donc pas plus importante que celle générée par le SAHA mais son affinité de liaison pour les autres protéines HDAC est bien plus faible (Hai *et al.*, 2016).

Afin de valider les résultats obtenus, nous avons souhaité tester par la suite l'activité des différents SC de la protéine HDAC6. Nos résultats montrent que seules les protéines immunoprécipitées à partir des cellules K-562 transfectées avec les plasmides HDAC6 sauvage et H216A possèdent une activité HDAC6 avec les substrats Fluor de Lys SIRT1 et H4-AcK16 (Figure 49). Ces résultats montrent que seul le SC2 de la protéine HDAC6 lui confère son activité lors de l'utilisation des substrats Fluor de Lys SIRT1 et H4-AcK16. Haggarty *et al.* en utilisant les mêmes plasmides mais dans les cellules JURKAT ont montré des résultats similaires avec l'utilisation de la tubuline α acétylée en tant que substrat, montrant ainsi, comme vu précédemment, que seul le SC2 est nécessaire à la désacétylation de la tubuline α (Haggarty *et al.*, 2003). Une autre équipe ayant utilisé des plasmides HDAC6 sauvage et mutés au niveau des histidines 193 au niveau du SC1 et 574 au niveau du SC2, a montré que le SC1 possédait une activité HDAC faible mais mesurable (Miyake *et al.*, 2016).

Le composé 7b et le MAKV-15, deux inhibiteurs d'HDAC6 induisant une augmentation de l'acétylation de la tubuline α, ciblent par conséquent très probablement le deuxième site catalytique de la protéine HDAC6, seul SC à posséder une activité HDAC lors de l'utilisation des substrats Fluor de Lys SIRT1 et H4-AcK16. Il est néanmoins possible que les résultats divergent en fonction des substrats utilisés et du réarrangement spatial de la protéine HDAC6 dont l'hélice H25 du SC2 a montré jouer un rôle critique dans la reconnaissance des substrats (Miyake *et al.*, 2016). Rappelons que ces expériences sont réalisées *in vitro* et nécessitent de plus amples investigations.

D'après nos connaissances notre étude est la première à relater des effets anti-cancéreux prometteurs de la combinaison d'un ITK et d'un inhibiteur d'HDAC6 à l'encontre de cellules de LMC incluant les cellules souches leucémiques et en particulier son potentiel à surmonter la résistance aux ITK *in vivo* dans le cas de l'étude du composé 7b.

Conclusions et perspectives

I. Conclusions et perspectives de l'étude du composé 7b

Dans la première partie du manuscrit, il a été montré que le composé 7b inhibe de façon spécifique HDAC6 dans différents modèles cellulaires de LMC et qu'il remplit les conditions nécessaires pour une bonne administration par voie orale. L'inhibition d'HDAC6 par le composé 7b stimule l'ubiquitination de BCR-ABL dès 30 minutes de traitement dans les cellules K-562 et est suivie de la diminution de son niveau d'expression protéique dès 2 heures de traitement sans affecter son expression d'ARNm**.** En combinaison avec l'imatinib, le composé 7b induit un effet synergique sur la réduction de la mort des cellules K-562 plus important que celui induit par la combinaison de l'imatinib et d'un inhibiteur d'HDAC6 de référence (tubacine) et présente une bonne sélectivité pour les cellules cancéreuses par rapport à différents modèles de cellules saines. De plus, la combinaison imatinib-7b induit une diminution du pourcentage de cellules $ALDH^+$ contrairement à la combinaison imatinib-tubacine. Cependant les deux autres lignées de LMC (les cellules KBM-5 et MEG-01) ne présentent pas de réduction synergique de viabilité. D'un point de vue mécanistique, le composé 7b semblerait cibler le SC2 d'HDAC6 et en combinaison avec l'imatinib, il induit une mort cellulaire de type apoptotique dépendante des caspases et active les voies apoptotiques intrinsèque et extrinsèque. De plus, la combinaison imatinib-7b induit une diminution de l'expression des protéines Mcl-1, c-Myc, STAT5 et de la phosphorylation de la protéine BCR-ABL par rapport aux traitements avec les composés seuls. Enfin, la combinaison imatinib-7b diminue la capacité des cellules K-562 à former des colonies en milieu semi-solide et réduit la formation tumorale *in vivo* (Figure 50).

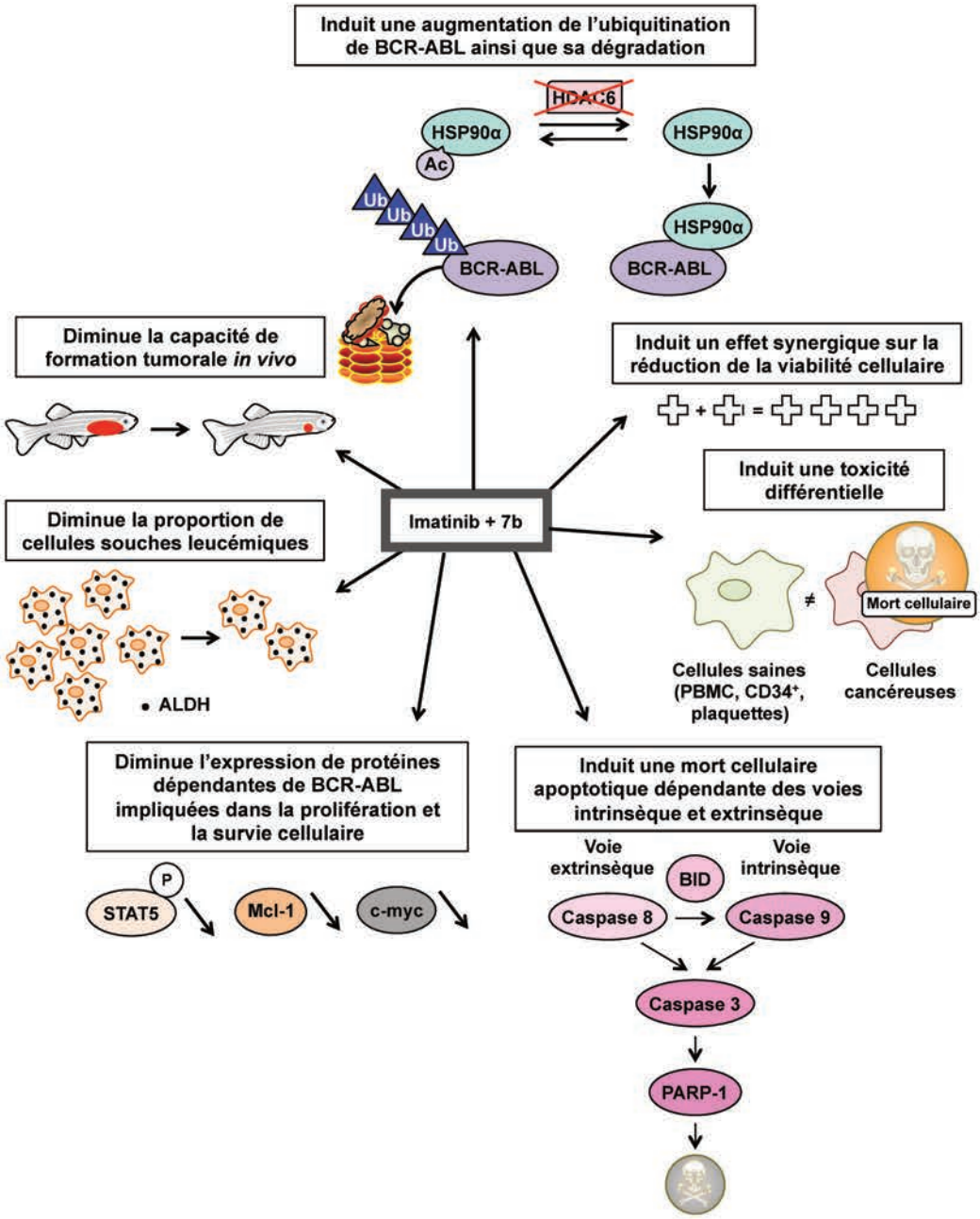


Figure 50 : Schéma récapitulatif des effets de la combinaison imatinib-7b dans les cellules K-562.

La combinaison imatinib-7b induit une augmentation de l'ubiquitination de BCR-ABL ainsi que sa dégradation, ce qui entraine la diminution de l'expression de protéines impliquées dans la prolifération et la survie cellulaire qui lui sont dépendantes. La combinaison a un effet synergique et sélectif sur la réduction de la viabilité des cellules cancéreuses K-562 par rapport aux cellules saines. La mort cellulaire induite est de type apoptotique et est dépendante des voies apoptotiques intrinsèque et extrinsèque. Enfin, la combinaison imatinib-7b induit la diminution de la proportion de cellules souches ainsi que la capacité de formation tumorale *in vivo*. Ac : acétyl ; ALDH : aldéhyde déshydrogénase ; BCR-ABL : *breakpoint cluster region-Abelson* ; BID : *BH3 interacting-domain death agonist* ; CD : cluster de différenciation ; HDAC : désacétylase d'histone ; HSP : *heat shock protein* ; Mcl-1 : *myeloid cell leukemia 1* ; P : phosphate ; PARP : poly(ADP-ribose) polymérase ; PBMC : *peripheral blood mononuclear cell* ; STAT : *signal transducer and activator of transcription.*

Afin de parfaire l'étude réalisée sur le composé 7b, des expériences supplémentaires peuvent être réalisées.

Parmi les protéines clientes d'HSP90α se trouve BCR-ABL, le récepteur aux androgènes comme vu précédemment (Seidel *et al.*, 2016), mais également HER2 (Oh *et al.*, 2017), qui est surexprimée dans certains types de cancer du sein (Figueroa-Magalhaes *et al.*, 2014). Il serait donc intéressant de tester l'effet du composé 7b en combinaison avec une molécule utilisée pour traiter ce type de cancer comme par exemple le trastuzumab.

Le composé 7b devrait également être testé en combinaison avec d'autres ITK tel que le ponatinib et testé dans ce cas précis dans les cellules KBM-5 exprimant la mutation T315I spécifiquement ciblé par cet ITK afin d'évaluer sa capacité à prévenir le développement de résistance. Le composé 7b pourrait également être combiné aux traitements de première intention de tous les cancers présentant une surexpression de la protéine HDAC6 afin d'en diminuer les concentrations d'utilisation et ainsi les effets secondaires. Par exemple, le composé 7b pourrait être combiné à l'ibrutinib dans le cadre de la leucémie lymphocytaire chronique surexprimant HDAC6 (Maharaj *et al.*, 2018) De la même façon, une combinaison au composé asciminib, un inhibiteur allostérique de BCR-ABL récemment synthétisé (Westerweel *et al.*, 2019) pourrait être intéressante dans le cadre de la LMC. Etudier l'effet du composé 7b en combinaison avec un inhibiteur du protéasome pour le traitement du myélome multiple pourrait également s'avérer être intéressant. En effet le myélome multiple est caractérisé par une importante synthèse protéique entrainant un stress du réticulum endoplasmique qui induit une importante dégradation des protéines mal repliées par le protéasome. Suite à un traitement par inhibiteur de protéasome les protéines sont dégradées par les autophagolysosomes *via* l'autophagie, voie dans laquelle intervient HDAC6. Ainsi la combinaison d'inhibiteur d'HDAC6 et d'inhibiteur du protéasome a déjà montré entrainer une activité anti-cancéreuse synergique dans des cellules de myélome multiple (Cosenza *et al.*, 2018 ; Imai *et al.*, 2019).

L'insensibilité des CSL aux ITK, de même que leur capacité à induire une rechute de la maladie, font des CSL des cellules particulièrement étudiées et dont le ciblage s'avère important pour garantir l'éradication de la pathologie. Un nombre croissant d'études porte sur la détermination de marqueurs spécifiques des CSL. Les antigènes de surface spécifiquement exprimés sur ces cellules représentent des cibles moléculaires immunologiques pertinentes dans le cadre du traitement de la LMC (Valent *et al.*, 2019). Il serait intéressant d'étudier la capacité du composé 7b à inhiber les points de contrôle réprimant la réponse immunitaire

ainsi qu'à stimuler ceux l'activant ; de même que sa capacité à restaurer l'expression d'antigènes associés aux tumeurs ou celle de gènes liés au complexe majeur d'histocompatibilité de classe I et II (Schnekenburger *et al.*, 2019) de manière à étudier son potentiel à améliorer la reconnaissance des cellules cancéreuses par le système immunitaire. L'évaluation du potentiel immunogénique du composé 7b sur des marqueurs de mort immunogénique, tels que la translocation de la calréticuline à la surface des cellules mourantes, et le relargage de l'ATP et de la *high-mobility group box 1* (HMGB1) (Schnekenburger *et al.*, 2019), pourrait également être intéressante.

Des différences de résultats ont été observées entre les différentes lignées de LMC présentant pour certaines d'entre elles des transcrits différents. Tester l'effet de la combinaison imatinib-7b sur d'autres lignées cellulaires de LMC ainsi que sur des échantillons de patients atteints de LMC ou tout type de leucémie BCR-ABL$^+$ sélectionnés selon l'expression de leur(s) transcrit(s) et de leur surexpression d'HDAC6 serait particulièrement intéressant afin de déterminer s'il y a une réponse sélective en fonction du type de transcrit ou du taux d'expression d'HDAC6 exprimé chez le patient, qui deviendraient alors des marqueurs pronostics de réponse à la combinaison imatinib-7b dans le cadre d'une médecine personnalisée.

A la vue du potentiel risque de toxicité cardiaque mis en évidence lors de l'étude *in silico*, il serait intéressant de tester le risque de toxicité cardiaque du composé *in vivo*. Pour cela, nous pourrions étudier le rythme cardiaque d'embryons de poissons zèbres exposés au composé.

Enfin, une étude de relations structure-activité de dérivés du composé 7b vis-à-vis de l'activité enzymatique d'HDAC6 et la détermination de leurs effets anti-cancéreux sur des cellules de LMC permettrait potentiellement de trouver une molécule inhibant HDAC6 utilisable à une concentration plus faible *in cellulo*.

II. Conclusions et perspectives de l'étude du MAKV-15

Dans La deuxième partie du manuscrit, il a montré que le MAKV-15 remplit les conditions nécessaires pour une bonne administration par voie orale. Le MAKV-15 inhibe de façon spécifique HDAC6 dans différents modèles cellules de LMC et induit une diminution de l'expression de BCR-ABL dès 2 heures de traitement dans les cellules KBM-5. Le traitement BM+I induit une mort des cellules KBM-5 et KBM-5R plus importante que celle induite par les composés seuls accompagnée d'une sélectivité favorable pour les cellules

cancéreuses par rapport à différents modèles de cellules saines. Du point de vue mécanistique, le MAKV-15 semblerait cible le SC2 de la protéine HDAC6, le traitement BM+I induit une mort cellulaire de type apoptotique dépendante des caspases dans les lignées KBM-5 et KBM-5R et une activation des voies apoptotiques intrinsèque et extrinsèque a été montrée dans les cellules KBM-5 (Figure 51).

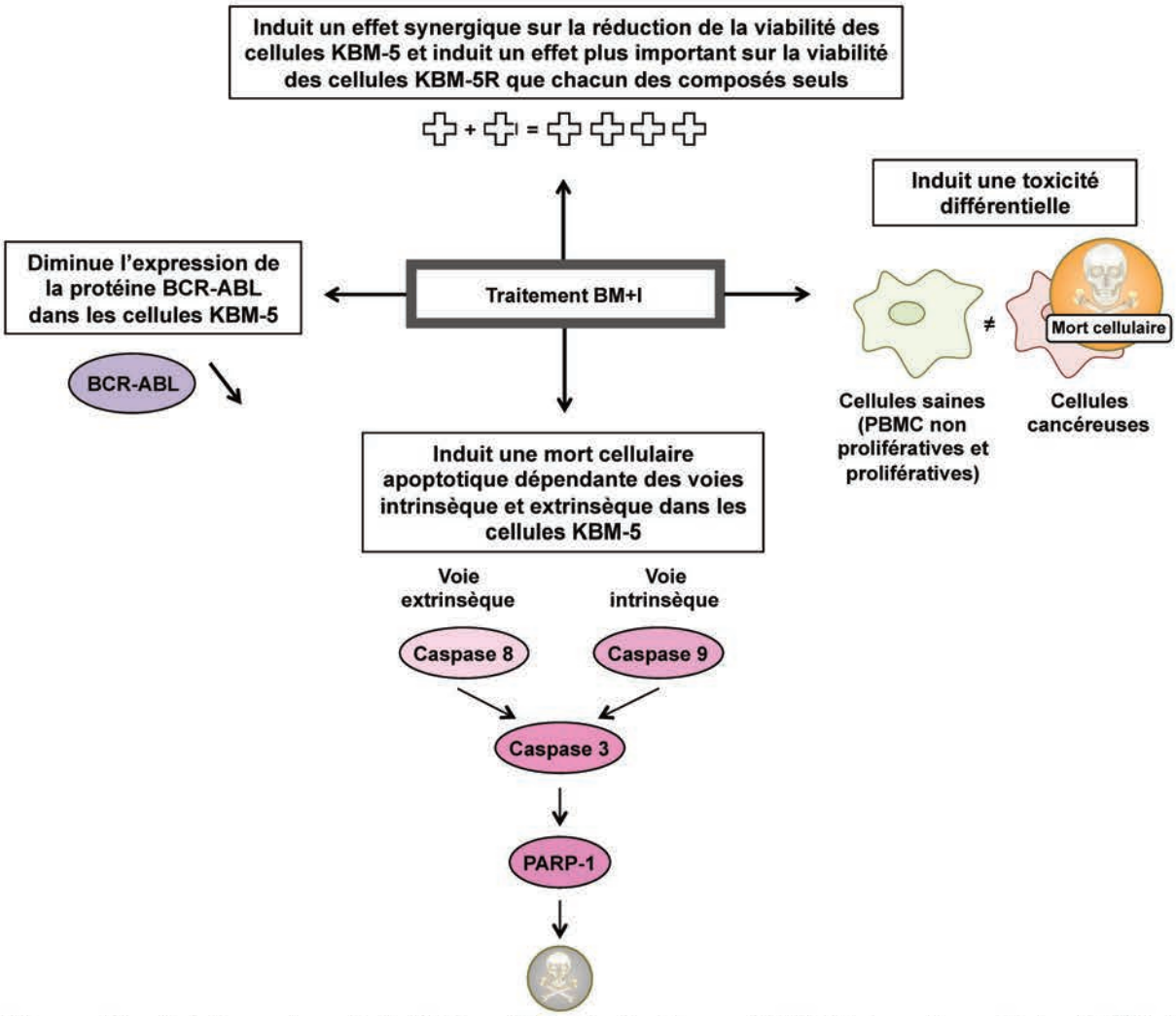


Figure 51 : Schéma récapitulatif des effets du traitement BM+I dans les cellules KBM-5 sensibles et résistantes à l'imatinib.

Le traitement BM+I réduit la viabilité des cellules KBM-5 de façon synergique et induit un une réduction de viabilité plus important des cellules KBM-5R que chacun des composés seuls effets qui sont sélectifs des cellules de LMC par rapport aux cellules saines. La mort cellulaire induite est de type apoptotique et est dépendante des voies apoptotiques intrinsèque et extrinsèque. BCR-ABL : *breakpoint cluster region-Abelson* ; PARP : poly(ADP-ribose) polymérase ; PBMC : *peripheral blood mononuclear cell*.

Les résultats préliminaires obtenus dans cette étude avec le MAKV-15 nécessitent d'être bien évidemment approfondis. Dans ce but, il serait intéressant d'étudier le mécanisme d'action du traitement BM+I en étudiant les niveaux d'expression de protéines appartenant aux voies de signalisation dépendantes de BCR-ABL. Le mécanisme d'interaction du MAKV-15 avec la protéine HDAC6 pourra être testé *via* docking et comparé à l'interaction de la tubastatine A, dont il dérive.

A la vue du potentiel risque de toxicité cardiaque mis en évidence lors de l'étude *in silico*, il serait intéressant de tester le risque de toxicité cardiaque du composé *in vivo* chez le poisson zèbre en étudiant le rythme cardiaque d'embryons de poissons zèbres exposés au composé.

La saturation de la dégradation protéique potentiellement entrainée par le traitement BM+I devra être vérifiée par l'analyse des niveaux de protéines ubiquitinées par Western Blot et par analyse de l'activité du protéasome et détection d'aggrésomes dans les cellules traitées. Si la saturation de la dégradation protéique est vérifiée il sera intéressant de déterminer si elle entraine un stress du réticulum endoplasmique ou l'autophagie avant d'induire l'apoptose dans les cellules KBM-5.

Il a déjà été montré que la combinaison d'un inhibiteur d'HDAC et d'un inhibiteur du protéasome induisait une diminution de la protéine BCR-ABL dans des cellules de LMC *via* une augmentation de niveaux intracellulaires d'espèces réactives de l'oxygène (Zhou *et al.*, 2015b). L'effet du traitement BM+I sur les niveaux intracellulaires d'espèces réactives de l'oxygène pourrait donc être étudié dans les cellules KBM-5.

L'évaluation du potentiel immunogénique du MAKV-15 sur des marqueurs de mort immunogénique et points de contrôle immunitaires pourrait également être intéressante.

Enfin l'impact du traitement BM+I pourrait également être testé sur la prolifération et la viabilité d'autres modèles de LMC, sur la proportion de CSL, sur la capacité de formation de colonies en milieu semi-solides, ainsi que sur des xénogreffes de cellules tumorales chez le poisson zèbre ou la souris, ainsi que sur les cellules de patients dans le cadre d'une approche translationnelle.

CONCLUSION GENERALE :

L'hypothèse de cette étude était que la combinaison d'un inhibiteur d'HDAC6 et d'un ITK pourrait être efficace pour le traitement de la LMC. L'ensemble de nos résultats suggère qu'une telle combinaison offre des perspectives particulièrement prometteuses, que cela soit en combinaison simple ou dans le cadre d'un protocole de traitement incluant un pré-traitement inhibiteur d'HDAC6-inhibiteur du protéasome, suivi du traitement avec un ITK ; validant ainsi l'hypothèse de départ.

Annexes

Annexe 1 : Liste des inhibiteurs d'HDAC6.

Classes chimiques	**Inhibiteurs d'HDAC6**	**Domaines d'intéraction**	**Inhibition de l'activité HDAC6 *in vitro* (CI_{50} en nM)**	**Inhibition d'HDAC6 *in cellulo* (µM)[$]**	**Effet sur les cellules cancéreuses (type de cancer)**	**Références**
Benzamides	Dérivé trithiocarbonate (12ac)	ND	65	10 (cancer du poumon)	CI_{50} = 8,2 µM (cancer du col de l'utérus)	(Dehmel *et al.*, 2008)
	NQN-1 (2-benzyl-amino-naphthoquinone)	ND	5540	4 (leucémie myéloïde aiguë)	CI_{50} = 0,8 µM (leucémies)	(Inks *et al.*, 2012)
Hydroxamates	Acide hydroxamique contenant une phenylalanine (4n)	His215, His216, Tyr386, Phe283, et Tyr255 du SC1 et His610, His611, Tyr782, Phe620, et Phe680 d'un	1690	1 (carcinome colorectal)	IC_{50} : 3 à > 50 µM (diverses lignées cellulaires cancéreuses)	(Schafer *et al.*, 2008)

	modèle d'homologie d'HDAC6				
Acide hydroxamique contenant une pyridylalanine (5a)	Phe566 du SC2 d'un modèle d'homologie d'HDAC6	3970	ND	IC_{50} : 104 µM (cancer du sein)	(Schafer *et al.*, 2009)
ACY-738	ND	1,7	2,5 (cellules neuronales)	ND	(Jochems *et al.*, 2014)
ACY-775	ND	7,5	2,5 (cellules neuronales)	ND	(Jochems *et al.*, 2014)
ACY-1083	His573 et His574 du SC2 d'HDAC6	3	0,03 (neuroblastome)	ND	(Krukowski *et al.*, 2017; Porter *et al.*, 2017)
Bavarostat	Ser568 du SC2 d'HDAC6	60	10 (cellules progénitrices neurales dérivées de cellules souches pluripotentes induites)	ND	(Strebl *et al.*, 2017)

BRD9757	ND	30	10 (cancer du col de l'utérus)	ND	(Wagner *et al.*, 2013)
C1A	Phe150 et Phe205 sur SC1 et Phe620 et Phe680 sur SC2 d'HDAC6	479	1 (cancer du colon)	IC_{50} : 0,2 à 7,7 µM (diverses lignées cellulaires cancéreuses)	(Kaliszczak *et al.*, 2013)
Cay10603	His499 sur SC2 d'un modèle d'homologie d'HDAC6	0,002	<1 à 1 µM (plusieurs lignées de cancer du pancréas)	ND	(Kozikowski *et al.*, 2008 ; Sixto-Lopez *et al.*, 2017)
Citarinostat (ACY-241)	ND	2,6	0,3 (cancer des ovaires)	CI_{50} : 4,6 à 6,1 µM (cancers ovariens et cancer du sein)	(Huang *et al.*, 2017)
Composé α3*β*- tetrapeptide cyclique (23)	ND	39	2 (leucémie aiguë lymphoblastique)	IC_{50} : 9 à > 20 µM (diverses lignées cellulaires cancéreuses)	(Olsen *et al.*, 2009)
Composé contenant un groupement phénylisoxazole en tant que groupe de	His499 d'HDAC7	0,002	ND	IC_{50} : 0,1 à 1 µM (plusieurs lignées de cancer de la	(Kozikowski *et al.*, 2008)

reconnaissance de surface (7)				prostate)	
Composé contenant un groupement triazolylphényle (6b)	ND	1,9	ND	IC_{50} : <0,5 à 22 µM (plusieurs lignées de cancer de la prostate)	(Chen *et al.*, 2008)
Composé contenant un peptoïde (2i)	Tyr301 du SC2 d'un modèle d'homologie d'HDAC6	1,59	ND	IC_{50} : 0,34 à 2,7 µM (diverses lignées cellulaires cancéreuses)	(Diedrich *et al.*, 2016)
Dérivé 3-aminopyrrolidinone (33)	ND	17	0,3 (myélome multiple)	ND	(Lin *et al.*, 2015)
Dérivé de l'acide 4-aminomethylaryl (1a)	ND	19	0,46 (cancer du col de l'utérus)	ND	(Blackburn *et al.*, 2013)
Dérivé de l'acide 4-hydroxybenzoïque (7b)	ND	200	50 (cancer de la prostate)	IC_{50} : 41 à 130 (plusieurs lignées de cancer de la prostate et du sein)	(Seidel *et al.*, 2016)
Dérivé de l'acide 4-hydroxybenzoïque (13a)	ND	20000	50 (cancer de la prostate)	IC_{50} : 19 à 127 (plusieurs lignées de cancer de la prostate et du sein)	(Seidel *et al.*, 2016)

Dérivé aminotétraline (32)	Phe620 et Phe680 d'un modèle d'homologie d'HDAC6	50	2 (neuroblastome)	IC_{50} = 5.4 µM (neuroblastome)	(Tang *et al.*, 2014)
Dérivé benzothiophène (39)	ND	14	Même effet que tubastatine A	Ne cible pas NKκB et AP-1 de manière directe au niveau transcriptionnel	(Wang *et al.*, 2017)
Dérivé 2,4-imidazolinedione (10c)	ND	4,4	1,6 (leucémie myéloïde aiguë)	IC_{50} : 0,2 à 0,8 µM (diverses lignées cellulaires cancéreuses)	(Liang *et al.*, 2019)
Dérivé mercaptoacétamide (2)	ND	95,3	ND	A 10 µM protège les neurones corticaux du stress oxydatif induisant la mort	(Kozikowski *et al.*, 2007)
Dérivé (N-Hydroxycarbonylbenylamino)	ND	0,29	0,1 (myélome multiple)	IC_{50} : 9,1 à 40,6 µM (myélome	(Lee *et al.*, 2018)

quinolines (13)				multiple)	
Dérivé isoxazole-3-hydroxamate (SS-208)	His463, Pro464, Phe583 et Leu712 sur SC2 d'HDAC6	12	5 (mélanome)	ND	(Shen *et al.*, 2019)
Dérivé phénothiazine (7i)	Phe620 et Phe680 sur SC2 d'HDAC6	5	0,1 (leucémie myéloïde aiguë)	ND	(Vogerl *et al.*, 2019)
Dérivé phénylhydroxamate (2)	Phe464 et His614 sur SC2 d'HDAC6	3	ND	CI_{50} : 0,65 à 2,77 (cancer ovarien et carcinome épidermoïde de la langue)	(Diedrich *et al.*, 2016 ; Porter *et al.*, 2018)
Dérivé phénylsulfonylfuroxan (5c)	ND	7,4	0,013 (leucémie myéloïde aiguë)	IC_{50} : 0,4 à 5,8 µM (diverses lignées cellulaires cancéreuses)	(Duan *et al.*, 2015)
Dérivé pyridone (11e)	Phe155 et Phe210 d'HDAC2	2,46	ND	IC_{50} : 0,14 à 0,38 µM (plusieurs lignées cellulaires	(Cho *et al.*, 2013)

				cancéreuses)	
Dérivé pyrimidinedione (6)	ND	12,4	ND	Induit l'arrêt du cycle cellulaire en phase subG1 et une mort par apoptose (cancer du colon)	(Liu *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2017)
Dérivé quinazolin-4-one (3f)	ND	29	augmente les niveaux d' acétylation de la tubuline α et de l'histone H3 à 10 µM	ND	(Yu *et al.*, 2013)
Dérivé sulfone (36)	ND	8	0,01 (non précisé)	ND	(Wang *et al.*, 2017)
Dérivé de la trichostatine A (M344, 16b)	ND	88	ND	ND	(Heltweg *et al.*, 2004)
Dérivé de la tubacine (WT-161)	Phe200, Phe201, Leu270, Arg194 d'HDAC7	0,4	0,3 (myélome multiple)	IC_{50} = 3,6 µM (myélome multiple) CI_{50} : 1,5 à 4,7 µM	(Hideshima *et al.*, 2016)

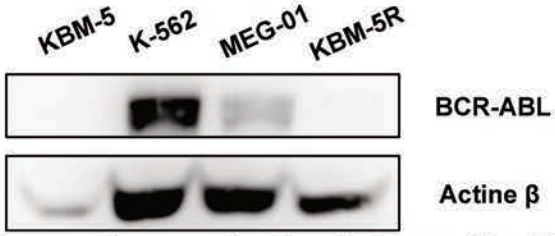
				(plusieurs lignées de myélome multiple)	
Dérivé de la tubastatine A (Marbostat-100)	Asp649, His651 et Asp742 du SC2 d'HDAC6	0,7	0,05 (leucémie monocytaire aiguë)	Non cytotoxique	(Sellmer *et al.*, 2018)
(E)-N-hydroxy-3-{1-[3-(naphthalen-2-yl)prop-yl]-2-oxo-1,2-dihydropyridin-3-yl}acrylamide (11e)	ND	2,46	ND	IC_{50} : 0,14 à 0,38 µM (plusieurs lignées cellulaires cancéreuses)	(Cho *et al.*, 2013)
Hydroxamate indolylsulfonylcinnamique (12)	ND	5,2	0,1 (cancer du colon)	IC_{50} : 0,4 à 2,5 µM (plusieurs lignées cellulaires cancéreuses)	(Lee *et al.*, 2014)
Hydroxamate phénylsulfonylfuroxane (5c)	ND	7,4	0,0125 (leucémie myéloïde aiguë)	IC_{50} : 0,38 à 5,84 µM (plusieurs lignées cellulaires cancéreuses)	(Duan *et al.*, 2015)
MAIP-032	SC2 d'HDAC6	58	ND	CI_{50} : 3,87 µM (lignée de carcinome	(Mackwitz *et al.*, 2018)

			épidermoïde de la langue)		
MPT0G211	ND	0,291	0,1 (neuroblastome)	ND	(Fan *et al.*, 2018)
N-hydroxy-4-[(N(2-hydroxyethyl)-2-phenylacetamido)methyl)-benzamide)] (HPB)	His573 et His574 du SC2 d'HDAC6	31	8 (cancer de la prostate)	ND	(Lee *et al.*, 2015a; Porter *et al.*, 2017)
N-hydroxy-4-(2-[(2-hydroxyethyl)(phenyl)amino]-2-oxoethyl)benzamide (HPOB)	Liaison à l'ion zinc uniquement *via* son groupement OH mais ne déplace pas la molécule d'eau liée au zinc	56	16 (cancer de la prostate, adénocarcinome, glioblastome)	En combinaison avec étoposide, dexaméthasone ou SAHA augmente l'effet sur la viabilité cellulaire	(Lee *et al.*, 2013 ; Hai *et al.*, 2016)
N-hydroxy-4-(2-methoxy-5-(methyl(2-methylquinazolin-4-yl)-amino)phenoxy)butanamide (23bb)	Tyr298 et Glu255 d'un modèle d'homologie d'HDAC6	17	0,051 (cancer du col de l'utérus)	IC_{50} : 14 à 104 nM (diverses lignées cellulaires cancéreuses)	(Yang *et al.*, 2016)
Nexturastat A	SC2 d'un modèle	5	0,01 (mélanome	IC_{50} = 14,3 µM	(Bergman *et*

	d'homologie d'HDAC6		murin)	(mélanome)	*al.*, 2012 ; Sixto-Lopez *et al.*, 2017)
Oxazole hydroxamate (4g)	Phe620, Phe680, Leu749 et Tyr782 sur SC2 d'un modèle d'homologie d'HDAC6	59	10 (cancer du col de l'utérus)	IC_{50} = 10,2 µM (leucémie myéloïde aiguë)	(Senger *et al.*, 2016)
Ricolinostat (ACY-1215)	SC2 d'un modèle d'homologie d'HDAC6	4,7	0,62 (myélome multiple)	CI_{50} : 2 à 8 µM (plusieurs lignées de myélome multiple)	(Santo *et al.*, 2012 ; Sixto-Lopez *et al.*, 2017)
Sahaquine	ND	ND	0,1 (glioblastome)	CI_{50} : 10 µM (glioblastome)	(Zhang *et al.*, 2018)
TC24	Ser568, His610, Phe679 et Tyr782 d'HDAC6	ND	1 et 10 (cancer gastrique)	CI_{50} : 10,2 à 17,2 µM (plusieurs lignées de cancer gastrique)	(Dong *et al.*, 2018)
Tétrahydroisoquinoline (5a)	ND	36	0,21 (cancer du col de l'utérus)	ND	(Blackburn *et al.*, 2013)

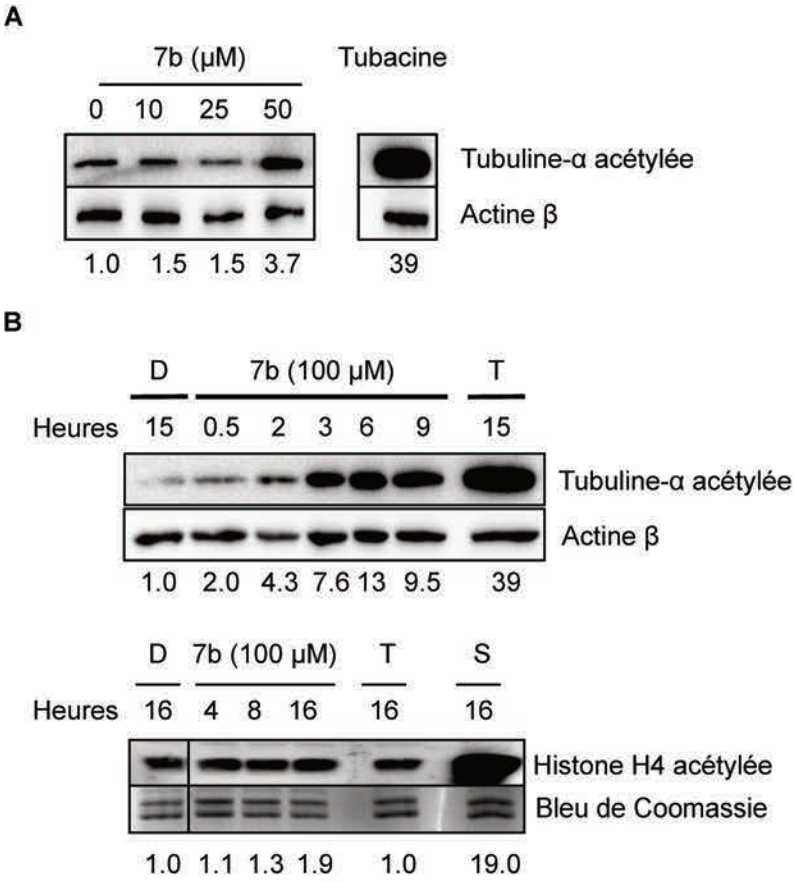
	Thiophène	ND	19	ND	ND	(Blackburn *et al.*, 2013)
	Thiazole	ND	52	ND	ND	(Blackburn *et al.*, 2013)
	Tubacine	SC2 d'un modèle d'homologie d'HDAC6	4	5 (cancer de la prostate) 2,5 (leucémie lymphoblastique aiguë)	IC_{50} : 1,2 à 2 µM (leucémie lymphoblastique aiguë)	(Butler *et al.*, 2010 ; Aldana-Masangkay *et al.*, 2011 ; Sixto-Lopez *et al.*, 2017)
	Tubastatine A	His610, His611, Phe679, Phe680 et Tyr782 d'HDAC6	15	2,5 (non précisé)	ND	(Butler *et al.*, 2010 ; Dong *et al.*, 2018)
	Tubathian A	ND	1,9	0,1 (cancer ovarien)	ND	(Depetter *et al.*, 2019)
Autres	3-hydroxypyridin-2-thione (3-HPT)	Tyr306 d'HDAC8	681	ND	Inactif contre deux lignées de cancer de la prostate et une lignée de leucémie aiguë à	(Patil *et al.*, 2013)

					cellules T	
	Acide 1-hydroxypyridine-2-thione (1HPT)-6-carboxylique	SC	150	ND	CI_{50} : 18 à 75 µM (leucémies)	(Muthyala *et al.*, 2015)
	Dérivé adamantylamino (20a)	ND	82	ND	ND	(Itoh *et al.*, 2007)
	Dérivé mercaptoacétamide (2b)	ND	1,3	10 (culture corticale primaire de rat)	ND	(Segretti *et al.*, 2015)
	Dérivé sulfamide (13e)	ND	440	1 (cancer de la vessie)	ND	(Wahhab *et al.*, 2009)
Structure non définie	CKD-506	ND	5	0,03 (PBMC humaines)	ND	(Choi *et al.*, 2018)



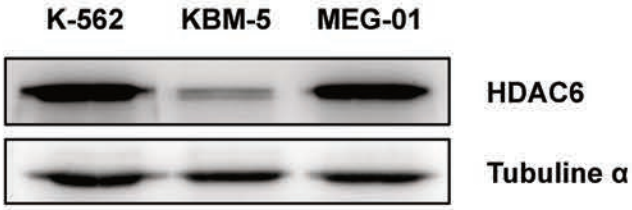
Annexe 2 : Etude de l'expression constitutive de la protéine BCR-ABL dans plusieurs lignées de LMC.

L'expression de la protéine BCR-ABL a été étudiée par Western Blot. L'actine β a été utilisée comme contrôle de chargement. Les blots présentés sont représentatifs de trois expériences indépendantes.



Annexe 3 : Effet du composé 7b sur l'acétylation de la tubuline α et de l'histone H4 dans la lignée K-562.

(A) Les cellules K-562 ont été traitées avec des concentrations croissantes de composé 7b pendant 24 heures. La tubacine (2 µM, 24 heures) est utilisée en tant qu'inhibiteur d'HDAC6 de référence. L'acétylation de la tubuline α a été étudiée par Western Blot. L'actine β a été utilisé comme contrôle de chargement. (B) Les cellules K-562 ont été traitées le composé 7b aux temps indiqués. Le DMSO (D) est utilisé en tant que contrôle solvant, la tubacine (T, 2 µM) en tant qu'inhibiteur d'HDAC6 de référence et le SAHA (S, 2 µM) en tant qu'inhibiteur d'HDAC de référence. L'actine β et le bleu de Coomassie ont été utilisés comme contrôles de chargement. Le ratio d'intensité de la protéine d'intérêt sur le contrôle de charge est présenté sous les blots.



Annexe 4 : Etude de l'expression constitutive de la protéine HDAC6 dans plusieurs lignées de LMC.

L'expression de la protéine HDAC6 a été étudiée par Western Blot. La tubuline α a été utilisée comme contrôle de chargement. Les blots présentés sont représentatifs de trois expériences indépendantes.

Références

Abraham S.A., Hopcroft L.E., Carrick E., Drotar M.E., Dunn K., Williamson A.J., Korfi K., Baquero P., Park L.E., Scott M.T., Pellicano F., Pierce A., Copland M., Nourse C., Grimmond S.M., Vetrie D., Whetton A.D., Holyoake T.L.

Dual targeting of p53 and c-MYC selectively eliminates leukaemic stem cells.

Nature, 2016, **534**(7607): 341-6.

Aldana-Masangkay G.I., Rodriguez-Gonzalez A., Lin T., Ikeda A.K., Hsieh Y.T., Kim Y.M., Lomenick B., Okemoto K., Landaw E.M., Wang D., Mazitschek R., Bradner J.E., Sakamoto K.M.

Tubacin suppresses proliferation and induces apoptosis of acute lymphoblastic leukemia cells.

Leuk Lymphoma, 2011, **52**(8): 1544-55.

Alikian M., Gale R.P., Apperley J.F., Foroni L.

Molecular techniques for the personalised management of patients with chronic myeloid leukaemia.

Biomol Detect Quantif, 2017, **11**: 4-20.

An X., Tiwari A.K., Sun Y., Ding P.R., Ashby C.R., Jr., Chen Z.S.

BCR-ABL tyrosine kinase inhibitors in the treatment of Philadelphia chromosome positive chronic myeloid leukemia: a review.

Leuk Res, 2010, **34**(10): 1255-68.

Ankathil R., Azlan H., Dzarr A.A., Baba A.A.

Pharmacogenetics and the treatment of chronic myeloid leukemia: how relevant clinically? An update.

Pharmacogenomics, 2018,

Apperley J.F.

Part I: mechanisms of resistance to imatinib in chronic myeloid leukaemia.

Lancet Oncol, 2007, **8**(11): 1018-29.

Apperley J.F.

Chronic myeloid leukaemia.

Lancet, 2015, **385**(9976): 1447-59.

Audero E., Cascone I., Maniero F., Napione L., Arese M., Lanfrancone L., Bussolino F.

Adaptor ShcA protein binds tyrosine kinase Tie2 receptor and regulates migration and sprouting but not survival of endothelial cells.

J Biol Chem, 2004, **279**(13): 13224-33.

Ault P.S., Rose Pharm D.J., Nodzon Ph D.L., Kaled E.S.

Bosutinib Therapy in Patients With Chronic Myeloid Leukemia: Practical Considerations for Management of Side Effects.

J Adv Pract Oncol, 2016, **7**(2): 160-75.

Azad N.A., Shah Z.A., Pandith A.A., Khan M.S., Rasool R., Rasool J., Aziz S.A.

Prognostic Implication of BCR-ABL Fusion Transcript Variants in Chronic Myeloid Leukemia (CML) Treated with Imatinib. A First of Its Kind Study on CML Patients of Kashmir.

Asian Pac J Cancer Prev, 2018, **19**(6): 1479-85.

Balabanov S., Braig M., Brummendorf T.H.

Current aspects in resistance against tyrosine kinase inhibitors in chronic myelogenous leukemia.

Drug Discov Today Technol, 2014, **11**: 89-99.

Bamodu O.A., Kuo K.T., Yuan L.P., Cheng W.H., Lee W.H., Ho Y.S., Chao T.Y., Yeh C.T.

HDAC inhibitor suppresses proliferation and tumorigenicity of drug-resistant chronic myeloid leukemia stem cells through regulation of hsa-miR-196a targeting BCR/ABL1.

Exp Cell Res, 2018, **370**(2): 519-30.

Beier U.H., Wang L., Han R., Akimova T., Liu Y., Hancock W.W.

Histone deacetylases 6 and 9 and sirtuin-1 control Foxp3+ regulatory T cell function through shared and isoform-specific mechanisms.

Sci Signal, 2012, **5**(229): ra45.

Beran M., Pisa P., O'Brien S., Kurzrock R., Siciliano M., Cork A., Andersson B.S., Kohli V., Kantarjian H.

Biological properties and growth in SCID mice of a new myelogenous leukemia cell line (KBM-5) derived from chronic myelogenous leukemia cells in the blastic phase.

Cancer Res, 1993, **53**(15): 3603-10.

Berger A., Hoelbl-Kovacic A., Bourgeais J., Hoefling L., Warsch W., Grundschober E., Uras I.Z., Menzl I., Putz E.M., Hoermann G., Schuster C., Fajmann S., Leitner E., Kubicek S., Moriggl R., Gouilleux F., Sexl V.

PAK-dependent STAT5 serine phosphorylation is required for BCR-ABL-induced leukemogenesis.

Leukemia, 2014, **28**(3): 629-41.

Bergman J.A., Woan K., Perez-Villarroel P., Villagra A., Sotomayor E.M., Kozikowski A.P.

Selective histone deacetylase 6 inhibitors bearing substituted urea linkers inhibit melanoma cell growth.

J Med Chem, 2012, **55**(22): 9891-9.

Bertos N.R., Gilquin B., Chan G.K., Yen T.J., Khochbin S., Yang X.J.

Role of the tetradecapeptide repeat domain of human histone deacetylase 6 in cytoplasmic retention.

J Biol Chem, 2004, **279**(46): 48246-54.

Bixby D., Talpaz M.

Mechanisms of resistance to tyrosine kinase inhibitors in chronic myeloid leukemia and recent therapeutic strategies to overcome resistance.

Hematology Am Soc Hematol Educ Program, 2009: 461-76.

Blackburn C., Barrett C., Chin J., Garcia K., Gigstad K., Gould A., Gutierrez J., Harrison S., Hoar K., Lynch C., Rowland R.S., Tsu C., Ringeling J., Xu H.

Potent histone deacetylase inhibitors derived from 4-(aminomethyl)-N-hydroxybenzamide with high selectivity for the HDAC6 isoform.

J Med Chem, 2013, **56**(18): 7201-11.

Bu Q., Cui L., Li J., Du X., Zou W., Ding K., Pan J.

SAHA and S116836, a novel tyrosine kinase inhibitor, synergistically induce apoptosis in imatinib-resistant chronic myelogenous leukemia cells.

Cancer Biol Ther, 2014, **15**(7): 951-62.

Butler K.V., Kalin J., Brochier C., Vistoli G., Langley B., Kozikowski A.P.

Rational design and simple chemistry yield a superior, neuroprotective HDAC6 inhibitor, tubastatin A.

J Am Chem Soc, 2010, **132**(31): 10842-6.

Carafa V., Rotili D., Forgione M., Cuomo F., Serretiello E., Hailu G.S., Jarho E., Lahtela-Kakkonen M., Mai A., Altucci L.

Sirtuin functions and modulation: from chemistry to the clinic.

Clin Epigenetics, 2016, **8**: 61.

Carvalho B.S., Irizarry R.A.

A framework for oligonucleotide microarray preprocessing.

Bioinformatics, 2010, **26**(19): 2363-7.

Chang Y.W., Tseng C.F., Wang M.Y., Chang W.C., Lee C.C., Chen L.T., Hung M.C., Su J.L.

Deacetylation of HSPA5 by HDAC6 leads to GP78-mediated HSPA5 ubiquitination at K447 and suppresses metastasis of breast cancer.

Oncogene, 2016, **35**(12): 1517-28.

Chen Y., Lopez-Sanchez M., Savoy D.N., Billadeau D.D., Dow G.S., Kozikowski A.P.

A series of potent and selective, triazolylphenyl-based histone deacetylases inhibitors with activity against pancreatic cancer cells and Plasmodium falciparum.

J Med Chem, 2008, **51**(12): 3437-48.

Cho M., Choi E., Yang J.S., Lee C., Seo J.J., Kim B.S., Oh S.J., Kim H.M., Lee K., Park S.K., Kwon H.J., Han G.

Discovery of pyridone-based histone deacetylase inhibitors: approaches for metabolic stability.

ChemMedChem, 2013, **8**(2): 272-9.

Choi E.W., Song J.W., Ha N., Choi Y.I., Kim S.

CKD-506, a novel HDAC6-selective inhibitor, improves renal outcomes and survival in a mouse model of systemic lupus erythematosus.

Sci Rep, 2018, **8**(1): 17297.

Chou T.C.

Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies.

Pharmacol Rev, 2006, **58**(3): 621-81.

Claudiani S., Apperley J.F., Gale R.P., Clark R., Szydlo R., Deplano S., Palanicawandar R., Khorashad J., Foroni L., Milojkovic D.

E14a2 BCR-ABL1 transcript is associated with a higher rate of treatment-free remission in individuals with chronic myeloid leukemia after stopping tyrosine kinase inhibitor therapy.

Haematologica, 2017, **102**(8): e297-e9.

Colicelli J.

ABL tyrosine kinases: evolution of function, regulation, and specificity.

Sci Signal, 2010, **3**(139): re6.

Cosenza M., Pozzi S.

The Therapeutic Strategy of HDAC6 Inhibitors in Lymphoproliferative Disease.

Int J Mol Sci, 2018, **19**(8)

Dai Z., Quackenbush R.C., Courtney K.D., Grove M., Cortez D., Reuther G.W., Pendergast A.M.

Oncogenic Abl and Src tyrosine kinases elicit the ubiquitin-dependent degradation of target proteins through a Ras-independent pathway.

Genes Dev, 1998, **12**(10): 1415-24.

Danisz K., Blasiak J.

Role of anti-apoptotic pathways activated by BCR/ABL in the resistance of chronic myeloid leukemia cells to tyrosine kinase inhibitors.

Acta Biochim Pol, 2013, **60**(4): 503-14.

De Blasio A., Vento R., Di Fiore R.

Mcl-1 targeting could be an intriguing perspective to cure cancer.

J Cell Physiol, 2018, **233**(11): 8482-98.

de Lemos J.A., de Oliveira C.M., Scerni A.C., Bentes A.Q., Beltrao A.C., Bentes I.R., Azevedo T.C., Maradei-Pereira L.M.

Differential molecular response of the transcripts B2A2 and B3A2 to imatinib mesylate in chronic myeloid leukemia.

Genet Mol Res, 2005, **4**(4): 803-11.

de Ruijter A.J., van Gennip A.H., Caron H.N., Kemp S., van Kuilenburg A.B.

Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family.

Biochem J, 2003, **370**(Pt 3): 737-49.

Deakin N.O., Turner C.E.

Paxillin inhibits HDAC6 to regulate microtubule acetylation, Golgi structure, and polarized migration.

J Cell Biol, 2014, **206**(3): 395-413.

Dehmel F., Weinbrenner S., Julius H., Ciossek T., Maier T., Stengel T., Fettis K., Burkhardt C., Wieland H., Beckers T.

Trithiocarbonates as a novel class of HDAC inhibitors: SAR studies, isoenzyme selectivity, and pharmacological profiles.

J Med Chem, 2008, **51**(13): 3985-4001.

Depetter Y., Geurs S., De Vreese R., Goethals S., Vandoorn E., Laevens A., Steenbrugge J., Meyer E., de Tullio P., Bracke M., D'Hooghe M., De Wever O.

Selective pharmacological inhibitors of HDAC6 reveal biochemical activity but functional tolerance in cancer models.

Int J Cancer, 2019, **145**(3): 735-47.

Di Fulvio S., Azakir B.A., Therrien C., Sinnreich M.

Dysferlin interacts with histone deacetylase 6 and increases alpha-tubulin acetylation.

PLoS One, 2011, **6**(12): e28563.

Diedrich D., Hamacher A., Gertzen C.G., Alves Avelar L.A., Reiss G.J., Kurz T., Gohlke H., Kassack M.U., Hansen F.K.

Rational design and diversity-oriented synthesis of peptoid-based selective HDAC6 inhibitors.

Chem Commun (Camb), 2016, **52**(15): 3219-22.

Dong J., Zheng N., Wang X., Tang C., Yan P., Zhou H.B., Huang J.

A novel HDAC6 inhibitor exerts an anti-cancer effect by triggering cell cycle arrest and apoptosis in gastric cancer.

Eur J Pharmacol, 2018, **828**: 67-79.

Drexler H.G., MacLeod R.A., Uphoff C.C.

Leukemia cell lines: in vitro models for the study of Philadelphia chromosome-positive leukemia.

Leuk Res, 1999, **23**(3): 207-15.

Drummond M.W., Lush C.J., Vickers M.A., Reid F.M., Kaeda J., Holyoake T.L.

Imatinib mesylate-induced molecular remission of Philadelphia chromosome-positive myelodysplastic syndrome.

Leukemia, 2003, **17**(2): 463-5.

Duan W., Li J., Inks E.S., Chou C.J., Jia Y., Chu X., Li X., Xu W., Zhang Y.

Design, synthesis, and antitumor evaluation of novel histone deacetylase inhibitors equipped with a phenylsulfonylfuroxan module as a nitric oxide donor.

J Med Chem, 2015, **58**(10): 4325-38.

Egan D., Radich J.

Making the diagnosis, the tools, and risk stratification: More than just BCR-ABL.

Best Pract Res Clin Haematol, 2016, **29**(3): 252-63.

Emole J., Talabi T., Pinilla-Ibarz J.

Update on the management of Philadelphia chromosome positive chronic myelogenous leukemia: role of nilotinib.

Biologics, 2016, **10**: 23-31.

Etienne G., Dulucq S., Huguet F., Schmitt A., Lascaux A., Hayette S., Fort M.P., Sujobert P., Bijou F., Morisset S., Tavitian S., Bidet A., Turcq B., Robbesyn F., Chollet C., Belloc F., Durrieu F., Mahon F.X., Nicolini F.E.

Incidence and outcome of BCR-ABL mutated chronic myeloid leukemia patients who failed to tyrosine kinase inhibitors.

Cancer Med, 2019, **8**(11): 5173-82.

Fan S.J., Huang F.I., Liou J.P., Yang C.R.

The novel histone de acetylase 6 inhibitor, MPT0G211, ameliorates tau phosphorylation and cognitive deficits in an Alzheimer's disease model.

Cell Death Dis, 2018, **9**(6): 655.

Feller S.M.

Crk family adaptors-signalling complex formation and biological roles.

Oncogene, 2001, **20**(44): 6348-71.

Figueroa-Magalhaes M.C., Jelovac D., Connolly R., Wolff A.C.

Treatment of HER2-positive breast cancer.

Breast, 2014, **23**(2): 128-36.

Finnin M.S., Donigian J.R., Cohen A., Richon V.M., Rifkind R.A., Marks P.A., Breslow R., Pavletich N.P.

Structures of a histone deacetylase homologue bound to the TSA and SAHA inhibitors.

Nature, 1999, **401**(6749): 188-93.

Flis S., Chojnacki T.

Chronic myelogenous leukemia, a still unsolved problem: pitfalls and new therapeutic possibilities.

Drug Des Devel Ther, 2019, **13**: 825-43.

Freeburn R.W., Wright K.L., Burgess S.J., Astoul E., Cantrell D.A., Ward S.G.

Evidence that SHIP-1 contributes to phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate metabolism in T lymphocytes and can regulate novel phosphoinositide 3-kinase effectors.

J Immunol, 2002, **169**(10): 5441-50.

Frietsch J.J., Kastner C., Grunewald T.G., Schweigel H., Nollau P., Ziermann J., Clement J.H., La Rosee P., Hochhaus A., Butt E.

LASP1 is a novel BCR-ABL substrate and a phosphorylation-dependent binding partner of CRKL in chronic myeloid leukemia.

Oncotarget, 2014, **5**(14): 5257-71.

Gao L., Cueto M.A., Asselbergs F., Atadja P.

Cloning and functional characterization of HDAC11, a novel member of the human histone deacetylase family.

J Biol Chem, 2002, **277**(28): 25748-55.

Goldman J.M., Melo J.V.

Chronic myeloid leukemia--advances in biology and new approaches to treatment.

N Engl J Med, 2003, **349**(15): 1451-64.

Goss V.L., Lee K.A., Moritz A., Nardone J., Spek E.J., MacNeill J., Rush J., Comb M.J., Polakiewicz R.D.

A common phosphotyrosine signature for the Bcr-Abl kinase.

Blood, 2006, **107**(12): 4888-97.

Grimmler M., Wang Y., Mund T., Cilensek Z., Keidel E.M., Waddell M.B., Jakel H., Kullmann M., Kriwacki R.W., Hengst L.

Cdk-inhibitory activity and stability of p27Kip1 are directly regulated by oncogenic tyrosine kinases.

Cell, 2007, **128**(2): 269-80.

Haggarty S.J., Koeller K.M., Wong J.C., Grozinger C.M., Schreiber S.L.

Domain-selective small-molecule inhibitor of histone deacetylase 6 (HDAC6)-mediated tubulin deacetylation.

Proc Natl Acad Sci U S A, 2003, **100**(8): 4389-94.

Hai Y., Christianson D.W.

Histone deacetylase 6 structure and molecular basis of catalysis and inhibition.

Nat Chem Biol, 2016, **12**(9): 741-7.

Hantschel O.

Structure, regulation, signaling, and targeting of abl kinases in cancer.

Genes Cancer, 2012, **3**(5-6): 436-46.

Hantschel O., Grebien F., Superti-Furga G.

The growing arsenal of ATP-competitive and allosteric inhibitors of BCR-ABL.

Cancer Res, 2012, **72**(19): 4890-5.

Heltweg B., Dequiedt F., Marshall B.L., Brauch C., Yoshida M., Nishino N., Verdin E., Jung M.

Subtype selective substrates for histone deacetylases.

J Med Chem, 2004, **47**(21): 5235-43.

Hideshima T., Qi J., Paranal R.M., Tang W., Greenberg E., West N., Colling M.E., Estiu G., Mazitschek R., Perry J.A., Ohguchi H., Cottini F., Mimura N., Gorgun G., Tai Y.T., Richardson P.G., Carrasco R.D., Wiest O., Schreiber S.L., Anderson K.C., Bradner J.E.

Discovery of selective small-molecule HDAC6 inhibitor for overcoming proteasome inhibitor resistance in multiple myeloma.

Proc Natl Acad Sci U S A, 2016, **113**(46): 13162-7.

Hochhaus A., Reiter A., Skladny H., Melo J.V., Sick C., Berger U., Guo J.Q., Arlinghaus R.B., Hehlmann R., Goldman J.M., Cross N.C.

A novel BCR-ABL fusion gene (e6a2) in a patient with Philadelphia chromosome-negative chronic myelogenous leukemia.

Blood, 1996, **88**(6): 2236-40.

Hoffmann V.S., Baccarani M., Hasford J., Lindoerfer D., Burgstaller S., Sertic D., Costeas P., Mayer J., Indrak K., Everaus H., Koskenvesa P., Guilhot J., Schubert-Fritschle G., Castagnetti F., Di Raimondo F., Lejniece S., Griskevicius L., Thielen N., Sacha T., Hellmann A., Turkina A.G., Zaritskey A., Bogdanovic A., Sninska Z., Zupan I., Steegmann J.L., Simonsson B., Clark R.E., Covelli A., Guidi G., Hehlmann R.

The EUTOS population-based registry: incidence and clinical characteristics of 2904 CML patients in 20 European Countries.

Leukemia, 2015, **29**(6): 1336-43.

Hoffmann V.S., Baccarani M., Hasford J., Castagnetti F., Di Raimondo F., Casado L.F., Turkina A., Zackova D., Ossenkoppele G., Zaritskey A., Hoglund M., Simonsson B., Indrak K., Sninska Z., Sacha T., Clark R., Bogdanovic A., Hellmann A., Griskevicius L., Schubert-Fritschle G., Sertic D., Guilhot J., Lejniece S., Zupan I., Burgstaller S., Koskenvesa P., Everaus H., Costeas P., Lindoerfer D., Rosti G., Saussele S., Hochhaus A., Hehlmann R.

Treatment and outcome of 2904 CML patients from the EUTOS population-based registry.

Leukemia, 2017, **31**(3): 593-601.

Holohan C., Van Schaeybroeck S., Longley D.B., Johnston P.G.

Cancer drug resistance: an evolving paradigm.

Nat Rev Cancer, 2013, **13**(10): 714-26.

Huang P., Almeciga-Pinto I., Jarpe M., van Duzer J.H., Mazitschek R., Yang M., Jones S.S., Quayle S.N.

Selective HDAC inhibition by ACY-241 enhances the activity of paclitaxel in solid tumor models.

Oncotarget, 2017, **8**(2): 2694-707.

Huo L., Li D., Sun X., Shi X., Karna P., Yang W., Liu M., Qiao W., Aneja R., Zhou J.

Regulation of Tat acetylation and transactivation activity by the microtubule-associated deacetylase HDAC6.

J Biol Chem, 2011, **286**(11): 9280-6.

Imai Y., Hirano M., Kobayashi M., Futami M., Tojo A.

HDAC Inhibitors Exert Anti-Myeloma Effects through Multiple Modes of Action.

Cancers (Basel), 2019, **11**(4)

Ingley E.

Functions of the Lyn tyrosine kinase in health and disease.

Cell Commun Signal, 2012, **10**(1): 21.

Inks E.S., Josey B.J., Jesinkey S.R., Chou C.J.

A novel class of small molecule inhibitors of HDAC6.

ACS Chem Biol, 2012, **7**(2): 331-9.

Itoh Y., Suzuki T., Kouketsu A., Suzuki N., Maeda S., Yoshida M., Nakagawa H., Miyata N.

Design, synthesis, structure--selectivity relationship, and effect on human cancer cells of a novel series of histone deacetylase 6-selective inhibitors.

J Med Chem, 2007, **50**(22): 5425-38.

Jabbour E.J., Cortes J.E., Kantarjian H.M.

Resistance to tyrosine kinase inhibition therapy for chronic myelogenous leukemia: a clinical perspective and emerging treatment options.

Clin Lymphoma Myeloma Leuk, 2013, **13**(5): 515-29.

Jain P., Kantarjian H., Patel K.P., Gonzalez G.N., Luthra R., Kanagal Shamanna R., Sasaki K., Jabbour E., Romo C.G., Kadia T.M., Pemmaraju N., Daver N., Borthakur G., Estrov Z., Ravandi F., O'Brien S., Cortes J.

Impact of BCR-ABL transcript type on outcome in patients with chronic-phase CML treated with tyrosine kinase inhibitors.

Blood, 2016, **127**(10): 1269-75.

Jilani I., Kantarjian H., Gorre M., Cortes J., Ottmann O., Bhalla K., Giles F.J., Albitar M.

Phosphorylation levels of BCR-ABL, CrkL, AKT and STAT5 in imatinib-resistant chronic myeloid leukemia cells implicate alternative pathway usage as a survival strategy.

Leuk Res, 2008, **32**(4): 643-9.

Jochems J., Boulden J., Lee B.G., Blendy J.A., Jarpe M., Mazitschek R., Van Duzer J.H., Jones S., Berton O.

Antidepressant-like properties of novel HDAC6-selective inhibitors with improved brain bioavailability.

Neuropsychopharmacology, 2014, **39**(2): 389-400.

Kaliszczak M., Trousil S., Aberg O., Perumal M., Nguyen Q.D., Aboagye E.O.

A novel small molecule hydroxamate preferentially inhibits HDAC6 activity and tumour growth.

Br J Cancer, 2013, **108**(2): 342-50.

Kang Z.J., Liu Y.F., Xu L.Z., Long Z.J., Huang D., Yang Y., Liu B., Feng J.X., Pan Y.J., Yan J.S., Liu Q.

The Philadelphia chromosome in leukemogenesis.

Chin J Cancer, 2016, **35**: 48.

Kassambara A. (2018). ggpubr: 'ggplot2' Based Publication Ready Plots.

Keskin D., Sadri S., Eskazan A.E.

Dasatinib for the treatment of chronic myeloid leukemia: patient selection and special considerations.

Drug Des Devel Ther, 2016, **10**: 3355-61.

Khatri A., Wang J., Pendergast A.M.

Multifunctional Abl kinases in health and disease.

J Cell Sci, 2016, **129**(1): 9-16.

Kim D.H., Sarbassov D.D., Ali S.M., King J.E., Latek R.R., Erdjument-Bromage H., Tempst P., Sabatini D.M.

mTOR interacts with raptor to form a nutrient-sensitive complex that signals to the cell growth machinery.

Cell, 2002, **110**(2): 163-75.

Kolesnikov N., Hastings E., Keays M., Melnichuk O., Tang Y.A., Williams E., Dylag M., Kurbatova N., Brandizi M., Burdett T., Megy K., Pilicheva E., Rustici G., Tikhonov A., Parkinson H., Petryszak R., Sarkans U., Brazma A.

ArrayExpress update--simplifying data submissions.

Nucleic Acids Res, 2015, **43**(Database issue): D1113-6.

Kozikowski A.P., Chen Y., Gaysin A., Chen B., D'Annibale M.A., Suto C.M., Langley B.C.

Functional differences in epigenetic modulators-superiority of mercaptoacetamide-based histone deacetylase inhibitors relative to hydroxamates in cortical neuron neuroprotection studies.

J Med Chem, 2007, **50**(13): 3054-61.

Kozikowski A.P., Tapadar S., Luchini D.N., Kim K.H., Billadeau D.D.

Use of the nitrile oxide cycloaddition (NOC) reaction for molecular probe generation: a new class of enzyme selective histone deacetylase inhibitors (HDACIs) showing picomolar activity at HDAC6.

J Med Chem, 2008, **51**(15): 4370-3.

Krukowski K., Ma J., Golonzhka O., Laumet G.O., Gutti T., van Duzer J.H., Mazitschek R., Jarpe M.B., Heijnen C.J., Kavelaars A.

HDAC6 inhibition effectively reverses chemotherapy-induced peripheral neuropathy.

Pain, 2017, **158**(6): 1126-37.

Kuchay S., Duan S., Schenkein E., Peschiaroli A., Saraf A., Florens L., Washburn M.P., Pagano M.

FBXL2- and PTPL1-mediated degradation of p110-free p85beta regulatory subunit controls the PI(3)K signalling cascade.

Nat Cell Biol, 2013, **15**(5): 472-80.

Kusenda B., Mraz M., Mayer J., Pospisilova S.

MicroRNA biogenesis, functionality and cancer relevance.

Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub, 2006, **150**(2): 205-15.

La S.H., Kim S.J., Kang H.G., Lee H.W., Chun K.H.

Ablation of human telomerase reverse transcriptase (hTERT) induces cellular senescence in gastric cancer through a galectin-3 dependent mechanism.

Oncotarget, 2016, **7**(35): 57117-30.

Lafarga V., Aymerich I., Tapia O., Mayor F., Jr., Penela P.

A novel GRK2/HDAC6 interaction modulates cell spreading and motility.

EMBO J, 2012, **31**(4): 856-69.

Lamoral-Theys D., Pottier L., Kerff F., Dufrasne F., Proutiere F., Wauthoz N., Neven P., Ingrassia L., Antwerpen P.V., Lefranc F., Gelbcke M., Pirotte B., Kraus J.L., Neve J., Kornienko A., Kiss R., Dubois J.

Simple di- and trivanillates exhibit cytostatic properties toward cancer cells resistant to pro-apoptotic stimuli.

Bioorg Med Chem, 2010, **18**(11): 3823-33.

Landgren O., Iskander K.

Modern multiple myeloma therapy: deep, sustained treatment response and good clinical outcomes.

J Intern Med, 2017, **281**(4): 365-82.

Laurent E., Talpaz M., Kantarjian H., Kurzrock R.

The BCR gene and philadelphia chromosome-positive leukemogenesis.

Cancer Res, 2001, **61**(6): 2343-55.

Law J.C., Ritke M.K., Yalowich J.C., Leder G.H., Ferrell R.E.

Mutational inactivation of the p53 gene in the human erythroid leukemic K562 cell line.

Leuk Res, 1993, **17**(12): 1045-50.

Lê S.J., J; Husson, F.

FactoMineR: An R Package for Multivariate Analysis.

Journal of Statistical Software, 2008, **25**(1): 1-18.

Lee H.Y., Tsai A.C., Chen M.C., Shen P.J., Cheng Y.C., Kuo C.C., Pan S.L., Liu Y.M., Liu J.F., Yeh T.K., Wang J.C., Chang C.Y., Chang J.Y., Liou J.P.

Azaindolylsulfonamides, with a more selective inhibitory effect on histone deacetylase 6 activity, exhibit antitumor activity in colorectal cancer HCT116 cells.

J Med Chem, 2014, **57**(10): 4009-22.

Lee H.Y., Nepali K., Huang F.I., Chang C.Y., Lai M.J., Li Y.H., Huang H.L., Yang C.R., Liou J.P.

(N-Hydroxycarbonylbenylamino)quinolines as Selective Histone Deacetylase 6 Inhibitors Suppress Growth of Multiple Myeloma in Vitro and in Vivo.

J Med Chem, 2018, **61**(3): 905-17.

Lee J.H., Mahendran A., Yao Y., Ngo L., Venta-Perez G., Choy M.L., Kim N., Ham W.S., Breslow R., Marks P.A.

Development of a histone deacetylase 6 inhibitor and its biological effects.

Proc Natl Acad Sci U S A, 2013, **110**(39): 15704-9.

Lee J.H., Yao Y., Mahendran A., Ngo L., Venta-Perez G., Choy M.L., Breslow R., Marks P.A.

Creation of a histone deacetylase 6 inhibitor and its biological effects [corrected].

Proc Natl Acad Sci U S A, 2015a, **112**(39): 12005-10.

Lee S.M., Bae J.H., Kim M.J., Lee H.S., Lee M.K., Chung B.S., Kim D.W., Kang C.D., Kim S.H.

Bcr-Abl-independent imatinib-resistant K562 cells show aberrant protein acetylation and increased sensitivity to histone deacetylase inhibitors.

J Pharmacol Exp Ther, 2007, **322**(3): 1084-92.

Lee S.W., Yang J., Kim S.Y., Jeong H.K., Lee J., Kim W.J., Lee E.J., Kim H.S.

MicroRNA-26a induced by hypoxia targets HDAC6 in myogenic differentiation of embryonic stem cells.

Nucleic Acids Res, 2015b, **43**(4): 2057-73.

Li A., Chen P., Leng Y., Kang J.

Histone deacetylase 6 regulates the immunosuppressive properties of cancer-associated fibroblasts in breast cancer through the STAT3-COX2-dependent pathway.

Oncogene, 2018a, **37**(45): 5952-66.

Li S., Couvillon A.D., Brasher B.B., Van Etten R.A.

Tyrosine phosphorylation of Grb2 by Bcr/Abl and epidermal growth factor receptor: a novel regulatory mechanism for tyrosine kinase signaling.

EMBO J, 2001, **20**(23): 6793-804.

Li T., Zhang C., Hassan S., Liu X., Song F., Chen K., Zhang W., Yang J.

Histone deacetylase 6 in cancer.

J Hematol Oncol, 2018b, **11**(1): 111.

Li Y., Shin D., Kwon S.H.

Histone deacetylase 6 plays a role as a distinct regulator of diverse cellular processes.

FEBS J, 2013, **280**(3): 775-93.

Liang T., Hou X., Zhou Y., Yang X., Fang H.

Design, Synthesis, and Biological Evaluation of 2,4-Imidazolinedione Derivatives as HDAC6 Isoform-Selective Inhibitors.

ACS Med Chem Lett, 2019, **10**(8): 1122-7.

Liang X., Hajivandi M., Veach D., Wisniewski D., Clarkson B., Resh M.D., Pope R.M.

Quantification of change in phosphorylation of BCR-ABL kinase and its substrates in response to Imatinib treatment in human chronic myelogenous leukemia cells.

Proteomics, 2006, **6**(16): 4554-64.

Lin H.X., Sjaarda J., Dyck J., Stringer R., Hillis C., Harvey M., Carter R., Ainsworth P., Leber B., Pare G., Sadikovic B.

Gender and BCR-ABL transcript type are correlated with molecular response to imatinib treatment in patients with chronic myeloid leukemia.

Eur J Haematol, 2016, **96**(4): 360-6.

Lin X., Chen W., Qiu Z., Guo L., Zhu W., Li W., Wang Z., Zhang W., Zhang Z., Rong Y., Zhang M., Yu L., Zhong S., Zhao R., Wu X., Wong J.C., Tang G.

Design and synthesis of orally bioavailable aminopyrrolidinone histone deacetylase 6 inhibitors.

J Med Chem, 2015, **58**(6): 2809-20.

Linev A.J., Ivanov H.J., Zhelyazkov I.G., Ivanova H., Goranova-Marinova V.S., Stoyanova V.K.

Mutations Associated with Imatinib Mesylate Resistance - Review.

Folia Med (Plovdiv), 2018, **60**(4): 617-23.

Lionberger J.M., Smithgall T.E.

The c-Fes protein-tyrosine kinase suppresses cytokine-independent outgrowth of myeloid leukemia cells induced by Bcr-Abl.

Cancer Res, 2000, **60**(4): 1097-103.

Liston D.R., Davis M.

Clinically Relevant Concentrations of Anticancer Drugs: A Guide for Nonclinical Studies.

Clin Cancer Res, 2017, **23**(14): 3489-98.

Liu K.P., Zhou D., Ouyang D.Y., Xu L.H., Wang Y., Wang L.X., Pan H., He X.H.

LC3B-II deacetylation by histone deacetylase 6 is involved in serum-starvation-induced autophagic degradation.

Biochem Biophys Res Commun, 2013, **441**(4): 970-5.

Liu Y.M., Lee H.Y., Lai M.J., Pan S.L., Huang H.L., Kuo F.C., Chen M.C., Liou J.P.

Pyrimidinedione-mediated selective histone deacetylase 6 inhibitors with antitumor activity in colorectal cancer HCT116 cells.

Org Biomol Chem, 2015, **13**(40): 10226-35.

Lopez-Colome A.M., Lee-Rivera I., Benavides-Hidalgo R., Lopez E.

Paxillin: a crossroad in pathological cell migration.

J Hematol Oncol, 2017, **10**(1): 50.

Los M.

Tumor Growth and Cell Proliferation

In "The Impact of Tumor Biology on Cancer Treatment and Multidisciplinary Strategies", Molls M., P. Vaupel, C. Nieder and M. S. Anscher, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2009, pp.

Loscocco F., Visani G., Galimberti S., Curti A., Isidori A.

BCR-ABL Independent Mechanisms of Resistance in Chronic Myeloid Leukemia.

Front Oncol, 2019, **9**: 939.

Losson H., Schnekenburger M., Dicato M., Diederich M.

Natural Compound Histone Deacetylase Inhibitors (HDACi): Synergy with Inflammatory Signaling Pathway Modulators and Clinical Applications in Cancer.

Molecules, 2016, **21**(11)

Mackwitz M.K.W., Hamacher A., Osko J.D., Held J., Scholer A., Christianson D.W., Kassack M.U., Hansen F.K.

Multicomponent Synthesis and Binding Mode of Imidazo[1,2- a]pyridine-Capped Selective HDAC6 Inhibitors.

Org Lett, 2018, **20**(11): 3255-8.

Mahalingam D., Swords R., Carew J.S., Nawrocki S.T., Bhalla K., Giles F.J.

Targeting HSP90 for cancer therapy.

Br J Cancer, 2009, **100**(10): 1523-9.

Maharaj K., Powers J.J., Achille A., Deng S., Fonseca R., Pabon-Saldana M., Quayle S.N., Jones S.S., Villagra A., Sotomayor E.M., Sahakian E., Pinilla-Ibarz J.

Silencing of HDAC6 as a therapeutic target in chronic lymphocytic leukemia.

Blood Adv, 2018, **2**(21): 3012-24.

Marcato P., Dean C.A., Giacomantonio C.A., Lee P.W.

Aldehyde dehydrogenase: its role as a cancer stem cell marker comes down to the specific isoform.

Cell Cycle, 2011, **10**(9): 1378-84.

Mashima R., Hishida Y., Tezuka T., Yamanashi Y.

The roles of Dok family adapters in immunoreceptor signaling.

Immunol Rev, 2009, **232**(1): 273-85.

Matsuyama A., Shimazu T., Sumida Y., Saito A., Yoshimatsu Y., Seigneurin-Berny D., Osada H., Komatsu Y., Nishino N., Khochbin S., Horinouchi S., Yoshida M.

In vivo destabilization of dynamic microtubules by HDAC6-mediated deacetylation.

EMBO J, 2002, **21**(24): 6820-31.

Medler T.R., Craig J.M., Fiorillo A.A., Feeney Y.B., Harrell J.C., Clevenger C.V.

HDAC6 Deacetylates HMGN2 to Regulate Stat5a Activity and Breast Cancer Growth.

Mol Cancer Res, 2016, **14**(10): 994-1008.

Mei Z., Zhang X., Yi J., Huang J., He J., Tao Y.

Sirtuins in metabolism, DNA repair and cancer.

J Exp Clin Cancer Res, 2016, **35**(1): 182.

Miyake Y., Keusch J.J., Wang L., Saito M., Hess D., Wang X., Melancon B.J., Helquist P., Gut H., Matthias P.

Structural insights into HDAC6 tubulin deacetylation and its selective inhibition.

Nat Chem Biol, 2016, **12**(9): 748-54.

Moreno-Gonzalo O., Mayor F., Jr., Sanchez-Madrid F.

HDAC6 at Crossroads of Infection and Innate Immunity.

Trends Immunol, 2018, **39**(8): 591-5.

Morotti A., Carra G., Panuzzo C., Crivellaro S., Taulli R., Guerrasio A., Saglio G.

Protein Kinase CK2: A Targetable BCR-ABL Partner in Philadelphia Positive Leukemias.

Adv Hematol, 2015, **2015**: 612567.

Mortenson J.B., Heppler L.N., Banks C.J., Weerasekara V.K., Whited M.D., Piccolo S.R., Johnson W.E., Thompson J.W., Andersen J.L.

Histone deacetylase 6 (HDAC6) promotes the pro-survival activity of 14-3-3zeta via deacetylation of lysines within the 14-3-3zeta binding pocket.

J Biol Chem, 2015, **290**(20): 12487-96.

Muthyala R., Shin W.S., Xie J., Sham Y.Y.

Discovery of 1-hydroxypyridine-2-thiones as selective histone deacetylase inhibitors and their potential application for treating leukemia.

Bioorg Med Chem Lett, 2015, **25**(19): 4320-4.

Nakka K.K., Chaudhary N., Joshi S., Bhat J., Singh K., Chatterjee S., Malhotra R., De A., Santra M.K., Dilworth F.J., Chattopadhyay S.

Nuclear matrix-associated protein SMAR1 regulates alternative splicing via HDAC6-mediated deacetylation of Sam68.

Proc Natl Acad Sci U S A, 2015, **112**(26): E3374-83.

Nguyen T., Dai Y., Attkisson E., Kramer L., Jordan N., Nguyen N., Kolluri N., Muschen M., Grant S.

HDAC inhibitors potentiate the activity of the BCR/ABL kinase inhibitor KW-2449 in imatinib-sensitive or -resistant BCR/ABL+ leukemia cells in vitro and in vivo.

Clin Cancer Res, 2011, **17**(10): 3219-32.

Nowell P.C.

Discovery of the Philadelphia chromosome: a personal perspective.

J Clin Invest, 2007, **117**(8): 2033-5.

O'Hare T., Deininger M.W., Eide C.A., Clackson T., Druker B.J.

Targeting the BCR-ABL signaling pathway in therapy-resistant Philadelphia chromosome-positive leukemia.

Clin Cancer Res, 2011, **17**(2): 212-21.

Oh Y.J., Seo Y.H.

A novel chalcone-based molecule, BDP inhibits MDAMB231 triple-negative breast cancer cell growth by suppressing Hsp90 function.

Oncol Rep, 2017, **38**(4): 2343-50.

Olsen C.A., Ghadiri M.R.

Discovery of potent and selective histone deacetylase inhibitors via focused combinatorial libraries of cyclic alpha3beta-tetrapeptides.

J Med Chem, 2009, **52**(23): 7836-46.

Orth M.F., Cazes A., Butt E., Grunewald T.G.

An update on the LIM and SH3 domain protein 1 (LASP1): a versatile structural, signaling, and biomarker protein.

Oncotarget, 2015, **6**(1): 26-42.

Pamonsinlapatham P., Hadj-Slimane R., Lepelletier Y., Allain B., Toccafondi M., Garbay C., Raynaud F.

p120-Ras GTPase activating protein (RasGAP): a multi-interacting protein in downstream signaling.

Biochimie, 2009, **91**(3): 320-8.

Park A.R., Oh D., Lim S.H., Choi J., Moon J., Yu D.Y., Park S.G., Heisterkamp N., Kim E., Myung P.K., Lee J.R.

Regulation of dendritic arborization by BCR Rac1 GTPase-activating protein, a substrate of PTPRT.

J Cell Sci, 2012, **125**(Pt 19): 4518-31.

Parmigiani R.B., Xu W.S., Venta-Perez G., Erdjument-Bromage H., Yaneva M., Tempst P., Marks P.A.

HDAC6 is a specific deacetylase of peroxiredoxins and is involved in redox regulation.

Proc Natl Acad Sci U S A, 2008, **105**(28): 9633-8.

Patil V., Sodji Q.H., Kornacki J.R., Mrksich M., Oyelere A.K.

3-Hydroxypyridin-2-thione as novel zinc binding group for selective histone deacetylase inhibition.

J Med Chem, 2013, **56**(9): 3492-506.

Perez M., Santa-Maria I., Gomez de Barreda E., Zhu X., Cuadros R., Cabrero J.R., Sanchez-Madrid F., Dawson H.N., Vitek M.P., Perry G., Smith M.A., Avila J.

Tau--an inhibitor of deacetylase HDAC6 function.

J Neurochem, 2009, **109**(6): 1756-66.

Perkins A., Nelson K.J., Parsonage D., Poole L.B., Karplus P.A.

Peroxiredoxins: guardians against oxidative stress and modulators of peroxide signaling.

Trends Biochem Sci, 2015, **40**(8): 435-45.

Porter N.J., Mahendran A., Breslow R., Christianson D.W.

Unusual zinc-binding mode of HDAC6-selective hydroxamate inhibitors.

Proc Natl Acad Sci U S A, 2017, **114**(51): 13459-64.

Porter N.J., Osko J.D., Diedrich D., Kurz T., Hooker J.M., Hansen F.K., Christianson D.W.

Histone Deacetylase 6-Selective Inhibitors and the Influence of Capping Groups on Hydroxamate-Zinc Denticity.

J Med Chem, 2018, **61**(17): 8054-60.

Puil L., Liu J., Gish G., Mbamalu G., Bowtell D., Pelicci P.G., Arlinghaus R., Pawson T.

Bcr-Abl oncoproteins bind directly to activators of the Ras signalling pathway.

EMBO J, 1994, **13**(4): 764-73.

Qian H., Chen Y., Nian Z., Su L., Yu H., Chen F.J., Zhang X., Xu W., Zhou L., Liu J., Yu J., Yu L., Gao Y., Zhang H., Zhang H., Zhao S., Yu L., Xiao R.P., Bao Y., Hou S., Li P., Li J., Deng H., Jia W., Li P.

HDAC6-mediated acetylation of lipid droplet-binding protein CIDEC regulates fat-induced lipid storage.

J Clin Invest, 2017, **127**(4): 1353-69.

R Development Core Team (2010). R: A language and environment for statistical computing, R Foundation for Statistical Computing.

Rahikainen R., von Essen M., Schaefer M., Qi L., Azizi L., Kelly C., Ihalainen T.O., Wehrle-Haller B., Bastmeyer M., Huang C., Hytonen V.P.

Mechanical stability of talin rod controls cell migration and substrate sensing.

Sci Rep, 2017, **7**(1): 3571.

Rao R., Fiskus W., Yang Y., Lee P., Joshi R., Fernandez P., Mandawat A., Atadja P., Bradner J.E., Bhalla K.

HDAC6 inhibition enhances 17-AAG--mediated abrogation of hsp90 chaperone function in human leukemia cells.

Blood, 2008, **112**(5): 1886-93.

Reuther G.W., Fu H., Cripe L.D., Collier R.J., Pendergast A.M.

Association of the protein kinases c-Bcr and Bcr-Abl with proteins of the 14-3-3 family.

Science, 1994, **266**(5182): 129-33.

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.

Roy A., Ye J., Deng F., Wang Q.J.

Potein kinase D signaling in cancer: A friend or foe?

Biochim Biophys Acta, 2017, **1868**(1): 283-94.

RStudio Team (2015). RStudio: Integrated Development for R.

Salemi L.M., Almawi A.W., Lefebvre K.J., Schild-Poulter C.

Aggresome formation is regulated by RanBPM through an interaction with HDAC6.

Biol Open, 2014, **3**(6): 418-30.

Salian-Mehta S., Xu M., McKinsey T.A., Tobet S., Wierman M.E.

Novel Interaction of Class IIb Histone Deacetylase 6 (HDAC6) with Class IIa HDAC9 Controls Gonadotropin Releasing Hormone (GnRH) Neuronal Cell Survival and Movement.

J Biol Chem, 2015, **290**(22): 14045-56.

Santo L., Hideshima T., Kung A.L., Tseng J.C., Tamang D., Yang M., Jarpe M., van Duzer J.H., Mazitschek R., Ogier W.C., Cirstea D., Rodig S., Eda H., Scullen T., Canavese M., Bradner J., Anderson K.C., Jones S.S., Raje N.

Preclinical activity, pharmacodynamic, and pharmacokinetic properties of a selective HDAC6 inhibitor, ACY-1215, in combination with bortezomib in multiple myeloma.

Blood, 2012, **119**(11): 2579-89.

Schafer S., Saunders L., Eliseeva E., Velena A., Jung M., Schwienhorst A., Strasser A., Dickmanns A., Ficner R., Schlimme S., Sippl W., Verdin E., Jung M.

Phenylalanine-containing hydroxamic acids as selective inhibitors of class IIb histone deacetylases (HDACs).

Bioorg Med Chem, 2008, **16**(4): 2011-33.

Schafer S., Saunders L., Schlimme S., Valkov V., Wagner J.M., Kratz F., Sippl W., Verdin E., Jung M.

Pyridylalanine-containing hydroxamic acids as selective HDAC6 inhibitors.

ChemMedChem, 2009, **4**(2): 283-90.

Schnekenburger M., Florean C., Dicato M., Diederich M.

Epigenetic alterations as a universal feature of cancer hallmarks and a promising target for personalized treatments.

Curr Top Med Chem, 2016, **16**(7): 745-76.

Schnekenburger M., Dicato M., Diederich M.F.

Anticancer potential of naturally occurring immunoepigenetic modulators: A promising avenue?

Cancer, 2019, **125**(10): 1612-28.

Schofield A.V., Gamell C., Bernard O.

Tubulin polymerization promoting protein 1 (TPPP1) increases beta-catenin expression through inhibition of HDAC6 activity in U2OS osteosarcoma cells.

Biochem Biophys Res Commun, 2013, **436**(4): 571-7.

Schultheis B., Wang L., Clark R.E., Melo J.V.

BCR-ABL with an e6a2 fusion in a CML patient diagnosed in blast crisis.

Leukemia, 2003, **17**(10): 2054-5.

Scott M.T., Korfi K., Saffrey P., Hopcroft L.E., Kinstrie R., Pellicano F., Guenther C., Gallipoli P., Cruz M., Dunn K., Jorgensen H.G., Cassels J.E., Hamilton A., Crossan A., Sinclair A., Holyoake T.L., Vetrie D.

Epigenetic Reprogramming Sensitizes CML Stem Cells to Combined EZH2 and Tyrosine Kinase Inhibition.

Cancer Discov, 2016, **6**(11): 1248-57.

Segretti M.C., Vallerini G.P., Brochier C., Langley B., Wang L., Hancock W.W., Kozikowski A.P.

Thiol-Based Potent and Selective HDAC6 Inhibitors Promote Tubulin Acetylation and T-Regulatory Cell Suppressive Function.

ACS Med Chem Lett, 2015, **6**(11): 1156-61.

Seidel C., Schnekenburger M., Dicato M., Diederich M.

Histone deacetylase 6 in health and disease.

Epigenomics, 2015, **7**(1): 103-18.

Seidel C., Schnekenburger M., Mazumder A., Teiten M.H., Kirsch G., Dicato M., Diederich M.

4-Hydroxybenzoic acid derivatives as HDAC6-specific inhibitors modulating microtubular structure and HSP90alpha chaperone activity against prostate cancer.

Biochem Pharmacol, 2016, **99**: 31-52.

Sellmer A., Stangl H., Beyer M., Grunstein E., Leonhardt M., Pongratz H., Eichhorn E., Elz S., Striegl B., Jenei-Lanzl Z., Dove S., Straub R.H., Kramer O.H., Mahboobi S.

Marbostat-100 Defines a New Class of Potent and Selective Antiinflammatory and Antirheumatic Histone Deacetylase 6 Inhibitors.

J Med Chem, 2018, **61**(8): 3454-77.

Senger J., Melesina J., Marek M., Romier C., Oehme I., Witt O., Sippl W., Jung M.

Synthesis and Biological Investigation of Oxazole Hydroxamates as Highly Selective Histone Deacetylase 6 (HDAC6) Inhibitors.

J Med Chem, 2016, **59**(4): 1545-55.

Shen S., Hadley M., Ustinova K., Pavlicek J., Knox T., Noonepalle S., Tavares M.T., Zimprich C.A., Zhang G., Robers M.B., Barinka C., Kozikowski A., Villagra A.

Discovery of a New Isoxazole-3-hydroxamate Based Histone Deacetylase 6 Inhibitor SS-208 with Anti-tumor Activity in Syngeneic Melanoma Mouse Models.

J Med Chem, 2019,

Shi C.S., Tuscano J., Kehrl J.H.

Adaptor proteins CRK and CRKL associate with the serine/threonine protein kinase GCKR promoting GCKR and SAPK activation.

Blood, 2000, **95**(3): 776-82.

Shin S., Lee Y., Kim W., Ko H., Choi H., Kim K.

Caspase-2 primes cancer cells for TRAIL-mediated apoptosis by processing procaspase-8.

EMBO J, 2005, **24**(20): 3532-42.

Siegel R.L., Miller K.D., Jemal A.

Cancer statistics, 2018.

CA Cancer J Clin, 2018, **68**(1): 7-30.

Sixto-Lopez Y., Bello M., Rodriguez-Fonseca R.A., Rosales-Hernandez M.C., Martinez-Archundia M., Gomez-Vidal J.A., Correa-Basurto J.

Searching the conformational complexity and binding properties of HDAC6 through docking and molecular dynamic simulations.

J Biomol Struct Dyn, 2017, **35**(13): 2794-814.

Sorel N., Cayssials E., Brizard F., Chomel J.C.

Treatment and molecular monitoring update in chronic myeloid leukemia management.

Ann Biol Clin (Paris), 2017, **75**(2): 129-45.

Soverini S., Mancini M., Bavaro L., Cavo M., Martinelli G.

Chronic myeloid leukemia: the paradigm of targeting oncogenic tyrosine kinase signaling and counteracting resistance for successful cancer therapy.

Mol Cancer, 2018, **17**(1): 49.

St-Denis N.A., Derksen D.R., Litchfield D.W.

Evidence for regulation of mitotic progression through temporal phosphorylation and dephosphorylation of CK2alpha.

Mol Cell Biol, 2009, **29**(8): 2068-81.

Strebl M.G., Campbell A.J., Zhao W.N., Schroeder F.A., Riley M.M., Chindavong P.S., Morin T.M., Haggarty S.J., Wagner F.F., Ritter T., Hooker J.M.

HDAC6 Brain Mapping with [(18)F]Bavarostat Enabled by a Ru-Mediated Deoxyfluorination.

ACS Cent Sci, 2017, **3**(9): 1006-14.

Tala, Sun X., Chen J., Zhang L., Liu N., Zhou J., Li D., Liu M.

Microtubule stabilization by Mdp3 is partially attributed to its modulation of HDAC6 in addition to its association with tubulin and microtubules.

PLoS One, 2014, **9**(3): e90932.

Tang G., Wong J.C., Zhang W., Wang Z., Zhang N., Peng Z., Zhang Z., Rong Y., Li S., Zhang M., Yu L., Feng T., Zhang X., Wu X., Wu J.Z., Chen L.

Identification of a novel aminotetralin class of HDAC6 and HDAC8 selective inhibitors.

J Med Chem, 2014, **57**(19): 8026-34.

Thiagalingam S., Cheng K.H., Lee H.J., Mineva N., Thiagalingam A., Ponte J.F.

Histone deacetylases: unique players in shaping the epigenetic histone code.

Ann N Y Acad Sci, 2003, **983**: 84-100.

Valent P., Sadovnik I., Eisenwort G., Bauer K., Herrmann H., Gleixner K.V., Schulenburg A., Rabitsch W., Sperr W.R., Wolf D.

Immunotherapy-Based Targeting and Elimination of Leukemic Stem Cells in AML and CML.

Int J Mol Sci, 2019, **20**(17)

van der Velden V.H., Beverloo H.B., Hoogeveen P.G., Zwaan Ch M.

A novel BCR-ABL fusion transcript (e18a2) in a child with chronic myeloid leukemia.

Leukemia, 2007, **21**(4): 833-5.

Vergilio J., Bagg A.

Myeloproliferative disorders and myelodysplastic syndromes

In "Molecular Pathology in Clinical Practice", Leonard D. G. B., Springer New York, 2007, pp. 383-96

Vogerl K., Ong N., Senger J., Herp D., Schmidtkunz K., Marek M., Muller M., Bartel K., Shaik T.B., Porter N.J., Robaa D., Christianson D.W., Romier C., Sippl W., Jung M., Bracher F.

Synthesis and Biological Investigation of Phenothiazine-Based Benzhydroxamic Acids as Selective Histone Deacetylase 6 Inhibitors.

J Med Chem, 2019, **62**(3): 1138-66.

Wagner F.F., Olson D.E., Gale J.P., Kaya T., Weiwer M., Aidoud N., Thomas M., Davoine E.L., Lemercier B.C., Zhang Y.L., Holson E.B.

Potent and selective inhibition of histone deacetylase 6 (HDAC6) does not require a surface-binding motif.

J Med Chem, 2013, **56**(4): 1772-6.

Wahhab A., Smil D., Ajamian A., Allan M., Chantigny Y., Therrien E., Nguyen N., Manku S., Leit S., Rahil J., Petschner A.J., Lu A.H., Nicolescu A., Lefebvre S., Montcalm S., Fournel M., Yan T.P., Li Z., Besterman J.M., Deziel R.

Sulfamides as novel histone deacetylase inhibitors.

Bioorg Med Chem Lett, 2009, **19**(2): 336-40.

Wang J.Y.

The capable ABL: what is its biological function?

Mol Cell Biol, 2014, **34**(7): 1188-97.

Wang X.X., Wan R.Z., Liu Z.P.

Recent advances in the discovery of potent and selective HDAC6 inhibitors.

Eur J Med Chem, 2017,

Wang Y., Tomar A., George S.P., Khurana S.

Obligatory role for phospholipase C-gamma(1) in villin-induced epithelial cell migration.

Am J Physiol Cell Physiol, 2007, **292**(5): C1775-86.

Westerweel P.E., Te Boekhorst P.A.W., Levin M.D., Cornelissen J.J.

New Approaches and Treatment Combinations for the Management of Chronic Myeloid Leukemia.

Front Oncol, 2019, **9**: 665.

Williams K.A., Zhang M., Xiang S., Hu C., Wu J.Y., Zhang S., Ryan M., Cox A.D., Der C.J., Fang B., Koomen J., Haura E., Bepler G., Nicosia S.V., Matthias P., Wang C., Bai W., Zhang X.

Extracellular signal-regulated kinase (ERK) phosphorylates histone deacetylase 6 (HDAC6) at serine 1035 to stimulate cell migration.

J Biol Chem, 2013, **288**(46): 33156-70.

Withey J.M., Marley S.B., Kaeda J., Harvey A.J., Crompton M.R., Gordon M.Y.

Targeting primary human leukaemia cells with RNA interference: Bcr-Abl targeting inhibits myeloid progenitor self-renewal in chronic myeloid leukaemia cells.

Br J Haematol, 2005, **129**(3): 377-80.

Wu J.Y., Xiang S., Zhang M., Fang B., Huang H., Kwon O.K., Zhao Y., Yang Z., Bai W., Bepler G., Zhang X.M.

Histone deacetylase 6 (HDAC6) deacetylates extracellular signal-regulated kinase 1 (ERK1) and thereby stimulates ERK1 activity.

J Biol Chem, 2018, **293**(6): 1976-93.

Yaghmaie M., Ghaffari S.H., Ghavamzadeh A., Alimoghaddam K., Jahani M., Mousavi S.A., Irvani M., Bahar B., Bibordi I.

Frequency of BCR-ABL fusion transcripts in Iranian patients with chronic myeloid leukemia.

Arch Iran Med, 2008, **11**(3): 247-51.

Yan J., Seibenhener M.L., Calderilla-Barbosa L., Diaz-Meco M.T., Moscat J., Jiang J., Wooten M.W., Wooten M.C.

SQSTM1/p62 interacts with HDAC6 and regulates deacetylase activity.

PLoS One, 2013, **8**(9): e76016.

Yang K., Fu L.W.

Mechanisms of resistance to BCR-ABL TKIs and the therapeutic strategies: A review.

Crit Rev Oncol Hematol, 2015, **93**(3): 277-92.

Yang M.H., Laurent G., Bause A.S., Spang R., German N., Haigis M.C., Haigis K.M.

HDAC6 and SIRT2 regulate the acetylation state and oncogenic activity of mutant K-RAS.

Mol Cancer Res, 2013, **11**(9): 1072-7.

Yang Z., Wang T., Wang F., Niu T., Liu Z., Chen X., Long C., Tang M., Cao D., Wang X., Xiang W., Yi Y., Ma L., You J., Chen L.

Discovery of Selective Histone Deacetylase 6 Inhibitors Using the Quinazoline as the Cap for the Treatment of Cancer.

J Med Chem, 2016, **59**(4): 1455-70.

Yin C., Li P.

Growth Suppression of Glioma Cells Using HDAC6 Inhibitor, Tubacin.

Open Med (Wars), 2018, **13**: 221-6.

Yu C.W., Chang P.T., Hsin L.W., Chern J.W.

Quinazolin-4-one derivatives as selective histone deacetylase-6 inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease.

J Med Chem, 2013, **56**(17): 6775-91.

Zhang B., Strauss A.C., Chu S., Li M., Ho Y., Shiang K.D., Snyder D.S., Huettner C.S., Shultz L., Holyoake T., Bhatia R.

Effective targeting of quiescent chronic myelogenous leukemia stem cells by histone deacetylase inhibitors in combination with imatinib mesylate.

Cancer Cell, 2010, **17**(5): 427-42.

Zhang I., Beus M., Stochaj U., Le P.U., Zorc B., Rajic Z., Petrecca K., Maysinger D.

Inhibition of glioblastoma cell proliferation, invasion, and mechanism of action of a novel hydroxamic acid hybrid molecule.

Cell Death Discov, 2018, **4**: 41.

Zhang L., Liu S., Liu N., Zhang Y., Liu M., Li D., Seto E., Yao T.P., Shui W., Zhou J.

Proteomic identification and functional characterization of MYH9, Hsc70, and DNAJA1 as novel substrates of HDAC6 deacetylase activity.

Protein Cell, 2015, **6**(1): 42-54.

Zhang M., Luo Z., Liu H., Croce C.M., Burke T.R., Jr., Bottaro D.P.

Synergistic anti-leukemic activity of imatinib in combination with a small molecule Grb2 SH2 domain binding antagonist.

Leukemia, 2014a, **28**(4): 948-51.

Zhang M., Xiang S., Joo H.Y., Wang L., Williams K.A., Liu W., Hu C., Tong D., Haakenson J., Wang C., Zhang S., Pavlovicz R.E., Jones A., Schmidt K.H., Tang J., Dong H., Shan B., Fang B., Radhakrishnan R., Glazer P.M., Matthias P., Koomen J., Seto E., Bepler G., Nicosia S.V., Chen J., Li C., Gu L., Li G.M., Bai W., Wang H., Zhang X.

HDAC6 deacetylates and ubiquitinates MSH2 to maintain proper levels of MutSalpha.

Mol Cell, 2014b, **55**(1): 31-46.

Zhang Y., Gilquin B., Khochbin S., Matthias P.

Two catalytic domains are required for protein deacetylation.

J Biol Chem, 2006, **281**(5): 2401-4.

Zheng K., Jiang Y., He Z., Kitazato K., Wang Y.

Cellular defence or viral assist: the dilemma of HDAC6.

J Gen Virol, 2017, **98**(3): 322-37.

Zhou N., Xu W., Zhang Y.

Histone deacetylase inhibitors merged with protein tyrosine kinase inhibitors.

Drug Discov Ther, 2015a, **9**(3): 147-55.

Zhou W., Zhu W., Ma L., Xiao F., Qian W.

Proteasome inhibitor MG-132 enhances histone deacetylase inhibitor SAHA-induced cell death of chronic myeloid leukemia cells by an ROS-mediated mechanism and downregulation of the Bcr-Abl fusion protein.

Oncol Lett, 2015b, **10**(5): 2899-904.

Liste des publications

Abstract :

Schnekenburger M., **Losson H.**, Lernoux M., Florean C., Dicato M., Diederich M.

Natural Compounds as Epigenetic Modulators in Cancer.

Multidisciplinary Digital Publishing Institute Proceedings **11** (1), 30.

Revues :

Losson H., Schnekenburger M., Dicato M., Diederich M.

Natural compound histone deacetylase inhibitors (HDACi): synergy with inflammatory signaling pathway modulators and clinical applications in cancer.

Molecules **21** (11), 1608

Papier soumis dans *Pharmacological Research* le 10 novembre 2019 :

Losson H., Lernoux M., Lee J-Y., Mazumder A., Gérard D., Seidel C., Dicato M., Kirsch G., Han B. W., Schnekenburger M., Diederich M.

The HDAC6 inhibitor 7b induces BCR-ABL ubiquitination and downregulation and synergizes with imatinib to trigger apoptosis in chronic myeloid leukemia.

Papier soumis dans *Clinical Epigenetics* le 25 octobre 2019 :

Lernoux M., Schnekenburger M., **Losson H.**, Vermeulen K., Hahn H., Gérard D., Lee J-Y., Mazumder A., Ahamed M., Christov C., Kim D-W., Dicato M., Bormans G., Han B-W., Diederich M.

Novel HDAC inhibitor MAKV-8 and imatinib synergistically kill chronic myeloid leukemia cells via inhibition of BCR-ABL/MYC-signaling: effect on imatinib resistance and stem cells.

molecules

MDPI

Review

Natural Compound Histone Deacetylase Inhibitors (HDACi): Synergy with Inflammatory Signaling Pathway Modulators and Clinical Applications in Cancer

Hélène Losson [1], Michael Schnekenburger [1], Mario Dicato [1] and Marc Diederich [2,*]

[1] Laboratoire de Biologie Moléculaire et Cellulaire du Cancer (LBMCC), Hôpital Kirchberg, 9 Rue Edward Steichen, Luxembourg L-2540, Luxembourg; helene.losson@lbmcc.lu (H.L.); michael.schnekenburger@lbmcc.lu (M.S.); mdicato@gmail.com (M.D.)

[2] Department of Pharmacy, College of Pharmacy, Seoul National University, Building 29 Room 223, 1 Gwanak-ro, Gwanak-gu, Seoul 08826, Korea

* Correspondence: marcdiederich@snu.ac.kr; Tel.: +82-10-2928-2244

Academic Editor: Norbert Latruffe

Received: 28 September 2016; Accepted: 3 November 2016; Published: 23 November 2016

Abstract: The remarkable complexity of cancer involving multiple mechanisms of action and specific organs led researchers Hanahan and Weinberg to distinguish biological capabilities acquired by cancer cells during the multistep development of human tumors to simplify its understanding. These characteristic hallmarks include the abilities to sustain proliferative signaling, evade growth suppressors, resist cell death, enable replicative immortality, induce angiogenesis, activate invasion and metastasis, avoid immune destruction, and deregulate cellular energetics. Furthermore, two important characteristics of tumor cells that facilitate the acquisition of emerging hallmarks are tumor-promoting inflammation and genome instability. To treat a multifactorial disease such as cancer, a combination treatment strategy seems to be the best approach. Here we focus on natural histone deacetylase inhibitors (HDACi), their clinical uses as well as synergies with modulators of the pro-inflammatory transcription factor signaling pathways.

Keywords: histone deacetylase inhibitors; anticancer drugs; vorinostat; romidepsin; belinostat; panobinostat; histone acetylation; nuclear factor-κB modulation

1. Introduction

Epigenetic modifications can be the cause of each of the cancer hallmarks. Indeed, the term "epigenetic" refers to the change of a gene's expression without a change in its DNA sequence. Therefore, epigenetic modifications can regulate the expression of each gene implicated in cell tumorigenesis. Epigenetic modifications of DNA methylation, histone modification marks, and small RNA-mediated gene silencing are dynamic and potentially reversible changes [1]. We will focus on histone deacetylases (HDACs) that are implicated in histone modification. Increasing interest has been centered on the development of histone deacetylase inhibitors (HDACi) for cancer treatment, as they can modulate gene expression and the activity of numerous non-histone proteins. However, HDACi toxicity and limited clinical benefit in patients with solid tumors, have led to the investigation of combination treatments with other cancer therapeutics [2].

Epidemiological studies showed that regular consumption of vegetables and fruits is associated with a reduced risk of chronic diseases such as cancer. Natural products have been inevitably used as therapeutic agents. Moreover, most medicinal substances available today have their origin in natural products [2].

2. Histone Deacetylases and Their Classification

Among epigenetic modifications, histone acetylation has been the best studied. Histone acetylation status is controlled by histone acetyltransferases (HATs) and HDACs, which add or remove, respectively, an acetyl group on ε-amino groups of lysine residues in histone N-terminal regions [3]. Figure 1 shows acetylation and deacetylation reactions.

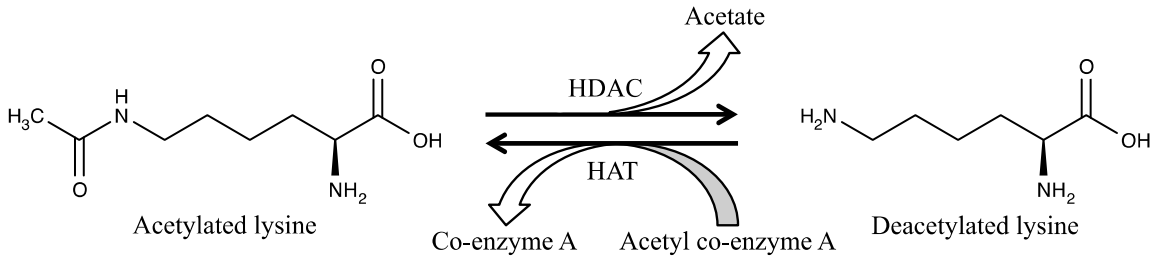


Figure 1. Acetylation and deacetylation reactions of lysine. The acetylation reaction is catalyzed by histone acetyltransferases (HATs) using acetyl co-enzyme A as an acetyl group donor. Deacetylation, on the other hand, is catalyzed by histone deacetylases (HDACs).

Histone hypoacetylation is associated with gene silencing because of an electrostatic interaction between the positive charge of hypoacetylated histones and negative charge of DNA phosphate, which maintains chromatin as a condensed structure. Moreover, the activity of non-histone proteins, such as signal transduction mediators, chaperone proteins, transcription factors, structural proteins, and inflammation mediators, is also dependent on their acetylation status regulated by HATs and HDACs. Consequently, a change in acetylation status has consequences for protein-DNA interactions, protein-protein interactions, and protein stability [4].

In humans, 18 HDACs, divided into two families, have been identified so far based on their homology to yeast deacetylases. One family requires zinc ion (Zn^{2+}) as a cofactor for deacetylase activity and includes HDAC1 to 11. A sequence homology was found between the yeast deacetylase reduced potassium dependency-3 (Rpd3) and HDAC1, 2, 3 and 8; and similarly, between the yeast histone deacetylases-1 (Hda1) and HDAC4, 5, 6, 9 and 10. HDAC11 shares sequence identity with both yeast deacetylases. The second HDAC family requires the cofactor nicotinamide adenine dinucleotide (NAD^+) and includes seven members, the sirtuins (SIRTs) 1 to 7 that are related to the yeast deacetylase silent information regulator-2 (Sir2) [2]. The two HDAC families are divided into four classes based on their size and cellular location. Class I (HDAC1, 2, 3 and 8) and class IV (HDAC11) are mainly found in the nucleus, while class IIb (HDAC6 and 10) is primarily found in the cytoplasm. Class IIa (HDAC4, 5, 7 and 9) is found shuttling between the nucleus and cytoplasm. Class III enzymes (sirtuins 1–7) are localized in the nucleus, cytoplasm, and mitochondria [5]. Table 1 summarizes the classification, protein size, implicated co-factor, cellular localization, some physiological functions, and expression of these HDACs [6,7]. Figure 2 represents the molecular structure of the different classes of HDACs.

Table 1. Histone deacetylase (HDAC) enzymes: classification, size, co-factor, cellular localization, physiological function, and expression.

Class	Members	Size (Amino Acids)	Co-Factor	Cellular Localization	Physiological Function	Expression
I	HDAC1	483	Zn^{2+}	Nucleus	Cell proliferation and survival	Ubiquitous
	HDAC2	488	Zn^{2+}	Nucleus	Cell proliferation and insulin resistance	
	HDAC3	428	Zn^{2+}	Nucleus	Cell proliferation and survival	
	HDAC8	377	Zn^{2+}	Nucleus	Cell proliferation	
IIa	HDAC4	1084	Zn^{2+}	Nucleus/Cytoplasm	Control of cytoskeletal dynamics and cell mobility	Tissue-specific
	HDAC5	1122	Zn^{2+}	Nucleus/Cytoplasm	Gluconeogenesis, cardiovascular growth, and function, and cardiac myocyte and endothelial cell function	
	HDAC7	912	Zn^{2+}	Nucleus/Cytoplasm	Glycogenesis, endothelial function, and thymocyte differentiation	
	HDAC9	1069	Zn^{2+}	Nucleus/Cytoplasm	Cardiovascular growth and function, homologous recombination, and thymocyte differentiation	
IIb	HDAC6	1215	Zn^{2+}	Cytoplasm	Control of cytoskeletal dynamics and cell mobility	Tissue-specific
	HDAC10	669	Zn^{2+}	Cytoplasm	Autophagy-mediated cell survival and homologous recombination	
III	SIRT1	747	NAD^+	Nucleus/Cytoplasm	Autoimmune system regulation, cell survival, aging, and redox regulation	Variable
	SIRT2	389	NAD^+	Nucleus	Cell survival, cell migration and invasion	
	SIRT3	399	NAD^+	Mitochondria	Redox balance, ATP regulation and metabolism, urea cycle, apoptosis, and cell signaling	
	SIRT4	314	NAD^+	Mitochondria	ATP regulation and metabolism, energy metabolism, apoptosis and cell signaling	
	SIRT5	310	NAD^+	Mitochondria	ATP regulation, urea cycle, energy metabolism, apoptosis, and cell signaling	
	SIRT6	355	NAD^+	Nucleus	Metabolic regulation	
	SIRT7	400	NAD^+	Nucleus	Apoptosis	
IV	HDAC11	347	Zn^{2+}	Nucleus	Immunomodulation and DNA replication	Ubiquitous

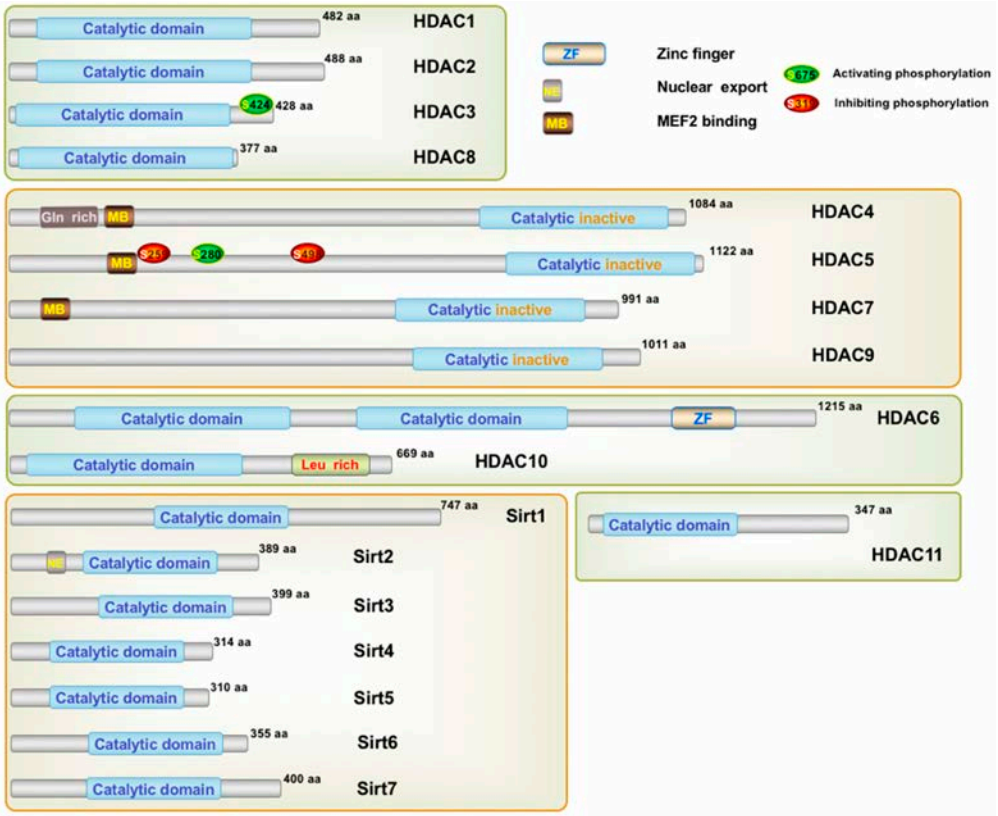


Figure 2. The molecular structure of human histone deacetylases (scheme realized with ScienceSlides 2016; VisiScience Inc., Chapel Hill, NC, USA).

3. Histone Deacetylases and Cancer

According to recent studies, altered acetylation levels and HDAC enzyme dysfunctions are linked to numerous human diseases including cancer. It has been shown that expression of HDACs is increased in hematological cancers and solid tumors, and is correlated with a poor prognosis. HDACs are involved in deacetylation of not only chromatin proteins, which can alter the regulation of gene transcription, but also non-histone proteins that control apoptosis and/or cell cycle progression and differentiation [8]. The involvement of HDACs at these regulation levels explains why they can be strongly implicated in the acquisition of malignant phenotypes. We will next focus on the role of each HDAC class in cancer.

3.1. Class I

HDACs that belong to class I induce cell proliferation but inhibit differentiation and apoptosis [9]. Some researchers have studied the expression of HDAC genes in different cancers. In this manuscript, *HDAC* in italics designate the corresponding gene. A *HDAC1* overexpression has been found in Hodgkin's lymphoma, ovarian, prostate, and gastric cancer [4]. Furthermore, an increase in HDAC1 expression has been reported in gastrointestinal and prostate cancer, breast carcinomas [9], colon adenocarcinoma [7], and chronic lymphocytic leukemia (CLL) [10]. However, a downregulation of HDAC1 has been observed in colorectal cancer [4]. Overexpression of HDAC2 has been observed in uterine, cervical, and gastric cancers [9], while *HDAC2* overexpression was detected in ovarian cancer and Hodgkin's lymphoma [4]. In some cancers, such as colon, endometrial, and gastric cancers, a truncating *HDAC2* mutation has been found [4]. *HDAC3* overexpression has been observed in Hodgkin's lymphoma [4], colon cancer [9], and CLL [10]. Moreover, *HDAC3* overexpression has been found in ovarian and lung cancers [4]. However, an increased expression of HDAC1 and 3 was paradoxically related to disease-free survival in invasive breast cancer patients [7].

3.2. Class II

Class II HDACs induce tumor angiogenesis [9]. However, reduced expression of class II HDACs is related to a poor clinical outcome in non-small-cell lung cancer patients [7]. *HDAC4* missense mutations have been observed in breast and colorectal cancers, while this HDAC is overexpressed in breast cancer [4]. Nevertheless, *HDAC4* has been shown to be downregulated in lung and colon cancers [4].

Interestingly in colorectal cancer, we find an *HDAC5* downregulation but an *HDAC7* overexpression, which is also observed in pancreatic cancer [4]. An overexpression of HDAC7 and HDAC9 has been detected in CLL [10]. HDAC6 specifically increases cell motility that results in distant metastasis [9]. HDAC6 has been reported to be overexpressed in acute lymphoblastic leukemia (ALL), acute myeloid leukemia (AML), breast cancer, CLL, cutaneous T-cell lymphoma (CTCL), hepatocellular carcinoma, oral squamous cell carcinoma, and ovarian and urothelial cancers. Paradoxically its overexpression is correlated with longer survival in CLL and CTCL [11]. Finally, HDAC10 overexpression has been reported in CLL [10].

3.3. Class III

An overexpression of sirtuin (SIRT)1 has been reported in CLL [10], AML, skin, colon, and prostate cancers [12]. Nevertheless, a *SIRT1* downregulation has been found in colorectal cancer [13]. Furthermore, a decrease in SIRT6 expression has been observed in liver cancer [14], while its overexpression has been found in CLL [10]. SIRT7 is overexpressed in breast cancer [15].

3.4. Class IV

HDAC11 protein does not seem to be implicated in tumorigenesis [4]. Table 2 summarizes the variation observed in HDAC protein and gene expression levels and their implication in specific cancers.

Table 2. Changes in histone deacetylase protein and gene expression implicated in cancer [a].

Class	Members	Type of Variation	Cancer Involved	References
I	HDAC1	Overexpression	Gastrointestinal carcinoma	[9]
			Prostate carcinoma	[9]
			Breast carcinoma	[9]
			Colon adenocarcinoma	[7]
			Chronic lymphocytic leukemia	[10]
		HDAC1 overexpression	Ovarian cancer	[4]
			Gastric cancer	[4]
			Hodgkin's lymphoma	[4]
			Prostate cancer	[4]
		HDAC1 downregulation	Colorectal cancer	[4]
	HDAC2	Overexpression	Uterine cancer	[9]
			Cervical cancer	[9]
			Gastric cancer	[9]
		HDAC2 overexpression	Ovarian cancer	[4]
			Hodgkin's lymphoma	[4]
		Truncating *HDAC2* mutation	Colon cancer	[4]
			Endometrial cancer	[4]
			Gastric cancer	[4]
	HDAC3	Overexpression	Colon cancer	[9]
			Hodgkin's lymphoma	[4]
			Chronic lymphocytic leukemia	[10]
		HDAC3 overexpression	Ovarian cancer	[4]
			Lung cancer	[4]

Table 2. *Cont.*

Class	Members	Type of Variation	Cancer Involved	References
IIa	HDAC4	*HDAC4* mutations	Breast cancer	[4]
			Colorectal cancer	[4]
		HDAC4 overexpression	Prostate cancer	[4]
			Breast cancer	[4]
		HDAC4 downregulation	Colon cancer	[16]
			Lung cancer	[16]
	HDAC5	*HDAC5* downregulation	Colorectal cancer	[4]
	HDAC7	Overexpression	Chronic lymphocytic leukemia	[10]
		HDAC7 overexpression	Colorectal cancer	[4]
			Pancreatic cancer	[4]
	HDAC9	Overexpression	Chronic lymphocytic leukemia	[10]
IIb	HDAC6	Overexpression	Acute lymphoblastic leukemia	[11]
			Acute myeloid leukemia	[11]
			Breast cancer	[11]
			Chronic lymphocytic leukemia	[11]
			Cutaneous T-cell lymphoma	[11]
			Hepatocellular carcinoma	[11]
			Oral squamous cell carcinoma	[11]
			Ovarian cancer	[11]
			Urothelial cancer	[11]
	HDAC10	Overexpression	Chronic lymphocytic leukemia	[10]
III	SIRT1	Overexpression	Acute myeloid leukemia	[12]
			Skin cancer	[12]
			Colon cancer	[12]
			Prostate cancer	[12]
			Chronic lymphocytic leukemia	[10]
		SIRT1 downregulation	Colorectal cancer	[13]
	SIRT6	Overexpression	Chronic lymphocytic leukemia	[10]
		Downregulation	Liver cancer	[14]
	SIRT7	Overexpression	Breast cancer	[15]

[a] In this table, HDAC in italics designate the corresponding gene.

4. Natural Compound Histone Deacetylase Inhibitors

Altogether natural compounds provide pleiotropic and potent inhibitors of all hallmarks of cancer [17–20]. Overall, it becomes mandatory to undertake a careful selection of natural compounds regarding specificity, drug-like characteristics and pharmacokinetic properties including pharmacologically relevant active concentration as well as potential side effects.

Natural compounds and their hemisynthetic derivatives of terrestrial [17] and marine origins [20] are considered potent anticancer as well as chemopreventive agents [21]. These compounds were shown to target multiple cancer cell signaling pathways leading to induction of various forms of cell death including apoptotic, autophagic [22] and more recently so-called non-canonical types of cell death [23].

Moreover, natural compounds provide pharmacological scaffolds that modify the epigenetic regulation of gene expression [19], allow cell-type specific differentiation with the aim to reprogram differentiation pathways [18] and act as inhibitors of inflammation [24]. Many natural compounds seem to interfere with a majority of molecular mechanisms involving proliferation and cell death (polyphenolic compounds, for example fisetin [25], curcumin [26], resveratrol [27], chalcones [28] or flavonoids [29]).

4.1. Natural Compound Scaffolds of Clinically Used HDAC Inhibitors

HDACi belong to a large family divided into five main classes according to their structure including hydroxamic acids, benzamides, cyclic peptides, short-chain fatty acids, and depsipeptides [3]. Interestingly, the four clinically approved HDACi are based on scaffolds originally discovered in microorganisms.

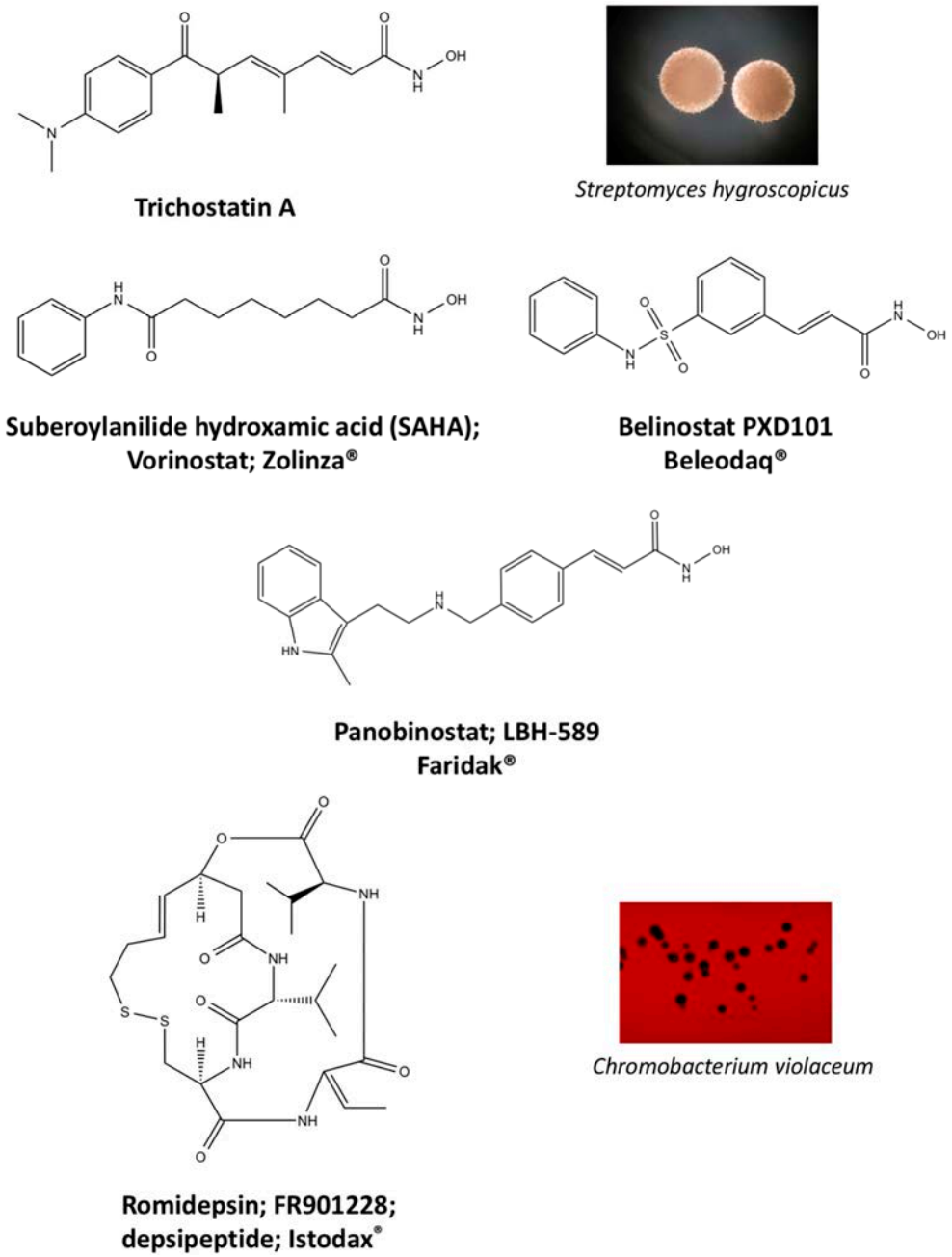


Figure 3. Molecular structures of clinically approved histone deacetylase inhibitors. (Trichostatin A is not clinically approved but added here as a precursor of a structural precursor of clinically used hydroxamate-derivatives).

In 1976, Tsuji et al. [30] described a natural compound, (*R*)-trichostatin A (TSA) (Figure 3), a naturally occurring hydroxamate antibiotic, originally extracted from *Streptomyces hygroscopicus*. TSA can trigger cell differentiation and interrupt the cell cycle of both normal and cancer cells together

with the accumulation of acetylated histones [31] and can be considered as a structural precursor of clinically used hydroxamate-derivatives. Related synthetic hydroxamate suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA; Vorinostat) (Figure 3), originally derived from hexamethylene bisacetamide (HMBA), were developed later [32] and eventually reached clinical applications. Similarly, synthetic compound PXD101 (Belinostat) (Figure 3) also belongs to the class of hydroxamates but inhibits HDACs in a low nanomolar range [33]. Furthermore, Novartis developed Panobinostat (Figure 3), a cinnamic hydroxamate [34].

In 1994, Ueda et al. [35] purified FR90122 (Figure 3), an antitumor bicyclic depsipeptide produced by *Chromobacterium violaceum* No. 968. Its HDAC inhibitory capacity was described by Nakajima et al. [36] leading to cell cycle arrest in G1 and G2/M stages.

4.2. Experimentally Used Natural Compound Scaffolds without Clinical Utilization

In 1977, Riggs et al. [37] described for the first time the effect of butyrate on histone modifications in HeLa and Friend erythroleukemia cell lines. In 1980, McKnight et al. [38] also investigated propionate, which had a lesser effect, on histone deacetylation in chick oviduct. Both natural compounds are active at millimolar levels and were initially discovered to be synthesized by colonic bacteria and contribute to the survival of colon cells otherwise undergoing autophagy. McKnight et al. also speculated that other proteins besides histones could be the target of acetylation changes and thus contribute to regulation of gene expression. Beyond cancer treatment, the effect of butyrate on colon cancer cells could also contribute to its cancer preventive potential [39]. Longer chained synthetic HDACi from the family of the fatty acids, valproic acid (VPA), is a clinically approved drug against epilepsy since the 1960s [40]. More recently, potent HDAC inhibition by VPA by binding to the active site of HDAC triggered differentiation of human leukemia cells [41]. This compound also has structural resemblance with the natural compound valeric acid extracted from *Valeriana officinalis* (Figure 4).

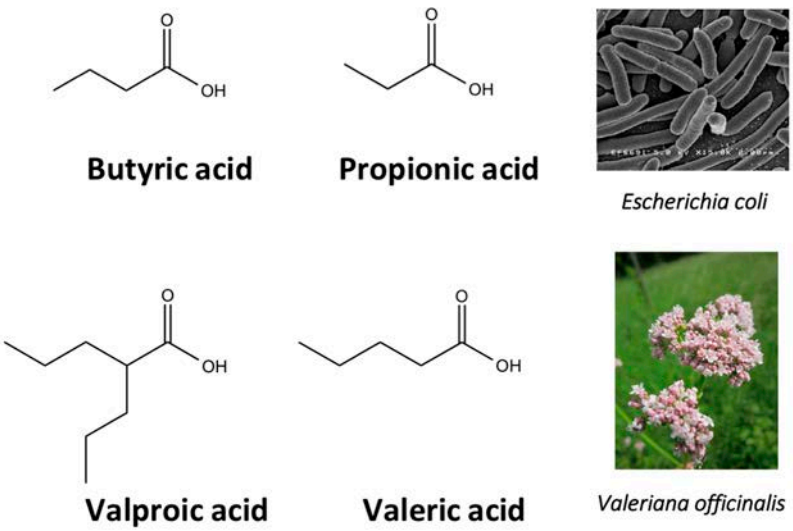


Figure 4. Molecular structures of short chain fatty acid HDACi scaffolds of natural origins.

In addition to the already mentioned natural compounds and their derivatives, numerous other natural compounds from both terrestrial and marine origin were described in the literature without apparent clinical applications yet (Table 3).

Table 3. Natural compounds with HDAC inhibitory function.

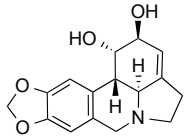
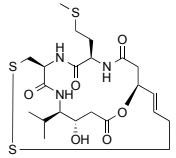
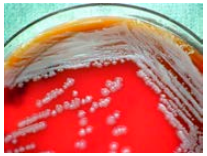
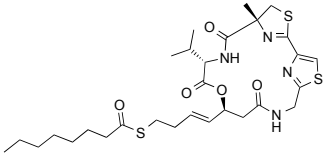
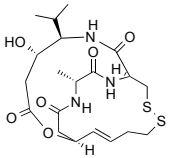
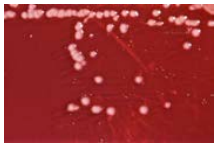
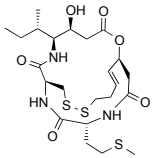
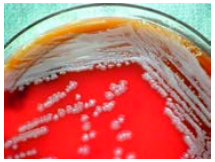
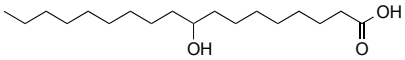
Compound Name	Chemical Category	HDAC Specificity	Origin of the Compound	Structure	Organism	Ref.
Lycorine	Alkaloid	Pan HDAC	*Amaryllidaceae*			[42]
Burkholdac A	Depsipeptide	Class I HDAC	*Burkholderia thailandensis*			[43]
Largazole	Depsipeptide	Class I HDAC HDAC1, 2, 3	*Cyanobacterium Symploca* sp.			[44]
Spiruchostatin A (YM753)	Depsipeptide	Class I HDAC	*Pseudomonas* sp.			[45]
Thailandepsin A (Burkholdac B)	Depsipeptide	Class I HDAC	*Burkholderia thailandensis*			[46,47]
9-Hydroxystearic acid	Fatty acid	Class I HDACs	Endogenous lipid peroxidation by-product			[48]

Table 3. *Cont.*

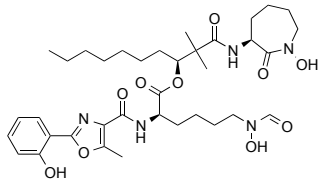
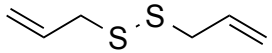
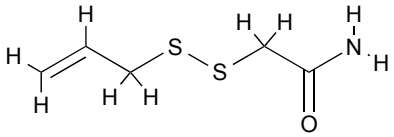
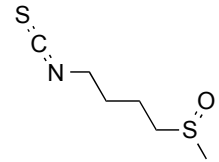
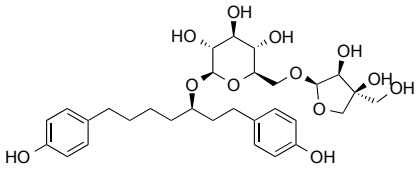
Compound Name	Chemical Category	HDAC Specificity	Origin of the Compound	Structure	Organism	Ref.
Amamistatin B	Mycobacterial siderophore	Pan HDAC	*Nocardia* sp.			[49]
Diallyl disulfide	Organosulfur compound	Increased acetylation	*Allium sativum*			[50]
(*S*)-allylmercaptocysteine	Organosulfur compound	Increased acetylation	*Allium sativum*			[51]
Sulforaphane	Organosulfur compound	Increased acetylation	*Brassica oleracea*			[52]
Aceroside VIII	Phenolic	HDAC6	*Betula platyphylla*			[53]

Table 3. *Cont.*

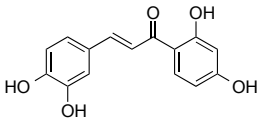
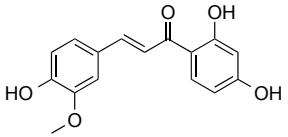
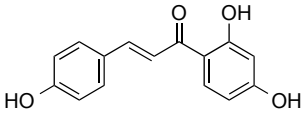
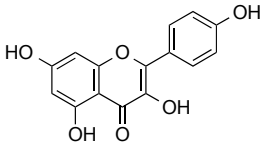
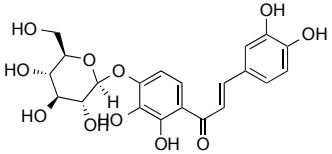
Compound Name	Chemical Category	HDAC Specificity	Origin of the Compound	Structure	Organism	Ref.
Butein	Phenolic	HDAC classes I, II and IV	*Toxicodendron vernicifluum*			[28]
Homobutein	Phenolic	HDAC classes I, II and IV	*Butea frondosa*			[28]
Isoliquiritigenin	Phenolic	HDAC classes I, II and IV	*Glycyrrhiza glabra*			[28]
Kaempferol	Phenolic	HDACs of class I, II and IV	*Aloe vera*			[54]
Marein	Phenolic	HDAC classes I, II and IV	*Coreopsis maritima*			[28]

Table 3. *Cont.*

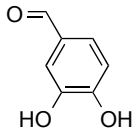
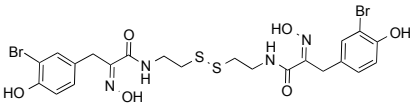
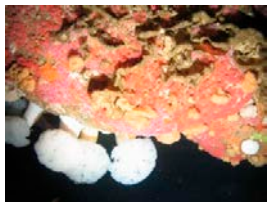
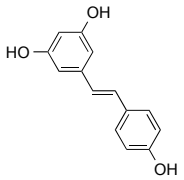
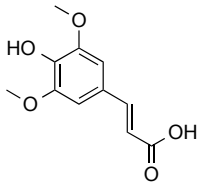
Compound Name	Chemical Category	HDAC Specificity	Origin of the Compound	Structure	Organism	Ref.
Protocatechuic aldehyde	Phenolic	HDAC2	*Hordeum vulgare*			[55]
Psammaplin A	Phenolic	Class I HDAC	*Poecillastra* sp. and *Jaspis* sp.			[56]
Resveratrol	Phenolic	HDACs of class I, II and IV	*Vitis vinifera*			[57]
Sinapinic acid	Phenolic	Pan HDAC	*Hydnophytum formicarum* Jack.			[58]

Table 3. *Cont.*

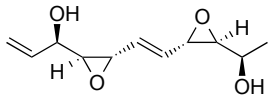
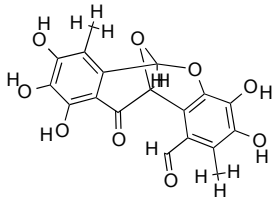
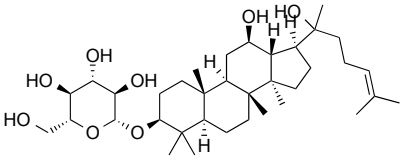
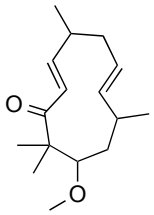
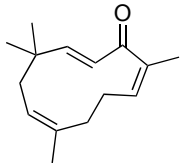
Compound Name	Chemical Category	HDAC Specificity	Origin of the Compound	Structure	Organism	Ref.
Depudecin	Polyketide	HDAC1	*Alternaria brassicicola*			[59]
Epicocconigrone A	Polyketide	HDACs of class I, IIb and IV	*Epicoccum nigrum*			[60]
20(*S*)-Ginsenoside Rh_2	*Steroid glycoside*	HDAC1, HDAC2, HDAC6	*Panax ginseng*			[61]
6-methoxy-2*E*,9*E*-humuladien-8-one	Terpenoid (sesqui-)	Pan HDAC	*Zingiber zerumbet* (L.) J. E. Smith			[62]
Zerumbone	Terpenoid (sesqui-)	Pan HDAC	*Zingiber zerumbet* (L.) J. E. Smith			[62]

Table 3. *Cont.*

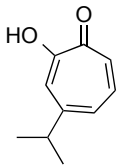
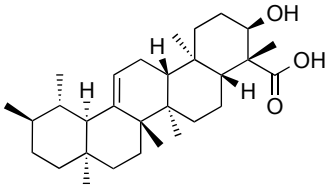
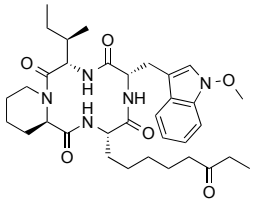
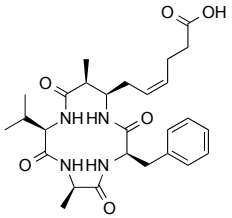
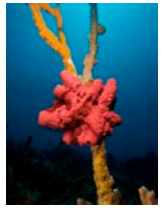
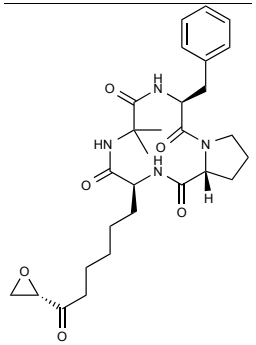
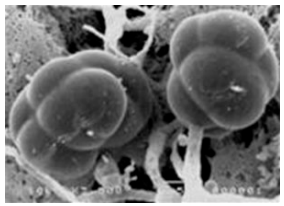
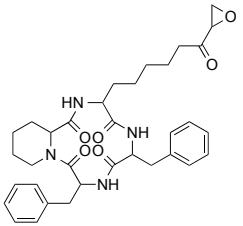
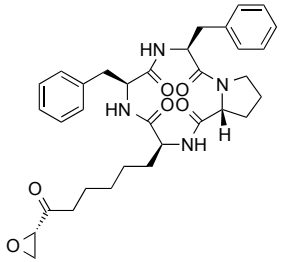
Compound Name	Chemical Category	HDAC Specificity	Origin of the Compound	Structure	Organism	Ref.
β-Thujaplicin (hinokitiol)	Terpenoid (mono)	HDAC2	*Cupressaceae* sp.			[63]
β-boswellic acid derivatives	Terpenoid (pentacyclic tri-)	HDAC8	*Boswellia sacra*			[64]
Apicidin	Tetrapeptide	Class I HDAC HDAC1, 2, 3, 8	*Fusarium* sp.			[65]
Azumamide E	Tetrapeptide	Class I HDAC HDAC1, 2, 3	*Mycale izuensis*			[66]

Table 3. *Cont.*

Compound Name	Chemical Category	HDAC Specificity	Origin of the Compound	Structure	Organism	Ref.
Chlamydocin	Tetrapeptide	HDAC1, 6	*Diheterospora chlamydosporia*			[67]
Trapoxin A	Tetrapeptide	Class I HDAC	*Helicoma ambiens* RF-1023			[68,69]
Trapoxin B	Tetrapeptide	Class I HDAC	*Helicoma ambiens* RF-1023			[68,69]

5. Clinically Approved Histone Deacetylase Inhibitors

Overexpression of various HDAC proteins is frequently reported in numerous cancers. In such cases, inhibitors of HDACs that reverse the malignant phenotype have emerged as promising anticancer therapeutics. The many biological effects due to HDAC inhibition are still unknown, as some important histones and non-histone proteins are regulated by acetylation. However, HDACi mainly induce hyperacetylation and consequently gene expression; they are implicated in chromatin stability, mitosis, and DNA repair mechanisms [4]. Even though a similar accumulation of acetylated histones has been shown after treatment of normal and tumor cells with HDACi, healthy cells appear to be much less sensitive to their apoptotic and growth inhibition effects than tumor cells [4]. All these characteristics seem to confirm the strong potential of HDACi in cancer treatment. To date, four HDACi have been approved by the United States Food and Drug Administration (USFDA) for cancer therapy: vorinostat, romidepsin, belinostat, and panobinostat. Three pharmacophores are found in class I and II HDACi, despite structural diversity: (1) A cap group which is in contact with residues on the rim of the binding pocket able to obstruct the entrance of the substrate; (2) a Zn^{2+} binding domain (ZBD); (3) a tail or linker that is a saturated or unsaturated aliphatic chain that can mimic the side chain of lysine [3,8].

5.1. Vorinostat

The first drug approved by USFDA in October 2006 for CTCL treatment was vorinostat (Figure 3) also known as SAHA or Zolinza®. Vorinostat is a linear hydroxamate compound, developed by Merck & Co. Inc., that inhibits class I, II, and IV HDACs [9]. An objective response rate of 30% was determined after a phase II trial in which 74 patients were given a daily oral administration of vorinostat (400 mg) [2]. Furthermore, a significant 31% response was obtained with continuous daily administration compared to an intermittent dosing (9%) [2]. However, severe side effects such as anemia and thrombocytopenia were reported, more frequently in patients who received vorinostat by intravenous administration [9]. Vorinostat appears to be useful in the treatment of some others diseases besides CTCL. Indeed, in a phase I trial, a clinical benefit was observed in seven of 41 patients with myelodysplastic syndromes (MDS) and advanced leukemia treated with vorinostat. According to clinicaltrials.gov, vorinostat is also being studied in 39 ongoing clinical trials as a single therapeutic agent for various cancers such as leukemia, non-small-cell lung cancer, multiple myelomas, MDS, and breast, pelvic and prostate cancers [70].

5.2. Romidepsin

Romidepsin (Figure 3), also known as FK228, FR901228, depsipeptide, or Istodax®, was the second drug approved by USFDA in November 2009 for CTCL, and in November 2011 for the treatment of peripheral T-cell lymphoma (PTCL). Romidepsin is a cyclic tetrapeptide isolated from the fermentation product of *Chromobacterium violaceum*, developed by Gloucester Pharmaceuticals, and it inhibits predominantly class I HDACs [9,71]. An overall response rate of 34% was determined after two phase II trials in which romidepsin was administered by intravenous infusion to 96 CTCL patients [2]. An objective response rate of 25% was obtained in PTCL patients [9]. However, side effects were reported such as nausea, vomiting, myelotoxicity, asthenia, and cardiac toxicity [72]. Currently, 34 ongoing clinical trials are studying the effect of romidepsin as a single agent on many other cancers such as leukemia, melanoma, and bladder, colorectal, breast, ovarian and prostate cancers (clinicaltrials.gov) [70].

5.3. Belinostat

The third drug (Figure 3) approved by USFDA in July 2014 for relapsed or refractory PTCL was belinostat (also named PXD101 or Beleodaq®). It is a hydroxamic acid-based compound developed by Spectrum Pharmaceuticals, that inhibits class I and II HDACs [73]. An overall response rate

of 26% was determined from clinical responses obtained after a multicenter, single arm trial on 120 PTCL patients who were refractory or had relapsed after their first treatment [6]. However, adverse events were reported, mainly fatigue, nausea, vomiting, diarrhea, constipation, phlebitis, headache, and dyspnea [72]. Belinostat is used in 15 ongoing clinical trials as a single agent for the treatment of cancers such as CTCL, MDS, multiple myelomas, Burkitt lymphoma, and solid tumors as in fallopian tube cancer [70].

5.4. Panobinostat

Panobinostat (LBH-589 or Faridak®) (Figure 3) was the fourth drug approved by USFDA in February 2015 for the treatment of multiple myelomas [9]. It is also a hydroxamic acid-based compound developed by Novartis, but that inhibits class I, II and IV HDACs [74]. Panobinostat has shown an objective response of 27% [9]. However, it induces severe diarrhea and cardiac toxicities [75]. Panobinostat is being studied in 50 clinical trials as a single agent for the treatment of other cancers such as CTCL, AML, Hodgkin's lymphoma, MDS, thyroid carcinoma, and colorectal and prostate cancers [70].

The four approved HDACi are indicated for hematological cancers, such as CTCL, PTCL, and multiple myelomas, but not for solid tumors. Early results of clinical trials including solid tumor patients have shown that HDACi are more efficient in the treatment of hematological cancers than solid tumors. Currently, the exact reasons for this are unknown, but some observations suggest that it may be explained by the instability of HDACi and hence their inability to reach solid tumor sites [6].

6. Combined Treatments of Histone Deacetylase Modulators and NF-κB Inhibitors

6.1. Post-Translational Modifications of NF-κB

Whereas the basic nuclear factor (NF)-κB cell signaling pathways are well known and investigated [76], synergistic interaction with epigenetic modifications and especially histone-mediated modifications remain a topic of investigation. Briefly, canonical activation of NF-κB takes place after stimulation of the tumor necrosis factor (TNF)-α receptor, triggering the formation of a signalosome comprising tumor necrosis factor receptor type 1-associated death domain (TRADD) adaptor protein, receptor-interacting protein (RIP) kinase, TNF receptor-associated factor (TRAF)2, transforming growth factor (TGF)-β-activated kinase 1 and MAP3K7-binding protein (TAB) 1 and 2 as well as TGF-β-activated kinase (TAK)1 leading to phosphorylation and activation of mitogen-activated protein kinase kinase kinase (MEKK)3. This kinase phosphorylates and activates IκB kinase (IKK) which in turn phosphorylates IκB, the natural inhibitor of NF-κB [77]. Upon phosphorylation, IκB dissociates from NF-κB. Devoid of its natural inhibitor, the nuclear localization sequence of NF-κB allows translocation from the cytoplasm to the nucleus [78] (Figure 5).

In addition to the release from IκB and nuclear translocation, the activation of NF-κB requires a wide variety of post-translational modifications (PTMs) of NF-κB subunits including phosphorylation, acetylation, ubiquitylation, and methylation. These modifications control nuclear translocation, target gene specificity, transcriptional activity, and subunit degradation [79] and are essential for the transactivation of target genes beyond the simple expression levels or even subcellular localization. Phosphorylation of NF-κB, especially the transactivating REL associated (RelA)/p65 NF-κB isoform was investigated and multiple kinases were shown to be involved, conferring both activating and inhibiting phosphorylation [80–84] (Figure 5).

Moreover, oxidation or nitrosylation of both p50 and p65 subunits forming the NF-κB transcription factor are also known to inhibit DNA binding [85]. The conserved C-38 residue of p65 is the target of many naturally occurring NF-κB inhibitors such as the sesquiterpene lactones [86]. RelA C-38 is also subject to hydrogen sulfide-linked sulfhydration [87] performed by cystathionine-lyase (CSE). Many natural products covalently modify C-38 to modulate NF-κB activity.

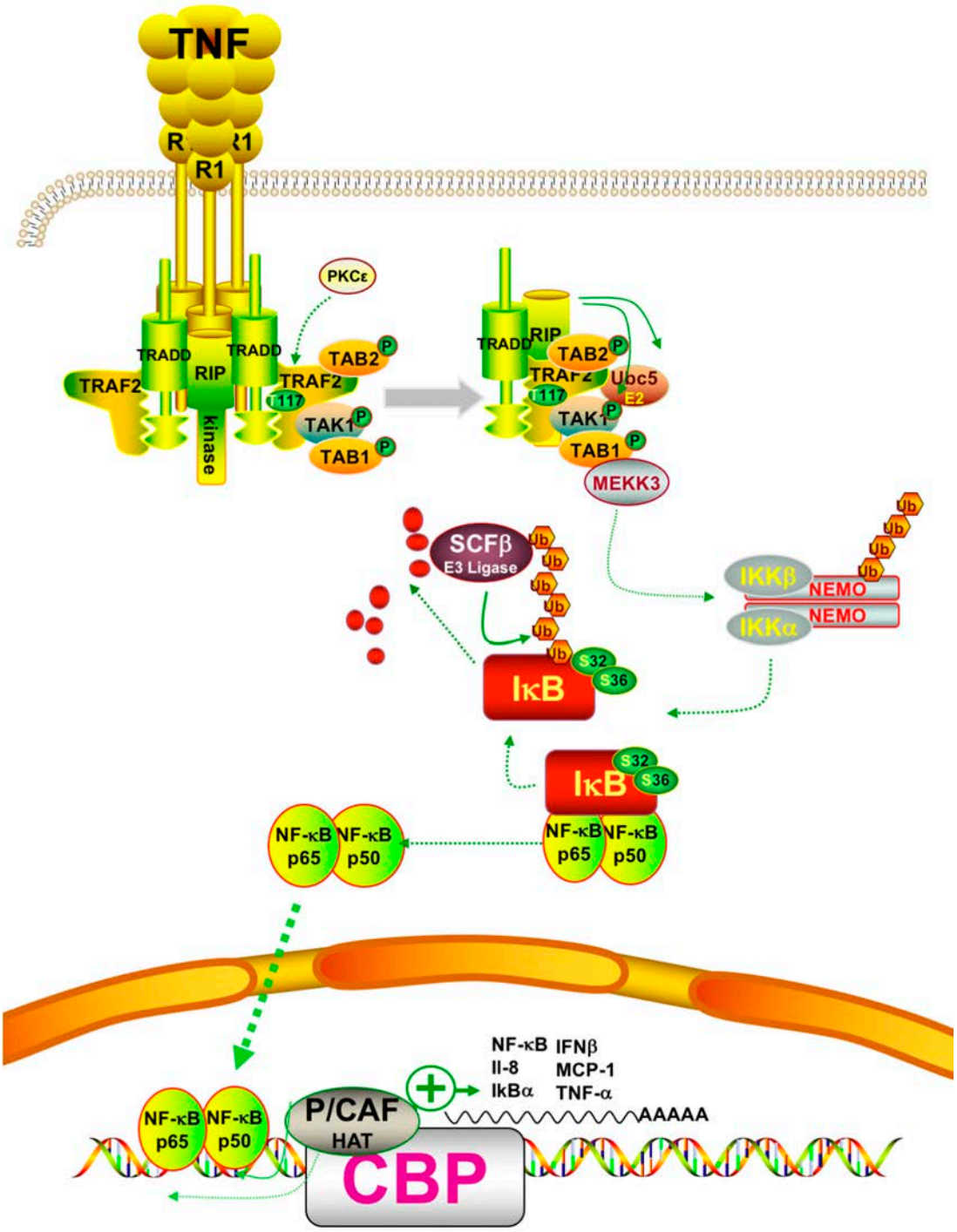


Figure 5. Upstream signal transduction pathway leading to activation of canonical p50/p65 NF-κB upon stimulation by tumor necrosis factor (TNF)-α (see text for details, scheme realized with ScienceSlides). Tumor necrosis factor receptor type 1-associated death domain (TRADD); TNF receptor-associated factor (TRAF); transforming growth factor β-activated kinase (TAK); TGF-β-activated kinase 1 and MAP3K7-binding protein (TAB); Ubiquitin-conjugating (enzyme) (Ubc); IκB kinase (IKK); Skp, Cullin, F-box (containing complex) (SCF); inhibitor of κB (I-κB); nuclear factor (NF)-κB, P300/CBP-associated factor (P/CAF); interleukin (Il); interferon (INF); monocyte chemotactic protein-1 (MCP); ubiquitin (Ub); cAMP-response element-binding protein binding protein (CBP); histone acetyltransferase (HAT); receptor-interacting protein (RIP); protein kinase (PK); NF-κB essential modulator (NEMO); mitogen-activated protein kinase kinase kinase 3 (MEKK3).

Beyond methylation, RelA or p65 phosphorylation at S-276 facilitates the recruitment of p300/cAMP-response element-binding protein (CREB) binding protein (CBP). This phosphorylation of p65 leads to CBP/p300 general transcription machinery interaction required for transactivation [88].

Post-translational modifications of NF-κB also include methylation of RelA/p65 leading to crosstalk between NF-κB and chromatin for the regulation of NF-κB target genes. In unstimulated cells, i.e., before TNF-α stimulation, the SET domain containing (SETD)6 methyltransferase methylates RelA at K-310 which triggers methylation of histone H3K9 by methyltransferase G9a-like protein (GLP) and leads to a transcriptionally repressed state of both chromatin and related NF-κB response genes. Furthermore, the crosstalk between methylated RelA and histone H3 maintains the repressed state of NF-κB target genes in unstimulated cells [89]. Whenever cells get stimulated by TNF-α, protein kinase (PK)C-ζ-mediates RelA phosphorylation at S-311 which abrogates methylation at K-310 and the binding of GLP. Recruitment of NF-κB co-activators and a change in the chromatin environment then eventually leads to transcription of NF-κB target genes. It is well known that the K-310me1 of RelA needs to be removed by a demethylase before p300/CBP accesses K-310 [89] (Figure 6).

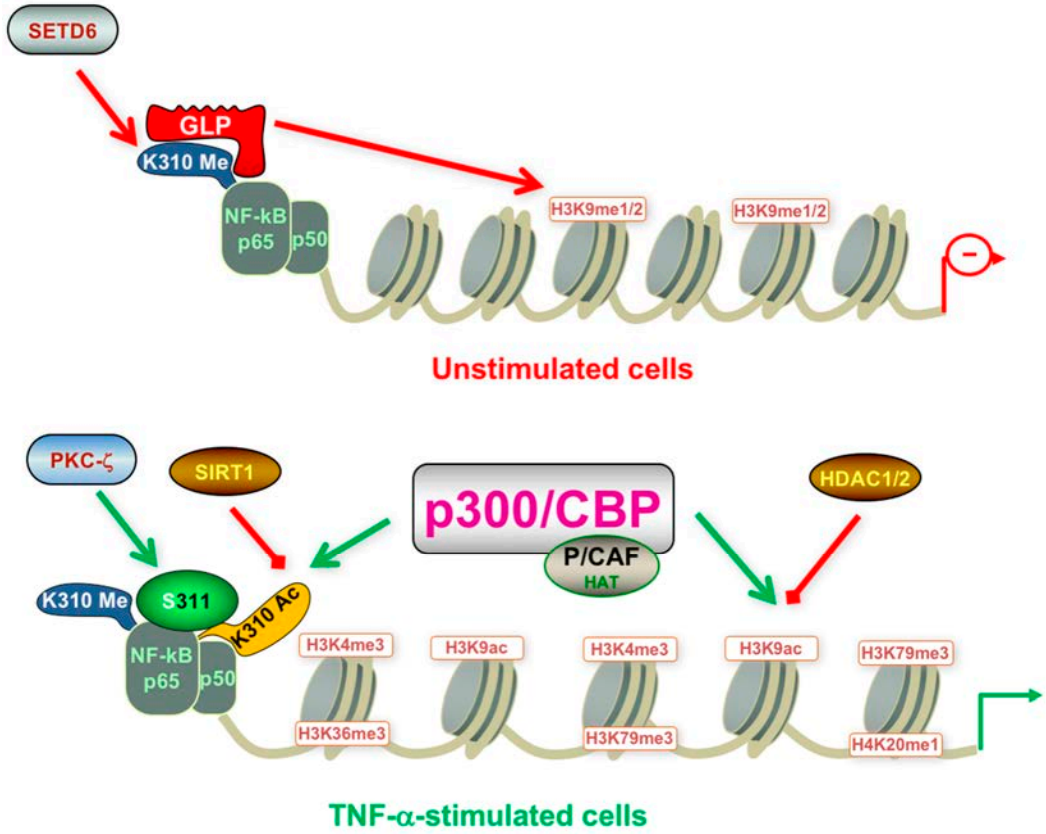


Figure 6. Regulation of posttranscriptional modifications of NF-κB and histone H3 with and without TNF-α stimulation. Open arrowheads designate addition of groups whereas closed arrowheads designate their removal; Red arrows show inhibiting post-translational modifications whereas green arrows show activating modifications, both related to NF-κB transactivation potential. cAMP-response element-binding protein binding protein (CBP); SET domain containing lysine methyltransferase 6 (SETD6); protein kinase C (PKC); G9a-like protein (methyltransferase) (GLP); p300/CBP-associated factor (P/CAF); histone acetyltransferases (HAT); histone deacetylase (HDAC); sirtuin (SIRT); tumor necrosis factor α (TNF-α); histone (H); methylation (me); acetylation (ac). (Scheme realized with Science Slides).

More recently, a highly conserved cysteine residue was discovered in the N-terminal region of the Rel homology domain (RHD) (C-38 in human RelA—p65) [90]. This residue interacts with the phosphate backbone of NF-κB binding sites [91].

Recruitment of CBP eventually leads to acetylation of p65/RelA and nearby histones, leading to NF-κB gene expression [79]. Acetylation of p65 modulates DNA-binding capacity, transcriptional activity, interaction with IκB and subcellular localization [92,93]. Acetylation of RelA p65 at K-310 is critical for the transcriptional activation of NF-κB, but p65 is also acetylated by p300 at K-314 and K-315. Here, acetylation of K-314 is essential for late gene expression [94,95].

Site-specific acetylation of p65 by CBP controls the specificity of NF-κB-dependent gene expression. Reversible protein acetylation is an important post-translational modification that regulates the function of histones and other proteins including transcription factors [96]. Acetylation has a rapid turnover because of the highly dynamic equilibrium between HATs and HDACs.

Especially SIRT2 regulates NF-κB-dependent gene expression through deacetylation of p65 at K-310 [97]. SIRT2 has multiple functions and binds to HDAC6 to deacetylate α-tubulin contributing to microtubular dynamics and cell cycle regulation [98–100]. Moreover, SIRT2 deacetylates other proteins including p53 besides p300 and histones H3 and H4 substrates [101–103]. In fact, SIRT2 is localized mainly in the cytoplasm during G2–M transition: here this HDAC shuttles to the nucleus to deacetylate histone H4 at K-16 (H4K16) [101]. In SIRT2−/− cells p65 is hyperacetylated at K-310 after TNFα stimulation. Thus, expression of a subset of p65 acetylation-dependent target genes is increased. Altogether, p65 is deacetylated by SIRT2 in the cytoplasm to regulate the expression of specific NF-κB-dependent genes [97].

6.2. Synergistic Treatments Involving HDAC and NF-κB inhibitors

One hand increased acetylation levels of histones lead to upregulation of gene expression patterns and as such could also contribute not only to increased expression of cell cycle inhibitors including p21 but also to transactivation of NF-κB target genes. Such proteins are mostly involved in cell proliferation and resistance to cell death, two of the key hallmarks of cancer as defined by Hanahan and Weinberg [104].

Accordingly, a combination of both HDAC and NF-κB inhibitors could lead to synergistic effects in cancer types highly "addicted" to NF-κB and thus prevent unwanted pro-inflammatory side effects due to upregulation of pro-inflammatory or growth promoting gene products after HDACi treatment, considering the numerous NF-κB target genes. Such results were described after treatment of HeLa cells with the natural HDACis TSA (Figure 3) or apicidin (Table 3) triggering transcription of interleukin (IL)-8 and cellular inhibitor of apoptosis (cIAP)-1 thus rather contributing to the overall survival of cancer cells [105], abrogating the otherwise cell-death inducing capacity of apicidin. Here the authors demonstrated feasibility by using a genetic inhibitor (dominant negative IκB) to show that inhibition of NF-κB is strictly required to abrogate the pro-survival effect induced by apicidin (Table 3), eventually achieving sensitization of HeLa cells towards apoptosis. Similarly, up-regulation of NF-κB activity was shown in MCF-7 cells in the presence of TSA (Figure 3) [106].

In human colorectal cancer cells, a combination of apicidin (Table 3) and proteasome inhibitors MG132, proteasome inhibitor 1 or epoxomicin (Figure 7) inhibited cancer cell growth and induced apoptosis, decreased NF-κB activity and increased reactive oxygen species (ROS) production [107]. Similarly, TSA (Figure 3) and sodium butyrate (Figure 4) were shown to enhance activation of NF-κB and target genes by increasing NF-κB p50/p65 DNA binding and acetylation of the RelA p65. In this study, the authors used small interfering RNA against p65 or bortezomib, an inhibitor of proteasome-dependent NF-κB activation to increase cancer cell sensitization [108].

Similarly, SAHA (Figure 3) and bortezomib synergistically induce apoptosis in Mantle cell lymphoma cells [109] by a similar mechanism where the HDACi led to acetylated NF-κB whereas bortezomib abrogated this activation. In this study, apoptosis induction was accompanied by *N*-acetyl-L-cysteine-sensitized ROS production. Co-treatment of NF-κB inhibitor parthenolide (Figure 7) and vorinostat or LBH589 (Figure 3) similarly potentiated cell death in human AML cells through a process involving NF-κB inhibition [110].

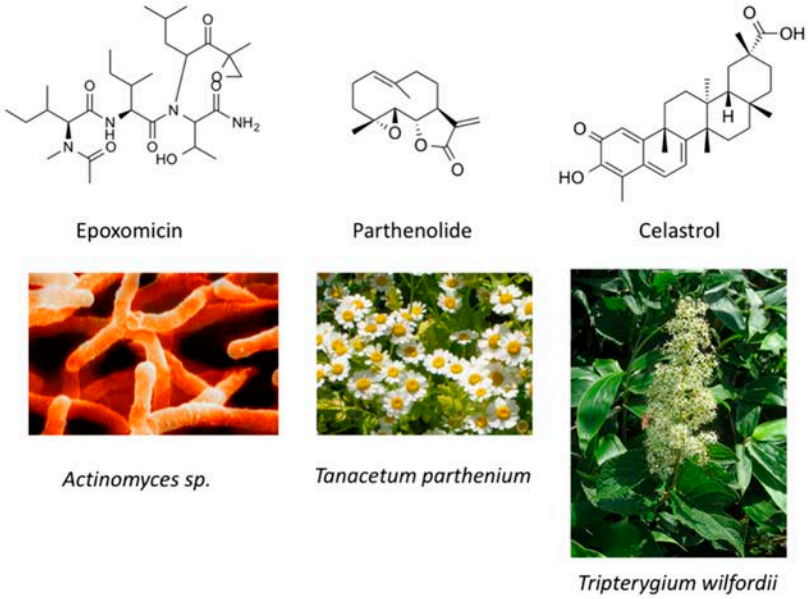


Figure 7. Molecular structures of natural compounds used in combination with histone deacetylases inhibitors.

In breast cancer, treatment of aromatase inhibitor-resistant cell lines with LBH589 (Figure 3) was also shown to suppress NF-κB1 mRNA (encoding the p105 subunit) and protein expression [111] even in the absence of additional NF-κB inhibitors. The combination of celastrol (Figure 7) and SAHA (Figure 3) exerted strong synergistic efficacy against human cancer cells in vitro and in vivo leading to caspase-mediated apoptosis [112].

Considering the multiple examples of synergistic effects of HDACi-mediated NF-κB activation coupled to a second compound known to block NF-κB cell signaling, Orlikova et al. suggested an approach with a single molecule with a dual inhibition potential. Accordingly, a series of hemi-synthetic chalcone lead compounds inhibited both TNF-α-induced NF-kB activity and total HDAC activity of classes I, II and IV (Table 3) providing insight into the future development of dual inhibitors in the treatment of inflammation and cancer [28].

Importantly, it was shown that HDAC modulators confer not only post-translational modifications to histones but also to many other cellular proteins, including NF-κB itself. NF-κB acetylation at K-310 is required for its transactivation potential. Accordingly, HAT lead to activation of NF-κB due to acetylation of this essential regulatory site whereas HDACs block NF-κB by its deacetylation. This dual regulatory potential leaves room for specific regulation steps that are intimately depending on the HDAC isoform activated or inhibited. For instance, SIRT1 was described to physically interact with RelA/p65 leading to transcriptional inhibition by deacetylating RelA/p65 at K-310 [113]. Interestingly natural compound resveratrol (Figure 3), a SIRT1 agonist, further activated NF-κB deacetylation, thus abrogating TNFα-induced transactivation of the NF-κB gene battery. Eventually, resveratrol leads to induction of apoptosis. Acetylated, activated, p65 is subsequently deacetylated via HDAC3, inducing binding to its inhibitor IκBα. Also in this instance pan-HDAC inhibition would prevent NF-κB deacetylation and likely contribute to the maintenance of its transactivation potential.

7. Conclusions and Perspectives

Results obtained so far clearly demonstrate the importance of specific HDACi to achieve a final cancer-inhibiting result, and that strict inhibition of HDAC is not the target in every instance. Therefore, HDAC isoform-specific inhibitors/activators will be of great importance combined with a better understanding of the essential role of both activating and inhibiting marks not only of histones but essentially also of other protein targets.

Accordingly, a combination treatment of selected highly specific HDAC inhibitors and activators would lead to an overall anticancer effect in a more rational way compared to the unspecific first generation pan inhibitors. Moreover, the cell type-specific effect of such inhibitors needs to be carefully considered as it was shown for compounds like apicidin that the effects can be pro-apoptotic in leukemia but apoptosis resistance-triggering in solid tumors.

Side effects observed with the first generation of pan-HDACi that are so far clinically approved could most likely be explained by the high simultaneous inhibition of HDACs with pro- and anticancer activities. Future research will aim at matching isoform-specific modulators with clearly identified cancer-specific molecular targets thus contributing to personalization of the cancer treatment. Considering the potent induction of NF-κB induction via hyperacetylation triggered by most pan-HDACi, pro-inflammatory effects are clearly foreseeable. Moreover, beyond NF-κB, Stat1 also requires acetylation on K-410 and K-413 [114] to interact further with NF-κB and certainly also contributes to pro-inflammatory signaling after HDACi treatment.

On the other hand, FR235222 selectively inhibits NF-κB activity rather than activating it so that many NF-κB-regulated genes were transcriptionally down-regulated in activated Jurkat T cells [115]. Considering the essential effect of HDACis on acetylation of target proteins, this inhibition is most likely indirect. The authors hypothesized that FR235222 abrogates interactions between NF-κB and coactivator proteins leading to NF-κB inhibition. Accordingly, future research needs to deeply investigate direct and indirect effects of novel and clinically used HDACi to prevent unwanted activation or inhibition mechanisms leading to adverse side effects. In that sense, the use of combined treatments against both HDACs and NF-κB seems interesting to trigger synergistic effects and abrogate side effects. Here the use of dual inhibitors appears to many as an excellent possibility to design entirely novel therapeutic approaches.

Acknowledgments: Hélène Losson is supported by a master's grant from the Action LIONS "Vaincre le Cancer". Michael Schnekenburger is supported by a "Waxweiler grant for cancer prevention research" from the Action LIONS "Vaincre le Cancer." Research at LBMCC is financially supported by the Fondation de Recherche Cancer et Sang, the "Recherches Scientifiques", Luxembourg association, the "Een Haerz fir kriibskrank Kanner" association, the "Action LIONS Vaincre le Cancer" association, and "Télévie Luxembourg". Research at SNU is supported by the NRF by the MEST of Korea for Tumor Microenvironment GCRC 2012-0001184 grant and by Brain Korea (BK21) PLUS program.

Author Contributions: Hélène Losson, Michael Schnekenburger, Mario Dicato and Marc Diederich wrote/edited this review.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

Abbreviations

The following abbreviations are used in this manuscript:

ALL	acute lymphoblastic leukemia
AML	acute myeloid leukemia
CBP	CREB binding protein
cIAP	cellular inhibitor of apoptosis
CLL	chronic lymphocytic leukemia
CREB	cAMP-response element-binding protein
CSE	cystathionine-lyase
CTCL	cutaneous T-cell lymphoma
GLP	G9a-like protein
HAT	histone acetyltransferase
HAT	histone acetyltransferases
Hda1	histone deacetylase 1
HDAC	histone deacetylase
HDACi	histone deacetylase inhibitor
HMBA	hexamethylene bisacetamide
IKK	IκB kinase
IL	interleukin
INF	interferon
IκB	inhibitor of κB

MDS	myelodysplastic syndromes
MDS	myelodysplastic syndromes
MEKK	mitogen-activated protein kinase kinase kinase
NAD	nicotinamide adenine dinucleotide
NEMO	NF-κB essential modulator
NF-κB	nuclear factor-κB
P/CAF	P300/CBP-associated factor
PK	protein kinase
PTCL	peripheral T-cell lymphoma
RelA	REL associated
RHD	Rel homology domain
RIP	receptor-interacting protein
ROS	reactive oxygen species
Rpd3	reduced potassium dependency-3
SAHA	suberoylanilide hydroxamic acid
SCF	Skp, Cullin, F-box (containing complex)
SETD	SET domain containing
Sir2	silent information regulator-2
SIRT	sirtuin
TAB	TGF-β-activated kinase 1 and MAP3K7-binding protein
TAK	transforming growth factor β-activated kinase
TNF	tumor necrosis factor
TGF	tumor growth factor
TRADD	tumor necrosis factor receptor type 1-associated death domain
TRAFF	TNF receptor-associated factor
TSA	trichostatin A
Ubc	Ubiquitin-conjugating (enzyme)
USFDA	United States Food and Drug Administration
VPA	valproic acid
ZBD	Zn^{2+} binding domain

References

1. Seidel, C.; Florean, C.; Schnekenburger, M.; Dicato, M.; Diederich, M. Chromatin-modifying agents in anti-cancer therapy. *Biochimie* **2012**, *94*, 2264–2279. [CrossRef] [PubMed]
2. Thurn, K.T.; Thomas, S.; Moore, A.; Munster, P.N. Rational therapeutic combinations with histone deacetylase inhibitors for the treatment of cancer. *Future Oncol.* **2011**, *7*, 263–283. [CrossRef] [PubMed]
3. Seidel, C.; Schnekenburger, M.; Dicato, M.; Diederich, M. Histone deacetylase modulators provided by Mother Nature. *Genes Nutr.* **2012**, *7*, 357–367. [CrossRef] [PubMed]
4. Bassett, S.A.; Barnett, M.P. The role of dietary histone deacetylases (HDACs) inhibitors in health and disease. *Nutrients* **2014**, *6*, 4273–4301. [CrossRef] [PubMed]
5. Lawson, M.; Uciechowska, U.; Schemies, J.; Rumpf, T.; Jung, M.; Sippl, W. Inhibitors to understand molecular mechanisms of NAD^+-dependent deacetylases (sirtuins). *Biochim. Biophys. Acta* **2010**, *1799*, 726–739. [CrossRef] [PubMed]
6. Mottamal, M.; Zheng, S.; Huang, T.L.; Wang, G. Histone deacetylase inhibitors in clinical studies as templates for new anticancer agents. *Molecules* **2015**, *20*, 3898–3941. [CrossRef] [PubMed]
7. Lane, A.A.; Chabner, B.A. Histone deacetylase inhibitors in cancer therapy. *J. Clin. Oncol.* **2009**, *27*, 5459–5468. [CrossRef] [PubMed]
8. Mai, A.; Massa, S.; Rotili, D.; Cerbara, I.; Valente, S.; Pezzi, R.; Simeoni, S.; Ragno, R. Histone deacetylation in epigenetics: An attractive target for anticancer therapy. *Med. Res. Rev.* **2005**, *25*, 261–309. [CrossRef] [PubMed]
9. Yoon, S.; Eom, G.H. HDAC and HDAC Inhibitor: From Cancer to Cardiovascular Diseases. *Chonnam Med. J.* **2016**, *52*, 1–11. [CrossRef] [PubMed]
10. Wang, J.C.; Kafeel, M.I.; Avezbakiyev, B.; Chen, C.; Sun, Y.; Rathnasabapathy, C.; Kalavar, M.; He, Z.; Burton, J.; Lichter, S. Histone deacetylase in chronic lymphocytic leukemia. *Oncology* **2011**, *81*, 325–329. [CrossRef] [PubMed]
11. Seidel, C.; Schnekenburger, M.; Dicato, M.; Diederich, M. Histone deacetylase 6 in health and disease. *Epigenomics* **2015**, *7*, 103–118. [CrossRef] [PubMed]

12. Carafa, V.; Nebbioso, A.; Altucci, L. Sirtuins and disease: The road ahead. *Front. Pharmacol.* **2012**, *3*, 4. [CrossRef] [PubMed]
13. Ozdag, H.; Teschendorff, A.E.; Ahmed, A.A.; Hyland, S.J.; Blenkiron, C.; Bobrow, L.; Veerakumarasivam, A.; Burtt, G.; Subkhankulova, T.; Arends, M.J.; et al. Differential expression of selected histone modifier genes in human solid cancers. *BMC Genom.* **2006**, *7*, 90. [CrossRef] [PubMed]
14. Marquardt, J.U.; Fischer, K.; Baus, K.; Kashyap, A.; Ma, S.; Krupp, M.; Linke, M.; Teufel, A.; Zechner, U.; Strand, D.; et al. Sirtuin-6-dependent genetic and epigenetic alterations are associated with poor clinical outcome in hepatocellular carcinoma patients. *Hepatology* **2013**, *58*, 1054–1064. [CrossRef] [PubMed]
15. Ashraf, N.; Zino, S.; Macintyre, A.; Kingsmore, D.; Payne, A.P.; George, W.D.; Shiels, P.G. Altered sirtuin expression is associated with node-positive breast cancer. *Br. J. Cancer* **2006**, *95*, 1056–1061. [CrossRef] [PubMed]
16. ME, L.L.; Vidal, F.; Gallardo, D.; Diaz-Fuertes, M.; Rojo, F.; Cuatrecasas, M.; Lopez-Vicente, L.; Kondoh, H.; Blanco, C.; Carnero, A.; et al. New p53 related genes in human tumors: Significant downregulation in colon and lung carcinomas. *Oncol. Rep.* **2006**, *16*, 603–608.
17. Cerella, C.; Teiten, M.H.; Radogna, F.; Dicato, M.; Diederich, M. From nature to bedside: Pro-survival and cell death mechanisms as therapeutic targets in cancer treatment. *Biotechnol. Adv.* **2014**, *32*, 1111–1122. [CrossRef] [PubMed]
18. Morceau, F.; Chateauvieux, S.; Orsini, M.; Trecul, A.; Dicato, M.; Diederich, M. Natural compounds and pharmaceuticals reprogram leukemia cell differentiation pathways. *Biotechnol. Adv.* **2015**, *33*, 785–797. [CrossRef] [PubMed]
19. Schnekenburger, M.; Dicato, M.; Diederich, M. Plant-derived epigenetic modulators for cancer treatment and prevention. *Biotechnol. Adv.* **2014**, *32*, 1123–1132. [CrossRef] [PubMed]
20. Schumacher, M.; Kelkel, M.; Dicato, M.; Diederich, M. Gold from the sea: Marine compounds as inhibitors of the hallmarks of cancer. *Biotechnol. Adv.* **2011**, *29*, 531–47. [CrossRef] [PubMed]
21. Surh, Y.J. Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. *Nat. Rev. Cancer* **2003**, *3*, 768–780. [CrossRef] [PubMed]
22. Radogna, F.; Dicato, M.; Diederich, M. Cancer-type-specific crosstalk between autophagy, necroptosis and apoptosis as a pharmacological target. *Biochem. Pharmacol.* **2015**, *94*, 1–11. [CrossRef] [PubMed]
23. Diederich, M.; Cerella, C. Non-canonical programmed cell death mechanisms triggered by natural compounds. *Semin. Cancer Biol.* **2016**, *40–41*, 4–44. [CrossRef] [PubMed]
24. Orlikova, B.; Legrand, N.; Panning, J.; Dicato, M.; Diederich, M. Anti-inflammatory and anticancer drugs from nature. *Cancer Treat. Res.* **2014**, *159*, 123–143. [PubMed]
25. Syed, D.N.; Adhami, V.M.; Khan, N.; Khan, M.I.; Mukhtar, H. Exploring the molecular targets of dietary flavonoid fisetin in cancer. *Semin. Cancer Biol.* **2016**, *40–41*, 130–140. [CrossRef] [PubMed]
26. Duvoix, A.; Blasius, R.; Delhalle, S.; Schnekenburger, M.; Morceau, F.; Henry, E.; Dicato, M.; Diederich, M. Chemopreventive and therapeutic effects of curcumin. *Cancer Lett.* **2005**, *223*, 181–190. [CrossRef] [PubMed]
27. Sinha, D.; Sarkar, N.; Biswas, J.; Bishayee, A. Resveratrol for breast cancer prevention and therapy: Preclinical evidence and molecular mechanisms. *Semin. Cancer Biol.* **2016**, *40–41*, 209–232. [CrossRef] [PubMed]
28. Orlikova, B.; Schnekenburger, M.; Zloh, M.; Golais, F.; Diederich, M.; Tasdemir, D. Natural chalcones as dual inhibitors of HDACs and NF-κB. *Oncol. Rep.* **2012**, *28*, 797–805. [PubMed]
29. Menezes, J.C.; Orlikova, B.; Morceau, F.; Diederich, M. Natural and Synthetic Flavonoids: Structure-Activity Relationship and Chemotherapeutic Potential for the Treatment of Leukemia. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2016**, *56*, S4–S28. [CrossRef] [PubMed]
30. Tsuji, N.; Kobayashi, M.; Nagashima, K.; Wakisaka, Y.; Koizumi, K. A new antifungal antibiotic, trichostatin. *J. Antibiot.* **1976**, *29*, 1–6. [CrossRef] [PubMed]
31. Yoshida, M.; Kijima, M.; Akita, M.; Beppu, T. Potent and specific inhibition of mammalian histone deacetylase both in vivo and in vitro by trichostatin A. *J. Biol. Chem.* **1990**, *265*, 17174–17179. [PubMed]
32. Richon, V.M.; Emiliani, S.; Verdin, E.; Webb, Y.; Breslow, R.; Rifkind, R.A.; Marks, P.A. A class of hybrid polar inducers of transformed cell differentiation inhibits histone deacetylases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *95*, 3003–3007. [CrossRef] [PubMed]
33. Plumb, J.A.; Finn, P.W.; Williams, R.J.; Bandara, M.J.; Romero, M.R.; Watkins, C.J.; La Thangue, N.B.; Brown, R. Pharmacodynamic response and inhibition of growth of human tumor xenografts by the novel histone deacetylase inhibitor PXD101. *Mol. Cancer Ther.* **2003**, *2*, 721–728. [PubMed]

34. Prince, H.M.; Bishton, M.J.; Johnstone, R.W. Panobinostat (LBH589): A potent pan-deacetylase inhibitor with promising activity against hematologic and solid tumors. *Future Oncol.* **2009**, *5*, 601–612. [CrossRef] [PubMed]
35. Ueda, H.; Nakajima, H.; Hori, Y.; Goto, T.; Okuhara, M. Action of FR901228, a novel antitumor bicyclic depsipeptide produced by *Chromobacterium violaceum* no. 968, on Ha-ras transformed NIH3T3 cells. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **1994**, *58*, 1579–1583. [CrossRef] [PubMed]
36. Nakajima, H.; Kim, Y.B.; Terano, H.; Yoshida, M.; Horinouchi, S. FR901228, a potent antitumor antibiotic, is a novel histone deacetylase inhibitor. *Exp. Cell Res.* **1998**, *241*, 126–133. [CrossRef] [PubMed]
37. Riggs, M.G.; Whittaker, R.G.; Neumann, J.R.; Ingram, V.M. *n*-Butyrate causes histone modification in HeLa and Friend erythroleukaemia cells. *Nature* **1977**, *268*, 462–464. [CrossRef] [PubMed]
38. McKnight, G.S.; Hager, L.; Palmiter, R.D. Butyrate and related inhibitors of histone deacetylation block the induction of egg white genes by steroid hormones. *Cell* **1980**, *22*, 469–477. [CrossRef]
39. Hassig, C.A.; Tong, J.K.; Schreiber, S.L. Fiber-derived butyrate and the prevention of colon cancer. *Chem. Biol.* **1997**, *4*, 783–789. [CrossRef]
40. Chateauvieux, S.; Eifes, S.; Morceau, F.; Grigorakaki, C.; Schnekenburger, M.; Henry, E.; Dicato, M.; Diederich, M. Valproic acid perturbs hematopoietic homeostasis by inhibition of erythroid differentiation and activation of the myelo-monocytic pathway. *Biochem. Pharmacol.* **2011**, *81*, 498–509. [CrossRef] [PubMed]
41. Gottlicher, M.; Minucci, S.; Zhu, P.; Kramer, O.H.; Schimpf, A.; Giavara, S.; Sleeman, J.P.; Lo Coco, F.; Nervi, C.; Pelicci, P.G.; et al. Valproic acid defines a novel class of HDAC inhibitors inducing differentiation of transformed cells. *EMBO J.* **2001**, *20*, 6969–6978. [CrossRef] [PubMed]
42. Li, L.; Dai, H.J.; Ye, M.; Wang, S.L.; Xiao, X.J.; Zheng, J.; Chen, H.Y.; Luo, Y.H.; Liu, J. Lycorine induces cell-cycle arrest in the G0/G1 phase in K562 cells via HDAC inhibition. *Cancer Cell Int.* **2012**, *12*, 49. [CrossRef] [PubMed]
43. Biggins, J.B.; Gleber, C.D.; Brady, S.F. Acyldepsipeptide HDAC inhibitor production induced in *Burkholderia thailandensis*. *Org. Lett.* **2011**, *13*, 1536–1539. [CrossRef] [PubMed]
44. Ghosh, A.K.; Kulkarni, S. Enantioselective total synthesis of (+)-largazole, a potent inhibitor of histone deacetylase. *Org. Lett.* **2008**, *10*, 3907–3909. [CrossRef] [PubMed]
45. Crabb, S.J.; Howell, M.; Rogers, H.; Ishfaq, M.; Yurek-George, A.; Carey, K.; Pickering, B.M.; East, P.; Mitter, R.; Maeda, S.; et al. Characterisation of the in vitro activity of the depsipeptide histone deacetylase inhibitor spiruchostatin A. *Biochem. Pharmacol.* **2008**, *76*, 463–475. [CrossRef] [PubMed]
46. Narita, K.; Matsuhara, K.; Itoh, J.; Akiyama, Y.; Dan, S.; Yamori, T.; Ito, A.; Yoshida, M.; Katoh, T. Synthesis and biological evaluation of novel FK228 analogues as potential isoform selective HDAC inhibitors. *Eur. J. Med. Chem.* **2016**, *121*, 592–609. [CrossRef] [PubMed]
47. Wang, C.; Henkes, L.M.; Doughty, L.B.; He, M.; Wang, D.; Meyer-Almes, F.J.; Cheng, Y.Q. Thailandepsins: bacterial products with potent histone deacetylase inhibitory activities and broad-spectrum antiproliferative activities. *J. Nat. Prod.* **2011**, *74*, 2031–2038. [CrossRef] [PubMed]
48. Parolin, C.; Calonghi, N.; Presta, E.; Boga, C.; Caruana, P.; Naldi, M.; Andrisano, V.; Masotti, L.; Sartor, G. Mechanism and stereoselectivity of HDAC I inhibition by (*R*)-9-hydroxystearic acid in colon cancer. *Biochim. Biophys. Acta* **2012**, *1821*, 1334–1340. [CrossRef] [PubMed]
49. Fennell, K.A.; Mollmann, U.; Miller, M.J. Syntheses and biological activity of amamistatin B and analogs. *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 1018–1024. [CrossRef] [PubMed]
50. Druesne, N.; Pagniez, A.; Mayeur, C.; Thomas, M.; Cherbuy, C.; Duee, P.H.; Martel, P.; Chaumontet, C. Diallyl disulfide (DADS) increases histone acetylation and p21(waf1/cip1) expression in human colon tumor cell lines. *Carcinogenesis* **2004**, *25*, 1227–1236. [CrossRef] [PubMed]
51. Lea, M.A.; Rasheed, M.; Randolph, V.M.; Khan, F.; Shareef, A.; desBordes, C. Induction of histone acetylation and inhibition of growth of mouse erythroleukemia cells by *S*-allylmercaptocysteine. *Nutr. Cancer* **2002**, *43*, 90–102. [CrossRef] [PubMed]
52. Dickinson, S.E.; Rusche, J.J.; Bec, S.L.; Horn, D.J.; Janda, J.; Rim, S.H.; Smith, C.L.; Bowden, G.T. The effect of sulforaphane on histone deacetylase activity in keratinocytes: Differences between in vitro and in vivo analyses. *Mol. Carcinog.* **2015**, *54*, 1513–1520. [CrossRef] [PubMed]
53. Ryu, H.W.; Lee, D.H.; Shin, D.H.; Kim, S.H.; Kwon, S.H. Aceroside VIII is a new natural selective HDAC6 inhibitor that synergistically enhances the anticancer activity of HDAC inhibitor in HT29 cells. *Planta Med.* **2015**, *81*, 222–227. [CrossRef] [PubMed]

54. Berger, A.; Venturelli, S.; Kallnischkies, M.; Bocker, A.; Busch, C.; Weiland, T.; Noor, S.; Leischner, C.; Weiss, T.S.; Lauer, U.M.; et al. Kaempferol, a new nutrition-derived pan-inhibitor of human histone deacetylases. *J. Nutr. Biochem.* **2013**, *24*, 977–985. [CrossRef] [PubMed]
55. Jeong, J.B.; Lee, S.H. Protocatechualdehyde possesses anti-cancer activity through downregulating cyclin D1 and HDAC2 in human colorectal cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2013**, *430*, 381–386. [CrossRef] [PubMed]
56. Jung, J.H.; Sim, C.J.; Lee, C.O. Cytotoxic compounds from a two-sponge association. *J. Nat. Prod.* **1995**, *58*, 1722–1726. [CrossRef] [PubMed]
57. Venturelli, S.; Berger, A.; Bocker, A.; Busch, C.; Weiland, T.; Noor, S.; Leischner, C.; Schleicher, S.; Mayer, M.; Weiss, T.S.; et al. Resveratrol as a pan-HDAC inhibitor alters the acetylation status of histone [corrected] proteins in human-derived hepatoblastoma cells. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e73097. [CrossRef]
58. Senawong, T.; Misuna, S.; Khaopha, S.; Nuchadomrong, S.; Sawatsitang, P.; Phaosiri, C.; Surapaitoon, A.; Sripa, B. Histone deacetylase (HDAC) inhibitory and antiproliferative activities of phenolic-rich extracts derived from the rhizome of *Hydnophytum formicarum* Jack.: Sinapinic acid acts as HDAC inhibitor. *BMC Complement. Altern. Med.* **2013**, *13*, 232. [CrossRef] [PubMed]
59. Kwon, H.J.; Owa, T.; Hassig, C.A.; Shimada, J.; Schreiber, S.L. Depudecin induces morphological reversion of transformed fibroblasts via the inhibition of histone deacetylase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *95*, 3356–3361. [CrossRef] [PubMed]
60. El Amrani, M.; Lai, D.; Debbab, A.; Aly, A.H.; Siems, K.; Seidel, C.; Schnekenburger, M.; Gaigneaux, A.; Diederich, M.; et al. Protein kinase and HDAC inhibitors from the endophytic fungus *Epicoccum nigrum*. *J. Nat. Prod.* **2014**, *77*, 49–56. [CrossRef] [PubMed]
61. Liu, Z.H.; Li, J.; Xia, J.; Jiang, R.; Zuo, G.W.; Li, X.P.; Chen, Y.; Xiong, W.; Chen, D.L. Ginsenoside 20(s)-Rh2 as potent natural histone deacetylase inhibitors suppressing the growth of human leukemia cells. *Chem. Biol. Interact.* **2015**, *242*, 227–234. [CrossRef] [PubMed]
62. Chung, I.M.; Kim, M.Y.; Park, W.H.; Moon, H.I. Histone deacetylase inhibitors from the rhizomes of *Zingiber zerumbet*. *Pharmazie* **2008**, *63*, 774–776. [PubMed]
63. Ononye, S.N.; VanHeyst, M.D.; Oblak, E.Z.; Zhou, W.; Ammar, M.; Anderson, A.C.; Wright, D.L. Tropolones as lead-like natural products: The development of potent and selective histone deacetylase inhibitors. *ACS Med. Chem. Lett.* **2013**, *4*, 757–761. [CrossRef] [PubMed]
64. Sharma, S.; Ahmad, M.; Bhat, J.A.; Kumar, A.; Kumar, M.; Zargar, M.A.; Hamid, A.; Shah, B.A. Design, synthesis and biological evaluation of beta-boswellic acid based HDAC inhibitors as inducers of cancer cell death. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2014**, *24*, 4729–4734. [CrossRef] [PubMed]
65. Jones, P.; Altamura, S.; Chakravarty, P.K.; Cecchetti, O.; de Francesco, R.; Gallinari, P.; Ingenito, R.; Meinke, P.T.; Petrocchi, A.; Rowley, M.; et al. A series of novel, potent, and selective histone deacetylase inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 5948–5952. [CrossRef] [PubMed]
66. Maulucci, N.; Chini, M.G.; Micco, S.D.; Izzo, I.; Cafaro, E.; Russo, A.; Gallinari, P.; Paolini, C.; Nardi, M.C.; Casapullo, A.; et al. Molecular Insights into Azumamide E Histone Deacetylases Inhibitory Activity. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 3007–3012. [CrossRef] [PubMed]
67. De Schepper, S.; Bruwiere, H.; Verhulst, T.; Steller, U.; Andries, L.; Wouters, W.; Janicot, M.; Arts, J.; van Heusden, J. Inhibition of histone deacetylases by chlamydocin induces apoptosis and proteasome-mediated degradation of survivin. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2003**, *304*, 881–888. [CrossRef] [PubMed]
68. Kijima, M.; Yoshida, M.; Sugita, K.; Horinouchi, S.; Beppu, T. Trapoxin, an antitumor cyclic tetrapeptide, is an irreversible inhibitor of mammalian histone deacetylase. *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 22429–22435. [PubMed]
69. Itazaki, H.; Nagashima, K.; Sugita, K.; Yoshida, H.; Kawamura, Y.; Yasuda, Y.; Matsumoto, K.; Ishii, K.; Uotani, N.; Nakai, H.; et al. Isolation and structural elucidation of new cyclotetrapeptides, trapoxins A and B, having detransformation activities as antitumor agents. *J. Antibiot.* **1990**, *43*, 1524–1532. [CrossRef] [PubMed]
70. ClinicalTrials.gov—A Service of the U.S. National Institutes of Health. Available online: https://clinicaltrials.gov/ (accessed on 18 November 2016).
71. Chakraborty, A.R.; Robey, R.W.; Luchenko, V.L.; Zhan, Z.; Piekarz, R.L.; Gillet, J.P.; Kossenkov, A.V.; Wilkerson, J.; Showe, L.C.; Gottesman, M.M.; et al. MAPK pathway activation leads to Bim loss and histone deacetylase inhibitor resistance: Rationale to combine romidepsin with an MEK inhibitor. *Blood* **2013**, *121*, 4115–4125. [CrossRef] [PubMed]

72. Piekarz, R.L.; Frye, R.; Turner, M.; Wright, J.J.; Allen, S.L.; Kirschbaum, M.H.; Zain, J.; Prince, H.M.; Leonard, J.P.; Geskin, L.J.; et al. Phase II multi-institutional trial of the histone deacetylase inhibitor romidepsin as monotherapy for patients with cutaneous T-cell lymphoma. *J. Clin. Oncol.* **2009**, *27*, 5410–5417. [CrossRef] [PubMed]
73. Ramalingam, S.S.; Belani, C.P.; Ruel, C.; Frankel, P.; Gitlitz, B.; Koczywas, M.; Espinoza-Delgado, I.; Gandara, D. Phase II study of belinostat (PXD101), a histone deacetylase inhibitor, for second line therapy of advanced malignant pleural mesothelioma. *J. Thorac. Oncol.* **2009**, *4*, 97–101. [CrossRef] [PubMed]
74. Chao, H.; Wang, L.; Hao, J.; Ni, J.; Chang, L.; Graham, P.H.; Kearsley, J.H.; Li, Y. Low dose histone deacetylase inhibitor, LBH589, potentiates anticancer effect of docetaxel in epithelial ovarian cancer via PI3K/Akt pathway in vitro. *Cancer Lett.* **2013**, *329*, 17–26. [CrossRef] [PubMed]
75. Moore, D. Panobinostat (Farydak): A Novel Option for the Treatment of Relapsed Or Relapsed and Refractory Multiple Myeloma. *P. T.* **2016**, *41*, 296–300. [PubMed]
76. Delhalle, S.; Blasius, R.; Dicato, M.; Diederich, M. A beginner's guide to NF-κB signaling pathways. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2004**, *1030*, 1–13. [CrossRef] [PubMed]
77. Yang, J.; Lin, Y.; Guo, Z.; Cheng, J.; Huang, J.; Deng, L.; Liao, W.; Chen, Z.; Liu, Z.; Su, B. The essential role of MEKK3 in TNF-induced NF-κB activation. *Nat. Immunol.* **2001**, *2*, 620–624. [CrossRef] [PubMed]
78. Fagerlund, R.; Kinnunen, L.; Kohler, M.; Julkunen, I.; Melen, K. NF-κB is transported into the nucleus by importin α3 and importin α4. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 15942–15951. [CrossRef] [PubMed]
79. Huang, B.; Yang, X.D.; Lamb, A.; Chen, L.F. Posttranslational modifications of NF-κB: Another layer of regulation for NF-κB signaling pathway. *Cell. Signal.* **2010**, *22*, 1282–1290. [CrossRef] [PubMed]
80. Mattioli, I.; Geng, H.; Sebald, A.; Hodel, M.; Bucher, C.; Kracht, M.; Schmitz, M.L. Inducible phosphorylation of NF-κB p65 at serine 468 by T cell costimulation is mediated by IKKε. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 6175–6183. [CrossRef] [PubMed]
81. Buss, H.; Dorrie, A.; Schmitz, M.L.; Frank, R.; Livingstone, M.; Resch, K.; Kracht, M. Phosphorylation of serine 468 by GSK-3β negatively regulates basal p65 NF-κB activity. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 49571–49574. [CrossRef] [PubMed]
82. Chen, L.F.; Greene, W.C. Shaping the nuclear action of NF-κB. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2004**, *5*, 392–401. [CrossRef] [PubMed]
83. Blonska, M.; Shambharkar, P.B.; Kobayashi, M.; Zhang, D.; Sakurai, H.; Su, B.; Lin, X. TAK1 is recruited to the tumor necrosis factor-α (TNF- α) receptor 1 complex in a receptor-interacting protein (RIP)-dependent manner and cooperates with MEKK3 leading to NF-κB activation. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 43056–43063. [CrossRef] [PubMed]
84. Adli, M.; Baldwin, A.S. IKK-i/IKKε controls constitutive, cancer cell-associated NF-κB activity via regulation of Ser-536 p65/RelA phosphorylation. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 26976–26984. [CrossRef] [PubMed]
85. Kelleher, Z.T.; Matsumoto, A.; Stamler, J.S.; Marshall, H.E. NOS2 regulation of NF-κB by *S*-nitrosylation of p65. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 30667–30672. [CrossRef] [PubMed]
86. Gilmore, T.D.; Herscovitch, M. Inhibitors of NF-κB signaling: 785 and counting. *Oncogene* **2006**, *25*, 6887–6899. [CrossRef] [PubMed]
87. Sen, N.; Paul, B.D.; Gadalla, M.M.; Mustafa, A.K.; Sen, T.; Xu, R.; Kim, S.; Snyder, S.H. Hydrogen sulfide-linked sulfhydration of NF-κB mediates its antiapoptotic actions. *Mol. Cell* **2012**, *45*, 13–24. [CrossRef] [PubMed]
88. Zhong, H.; May, M.J.; Jimi, E.; Ghosh, S. The phosphorylation status of nuclear NF-κB determines its association with CBP/p300 or HDAC-1. *Mol. Cell* **2002**, *9*, 625–636. [CrossRef]
89. Chen, L.f. Acetylation of RelA at discrete sites regulates distinct nuclear functions of NF-κB. *EMBO J.* **2002**, *21*, 6539–6548. [CrossRef] [PubMed]
90. Perkins, N.D. Cysteine 38 holds the key to NF-κB activation. *Mol. Cell* **2012**, *45*, 1–3. [CrossRef] [PubMed]
91. Chen, F.E.; Huang, D.B.; Chen, Y.Q.; Ghosh, G. Crystal structure of p50/p65 heterodimer of transcription factor NF-κB bound to DNA. *Nature* **1998**, *391*, 410–413. [CrossRef] [PubMed]
92. Kiernan, R.; Bres, V.; Ng, R.W.; Coudart, M.P.; El Messaoudi, S.; Sardet, C.; Jin, D.Y.; Emiliani, S.; Benkirane, M. Post-activation turn-off of NF-κB-dependent transcription is regulated by acetylation of p65. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 2758–2766. [CrossRef] [PubMed]
93. Chen, H.; Tini, M.; Evans, R.M. HATs on and beyond chromatin. *Curr. Opin. Cell Biol.* **2001**, *13*, 218–224. [CrossRef]

94. Rothgiesser, K.M.; Fey, M.; Hottiger, M.O. Acetylation of p65 at lysine 314 is important for late NF-κB-dependent gene expression. *BMC Genomics* **2010**, *11*, 22. [CrossRef] [PubMed]
95. Buerki, C.; Rothgiesser, K.M.; Valovka, T.; Owen, H.R.; Rehrauer, H.; Fey, M.; Lane, W.S.; Hottiger, M.O. Functional relevance of novel p300-mediated lysine 314 and 315 acetylation of RelA/p65. *Nucleic Acids Res.* **2008**, *36*, 1665–1680. [CrossRef] [PubMed]
96. Sterner, D.E.; Berger, S.L. Acetylation of histones and transcription-related factors. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2000**, *64*, 435–459. [CrossRef] [PubMed]
97. Rothgiesser, K.M.; Erener, S.; Waibel, S.; Luscher, B.; Hottiger, M.O. SIRT2 regulates NF-κB dependent gene expression through deacetylation of p65 Lys310. *J. Cell Sci.* **2010**, *123*, 4251–4258. [CrossRef] [PubMed]
98. Pandithage, R.; Lilischkis, R.; Harting, K.; Wolf, A.; Jedamzik, B.; Luscher-Firzlaff, J.; Vervoorts, J.; Lasonder, E.; Kremmer, E.; Knoll, B.; et al. The regulation of SIRT2 function by cyclin-dependent kinases affects cell motility. *J. Cell Biol.* **2008**, *180*, 915–929. [CrossRef] [PubMed]
99. North, B.J.; Marshall, B.L.; Borra, M.T.; Denu, J.M.; Verdin, E. The human Sir2 ortholog, SIRT2, is an NAD^+-dependent tubulin deacetylase. *Mol. Cell* **2003**, *11*, 437–444. [CrossRef]
100. Dryden, S.C.; Nahhas, F.A.; Nowak, J.E.; Goustin, A.S.; Tainsky, M.A. Role for human SIRT2 NAD-dependent deacetylase activity in control of mitotic exit in the cell cycle. *Mol. Cell. Biol.* **2003**, *23*, 3173–3185. [CrossRef] [PubMed]
101. Vaquero, A.; Scher, M.B.; Lee, D.H.; Sutton, A.; Cheng, H.L.; Alt, F.W.; Serrano, L.; Sternglanz, R.; Reinberg, D. SirT2 is a histone deacetylase with preference for histone H4 Lys 16 during mitosis. *Genes Dev.* **2006**, *20*, 1256–1261. [CrossRef] [PubMed]
102. Heltweg, B.; Gatbonton, T.; Schuler, A.D.; Posakony, J.; Li, H.; Goehle, S.; Kollipara, R.; Depinho, R.A.; Gu, Y.; Simon, J.A.; et al. Antitumor activity of a small-molecule inhibitor of human silent information regulator 2 enzymes. *Cancer Res.* **2006**, *66*, 4368–4377. [CrossRef] [PubMed]
103. Black, J.C.; Mosley, A.; Kitada, T.; Washburn, M.; Carey, M. The SIRT2 deacetylase regulates autoacetylation of p300. *Mol. Cell* **2008**, *32*, 449–455. [CrossRef] [PubMed]
104. Hanahan, D.; Weinberg, R.A. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* **2011**, *144*, 646–674. [CrossRef] [PubMed]
105. Kim, Y.K.; Lee, E.K.; Kang, J.K.; Kim, J.A.; You, J.S.; Park, J.H.; Seo, D.W.; Hwang, J.W.; Kim, S.N.; Lee, H.Y.; et al. Activation of NF-κB by HDAC inhibitor apicidin through Sp1-dependent de novo protein synthesis: Its implication for resistance to apoptosis. *Cell Death Differ.* **2006**, *13*, 2033–2041. [CrossRef] [PubMed]
106. Chavey, C.; Muhlbauer, M.; Bossard, C.; Freund, A.; Durand, S.; Jorgensen, C.; Jobin, C.; Lazennec, G. Interleukin-8 expression is regulated by histone deacetylases through the nuclear factor-κB pathway in breast cancer. *Mol. Pharmacol.* **2008**, *74*, 1359–2066. [CrossRef] [PubMed]
107. Abaza, M.S.; Bahman, A.M.; Al-Attiyah, R. Superior antimitogenic and chemosensitization activities of the combination treatment of the histone deacetylase inhibitor apicidin and proteasome inhibitors on human colorectal cancer cells. *Int. J. Oncol.* **2014**, *44*, 105–128. [CrossRef] [PubMed]
108. Duan, J.; Friedman, J.; Nottingham, L.; Chen, Z.; Ara, G.; van Waes, C. Nuclear factor-κB p65 small interfering RNA or proteasome inhibitor bortezomib sensitizes head and neck squamous cell carcinomas to classic histone deacetylase inhibitors and novel histone deacetylase inhibitor PXD101. *Mol. Cancer Ther.* **2007**, *6*, 37–50. [CrossRef] [PubMed]
109. Heider, U.; von Metzler, I.; Kaiser, M.; Rosche, M.; Sterz, J.; Rotzer, S.; Rademacher, J.; Jakob, C.; Fleissner, C.; Kuckelkorn, U.; et al. Synergistic interaction of the histone deacetylase inhibitor SAHA with the proteasome inhibitor bortezomib in mantle cell lymphoma. *Eur. J. Haematol.* **2008**, *80*, 133–142. [CrossRef] [PubMed]
110. Dai, Y.; Guzman, M.L.; Chen, S.; Wang, L.; Yeung, S.K.; Pei, X.Y.; Dent, P.; Jordan, C.T.; Grant, S. The NF (Nuclear factor)-κB inhibitor parthenolide interacts with histone deacetylase inhibitors to induce MKK7/JNK1-dependent apoptosis in human acute myeloid leukaemia cells. *Br. J. Haematol.* **2010**, *151*, 70–83. [CrossRef] [PubMed]
111. Kubo, M.; Kanaya, N.; Petrossian, K.; Ye, J.; Warden, C.; Liu, Z.; Nishimura, R.; Osako, T.; Okido, M.; Shimada, K.; et al. Inhibition of the proliferation of acquired aromatase inhibitor-resistant breast cancer cells by histone deacetylase inhibitor LBH589 (panobinostat). *Breast Cancer Res. Treat.* **2013**, *137*, 93–107. [CrossRef] [PubMed]

112. Zheng, L.; Fu, Y.; Zhuang, L.; Gai, R.; Ma, J.; Lou, J.; Zhu, H.; He, Q.; Yang, B. Simultaneous NF-κB inhibition and E-cadherin upregulation mediate mutually synergistic anticancer activity of celastrol and SAHA in vitro and in vivo. *Int. J. Cancer* **2014**, *135*, 1721–1732. [CrossRef] [PubMed]
113. Yeung, F.; Hoberg, J.E.; Ramsey, C.S.; Keller, M.D.; Jones, D.R.; Frye, R.A.; Mayo, M.W. Modulation of NF-κB-dependent transcription and cell survival by the SIRT1 deacetylase. *EMBO J.* **2004**, *23*, 2369–2380. [CrossRef] [PubMed]
114. Kramer, O.H.; Baus, D.; Knauer, S.K.; Stein, S.; Jager, E.; Stauber, R.H.; Grez, M.; Pfitzner, E.; Heinzel, T. Acetylation of Stat1 modulates NF-κB activity. *Genes Dev.* **2006**, *20*, 473–485. [CrossRef] [PubMed]
115. Matsuoka, H.; Fujimura, T.; Mori, H.; Aramori, I.; Mutoh, S. Mechanism of HDAC inhibitor FR235222-mediated IL-2 transcriptional repression in Jurkat cells. *Int. Immunopharmacol.* **2007**, *7*, 1422–1432. [CrossRef] [PubMed]

© 2016 by the authors; licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC-BY) license (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

Manuscript Details

Manuscript number	YPHRS_2019_2149
Title	The HDAC6 inhibitor 7b induces BCR-ABL ubiquitination and downregulation and synergizes with imatinib to trigger apoptosis in chronic myeloid leukemia
Article type	Research Paper

Abstract

Despite the discovery of tyrosine kinase inhibitors (TKIs) for the treatment of breakpoint cluster region-Abelson (BCR-ABL)+ cancers, patients with chronic myeloid leukemia (CML) treated with TKIs develop resistances and severe adverse effects. Combination treatments, especially with a histone deacetylase (HDAC)6 inhibitor (HDAC6i), appear to be an attractive option to prevent TKI resistances considering the potential capacity of HDAC6i to diminish BCR-ABL expression. Here, we hypothesized that HDAC6i compound 7b could lead to BCR-ABL downregulation in CML cells and sensitize them to TKI treatments. Results showed that the imatinib-7b combination caused a strong synergistic caspase-dependent apoptotic cell death and drastically reduced the proportion of cancer stem cells, whereas it only moderately affected healthy cells. Ultimately, the combination significantly decreased colony formation in a semisolid methylcellulose medium and tumor mass in xenografted zebrafishes as compared to each compound alone. Mechanistically, the combination induced BCR-ABL ubiquitination and downregulation followed by the disturbance of key proteins of its downstream pathways involved in CML proliferation and survival. Taken together, our results suggest that an HDAC6i potentiates the effect of imatinib and could overcome TKI resistance in CML cells.

Keywords	4-hydroxybenzoic acid; tyrosine kinase inhibitor; combination chemotherapy; synergistic cytotoxic effect; imatinib resistance; leukemia stem cells

Corresponding Author	Marc Diederich
Corresponding Author's Institution	Seoul National University
Order of Authors	Hélène Losson, Manon Lernoux, Jin-Young Lee, Aloran Mazumder, Déborah Gérard, Carole Seidel, Mario Dicato, Gilbert Kirsch, Byung Woo Han, Michael Schnekenburger, Marc Diederich
Suggested reviewers	Wim Vanden Berghe, Carine Michiels, Sergio Valente, Krystyna Skalicka-Woźniak, Gautam Sethi

Submission Files Included in this PDF

File Name [File Type]

Losson_Letter.doc [Cover Letter]

Losson_Author checklist_MD.docx [Checklist]

Losson_graphical.pptx [Graphical Abstract]

Losson_Text.docx [Manuscript File]

Losson_Conflicts.doc [Conflict of Interest]

Losson_Supplementary Materials V6.docx [e-Component]

Submission Files Not Included in this PDF

File Name [File Type]

Losson_Supplementary Figures V6.pptx [e-Component]

To view all the submission files, including those not included in the PDF, click on the manuscript title on your EVISE Homepage, then click 'Download zip file'.

The HDAC6 inhibitor 7b induces BCR-ABL ubiquitination and downregulation and synergizes with imatinib to trigger apoptosis in chronic myeloid leukemia

Hélène Losson[1], Manon Lernoux[1], Jin-Young Lee[2], Aloran Mazumder[2], Déborah Gérard[1], Carole Seidel[1,$], Mario Dicato[1], Gilbert Kirsch[3], Byung Woo Han[2], Michael Schnekenburger[1], Marc Diederich[2,*]

[1]Laboratoire de Biologie Moléculaire et Cellulaire du Cancer, Hôpital Kirchberg, 9, rue Edward Steichen, L-2540 Luxembourg, Luxembourg.

[2]Department of Pharmacy, College of Pharmacy, Seoul National University, Building 29 Room 223, 1 Gwanak-ro, Gwanak-gu, Seoul, 08826, Korea

[3]UMR CNRS 7565 SRSMC, Université de Lorraine, 57070 Metz, France

[$]Present address: Institut National de Recherche et Sécurité, Rue du Morvan, CS 60027, F-54519 Vandœuvre, Cedex, France

*Corresponding author: Marc Diederich. Tel.: +82 2-880-8919; E-mail address: marcdiederich@snu.ac.kr; Department of Pharmacy, College of Pharmacy, Seoul National University, Building 29 Room 223, 1 Gwanak-ro, Gwanak-gu, Seoul 08826, Korea.

Abstract

Despite the discovery of tyrosine kinase inhibitors (TKIs) for the treatment of breakpoint cluster region-Abelson $(BCR\text{-}ABL)^+$ cancers, patients with chronic myeloid leukemia (CML) treated with TKIs develop resistances and severe adverse effects. Combination treatments, especially with a histone deacetylase (HDAC)6 inhibitor (HDAC6i), appear to be an attractive option to prevent TKI resistances considering the potential capacity of HDAC6i to diminish BCR-ABL expression. Here, we hypothesized that HDAC6i compound 7b could lead to BCR-ABL downregulation in CML cells and sensitize them to TKI treatments. Results showed that the imatinib-7b combination caused a strong synergistic caspase-dependent apoptotic cell death and drastically reduced the proportion of leukemia stem cells, whereas it only moderately affected healthy cells. Ultimately, the combination significantly decreased colony formation in a semisolid methylcellulose medium and tumor mass in xenografted zebrafishes as compared to each compound alone. Mechanistically, the combination induced BCR-ABL ubiquitination and downregulation followed by the disturbance of key proteins of its downstream pathways involved in CML proliferation and survival. Taken together, our results suggest that an HDAC6i potentiates the effect of imatinib and could overcome TKI resistance in CML cells.

Keywords: 4-hydroxybenzoic acid; tyrosine kinase inhibitor; combination chemotherapy; synergistic cytotoxic effect; imatinib resistance; leukemia stem cells.

Chemical compounds studied in this article: imatinib (PubChem CID: 123596); suberanilohydroxamic acid (SAHA; PubChem CID: 5311); tubacin (PubChem CID: 6675804); Z-VAD-FMK (zVAD; PubChem CID: 5737); etoposide (VP-16; PubChem CID: 92209272) and cisplatin (PubChem CID: 441203).

Abbreviations:

ABL, Abelson; ALDH, aldehyde dehydrogenase; BCR, breakpoint cluster region; BID, BH3 interacting-domain death agonist; CD, cluster of differentiation; CML, chronic myeloid leukemia; CrkL, Crk-like protein; FBS, fetal bovine serum; FITC, fluorescein isothiocyanate; HDAC, histone deacetylase; HDACi, histone deacetylase inhibitor; HSP, heat shock protein; KBM-5R, imatinib-resistant KBM-5; K-562R, imatinib-resistant K-562; LSC, leukemia stem cell; Mcl-1, myeloid cell leukemia 1; MPER, mammalian protein extraction reagent; MTT, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide; PARP, poly(ADP-ribose) polymerase; PBMC, peripheral blood mononuclear cell; PDB, protein data bank; PHA, phytohemagglutinin; SAHA, suberanilohydroxamic acid; STAT5, phosphorylated signal transducer and activator of transcription 5; TKI, tyrosine kinase inhibitor; VP-16, etoposide; Z-VAD-FMK, zVAD.

1. Introduction

Chronic myeloid leukemia (CML) is a myeloproliferative disorder characterized by a reciprocal translocation between long arms of chromosomes 9 and 22, where Abelson (*ABL*) and breakpoint cluster region (*BCR*) genes are located, called the Philadelphia chromosome [1]. The result of this translocation is the constitutively active tyrosine kinase BCR-ABL involved in CML cell proliferation and survival [2] by inducing overproduction of immature myeloid cells in the bone marrow and peripheral blood of CML patients.

Since 2001, treatment with the first-generation tyrosine kinase inhibitor (TKI) imatinib (Gleevec®) has largely improved the management of CML; nevertheless, many patients develop resistance [3] notably due to the existence of CML leukemia stem cells (LSCs), incompletely eradicated by the TKI [4, 5]. Second- and third generation TKIs have been developed to overcome this drawback. However, the emergence of resistance to these TKIs associated with adverse effects requires the development of new therapeutic strategies to eliminate CML LSCs and prevent recurrence [6, 7].

Since monotherapy is frequently associated with drug resistance development, the use of combination therapies appears as an attractive approach to prevent drug resistance and improve therapeutic options for CML patients [8]. From this perspective, histone deacetylase (HDAC) inhibitors (HDACi) recently emerged as a promising family of drug candidates for combination therapies in multiple cancer models [9, 10] and to enhance imatinib-induced CML cell death [11]. Nonetheless, clinical trials revealed that inhibition of multiple HDACs associates with adverse effects [12] so that the use of pan-HDACis needs reconsideration.

HDAC6 plays a critical role by deacetylating heat shock protein (HSP) 90α, which in turn loses its chaperon function for client proteins, including BCR-ABL, thus leading to its ubiquitin-proteasome-dependent degradation [13]. We previously reported that the HDAC6-specific inhibitor 7b kills prostate cancer cells *via* HSP90α hyperacetylation-mediated

androgen receptor protein downregulation [14]. Accordingly, we hypothesized that compound 7b could trigger BCR-ABL degradation in CML cells to sensitize them to TKI treatments.

Here, we demonstrated that compound 7b binds to the second catalytic site of HDAC6 and decreases BCR-ABL expression in CML cells. Moreover, in combination with imatinib, 7b exerts synergistic anticancer effects on K-562 cells, unlike the *bona fide in vitro* HDAC6i tubacin. 7b displays favorable selective toxicity to cancer cells relative to healthy cells. Moreover a combination of imatinib and 7b decreases BCR-ABL activity and expression of its downstream targets involved in cell proliferation and survival, eventually leading to caspase-dependent apoptotic cell death. The imatinib-7b combination significantly reduced the LSC proportion. The anticancer potential of this combination was validated *in vivo,* where it suppressed imatinib-sensitive and -resistant CML tumor growth in a xenografted-zebrafish model.

2. Materials and methods

2.1. Cell culture

K-562, MEG-01, and U-937 cells were obtained from the Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (Braunschweig, Germany). KBM-5 cells and an imatinib-resistant K-562 (K-562R) subline were gifts from Dr. Bharat B. Aggarwal and from the Catholic University of Seoul, respectively. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from healthy adult human donors were isolated from blood obtained from the Red Cross (Luxembourg, Luxembourg), were purified, and were induced to proliferate by a mitogen-cytokine cocktail supplement whose composition includes phytohemagglutinin (PHA; Millipore, Darmstadt, Germany) and interleukin 2 (Miltenyi Biotec, Utrecht, The Netherlands) as reported before [15, 16]. Human primary hematopoietic cluster of differentiation (CD)34^+ progenitor/stem cells were isolated as previously reported [17].

All cell models were maintained at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% of CO_2 in a culture medium containing 1% (v/v) of an antibiotic solution (streptomycin and penicillin) and an antimycotic solution (Lonza, Verviers, Belgium) as well as 10% of heat-inactivated fetal bovine serum (FBS; Lonza). The cell lines K-562, MEG-01, and U-937 and PBMCs were cultured in RPMI 1640 (Lonza), whereas KBM-5 cells were cultured in IMDM (Lonza). The cell lines K-562R and KBM-5R were cultured in the same medium as the parental cell line with a supplement: 0.8 and 1 μM imatinib, respectively. $CD34^+$ cells were cultured in the serum-free Stem Cell II culture medium (Sigma-Aldrich, Overijse, Belgium) supplemented with 10 ng/mL interleukin 3 and 10 ng/mL stem cell factor (Reliatech, Wolfenbüttel, Germany). Cell lines with less than thirty passages were used in all experiments.

2.2. Reagents

Compound 7b was synthetized as previously described [14]. Imatinib (Sigma-Aldrich), suberanilohydroxamic acid (SAHA; Cayman Chemical Company, USA), tubacin (Sigma-Aldrich), Z-VAD-FMK (zVAD; Millipore), and etoposide (VP-16; Sigma-Aldrich) were dissolved in DMSO. Cisplatin (ONCO-Tain®, Hospira, USA) was purchased as an injectable solution. Unless specified otherwise, other chemicals were obtained from Sigma-Aldrich.

2.3. Western blot analyses

Histones were isolated as reported before [18]. Whole-cell lysates were prepared with the Mammalian Protein Extraction Reagent (MPER; Thermo Fischer Scientific) supplemented with a 1× protease inhibitor cocktail (Complete EDTA-free, Roche), 1× phosphatase inhibitor cocktail (PhosSTOP, Roche), and 10 μM SAHA according to the manufacturer's instructions. Protein concentration was determined by the Bradford assay (Bio-Rad, Temse, Belgium). Western blots were carried out as described elsewhere [19] with primary antibodies against α-tubulin (CP06; Calbiochem; lot number: 2760575), β-actin (A5441; Sigma-Aldrich; lot number: 107K4800), acetylated histone H4 (06-866; Millipore; lot number: 2153152), acetylated α-tubulin (sc-23950; Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany; lot number: C0916), BH3 interacting-domain death agonist (BID; 2002; Cell Signaling Technology, Leiden, The Netherlands; lot number: 4), c-Abelson (c-abl; sc-23; Santa Cruz Biotechnology; lot number: K0414), c-Myc (51-1485GR; BD Biosciences, Erembodegem, Belgium; lot number: 8334874), caspase 3 (sc-56053; Santa Cruz Biotechnology; lot number: F2714), caspase 8 (9746; Cell Signaling Technology; lot number:18), caspase 9 (9502; Cell Signaling Technology; 8), Crk-like protein (CrkL; 3182; Cell Signaling Technology; lot number: 5), histone H1 (sc-8030; Santa Cruz Biotechnology; lot number: D0815), Lyn (2732; Cell Signaling Technology; lot number: 4), myeloid cell leukemia 1 (Mcl-1; 4572; Cell Signaling Technology; lot number: 4), phospho (P)-CrkL (3181; Cell Signaling Technology; lot number:

7), P-Lyn (2731; Cell Signaling Technology; lot number: 5), Phosphorylated signal transducer and activator of transcription 5 (P-STAT5) (Y694; 9351; Cell Signaling Technology; lot number: 7), poly(ADP-ribose) polymerase (PARP)-1 (9542, Cell Signaling Technology; lot number: 14), STAT5 (9363; Cell Signaling Technology; lot number: 10), survivin (AF886; R&D Systems, Abingdon, United Kingdom; lot number: DYX0611051), and the corresponding secondary antibodies against mouse (sc-516102; Santa Cruz; lot number: E0119) and rabbit IgG (ab6720; Abcam, Cambridge, United Kingdom; lot number: A1817). Western Blot quantifications were performed with ImageQuant TL (GE Healthcare, Roosendaal, The Netherlands) or ImageJ software (U.S. National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA). The signal intensity of each band of interest was normalized with the respect to the signal intensity of the loading control and then reported to the control of the experiment.

2.4. Coimmunoprecipitation analyses

Immunoprecipitation procedures were performed with an antibody against ubiquitin (sc-8017; Santa Cruz Biotechnology) and the Universal Magnetic Co-IP Kit (Active Motif, La Hulpe, Belgium) following the manufacturer's protocol.

2.5. In silico *experiments*

Docking analyses were performed as described previously [15].

Drug-likeness parameters were determined using web-based Molinspiration (https://www.molinspiration.com) and PreADMET version 2.0 (https://preadmet.bmdrc.kr) software.

2.6. Transient transfections, immunoprecipitation procedures, and HDAC activity assays

K-562 cells (10^6) were transfected without DNA (mock) or with 5 µg of various FLAG-tagged plasmids causing overexpression of either wild-type or HDAC6 proteins mutated at the first catalytic site (H216A), at the second one (H611A), or at both sites (H216A/H611A) using Lipofectamine LTX with Plus Reagent (Thermo Fischer Scientific, Erembodegem-Aalst, Belgium) following the manufacturer's protocol. All HDAC6-containing plasmids were a gift from Pr. Schreiber [20], except that the double mutant H216A/H611A was a gift from Pr. Yao [Addgene plasmid # 30483] [21]. At 24 h post-transfection, the cells were resuspended in lysis buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 1% of Igepal, 0.25% of sodium deoxycholate, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10 µM SAHA, 1× Complete EDTA-free [Roche; Basel, Switzerland]) and incubated for 15 min at 4°C with mild agitation. After centrifugation to remove cell debris, the samples were precleared with at 4°C with a 50% gel slurry of protein A/G-agarose beads saturated with salmon sperm DNA and bovine serum albumin (Millipore), and protein concentration was determined by the Bradford assay (Bio-Rad, Temse, Belgium). Immunoprecipitation procedures were carried out overnight at 4°C using 250 µg of the protein extract and 5 µg of an antibody against FLAG (sc-807, Santa Cruz Biotechnology) and HDAC6 (sc-11420, Santa Cruz Biotechnology). Immune complexes were recovered by 1 h incubation at 4°C with a 50% gel slurry of protein A/G-agarose beads and were washed in lysis buffer. The samples were then divided in two fractions: one fraction was subjected to an *in vitro* HDAC6 activity assay as described elsewhere [22], and the other fraction was incubated for 5 min at 100°C with Laemmli buffer and analyzed by western blotting.

2.7. Viability assay

Cell viability and concentration were determined by means of a semiautomated image-based cell analyzer (Cedex XS Innovatis, Roche, Basel, Switzerland) after the Trypan Blue Exclusion Test (BioWhittaker®, Lonza).

2.8. Analysis of nuclear morphology

The morphology of the cell nucleus was observed after staining with the DNA-specific dye Hoechst 33342 (Calbiochem, Darmstadt, Germany) and intercalating agent propidium iodide (Sigma-Aldrich) by fluorescence microscopy by means of a Cell^M imaging station from Olympus (Aartselaar, Belgium).

2.9. Analysis of apoptotic cell death

Apoptosis was evaluated by the detection of phosphatidylserine exposure and was quantified using the Annexin V-Fluorescein Isothiocyanate (FITC) Apoptosis Detection Kit I (BD Biosciences) following the manufacturer's protocol. Cell fluorescence was measured on a FACS Calibur flow cytometer (BD Biosciences) and analyzed in Flowjo® software (version 10.4.1, Treestar, Ashland Oregon, USA).

2.10. Caspase activity measurements

Caspase activities were measured using Caspase-Glo® 3/7, 8, and 9 Assays (Promega, Leiden, The Netherlands) following the manufacturer's protocol. Luminescence was quantified on an Orion microplate luminometer (Berthold, Bad Wildbad, Germany) with the Simplicity software (CMMS Software Apps, West Dunbartonshire, Scotland).

2.11. Computational analysis of public CML datasets

The gene expression microarray dataset E-MTAB-2594 of $CD34^{+}/CD38^{-}$ cells isolated from primary human CML samples obtained from 6 chronic phase CML patients before any treatment from Scott *et al*. [23], was downloaded from the ArrayExpress database [24]. The robust multichip average algorithm from the oligo R package (version 1.48.0) [25] was used to

normalize the dataset and finally the function *removeBatchEffect* from the limma R package (version 3.40.2) [26] was used for batch correction. The analysis of the variance in the datasets corresponding to the various groups: untreated, dasatinib-, imatinib- and nilotinib-treated $CD34^+/CD38^-$ cells was submitted to principal component analysis using the dedicated function from the FactoMineR package [27] in R (version 3.6.0) [28] allowing us to pool the three TKI datasets as one TKI-treated group. The boxplots were drawn using the ggboxplot function from the ggpubr package (version 0.2.1) [29] in R (version 3.6.0) and RStudio [30].

2.12. Aldefluor assay

The detection of ALDH activity in cells was carried out by the Aldefluor Assay (Stemcell Technologies, Grenoble, France) according to the manufacturer's guidelines. The relative proportions of cell subpopulations with low and high ALDH activities were distinguished by means of the ALDH inhibitor diethylaminobenzaldehyde. Data were acquired on a FACS Calibur flow cytometer and analyzed in the Flowjo® software, v10.4.1.

2.13. Colony formation assays

Cells (10^3 cells/mL) were seeded on a semisolid methylcellulose medium (Methocult H4230, StemCell Technologies) supplemented with 10% heat inactivated FBS (Lonza) and treated with the indicated compounds. Colonies were grown at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% of CO_2 for 10 days and were detected by adding 1 mg/mL of the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT) reagent (Sigma-Aldrich) using the Gel Doc XR+ System (Bio-Rad). Clones were scored in the ImageJ software.

2.14. Zebrafish xenografts

Wild-type zebrafish (*Danio rerio*) were maintained according to Seoul National University, College of Pharmacy guidelines. Xenograft injections with K-562 cells pretreated for 24 h with imatinib and compound 7b were performed on the zebrafish model as described elsewhere [15].

2.15. Statistical analyses

These analyses were carried out in GraphPad Prism 8.0.1 software. For computational analysis of public CML datasets, statistical significance was assessed using ANOVA followed by the Kruskal-Wallis test. For all the other analyses, parametric or nonparametric one-way and two-way ANOVA tests and t tests were conducted for statistical comparisons. Data with p values below 0.05 were considered statistically significant.

3. Results

3.1. Clinical relevance of HDAC6 as a potential anti-leukemic target

To validate the clinical relevance of HDAC6 as a potential anti-leukemic target, we analyzed the public gene expression microarray dataset E-MTAB-2594 of leukemia stem cells (LSCs) isolated from primary human CML samples that were treated with various TKIs [dasatinib (150 nM), nilotinib (5 μM) and imatinib (5 μM)] for up to 7 days. We pooled these data into a unique TKI-treated group (Supplementary S1) and subsequently analyzed HDAC6 expression levels in untreated *vs.* TKI-treated groups. Our results showed that the later presented a significant reduction of HDAC6 mRNA levels after 7 days of treatment (Figure 1). Considering that TKI treatment led to a significant decrease in HDAC6 expression in CML patient cells, we hypothesized that HDAC6 is of essential importance for CML cell survival. These results provided us with an initial rationale to investigate the anti-leukemic activity of compound 7b, an HDAC6i described in our laboratory [14] alone or in combination with TKIs.

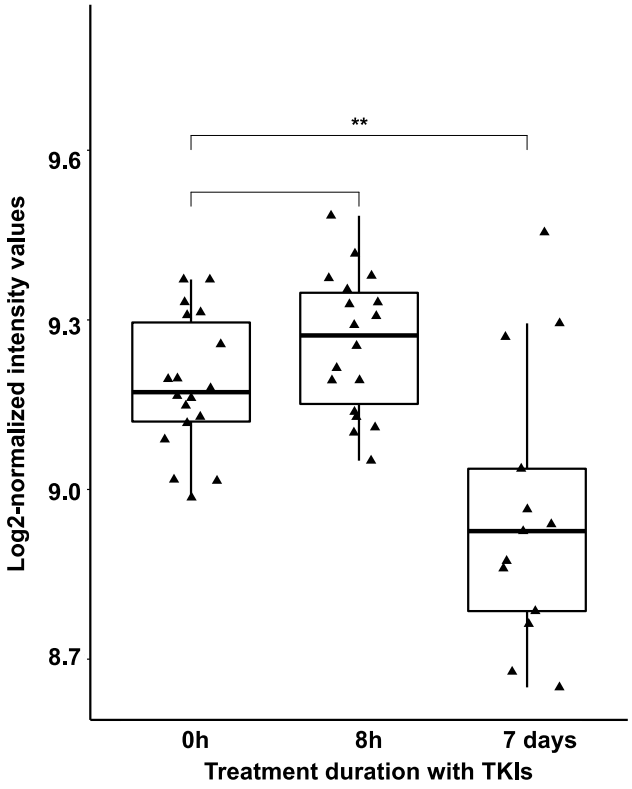


Figure 1: TKIs decreased HDAC6 mRNA levels in LSCs from CML patients.

HDAC6 mRNA levels in $CD34^+/CD38^-$ cells isolated from 6 CML patients and left untreated (N = 18) or treated with TKIs for 8h (N = 18) and 7 days (N = 13). Triangles mark individual patients and ** indicate $p < 0.01$.

3.2. Compound 7b reduces HDAC6 activity and BCR-ABL expression in CML cell lines

We then evaluated the HDAC selectivity of compound 7b in three $BCR\text{-}ABL^+$ CML cell lines expressing various constitutive HDAC6 protein levels (Supplementary Figure S2). Compound 7b significantly increased the acetylation of the HDAC6 substrate α-tubulin from 50 μM in K-562 cells and 75 μM in KBM-5 and MEG-01. Acetylation levels of histone H4, which is not a HDAC6 substrate, remained unchanged (Figure 2A).

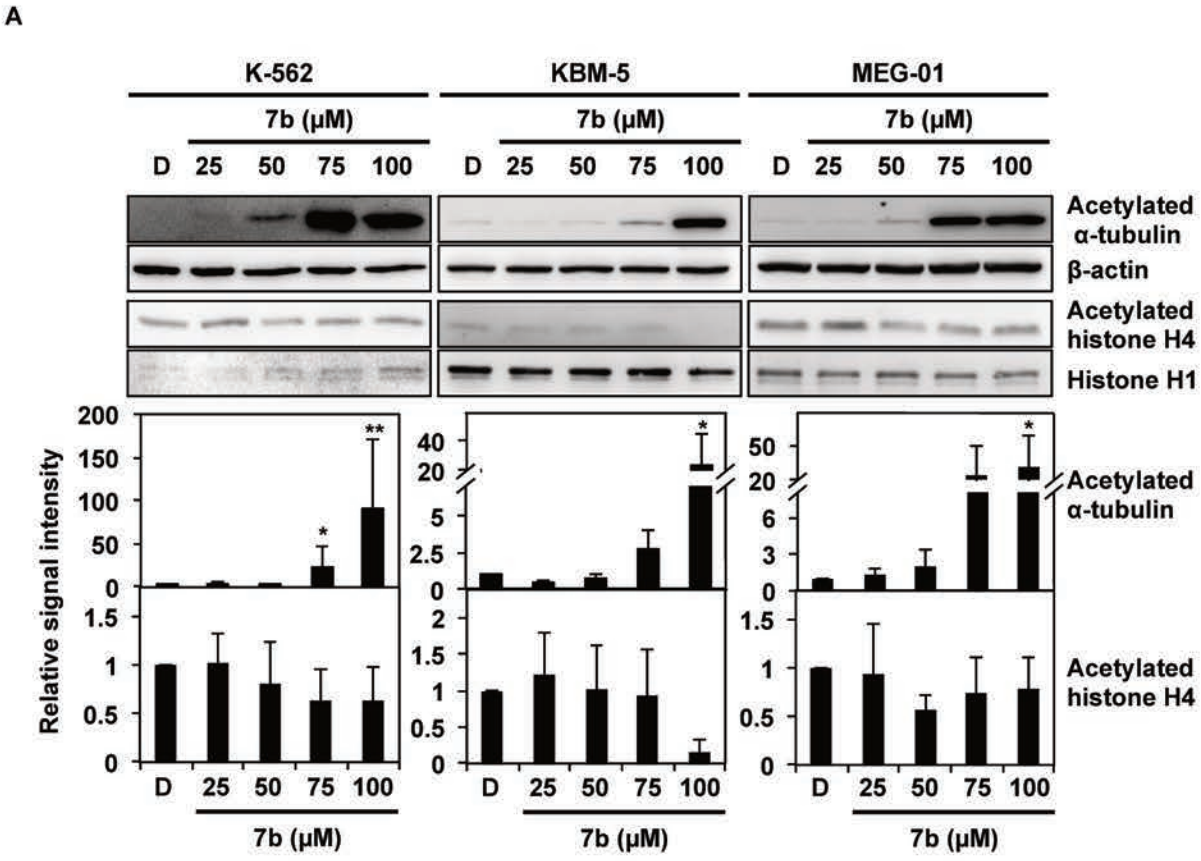


Figure 2: HDAC6i 7b increases α-tubulin acetylation and decreases BCR-ABL expression in CML cells.

(A) Effects of compound 7b on α-tubulin and histone H4 acetylation levels after 6 h of treatment. (B) Kinetic analysis of α-tubulin and histone H4 acetylation levels in cells treated with various concentrations of compound 7b. (C) Kinetic analysis of ubiquitinated (upper panel) and total BCR-ABL levels (lower panel) in K-562 cells treated with compound 7b. (D) Kinetic analysis of the action of compound 7b on BCR-ABL expression in KBM-5 and MEG-01 cells. DMSO (D) was used as solvent control and tubacin (2 μM for K-562 cells and 1.5 μM for KBM-5 and MEG-01 cells), and 2 μM SAHA were used as reference HDAC6i and pan-HDACi, respectively. Blots are representative of at least three independent experiments, with β-actin, histone H1, Coomassie blue and α-tubulin serving as loading controls. Images of the original western blots from which figures have been derived are presented in Supplementary Figure S3. Blot quantifications were performed and data are presented as histograms corresponding to the mean ± SD of the signal obtained from at least three independent blots. *, **, and *** indicate $p < 0.05$, $p < 0.01$, and $p < 0.001$, respectively, *versus* control cells.

The observed increase of α-tubulin acetylation was time-dependent starting from 0.5 h in K-562 cells and from 6 and 9 h in KBM-5 and MEG-01 cells, respectively (Figure 2B). These data confirmed the ability of compound 7b to selectively inhibit HDAC6 activity in CML cell models.

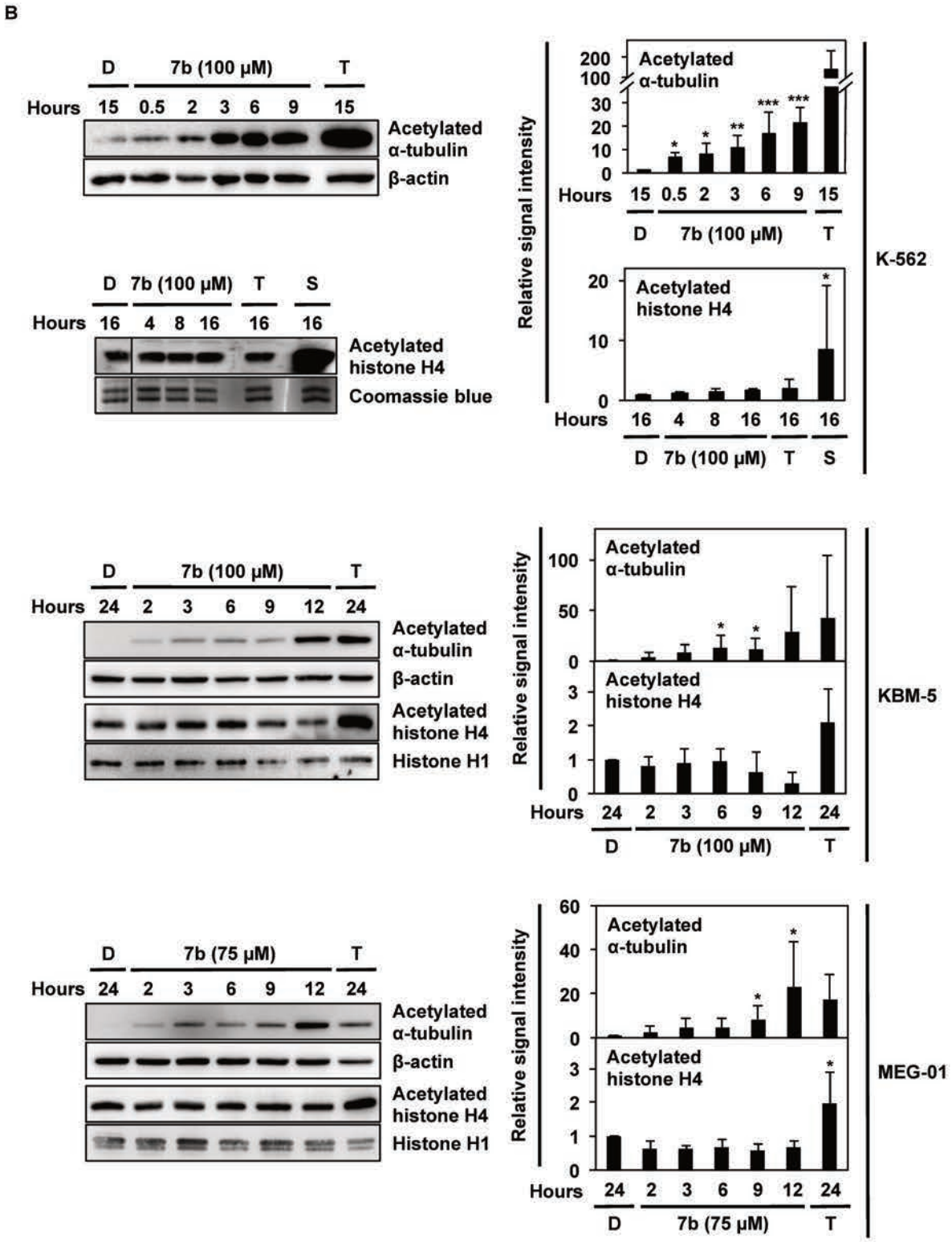


Figure 2 (continued)

HSP90α is another key cytoplasmic HDAC6 target, and its hyperacetylation leads to a loss of its chaperone activity and finally to ubiquitin-proteasome-dependent degradation of its

client proteins including BCR-ABL [13]. Accordingly, 7b-mediated HDAC6 activity inhibition in K-562 cells stimulated BCR-ABL ubiquitination starting from 0.5 h (Figure 2C, upper panel) followed by BCR-ABL protein downregulation at 6 h of treatment (Figure 2C, lower panel). Finally, we observed that compound 7b reduced BCR-ABL expression starting from 3 and 2 h in KBM-5 and MEG-01 cells, respectively (Figure 2D). Of note, in K-562 cells, compound 7b-induced decrease of BCR-ABL expression by was comparable to the effect of tubacin after 9 h of treatment. In KBM-5 and MEG-01 cells, the downregulation was more pronounced for compound 7b.

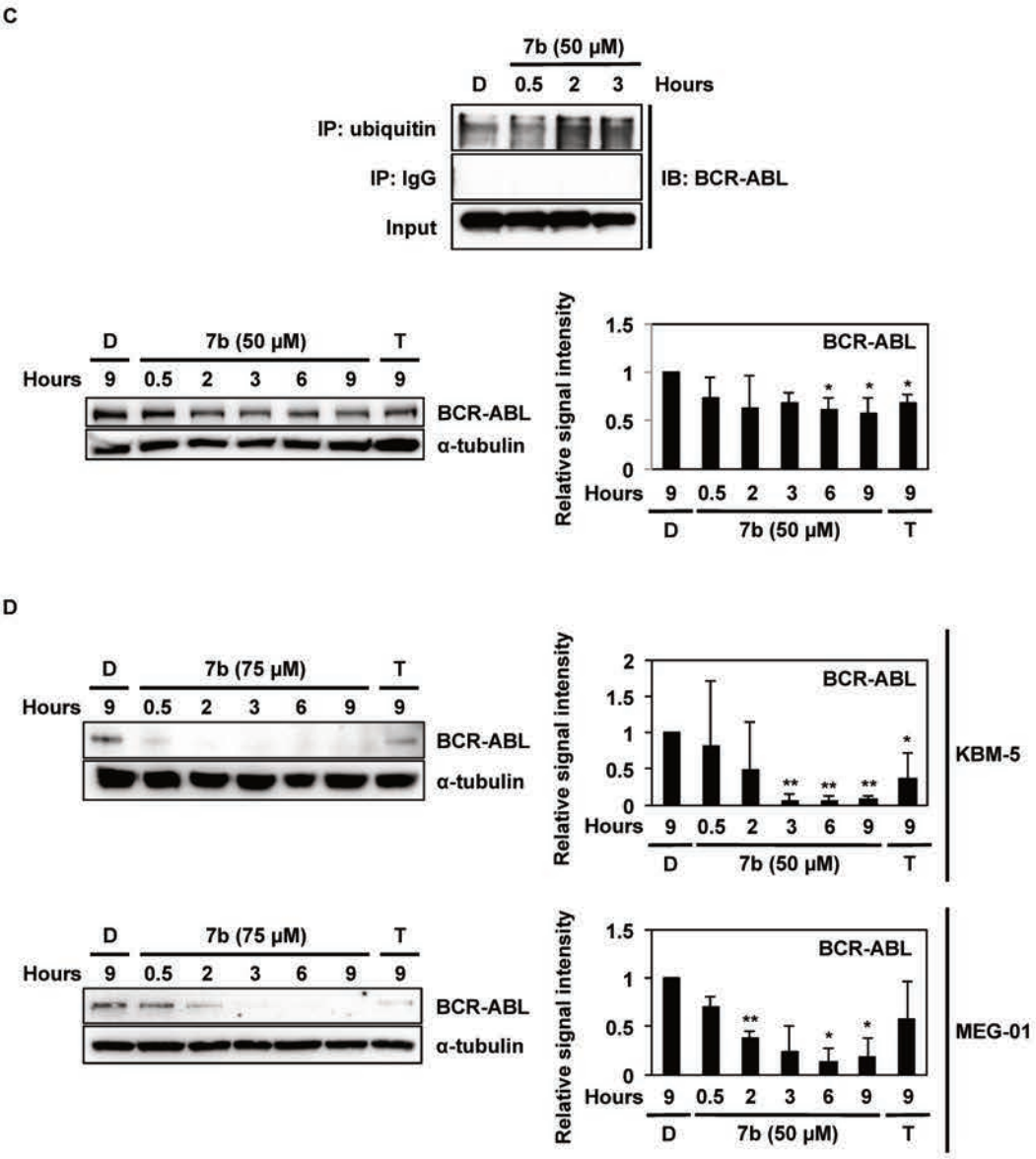


Figure 2 (continued)

3.3. In silico prediction of the biological activity of compound 7b

The presence of two catalytic sites in HDAC6 protein [11] encouraged us to determine which one could be targeted by compound 7b. We performed a docking simulation with compound 7b against the first and the second catalytic site of zebrafish [protein data bank (PDB) code 5G0G] and human (PDB code 5EDU) HDAC6, respectively. Compound 7b does not bind the first catalytic site under this pose (data not shown) but binds to the entrance of the second site with Phe620 and Phe680, similarly to other HDACis with zebrafish HDAC6 structures (Supplementary Figure S4A, B, C).

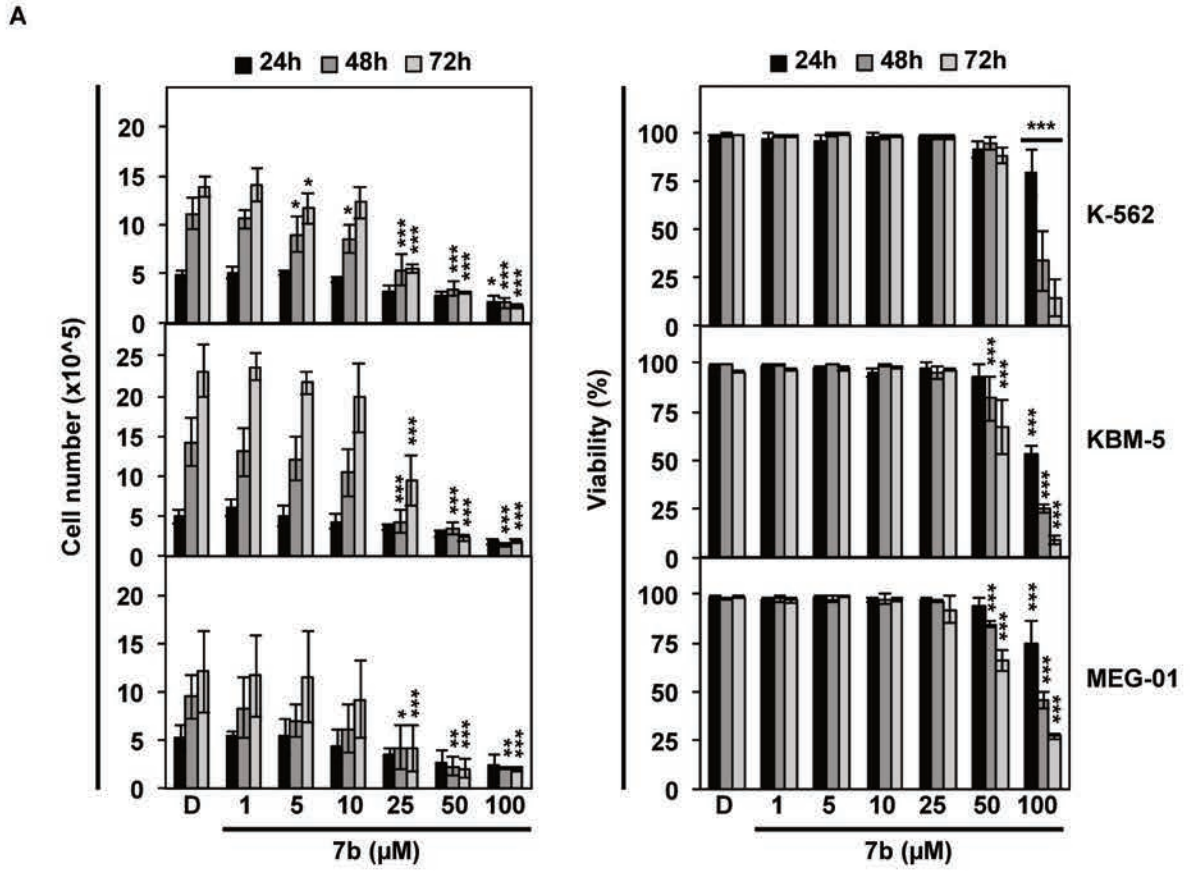
Since the implication of both catalytic sites in HDAC6 deacetylase activity is not clear, we transfected K-562 cells with plasmids expressing wild-type HDAC6 or catalytic mutants: deficient in the first catalytic site (H216A), the second (H611A), or both (H216A/H611A; Supplementary Figure S4D), and HDAC activity was measured after FLAG immunoprecipitation (Supplementary Figure S4E). Results revealed deacetylase activities in the H216A HDAC6 comparable to those of wild-type HDAC6, whereas a very weak activity (<10%) or no activity was detected in H611A and H216A/H611A HDAC6 respectively, suggesting that the second catalytic site is mainly responsible for HDAC6 activity at least toward the Fluor de Lys Sirt1 substrate. Similar results were obtained using another substrate, Fluor de Lys-H4-AcK16 (data not shown). Altogether, our results suggest that compound 7b interacts with the second HDAC6 catalytic site, mainly responsible for its deacetylase activity in our experimental conditions and reported to mediate *in cellulo* α-tubulin deacetylation [31, 32].

We also compared the *in silico* drug-likeness properties of compound 7b and of the *bona fide* HDAC6i tubacin. Results showed that unlike tubacin, compound 7b obeyed Lipinski's rule of five and globally showed better drug-likeness parameters than tubacin (Table I).

3.4. Compound 7b preferentially kills CML cells instead of healthy cells

We then tested the effect of HDAC6is on the proliferation and viability of K-562, KBM-5 and MEG-01 BCR-ABL$^+$ CML cell lines. Results revealed that 7b and tubacin, at concentrations sufficient to induce HDAC6 inhibition (Figure 2A, Supplementary Figure S5, Table II), are mainly cytostatic (Figure 3A, Supplementary Figure S6, Table III).

We then investigated the influence of 48 h treatment with compound 7b on various non-proliferative (*i.e.*, PBMCs and platelets) and proliferative (*i.e.*, PHA-stimulated PBMCs and primary human CD34$^+$ hematopoietic stem and progenitor cells) models of healthy cells. Among non-proliferative cells, compound 7b decreased PBMC viability only at 100 µM and had no effect on phosphatidylserine exposure in platelets. In proliferative cells, although compound 7b modestly reduced proliferation of CD34$^+$ cells, it impaired CD34$^+$ cell viability only at 100 µM and had no effect on PBMC growth and viability (Figure 3B).



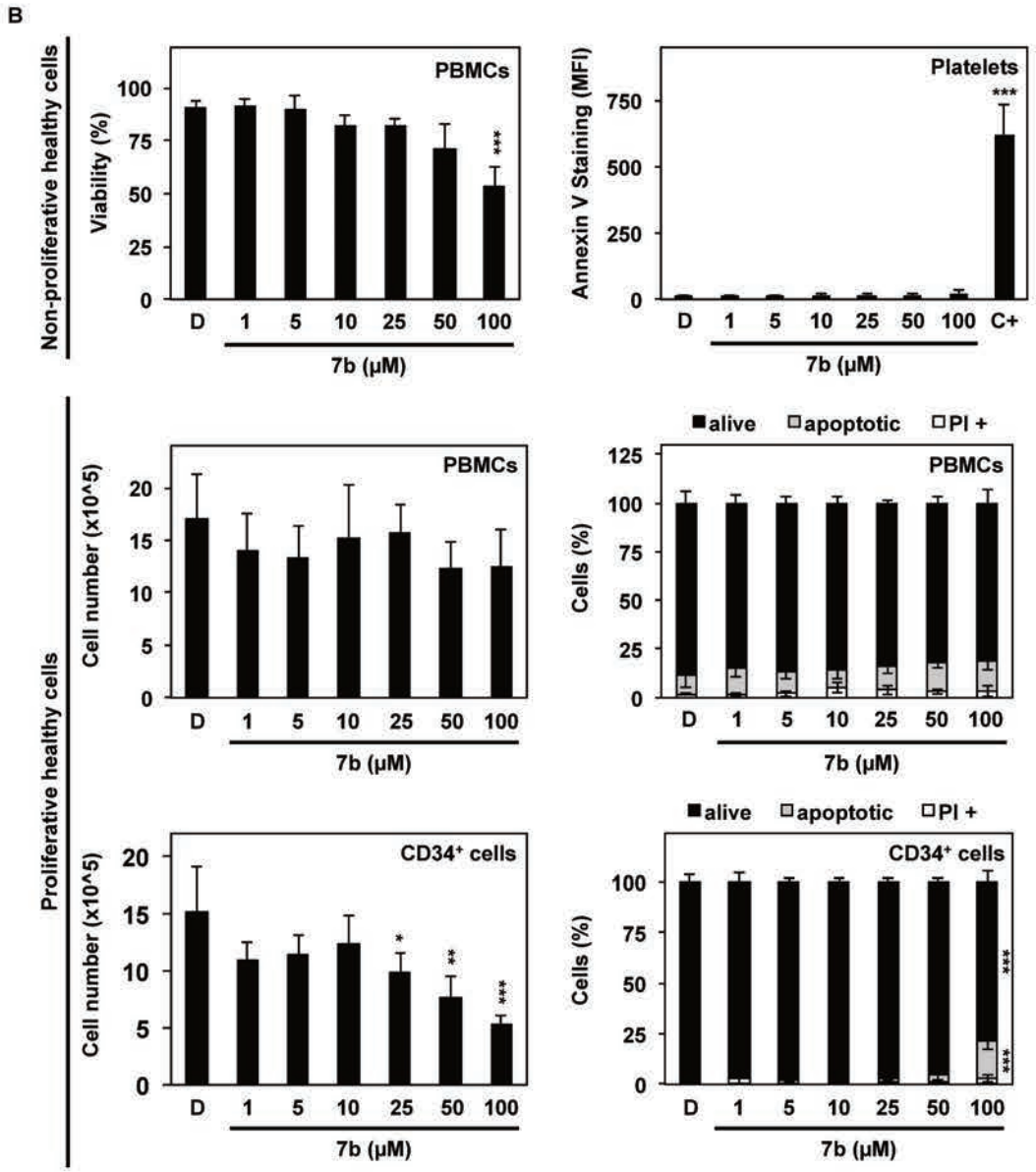


Figure 3 (continued)

Figure 3: **HDAC6i 7b has a moderate effect on healthy-cell viability compared to the effect induced on CML cells.**

(A) Cell number and viability of CML cells treated for up to 72h with increasing concentrations of compound 7b. Histograms correspond to the mean ± SD of at least three independent experiments. *, **, *** indicate $p < 0.05$, $p < 0.01$, $p < 0.001$ versus control cells, respectively. (B) The impact of compound 7b on viability of various non-proliferative and proliferative healthy cells after 48 h of treatment. DMSO (D) was used as solvent control. C+: positive control for phosphatidylserine exposure obtained by incubating platelets for 5 minutes with

50% DMSO. Viability was determined by Trypan blue staining of PBMCs, by analysis of phosphatidylserine exposure in platelets, and by nuclear morphological analysis of proliferative PBMCs and $CD34^+$ cells. Histograms correspond to the mean ± SD of three independent experiments. *, **, and *** indicate $p < 0.05$, $p < 0.01$, and $p < 0.001$, respectively, versus control cells.

3.5. Compound 7b combined to imatinib synergistically induces caspase-dependent apoptosis of K-562 cells and reduces the LSC population

The downregulation of BCR-ABL protein expression induced by compound 7b prompted us to evaluate its anticancer effect in combination with imatinib. The effects of imatinib on CML cell viability and proliferation were studied (Supplementary Figure S7), and concentrations inducing death of less than 20% of cells were selected for combination treatments (*i.e.*, 0.25 µM for K-562 and MEG-01 cells, and 2.5 µM for KBM-5 cells) with HDAC6is, 7b and tubacin, at concentrations sufficient to inhibit HDAC6 (Figure 2A, Supplementary Figure S5, Table II).

Analysis of K-562 nuclear morphology (Figure 4A) revealed that the combination of imatinib and 7b triggered significantly more apoptotic cell death at 48 h (85.2%) than each agent alone (imatinib, 15%; 7b, 6.8%). Of note, this combination was also more efficiently killing K-562 cells than an imatinib-tubacin combination (34.4%). Combination effects were synergistic (combination index was 0.2 and 0.95 for imatinib-7b and imatinib-tubacin combinations, respectively). In KBM-5 cells, the combination of imatinib and 7b markedly increased the apoptotic cell death rate triggered by either drug alone: 53.1% cell death *versus* 42.6% and 20.8% for 7b and imatinib, respectively, after 48 h of treatment. Of note, no effect was observed with when combining imatinib and tubacin in KBM-5 cells as the level of apoptosis (15.8%) of the combination was comparable to imatinib alone.

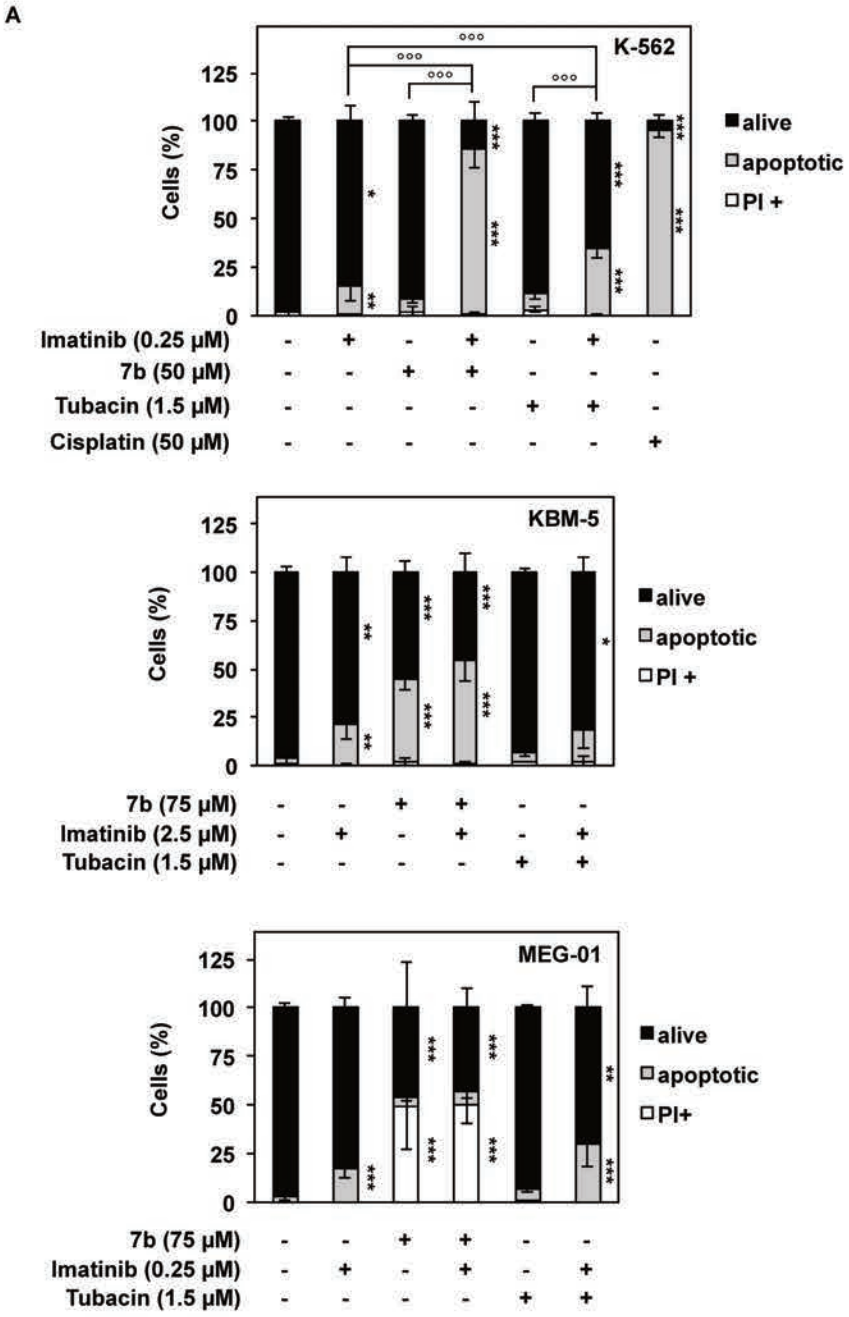


Figure 4: The combination of imatinib and compound 7b synergistically induces caspase-dependent apoptotic cell death in K-562 cells and reduces the LSC population among CML cells.

(A) Evaluation (by nuclear morphological analysis) of the influence of imatinib-HDAC6i combinations on CML cell viability after 48 h of treatment. Cisplatin served as a positive control of apoptosis induction. (B) Analysis of phosphatidylserine exposure in K-562 cells

treated for 48 h with imatinib-HDAC6i combinations. Dot plots are representative of three independent experiments, and the percentage of events in each quadrant is indicated (upper panel). The percentage of annexin V^+ cells (Q2 + Q4) is plotted as bar graphs (lower panel).. (C) Analysis of caspase and PARP-1 cleavage in K-562 cells treated with 0.25 μM imatinib alone or in combination with 50 μM 7b or 1.5 μM tubacin. DMSO (D) was used as solvent control and K-562 and U-937 cells treated with 50 μM cisplatin and 100 μM VP-16, respectively, served as positive controls of apoptosis induction and caspase cleavage. Blots are representative of three independent experiments, with α-tubulin serving as loading control. Images of the original western blots from which figures have been derived are presented in Supplementary Figure S3. Evaluation of (D) caspase activities and (E) nuclear morphology in K-562 cells pretreated for 1 h with 50 μM zVAD and then incubated in the presence of 0.25 μM imatinib alone or in combination with 50 μM 7b or 1.5 μM tubacin for 48 h. Histograms correspond to the mean ± SD of three independent experiments. *, **, and *** indicate $p < 0.05$, $p < 0.01$, and $p < 0.001$, respectively, versus control cells, and °°° denotes $p < 0.001$ (for live and apoptotic cells). (F) An assay of ALDH activity in K-562 cells upon 48 h of exposure to imatinib-HDAC6i combinations. The ALDH inhibitor diethylaminobenzaldehyde (DEAB) was employed to distinguish cell subpopulations with low and high ALDH activity. DMSO (D) was used as solvent control. Dot plots are representative of four independent experiments, and the numbers indicate the percentage of cells with high ALDH activity (upper panel). The percentage of $ALDH^+$ cells (*i.e.*, high ALDH activity) is plotted as a histogram representing the mean ± SD of four independent experiments with * indicating $p < 0.05$ versus control cells (lower panel).

Remarkably, in MEG-01 cells, compound 7b used alone or in combination with imatinib induced mainly necrotic cell death but the combination failed to further increase the cell death rate (50.5%) compared with compound 7b (49%) or imatinib alone (17.8%). Similarly, the

imatinib-tubacin combination failed to further increase the level of apoptotic cell death (29.4%) compared to imatinib alone (Figure 2A). These results were supported by stronger accumulation of K-562 cells exposing phosphatidylserine after imatinib-7b combination treatment (90%) as compared to imatinib-tubacin combination (39.7%) or either compound alone (7b, 37.3%; imatinib, 37.6%; Figure 4B).

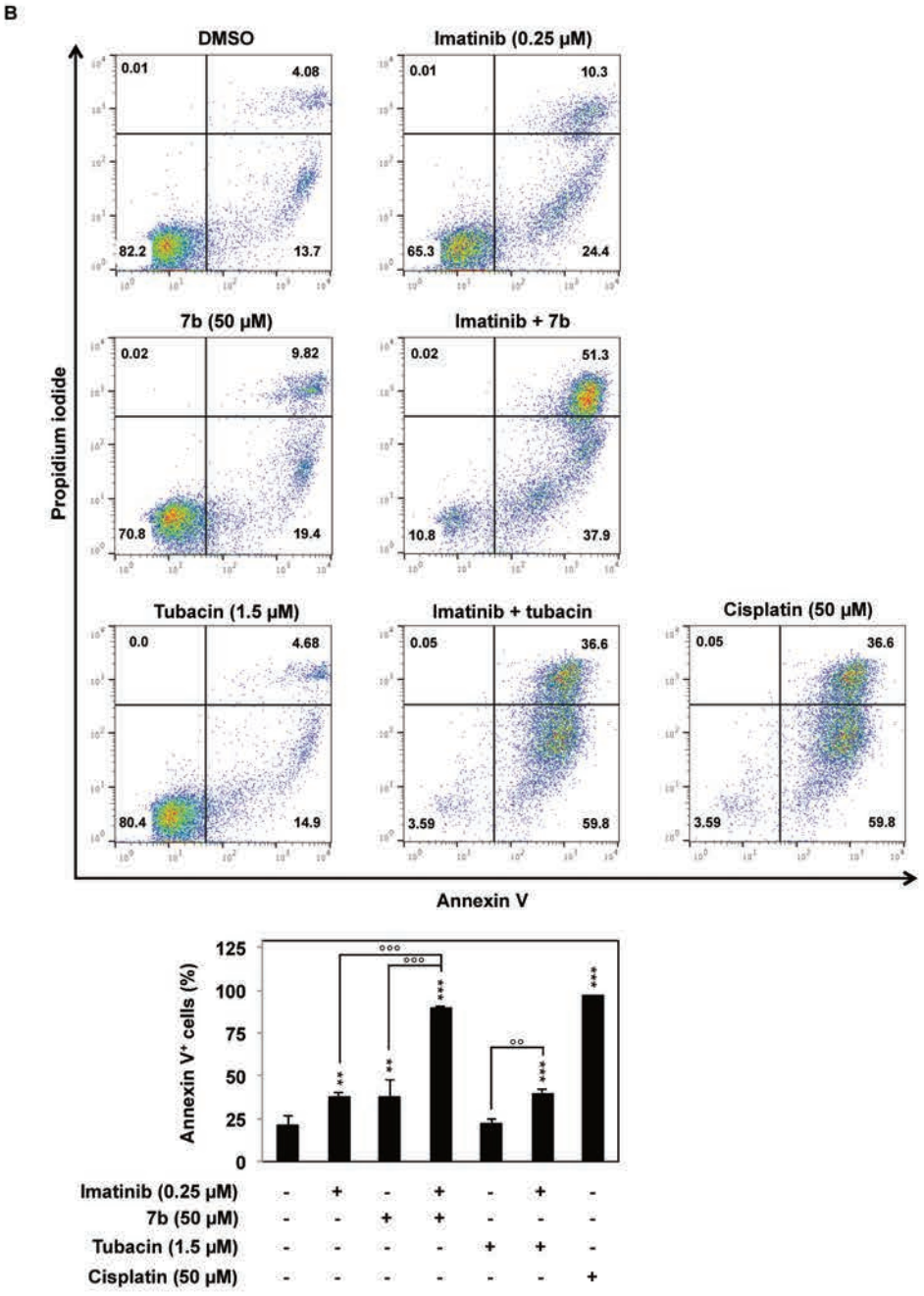


Figure 4 (continued)

Next, we investigated the involvement of caspases in imatinib-7b-induced K-562 apoptotic cell death. Western blot analyses showed that, unlike the combination of imatinib and tubacin, the combination of imatinib and 7b induced the cleavage of pro-caspases 3, 8, and 9, the truncation of BID and eventually the cleavage of PARP-1 (Figure 4C). Collectively, these findings indicate that the imatinib-7b combination induces both the intrinsic and extrinsic apoptotic pathways.

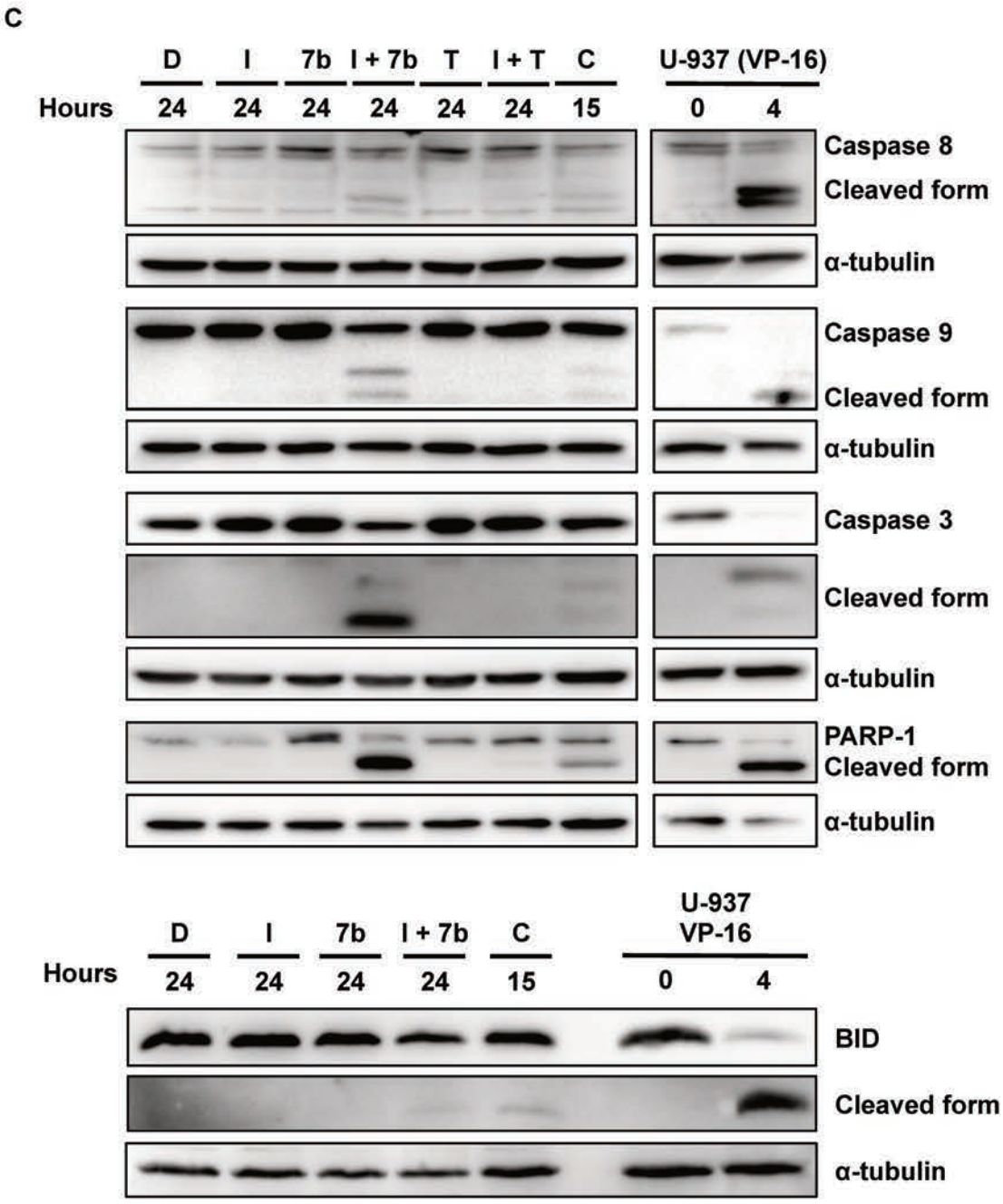


Figure 4 (continued)

These results were confirmed by increased activities of caspases 3/7, 8, and 9 following imatinib-7b treatment, which were abrogated in the presence of the pan-caspase inhibitor zVAD (Figure 4D). Moreover, zVAD completely prevented the apoptotic cell death of K-562 (a reduction from 85% to 0.5% for the imatinib-7b combination and from 48.3% to 7% for the imatinib-tubacin combination; Figure 4E).

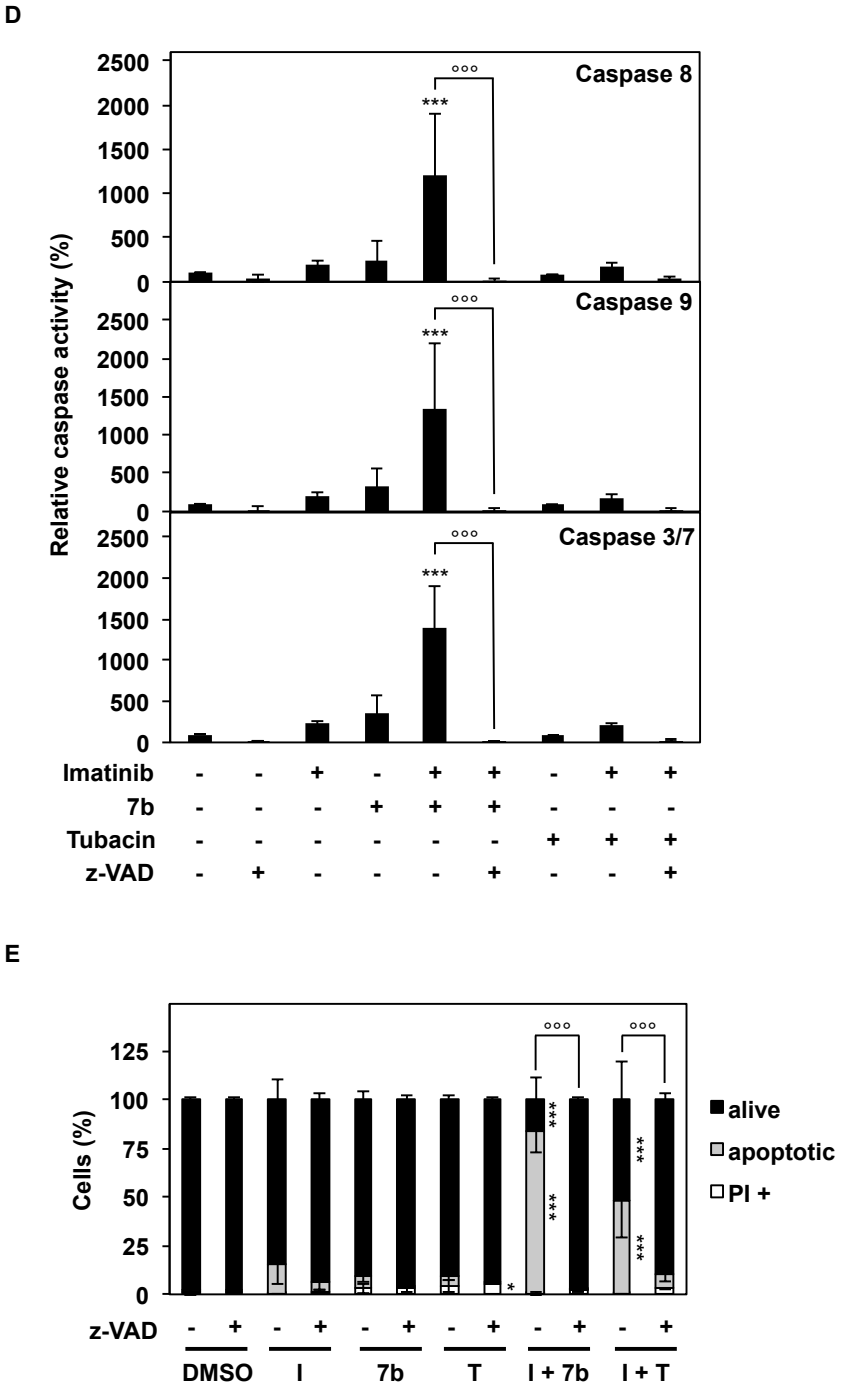


Figure 4 (continued)

Finally, we assessed the impact of imatinib-7b combination on LSC population. Because LSCs are characterized by enhanced ALDH activity [33], we tested the impact of the drug combinations on a K562 cell population with high ALDH activity. Remarkably, imatinib-7b combination was the only tested treatment that specifically diminished the proportion of cells with high ALDH activity (by ~30%) after 24 h of exposure (Figure 4F).

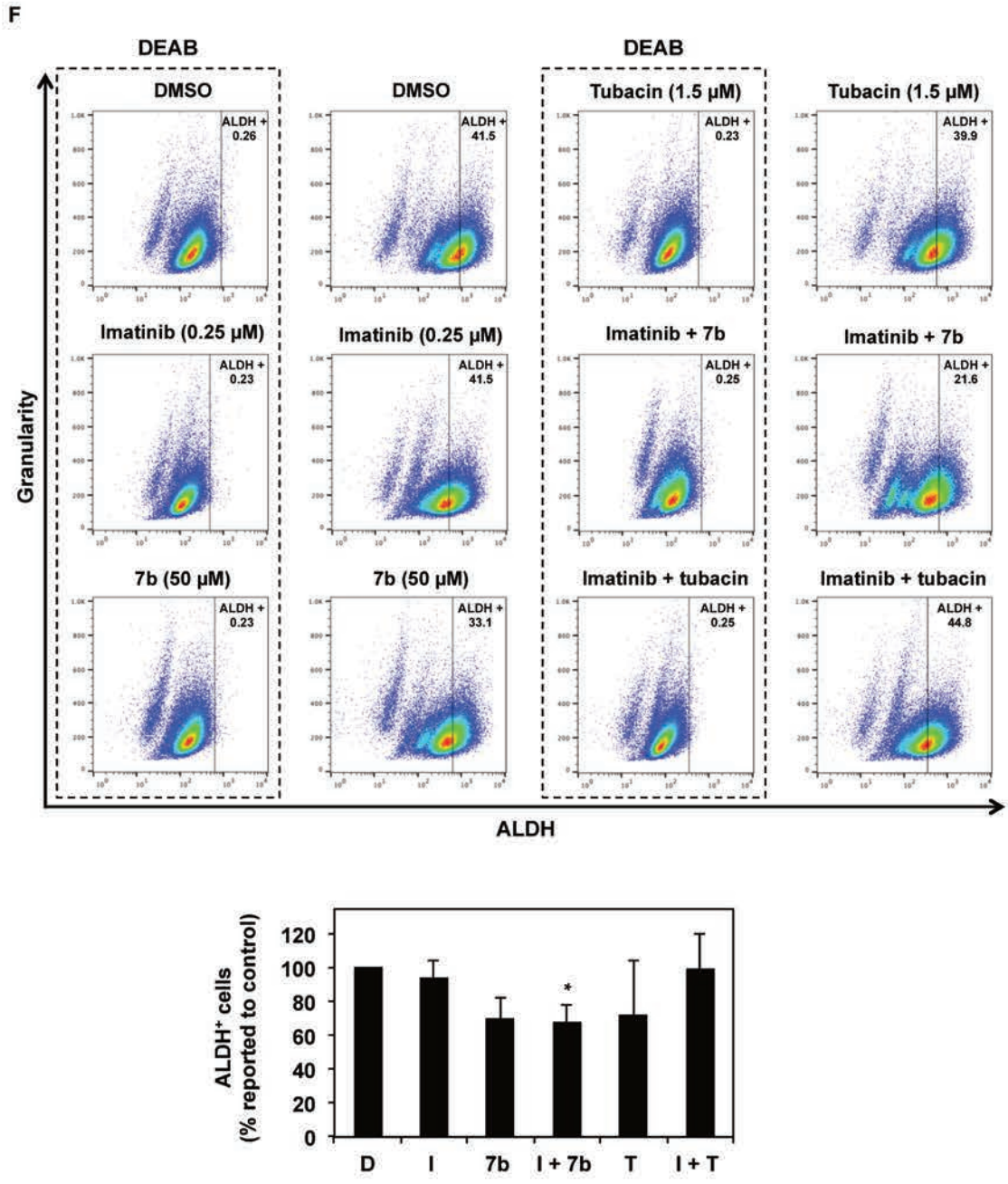


Figure 4 (continued)

3.6. Translational potential of the imatinib-7b combination

We then assessed the impact of the combination of imatinib and 7b on various healthy cell models after 48 h of treatment. Among non-proliferative cells, the imatinib-7b combination only slightly reduced PBMC viability similar than 7b alone. Moreover, the combination did not significantly affect platelet viability. Among proliferative cells, aside from slightly reducing $CD34^+$ cell growth, the imatinib-7b combination did not alter $CD34^+$ cell death or PBMC viability and proliferation (Figure 5A). The selectivity ratio of imatinib-7b combination for K-562 cells compared to non-healthy-cell models revealed that imatinib-7b combination is significantly more selective for K-562 cancer cells compared to healthy cell models (Table IV).

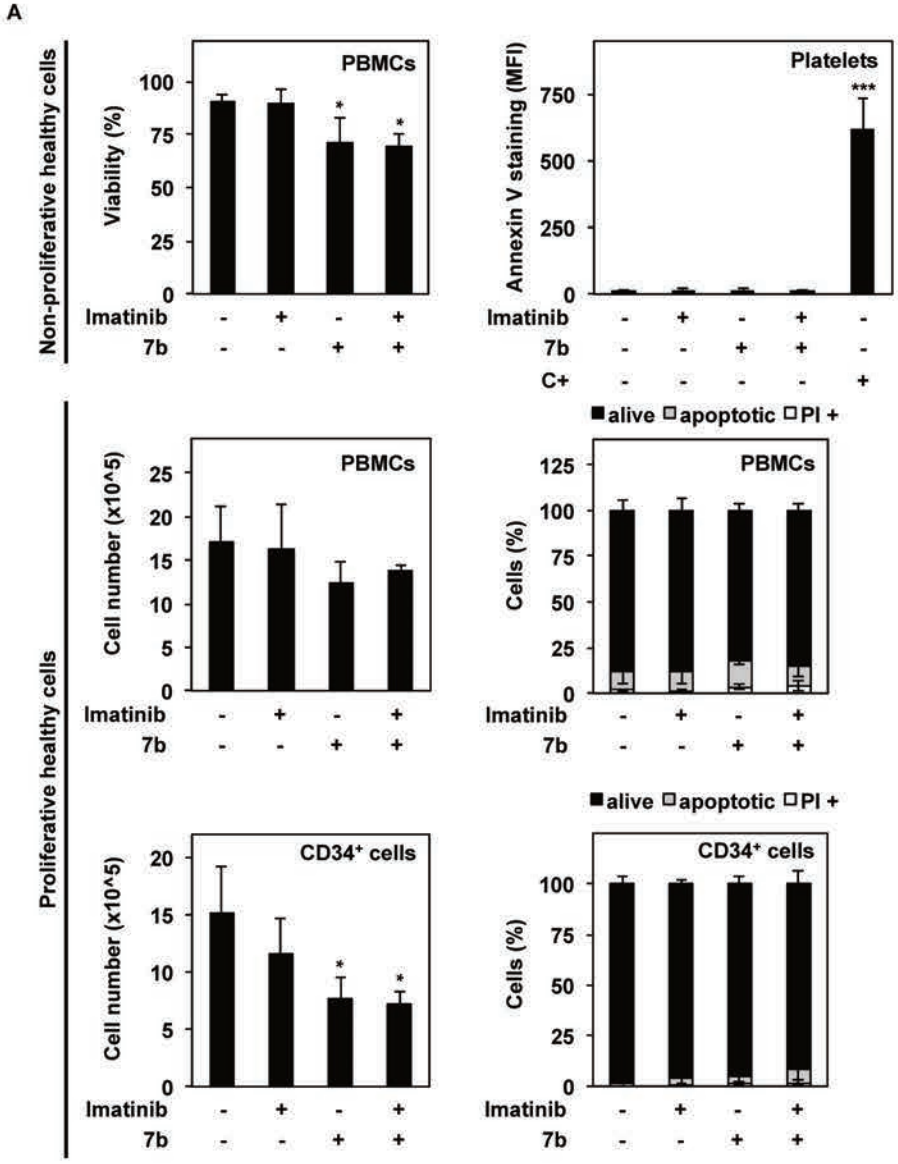


Figure 5: HDAC6i 7b in combination with imatinib presents differential toxicity against CML cells and reduces the CML cell colony-forming potential and tumor growth in xenografted zebrafishes. (A) Assessment of the effects of the imatinib-7b combination on the viability of various non-proliferative and proliferative healthy-cell models after 48 h of treatment. C+: positive control for phosphatidylserine exposure obtained by incubating platelets for 5 minutes with 50% DMSO. Viability was determined by Trypan blue staining of PBMCs, by analysis of phosphatidylserine exposure in platelets, and by nuclear morphological analysis of proliferative PBMCs and $CD34^+$ cells. Histograms correspond to the mean ± SD of three independent experiments. * and *** indicate $p < 0.05$ and $p < 0.001$, respectively. (B) The colony formation assay was performed on K-562 cells treated with 0.075 µM imatinib and 50 µM compound 7b for 10 days (upper panel). The quantification of the number of colonies by well, the well area covered by colonies and the total MTT signal intensity are presented as the mean ± SD of four independent experiments (lower panel). *, **, and *** indicate $p < 0.05$, $p < 0.01$, and $p < 0.001$, respectively, versus control cells. (C) Evaluation of the influence of the imatinib-7b combination on the tumor growth of imatinib-sensitive and resistant K-562 cells in the xenografted-zebrafish model. Zebrafish pictures were taken by fluorescence microscopy (upper panel). ** and *** indicate $p < 0.01$ and $p < 0.001$, respectively (lower panel).

Due to promising anticancer properties of imatinib-7b combination *in vitro*, we then tested the effects of this treatment in a 3D colony formation assay based on K-562 cells. In line with previous results, the combination induced a greater decrease in the number of colonies, well area covered by colonies and total MTT signal intensity as compared to each compound alone (Figure 5B).

B

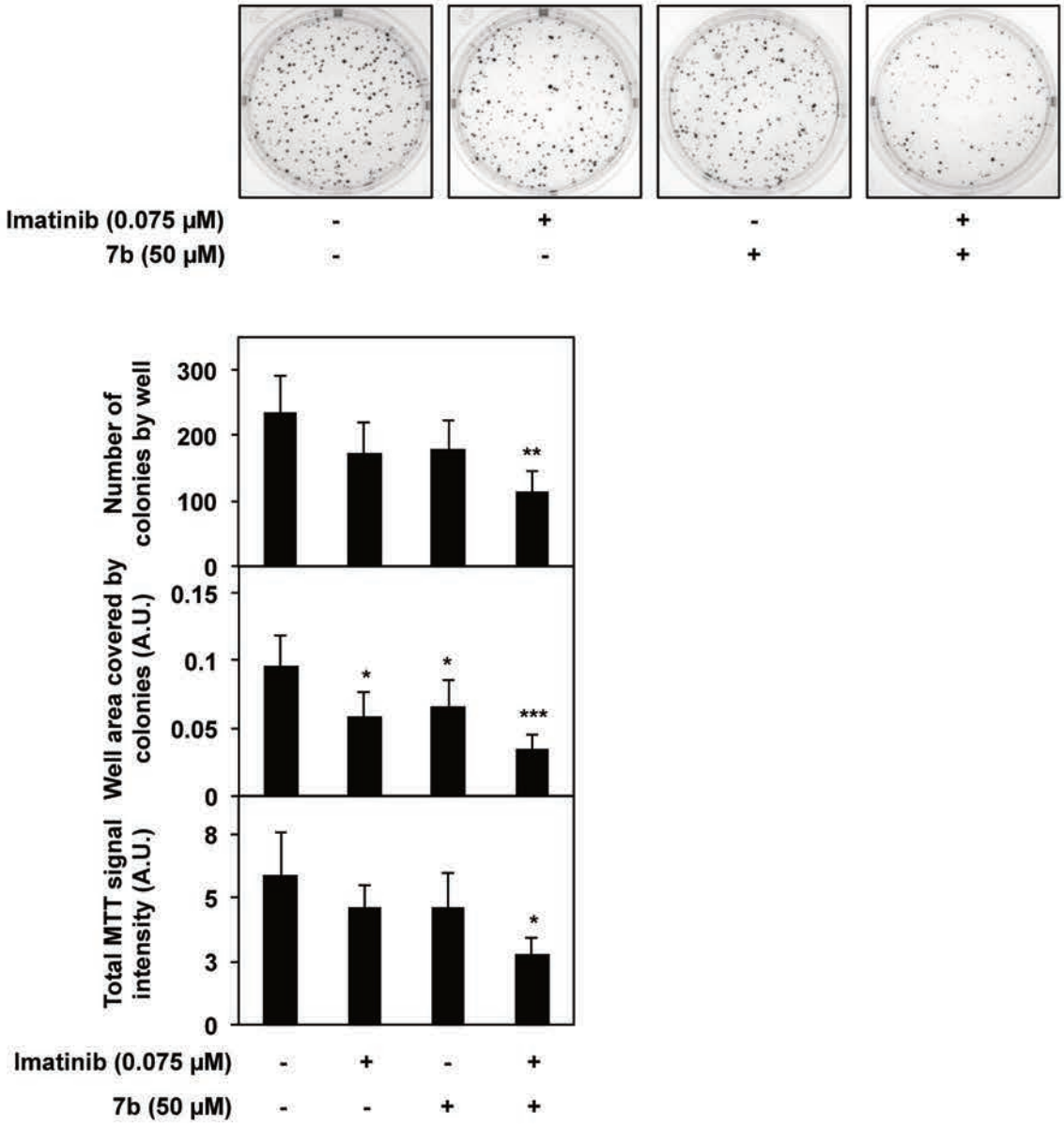


Figure 5 (continued)

We next extended our study to *in vivo* settings and demonstrated that imatinib-7b combination strongly attenuated the tumor formation capacity of K-562 and K-562R cells xenografted into a zebrafish model, whereas exposure to the corresponding single agents failed to significantly reduce tumor formation (Figure 5C).

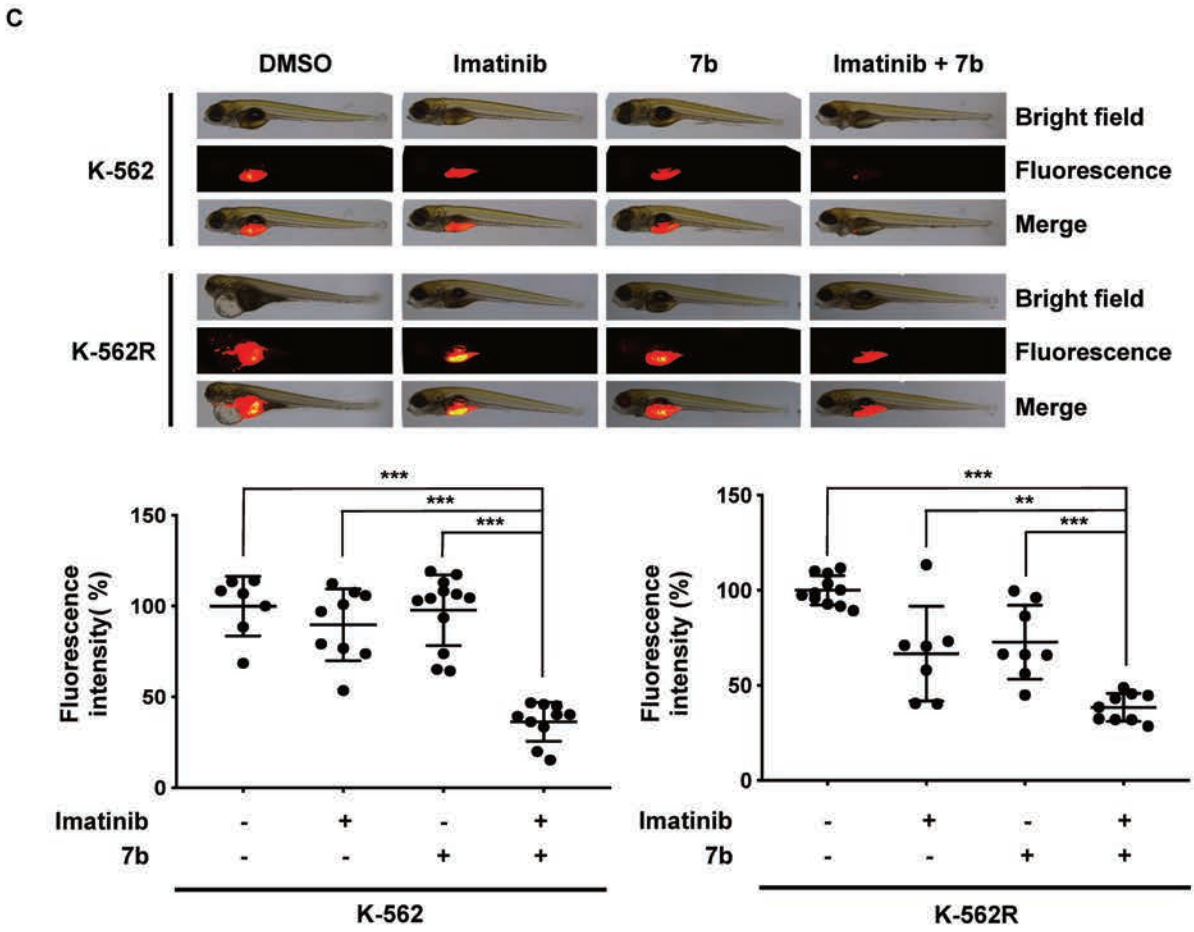
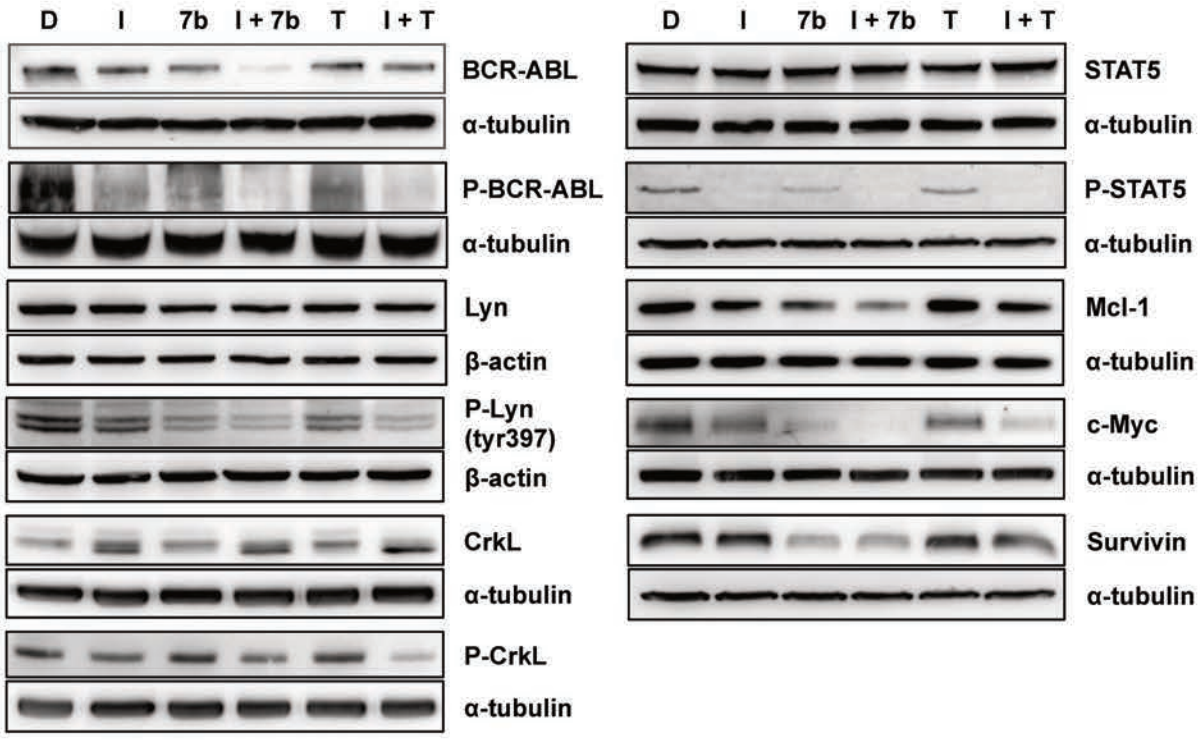


Figure 5 (continued)

3.6. The imatinib-7b combination synergistically inhibits BCR-ABL-related signaling pathways involved in CML cell growth and survival

To get insight into the mechanism of action of the synergy between the TKI and HDAC6is, we next examined the actions of imatinib and compound 7b or tubacin, alone and in combination, on the activation and expression of BCR-ABL and related downstream target proteins involved in cell proliferation and survival. These analyses were performed prior to strong apoptosis induction to avoid changes caused by the cell death process itself. Notably, K-562 cells treated with the imatinib-7b combination for 8 h manifested a stronger decrease in BCR-ABL phosphorylation than the cells exposed to either compound alone, essentially because of strong BCR-ABL downregulation. The imatinib-7b combination yielded a more

striking decrease in the phosphorylation of Lyn, a regulator of BCR-ABL phosphorylation, compared to imatinib-tubacin or either compound alone. Finally, the imatinib-7b combination reduced CrkL phosphorylation. Interestingly, the imatinib-7b combination lowered STAT5 phosphorylation more importantly than the imatinib-tubacin treatment or either compound alone. Imatinib-7b also reduced Mcl-1 expression levels. Finally, imatinib-7b treatment decreased survivin expression as much as 7b alone and reduced c-Myc protein expression more efficiently than imatinib-tubacin or either compound alone (Figure 6).



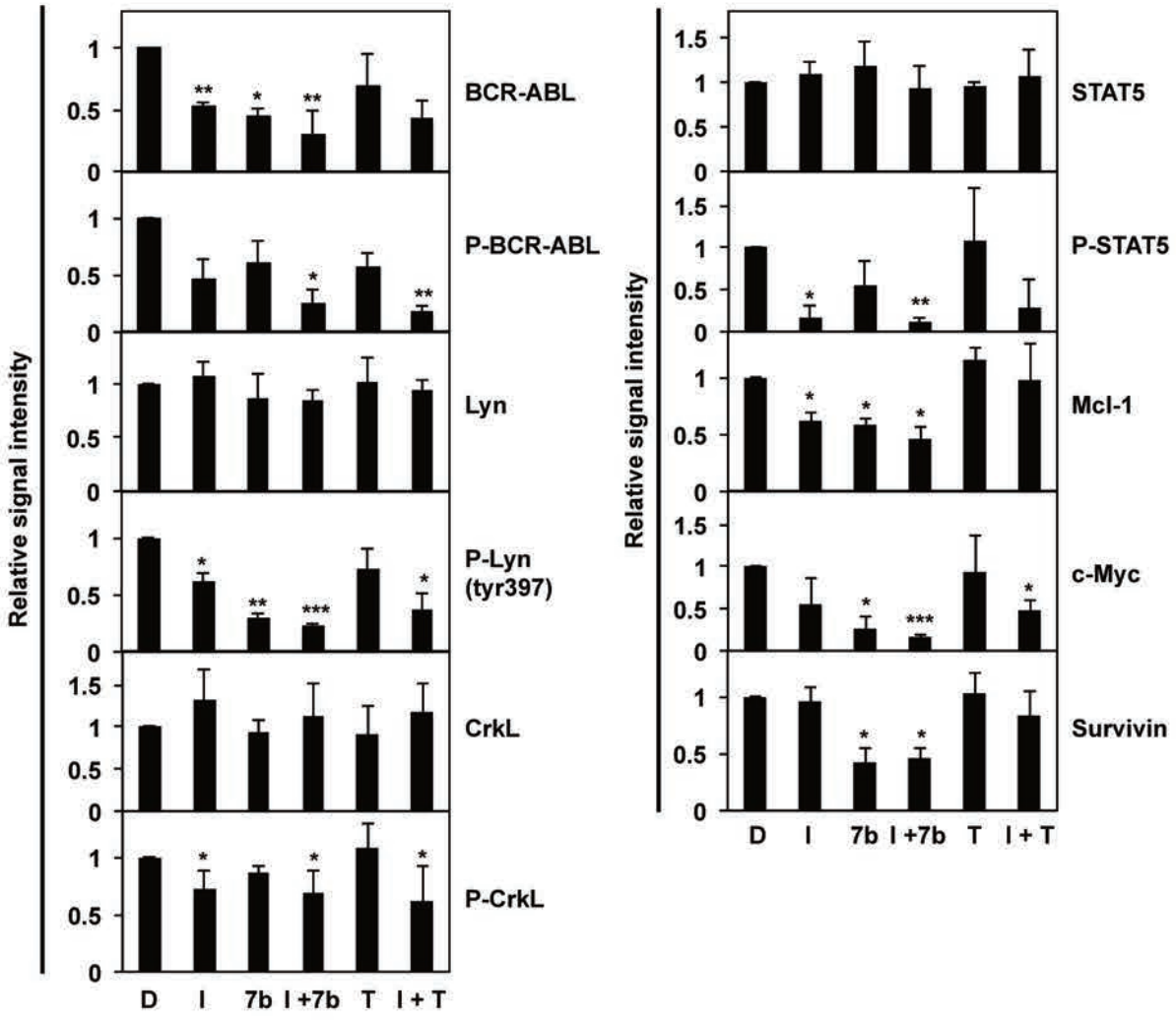


Figure 6: The imatinib-7b combination suppresses BCR-ABL-related signaling pathways in K-562 cells.

Western blot analyses of the impact of imatinib-HDAC6i combinations on BCR-ABL signaling by means of the indicated primary antibodies after 8 h of treatment. DMSO (D) was used as solvent control. Blots are representative of three independent experiments, with β-actin and α-tubulin serving as loading controls (upper panel). Images of the original western blots from which figures have been derived are presented in Supplementary Figure S3. Blot quantifications were performed and data are presented as histograms corresponding to the mean ± SD of the signal obtained from three independent blots. *, **, and *** indicate $p < 0.05$, $p < 0.01$, and $p < 0.001$, respectively, versus control cells (lower panel).

4. Discussion

Despite the major breakthrough of TKIs for the treatment of BCR-ABL$^+$ cancers, CML remains a life-threatening disease; especially for patients in accelerated and blast phases, mainly owing to the emergence of TKI resistance and persistence of CML LSCs [34]. Furthermore, patients treated with high concentrations of TKI experience severe adverse effects [35]. Thus, TKI combination with additional drugs targeting other enzymes seems to be an encouraging strategy to tackle the above-mentioned challenges related to CML treatments. Modifications in the epigenetic landscape represent a cancer hallmark, and dysregulation of HDAC signaling pathways in CML has been documented [10, 36, 37]. Accordingly, multiple pan-HDACis have been tested to enhance the antileukemic activity of TKIs, with encouraging results [38-40]. Nevertheless, increasing evidence points to the toxicity of pan-HDACis in clinical settings, thereby providing a strong scientific rationale for the use of a more selective HDACi. Over the past few years, HDAC6 has emerged as a key pharmacological target for selective inhibition owing to the participation of HDAC6 in multiple cellular processes involved in cancer pathogenesis; this approach might lower the toxicity associated with the off-target effects of pan-HDACis [17].

We previously demonstrated that compound 7b exerts antineoplastic action on prostate cancer cells through selective HDAC6 inhibition, thus leading to HSP90α hyperacetylation and a subsequent reduction in the expression of its client protein: androgen receptor [14]. Since BCR-ABL is another client protein of HSP90α, we hypothesized that HDAC6i 7b would lead to BCR-ABL degradation in CML cells thereby sensitizing them to TKI treatments. Here, we indeed demonstrated that combining compound 7b with imatinib strongly downregulates BCR-ABL signaling, and this combination synergizes in killing CML cells, whereas it has only a minor impact on the tested healthy-cell models.

The robust and fast induction of α-tubulin hyperacetylation without affecting histone H4 acetylation in CML cell lines confirmed the previously reported 7b-mediated HDAC6 inhibition in prostate cancer [14]. Moreover, results tend to demonstrate that 7b could target the second catalytic site of HDAC6. In K-562 cells, compound 7b enhances BCR-ABL ubiquitination followed by its protein degradation, revealing HSP90α hyperacetylation-mediated HDAC6 inhibition, as previously demonstrated in prostate cancer cells, where 7b triggers degradation of another HSP90α client protein: androgen receptor [14]. Indeed, the regulation of BCR-ABL degradation through HSP90α acetylation is well characterized for additional HDACis targeting HDAC6 activity, including LBH589 [41].

Moreover, the decrease in BCR-ABL protein expression induced by compound 7b is more important with imatinib compared to either compound alone, leading to a drastic decrease in BCR-ABL phosphorylation. Accordingly, imatinib-7b combination impairs the expression or phosphorylation of key downstream targets of BCR-ABL signaling involved in cell proliferation and survival that are known to play a critical part in leukemia maintenance. For example, the antiapoptotic Bcl-2 family member Mcl-1 is a downstream target of STAT5 and BCR-ABL, known to be one of the key regulators of LSC self-renewal and consequently performs a critical function in cancer survival and resistance [42]. Therefore, the Mcl-1 downregulation observed after imatinib-7b treatment could partially explain the synergistic apoptotic death triggered in K-562 cells.

Here, we also demonstrated that imatinib and generally TKIs decreased HDAC6 mRNA levels. Although based on only a limited number of data from CML patients data due to a rather restricted amount of public datasets concerning CML patients, these computational analyses are in line with the results from Bamodu *et al.* showing that imatinib lowers HDAC6 expression in $CD34^{+}/CD38^{-}$ K-562 cells after 24 h of treatment [43]. Altogether our results and the data from Bamodu *et al.* showing that HDAC6 is overexpressed in LSCs [43] could explain the

weak decrease of $ALDH^+$ cell proportion observed after imatinib treatment. In this context, the use of an HDAC6i in combination with imatinib is an attractive strategy to target LSCs, which is further supported by the significant decrease of $ALDH^+$ cell proportion obtained after combination treatment.

In addition, it has been demonstrated that the dual targeting of c-Myc and p53 selectively eliminates CML LSCs [44]. Furthermore, considering that the K-562 cell model harbors mutational inactivation of p53 gene [45] and that we observed a drastic c-Myc downregulation after imatinib-7b treatment, altogether these results could explain the reduction in the LSC population after combination treatment.

Concentrations of compound 7b used in this study may seem high in the current context where researchers are working to develop compounds usable at nanomolar concentrations; nevertheless, so far, many approved anticancer drugs are used in the high micromolar range, *e.g.*, hydroxyurea, 5-fluorouracil, and ifosfamide [46]. In addition, compound 7b alone or in combination with imatinib was found to be much more selective against cancer cells compared to healthy-cell models.

It is noteworthy that imatinib-7b combination globally exerts better anticancer effects than imatinib-tubacin combination. Although tubacin is frequently employed as a reference HDAC6i *in vitro* and has a good selectivity *in cellulo* [17], it also features, in addition to tedious synthesis [47], unfavorable drug-likeness properties due to its relatively large size and high lipophilicity. These parameters prevent its clinical use and could partially explain the discrepancies observed between these two HDAC6is.

Surprisingly, both imatinib-HDAC6i combinations fail to trigger any synergistic anticancer effects in two other tested CML cell lines. Although all CML cell lines have been isolated from patients in blast crisis and express the 210-kDa BCR-ABL protein, they express two BCR-ABL transcripts: e14a2 also called b3a2 in K-562 and KBM-5 cells, and e13a2 also

called b2a2 in MEG-01 cells [48]. It has been reported that BCR-ABL transcript type and patients' gender correlate with the molecular response to imatinib among CML patients; in particular, men with b2a2 transcript may need an alternative therapy owing to their less favorable molecular response to imatinib treatment as compared to patients with b3a2 transcript [49]. Furthermore, it was found that patients with b3a2 achieve a higher rate of treatment-free remission [50, 51]. These observations could explain why the combination is not synergistic in MEG-01 cells (from a man) in comparison with K-562 cells (from a woman). However, other studies suggest that there is no prognostic implication of BCR-ABL transcript types [52] or that patients expressing b2a2 have a better response to imatinib than do patients expressing b3a2 [53]. The influence of BCR-ABL transcript type on the response to imatinib treatment stays unclear and needs further research. Regarding KBM-5 cell line, the lower level of HDAC6 expression (Supplementary Figure S2) could explain why imatinib-HDAC6i combinations did not induce effects similar to those observed in K-562 cells. Obviously, further studies are needed to elucidate this finding.

In agreement with *in vitro* results, imatinib-7b combination reduced tumor formation of imatinib-sensitive and -resistant K-562 cell xenografts in zebrafish model. To the best of our knowledge, our study is the first to show the promising anticancer activity of a TKI-HDAC6i combination against CML cells including LSCs and in particular its potential to overcome TKI resistance *in vivo*.

Acknowledgements

ML and DG were supported by a grant from Télévie-Luxembourg. Research at LBMCC was supported by the "Recherche Cancer et Sang" foundation, the "Recherches Scientifiques Luxembourg" association, by the "Een Häerz fir kriibskrank Kanner" association, by the Action LIONS "Vaincre le Cancer" association, and by Télévie Luxembourg. Research at SNU is

supported by National Research Foundation (NRF) [Grant Number 019R1A2C1009231] and by a grant from the MEST of Korea for Tumor Microenvironment Global Core Research Center (GCRC) [Grant Number 2011-0030001]. Support from Brain Korea (BK21) PLUS program and Creative-Pioneering Researchers Program at Seoul National University [Funding number: 370C-20160062] are acknowledged.

Conflict of interest:

The authors declare no conflict of interest.

References

[1] J.F. Apperley, Chronic myeloid leukaemia, Lancet 385(9976) (2015) 1447-59, https://10.1016/S0140-6736(13)62120-0.

[2] Z.J. Kang, Y.F. Liu, L.Z. Xu, Z.J. Long, D. Huang, Y. Yang, B. Liu, J.X. Feng, Y.J. Pan, J.S. Yan, Q. Liu, The Philadelphia chromosome in leukemogenesis, Chinese journal of cancer 35 (2016) 48, https://10.1186/s40880-016-0108-0.

[3] D.L. Longo, Imatinib Changed Everything, N. Engl. J. Med. 376(10) (2017) 982-983, https://10.1056/NEJMe1700833.

[4] D. Bixby, M. Talpaz, Mechanisms of resistance to tyrosine kinase inhibitors in chronic myeloid leukemia and recent therapeutic strategies to overcome resistance, Hematology / the Education Program of the American Society of Hematology. American Society of Hematology. Education Program (2009) 461-76, https://10.1182/asheducation-2009.1.461.

[5] S. Balabanov, M. Braig, T.H. Brummendorf, Current aspects in resistance against tyrosine kinase inhibitors in chronic myelogenous leukemia, Drug discovery today. Technologies 11 (2014) 89-99, https://10.1016/j.ddtec.2014.03.003.

[6] J. Emole, T. Talabi, J. Pinilla-Ibarz, Update on the management of Philadelphia chromosome positive chronic myelogenous leukemia: role of nilotinib, Biologics : targets & therapy 10 (2016) 23-31, https://10.2147/btt.s67844.

[7] D. Keskin, S. Sadri, A.E. Eskazan, Dasatinib for the treatment of chronic myeloid leukemia: patient selection and special considerations, Drug Des. Devel. Ther. 10 (2016) 3355-3361, https://10.2147/dddt.s85050.

[8] Q. Bu, L. Cui, J. Li, X. Du, W. Zou, K. Ding, J. Pan, SAHA and S116836, a novel tyrosine kinase inhibitor, synergistically induce apoptosis in imatinib-resistant chronic myelogenous leukemia cells, Cancer Biol. Ther. 15(7) (2014) 951-62, https://10.4161/cbt.28931.

[9] C. Seidel, C. Florean, M. Schnekenburger, M. Dicato, M. Diederich, Chromatin-modifying agents in anti-cancer therapy, Biochimie 94(11) (2012) 2264-79, https://10.1016/j.biochi.2012.05.012.

[10] M. Schnekenburger, C. Florean, M. Dicato, M. Diederich, Epigenetic alterations as a universal feature of cancer hallmarks and a promising target for personalized treatments, Curr. Top. Med. Chem. 16(7) (2016) 745-76,

[11] H. Losson, M. Schnekenburger, M. Dicato, M. Diederich, Natural Compound Histone Deacetylase Inhibitors (HDACi): Synergy with Inflammatory Signaling Pathway Modulators and Clinical Applications in Cancer, Molecules 21(11) (2016), https://10.3390/molecules21111608.

[12] E. Ceccacci, S. Minucci, Inhibition of histone deacetylases in cancer therapy: lessons from leukaemia, Br. J. Cancer 114(6) (2016) 605-11, https://10.1038/bjc.2016.36.

[13] C. Seidel, M. Schnekenburger, M. Dicato, M. Diederich, Histone deacetylase 6 in health and disease, Epigenomics 7(1) (2015) 103-18, https://10.2217/epi.14.69.

[14] C. Seidel, M. Schnekenburger, A. Mazumder, M.H. Teiten, G. Kirsch, M. Dicato, M. Diederich, 4-Hydroxybenzoic acid derivatives as HDAC6-specific inhibitors modulating microtubular structure and HSP90alpha chaperone activity against prostate cancer, Biochem. Pharmacol. 99 (2016) 31-52, https://10.1016/j.bcp.2015.11.005.

[15] M. Schnekenburger, E. Goffin, J.Y. Lee, J.Y. Jang, A. Mazumder, S. Ji, B. Rogister, N. Bouider, F. Lefranc, W. Miklos, V. Mathieu, P. de Tullio, K.W. Kim, M. Dicato, W. Berger, B.W. Han, R. Kiss, B. Pirotte, M. Diederich, Discovery and Characterization of R/S-N-3-Cyanophenyl-N'-(6-tert-butoxycarbonylamino-3,4-dihydro-2,2-dimethyl-2H-1- benzopyran-4-yl)urea, a New Histone Deacetylase Class III Inhibitor Exerting Antiproliferative Activity against Cancer Cell Lines, J. Med. Chem. 60(11) (2017) 4714-4733, https://10.1021/acs.jmedchem.7b00533.

[16] A. Mazumder, J.Y. Lee, O. Talhi, C. Cerella, S. Chateauvieux, A. Gaigneaux, C.R. Hong, H.J. Kang, Y. Lee, K.W. Kim, D.W. Kim, H.Y. Shin, M. Dicato, K. Bachari, A.M.S. Silva, B. Orlikova-Boyer, M. Diederich, Hydroxycoumarin OT-55 kills CML cells alone or in synergy with imatinib or Synribo: Involvement of ER stress and DAMP release, Cancer Lett. 438 (2018) 197-218, https://10.1016/j.canlet.2018.07.041.

[17] M. Lernoux, M. Schnekenburger, M. Dicato, M. Diederich, Anti-cancer effects of naturally derived compounds targeting histone deacetylase 6-related pathways, Pharmacol. Res. 129 (2018) 337-356, https://10.1016/j.phrs.2017.11.004.

[18] C. Seidel, M. Schnekenburger, M. Dicato, M. Diederich, Antiproliferative and proapoptotic activities of 4-hydroxybenzoic acid-based inhibitors of histone deacetylases, Cancer Lett. 343(1) (2014) 134-46, https://10.1016/j.canlet.2013.09.026.

[19] C. Grandjenette, M. Schnekenburger, F. Morceau, F. Mack, K. Wiechmann, O. Werz, M. Dicato, M. Diederich, Dual induction of mitochondrial apoptosis and senescence in chronic myelogenous leukemia by myrtucommulone A, Anticancer Agents Med. Chem. 15(3) (2015) 363-73,

[20] S.J. Haggarty, K.M. Koeller, J.C. Wong, C.M. Grozinger, S.L. Schreiber, Domain-selective small-molecule inhibitor of histone deacetylase 6 (HDAC6)-mediated tubulin deacetylation, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 100(8) (2003) 4389-94, https://10.1073/pnas.0430973100.

[21] Y. Kawaguchi, J.J. Kovacs, A. McLaurin, J.M. Vance, A. Ito, T.P. Yao, The deacetylase HDAC6 regulates aggresome formation and cell viability in response to misfolded protein stress, Cell 115(6) (2003) 727-38,

[22] M. El Amrani, D. Lai, A. Debbab, A.H. Aly, K. Siems, C. Seidel, M. Schnekenburger, A. Gaigneaux, M. Diederich, D. Feger, W. Lin, P. Proksch, Protein kinase and HDAC inhibitors from the endophytic fungus Epicoccum nigrum, J. Nat. Prod. 77(1) (2014) 49-56, https://10.1021/np4005745.

[23] M.T. Scott, K. Korfi, P. Saffrey, L.E. Hopcroft, R. Kinstrie, F. Pellicano, C. Guenther, P. Gallipoli, M. Cruz, K. Dunn, H.G. Jorgensen, J.E. Cassels, A. Hamilton, A. Crossan, A. Sinclair, T.L. Holyoake, D. Vetrie, Epigenetic Reprogramming Sensitizes CML Stem Cells to Combined EZH2 and Tyrosine Kinase Inhibition, Cancer Discov 6(11) (2016) 1248-1257, https://10.1158/2159-8290.CD-16-0263.

[24] N. Kolesnikov, E. Hastings, M. Keays, O. Melnichuk, Y.A. Tang, E. Williams, M. Dylag, N. Kurbatova, M. Brandizi, T. Burdett, K. Megy, E. Pilicheva, G. Rustici, A. Tikhonov, H. Parkinson, R. Petryszak, U. Sarkans, A. Brazma, ArrayExpress update--simplifying data submissions, Nucleic Acids Res. 43(Database issue) (2015) D1113-6, https://10.1093/nar/gku1057.

[25] B.S. Carvalho, R.A. Irizarry, A framework for oligonucleotide microarray preprocessing, Bioinformatics 26(19) (2010) 2363-7, https://10.1093/bioinformatics/btq431.

[26] M.E. Ritchie, B. Phipson, D. Wu, Y. Hu, C.W. Law, W. Shi, G.K. Smyth, limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies, Nucleic Acids Res. 43(7) (2015) e47, https://10.1093/nar/gkv007.

[27] S.J. Lê, J; Husson, F., FactoMineR: An R Package for Multivariate Analysis, Journal of Statistical Software 25(1) (2008) 1-18,

[28] R Development Core Team, R: A language and environment for statistical computing, R Foundation for Statistical Computing, 2010.

[29] A. Kassambara, ggpubr: 'ggplot2' Based Publication Ready Plots., 2018.

[30] RStudio Team, RStudio: Integrated Development for R, 2015.

[31] N.J. Porter, A. Mahendran, R. Breslow, D.W. Christianson, Unusual zinc-binding mode of HDAC6-selective hydroxamate inhibitors, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 114(51) (2017) 13459-13464, https://10.1073/pnas.1718823114.

[32] N.J. Porter, F.F. Wagner, D.W. Christianson, Entropy as a Driver of Selectivity for Inhibitor Binding to Histone Deacetylase 6, Biochemistry 57(26) (2018) 3916-3924, https://10.1021/acs.biochem.8b00367.

[33] P. Marcato, C.A. Dean, C.A. Giacomantonio, P.W. Lee, Aldehyde dehydrogenase: its role as a cancer stem cell marker comes down to the specific isoform, Cell Cycle 10(9) (2011) 1378-84, https://10.4161/cc.10.9.15486.

[34] S. Flis, T. Chojnacki, Chronic myelogenous leukemia, a still unsolved problem: pitfalls and new therapeutic possibilities, Drug Des. Devel. Ther. 13 (2019) 825-843, https://10.2147/dddt.s191303.

[35] F. Kroschinsky, F. Stolzel, S. von Bonin, G. Beutel, M. Kochanek, M. Kiehl, P. Schellongowski, New drugs, new toxicities: severe side effects of modern targeted and immunotherapy of cancer and their management, Crit. Care 21(1) (2017) 89, https://10.1186/s13054-017-1678-1.

[36] C. Florean, M. Schnekenburger, C. Grandjenette, M. Dicato, M. Diederich, Epigenomics of leukemia: from mechanisms to therapeutic applications, Epigenomics 3(5) (2011) 581-609, https://10.2217/epi.11.73.

[37] S. Koschmieder, D. Vetrie, Epigenetic dysregulation in chronic myeloid leukaemia: A myriad of mechanisms and therapeutic options, Semin. Cancer Biol. 51 (2018) 180-197, https://10.1016/j.semcancer.2017.07.006.

[38] R. Nimmanapalli, L. Fuino, P. Bali, M. Gasparetto, M. Glozak, J. Tao, L. Moscinski, C. Smith, J. Wu, R. Jove, P. Atadja, K. Bhalla, Histone deacetylase inhibitor LAQ824 both lowers expression and promotes proteasomal degradation of Bcr-Abl and induces apoptosis of imatinib mesylate-sensitive or -refractory chronic myelogenous leukemia-blast crisis cells, Cancer Res. 63(16) (2003) 5126-35,

[39] S. Okabe, T. Tauchi, S. Kimura, T. Maekawa, T. Kitahara, Y. Tanaka, K. Ohyashiki, Combining the ABL1 kinase inhibitor ponatinib and the histone deacetylase inhibitor vorinostat: a potential treatment for BCR-ABL-positive leukemia, PLoS One 9(2) (2014) e89080, https://10.1371/journal.pone.0089080.

[40] Y. Matsuda, T. Yamauchi, N. Hosono, K. Uzui, E. Negoro, K. Morinaga, R. Nishi, A. Yoshida, S. Kimura, T. Maekawa, T. Ueda, Combination of panobinostat with ponatinib

synergistically overcomes imatinib-resistant CML cells, Cancer Sci. 107(7) (2016) 1029-38, https://10.1111/cas.12965.

[41] R. Rao, W. Fiskus, Y. Yang, P. Lee, R. Joshi, P. Fernandez, A. Mandawat, P. Atadja, J.E. Bradner, K. Bhalla, HDAC6 inhibition enhances 17-AAG--mediated abrogation of hsp90 chaperone function in human leukemia cells, Blood 112(5) (2008) 1886-93, https://10.1182/blood-2008-03-143644.

[42] A. De Blasio, R. Vento, R. Di Fiore, Mcl-1 targeting could be an intriguing perspective to cure cancer, J. Cell. Physiol. 233(11) (2018) 8482-8498, https://10.1002/jcp.26786.

[43] O.A. Bamodu, K.T. Kuo, L.P. Yuan, W.H. Cheng, W.H. Lee, Y.S. Ho, T.Y. Chao, C.T. Yeh, HDAC inhibitor suppresses proliferation and tumorigenicity of drug-resistant chronic myeloid leukemia stem cells through regulation of hsa-miR-196a targeting BCR/ABL1, Exp. Cell Res. 370(2) (2018) 519-530, https://10.1016/j.yexcr.2018.07.017.

[44] S.A. Abraham, L.E. Hopcroft, E. Carrick, M.E. Drotar, K. Dunn, A.J. Williamson, K. Korfi, P. Baquero, L.E. Park, M.T. Scott, F. Pellicano, A. Pierce, M. Copland, C. Nourse, S.M. Grimmond, D. Vetrie, A.D. Whetton, T.L. Holyoake, Dual targeting of p53 and c-MYC selectively eliminates leukaemic stem cells, Nature 534(7607) (2016) 341-6, https://10.1038/nature18288.

[45] J.C. Law, M.K. Ritke, J.C. Yalowich, G.H. Leder, R.E. Ferrell, Mutational inactivation of the p53 gene in the human erythroid leukemic K562 cell line, Leuk. Res. 17(12) (1993) 1045-50,

[46] D.R. Liston, M. Davis, Clinically Relevant Concentrations of Anticancer Drugs: A Guide for Nonclinical Studies, Clin. Cancer Res. 23(14) (2017) 3489-3498, https://10.1158/1078-0432.ccr-16-3083.

[47] M. Cosenza, S. Pozzi, The Therapeutic Strategy of HDAC6 Inhibitors in Lymphoproliferative Disease, Int. J. Mol. Sci. 19(8) (2018), https://10.3390/ijms19082337.

[48] H.G. Drexler, R.A. MacLeod, C.C. Uphoff, Leukemia cell lines: in vitro models for the study of Philadelphia chromosome-positive leukemia, Leuk. Res. 23(3) (1999) 207-15,

[49] H.X. Lin, J. Sjaarda, J. Dyck, R. Stringer, C. Hillis, M. Harvey, R. Carter, P. Ainsworth, B. Leber, G. Pare, B. Sadikovic, Gender and BCR-ABL transcript type are correlated with molecular response to imatinib treatment in patients with chronic myeloid leukemia, Eur. J. Haematol. 96(4) (2016) 360-6, https://10.1111/ejh.12597.

[50] S. Claudiani, J.F. Apperley, R.P. Gale, R. Clark, R. Szydlo, S. Deplano, R. Palanicawandar, J. Khorashad, L. Foroni, D. Milojkovic, E14a2 BCR-ABL1 transcript is associated with a higher rate of treatment-free remission in individuals with chronic myeloid leukemia after stopping tyrosine kinase inhibitor therapy, Haematologica 102(8) (2017) e297-e299, https://10.3324/haematol.2017.168740.

[51] P. Jain, H. Kantarjian, K.P. Patel, G.N. Gonzalez, R. Luthra, R. Kanagal Shamanna, K. Sasaki, E. Jabbour, C.G. Romo, T.M. Kadia, N. Pemmaraju, N. Daver, G. Borthakur, Z. Estrov, F. Ravandi, S. O'Brien, J. Cortes, Impact of BCR-ABL transcript type on outcome in patients with chronic-phase CML treated with tyrosine kinase inhibitors, Blood 127(10) (2016) 1269-75, https://10.1182/blood-2015-10-674242.

[52] N.A. Azad, Z.A. Shah, A.A. Pandith, M.S. Khan, R. Rasool, J. Rasool, S.A. Aziz, Prognostic Implication of BCR-ABL Fusion Transcript Variants in Chronic Myeloid Leukemia (CML) Treated with Imatinib. A First of Its Kind Study on CML Patients of Kashmir, Asian Pac. J. Cancer Prev. 19(6) (2018) 1479-1485, https://10.22034/apjcp.2018.19.6.1479.

[53] J.A. de Lemos, C.M. de Oliveira, A.C. Scerni, A.Q. Bentes, A.C. Beltrao, I.R. Bentes, T.C. Azevedo, L.M. Maradei-Pereira, Differential molecular response of the transcripts B2A2 and B3A2 to imatinib mesylate in chronic myeloid leukemia, Genet. Mol. Res. 4(4) (2005) 803-11.

Tables

Table I: *In silico* drug-likeness parameters of compound 7b and tubacin.

Method	Parameters	Compounds	
		7b	**Tubacin**
Rule of 5	Molecular mass (Da, ≤500)	432.5	721.9
	Number of atoms (from 20 to 70)	31	52
	Hydrogen bond donors (≤5)	2	4
	Hydrogen bond acceptors (≤10)	8	10
	Octanol-water partition coefficient (log P, ≤ 5)	4.64	7.65
Absorption	Intestinal absorption (≤70%)	93.78	94.43
	Plasma protein binding (≤90%)	91.65	93.6

[$] The theoretical values are indicated in brackets.

Table II: EC_{50} of tubacin toward the acetylated-α-tubulin level in CML cells.

Cell lines	EC_{50} (µM)
K-562	2.5 ± 0.9
KBM-5	1.6 ± 0.4
MEG-01	1.2 ± 0.2

Half-maximal effective concentration (EC_{50}) values were calculated from western-blot quantitative values given in Supplementary Figure 5 and correspond to the mean of three independent experiments. The values were determined in GraphPad Prism 8.0.1 software.

Table III: GI_{50} and LD_{50} of compound 7b and tubacin in CML cells.

Compounds	Time	K-562		KBM-5		MEG-01	
		GI_{50} (μM)	LD_{50} (μM)	GI_{50} (μM)	LD_{50} (μM)	GI_{50} (μM)	LD_{50} (μM)
7b	24 h	26.1 ± 7.5	>100	21.8 ± 11.4	>100	17.7 ±13.4	>100
	48 h	16.3 ± 3.1	90.1 ± 8.6	13 ± 3.3	75.3 ± 6.8	8.4 ± 5.6	96.4 ± 5
	72 h	18.2 ± 2.2	73.3 ± 6.6	19.1 ± 3.2	60.3 ± 6.4	13.7 ± 6	67.2 ± 4.7
Tubacin	24 h	7.6 ± 2.5	33.8 ± 10.6	4.1 ± 1	41 ± 12.4	8.7 ± 4.7	50.6 ± 9.5
	48 h	5.7 ± 0.8	19.6 ± 8	2.6 ± 0.7	16.6 ± 7.2	3.1 ± 1	19.4 ± 1.4
	72 h	5 ± 2.2	17.4 ± 6.1	3.5 ± 1.2	8.9 ± 2.1	4.8 ± 0.6	11.4 ± 1.2

Concentrations inhibiting 50% of cell growth (GI_{50}) and inducing 50% of cell death (LD_{50}) were calculated from the data presented in Figure 3A and Supplementary Figure 6 and correspond to the mean ± SD of three independent experiments. The values were determined with GraphPad Prism 8.0.1 software.

Table IV: The selectivity ratio of the imatinib-7b combination against K-562 cancer cells compared to healthy-cell models.

Healthy-cell models		Selectivity ratio
Non-proliferative	PBMCs	3.7
	Platelets	122.2
Proliferative	PBMCs	20.3
	$CD34^+$ cells	14.3

The selectivity ratio was calculated as follows: the percentage of cell death induced by the imatinib-7b combination in K-562 cells (relative to the control) divided by the percentage of death among healthy cells induced by the imatinib-7b combination (relative to the control).

Supplementary materials

The HDAC6 inhibitor 7b induces BCR-ABL ubiquitination and downregulation and synergizes with imatinib to trigger apoptotis in chronic myeloid leukemia

Hélène Losson[1], Manon Lernoux[1], Jin-Young Lee[2], Aloran Mazumder[2], Déborah Gérard[1], Carole Seidel[1,$], Mario Dicato[1], Gilbert Kirsch[3], Byung Woo Han[2], Michael Schnekenburger[1], Marc Diederich[2,*]

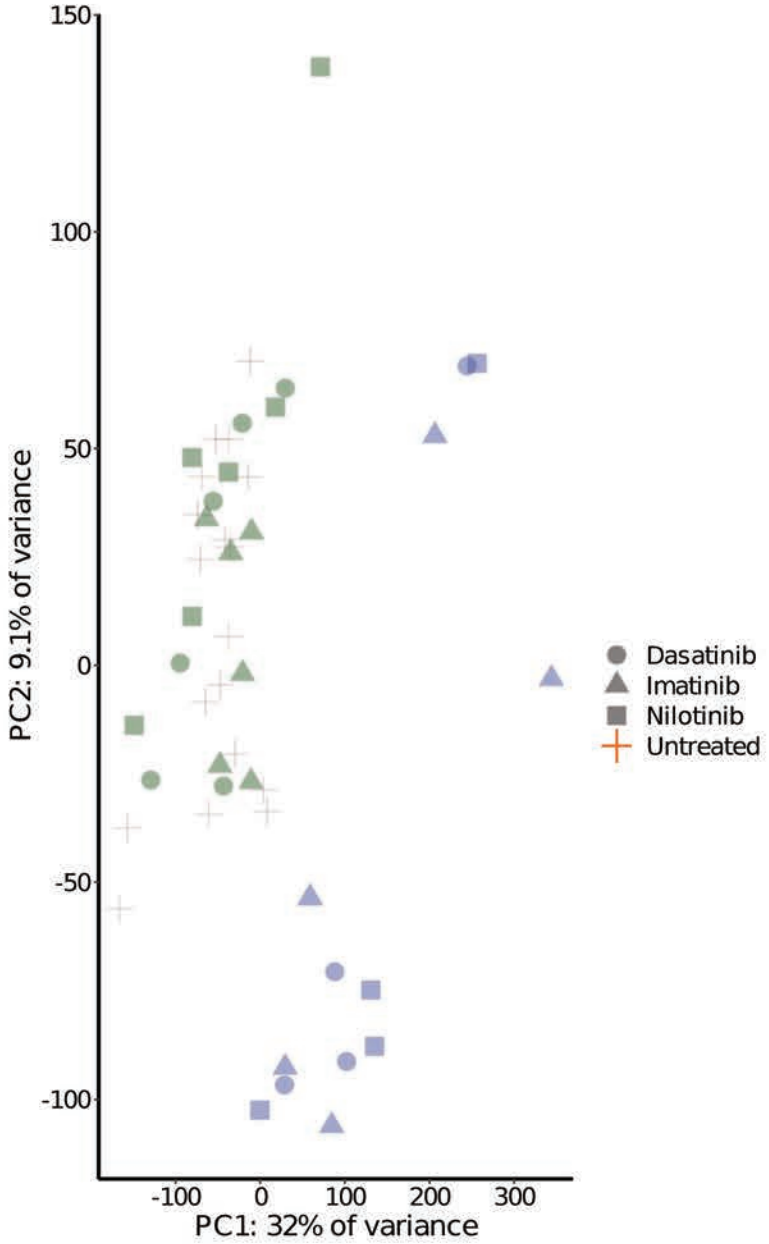


Figure S1: Principal component analysis of the public gene expression microarray dataset E-MTAB-2594.

Crosses, circles, triangles and squares mark untreated and dasatinib (150 nM), imatinib (5 μM) and nilotinib (5 μM)-treated $CD34^+$ $CD38^-$ CML patient cells, respectively, for 8h (green) and 7 days (blue). PC: principal component.

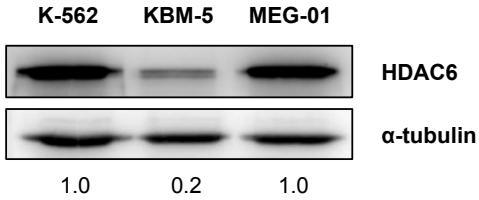


Figure S2: Constitutive HDAC6 protein expression levels in CML cells.

Western Blot analysis of HDAC6 expression in various CML cells. Blots are representative of three independent experiments and quantifications are indicated under blots with values reported to the control and α-tubulin was used as a loading control.

Images of original Western Blots of Figure 1A

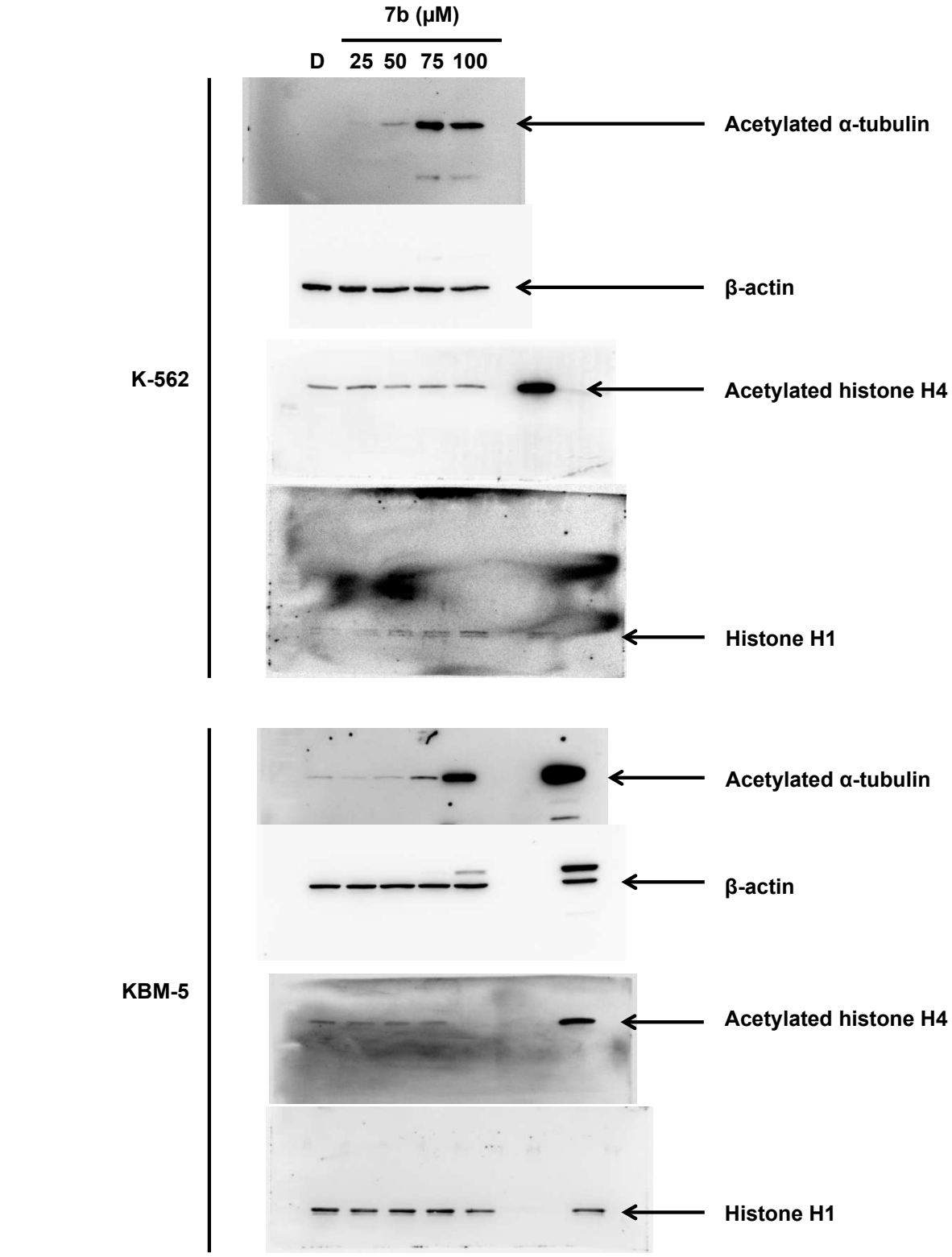


Figure legend on next page

Images of original Western Blots of Figure 1A

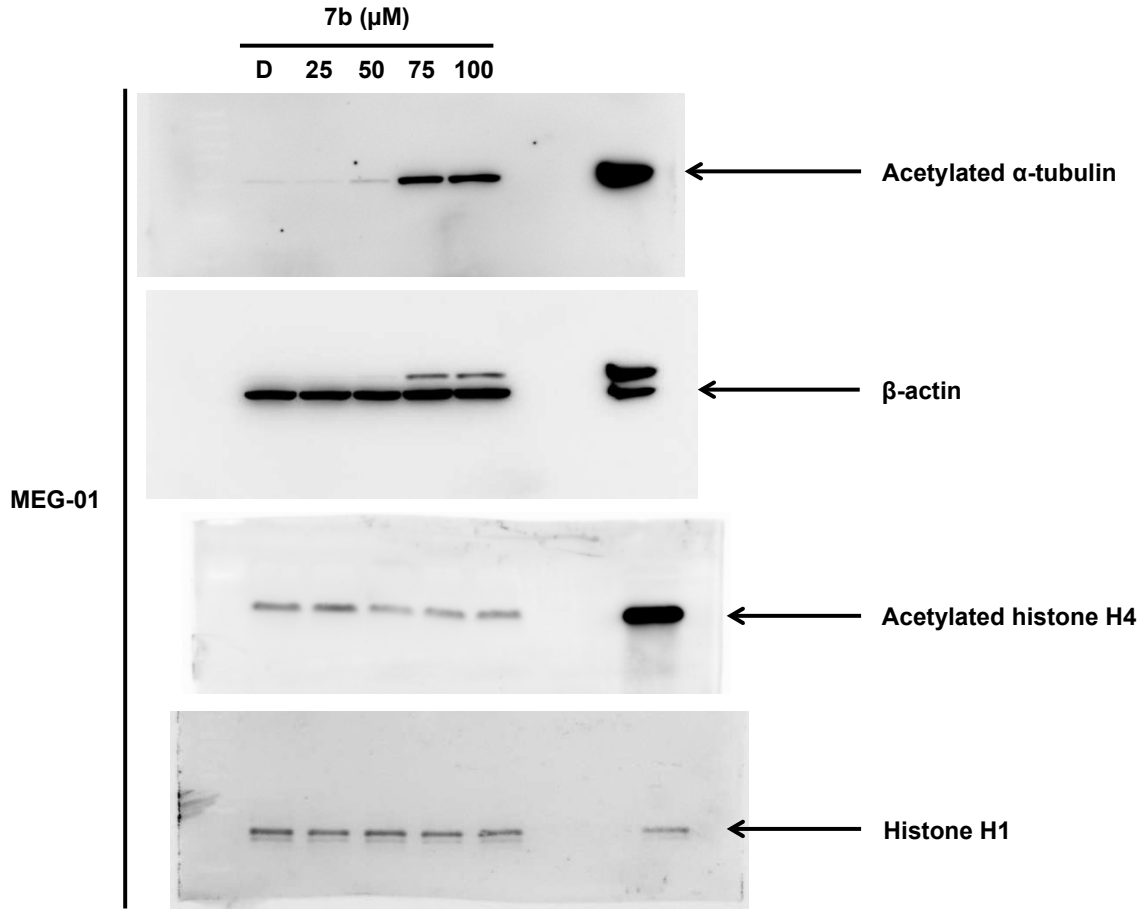


Figure legend on next page

Images of original Western Blots of Figure 1B

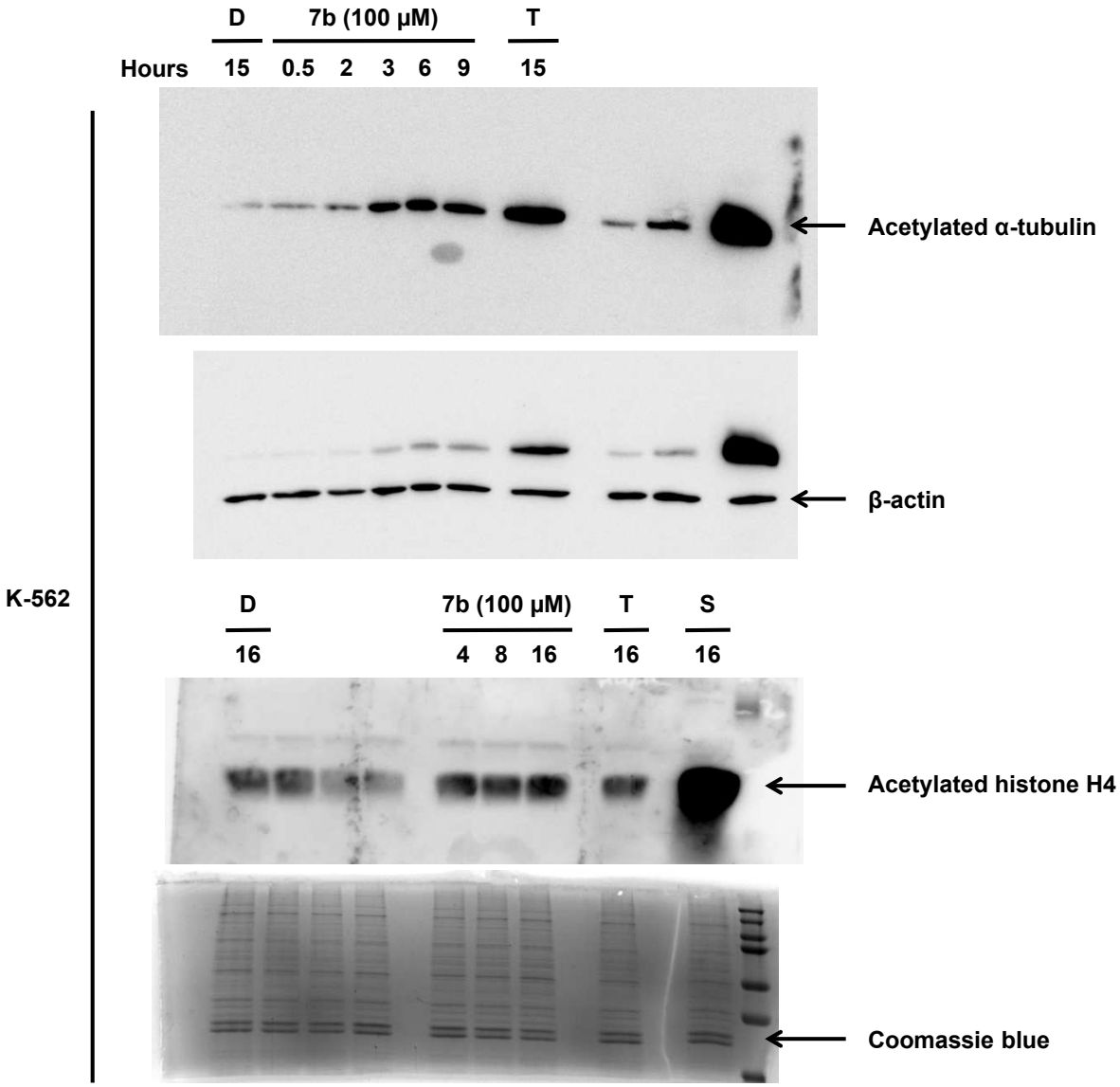


Figure legend on next page

Images of original Western Blots of Figure 1B

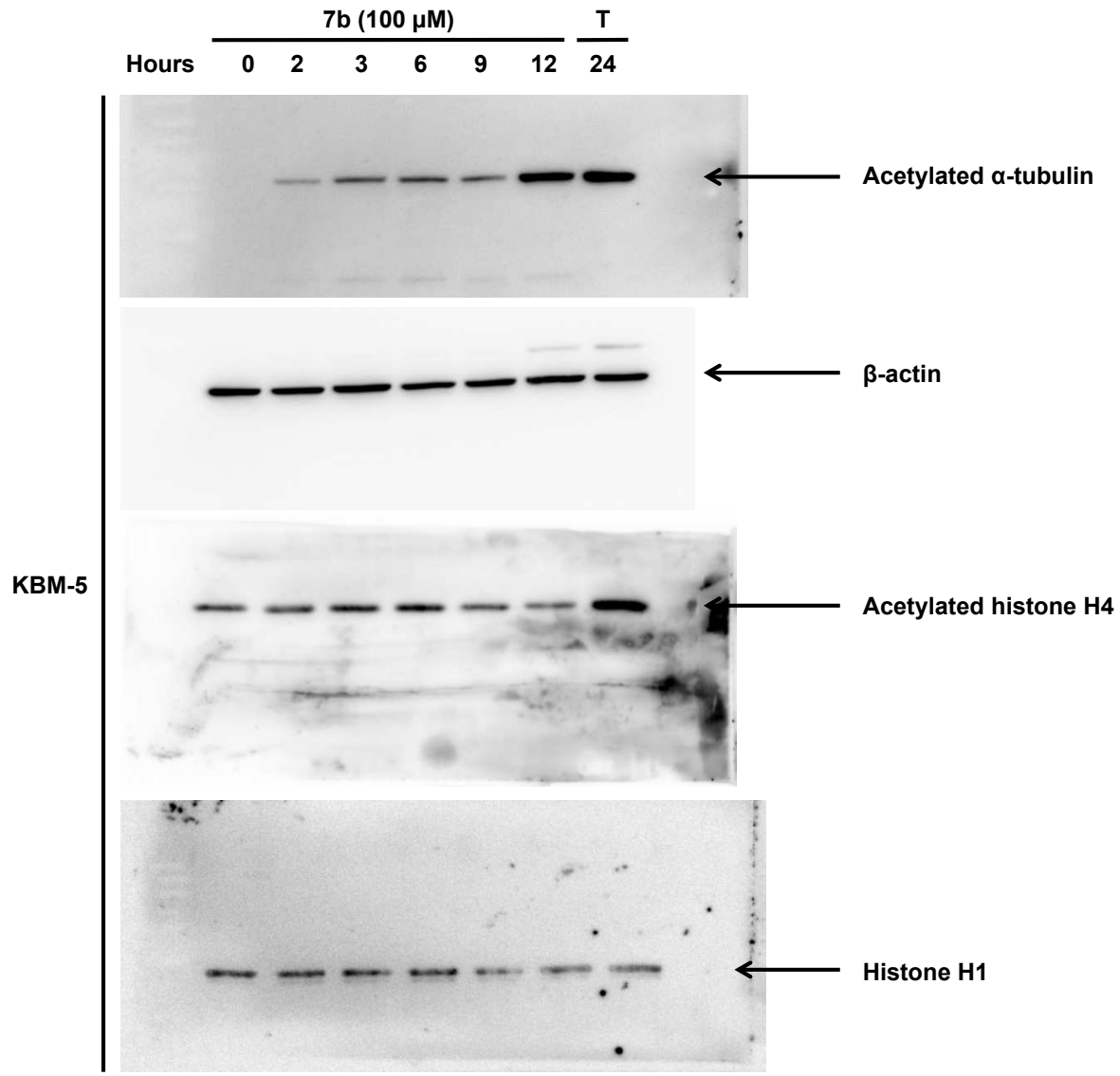


Figure legend on next page

Images of original Western Blots of Figure 1B

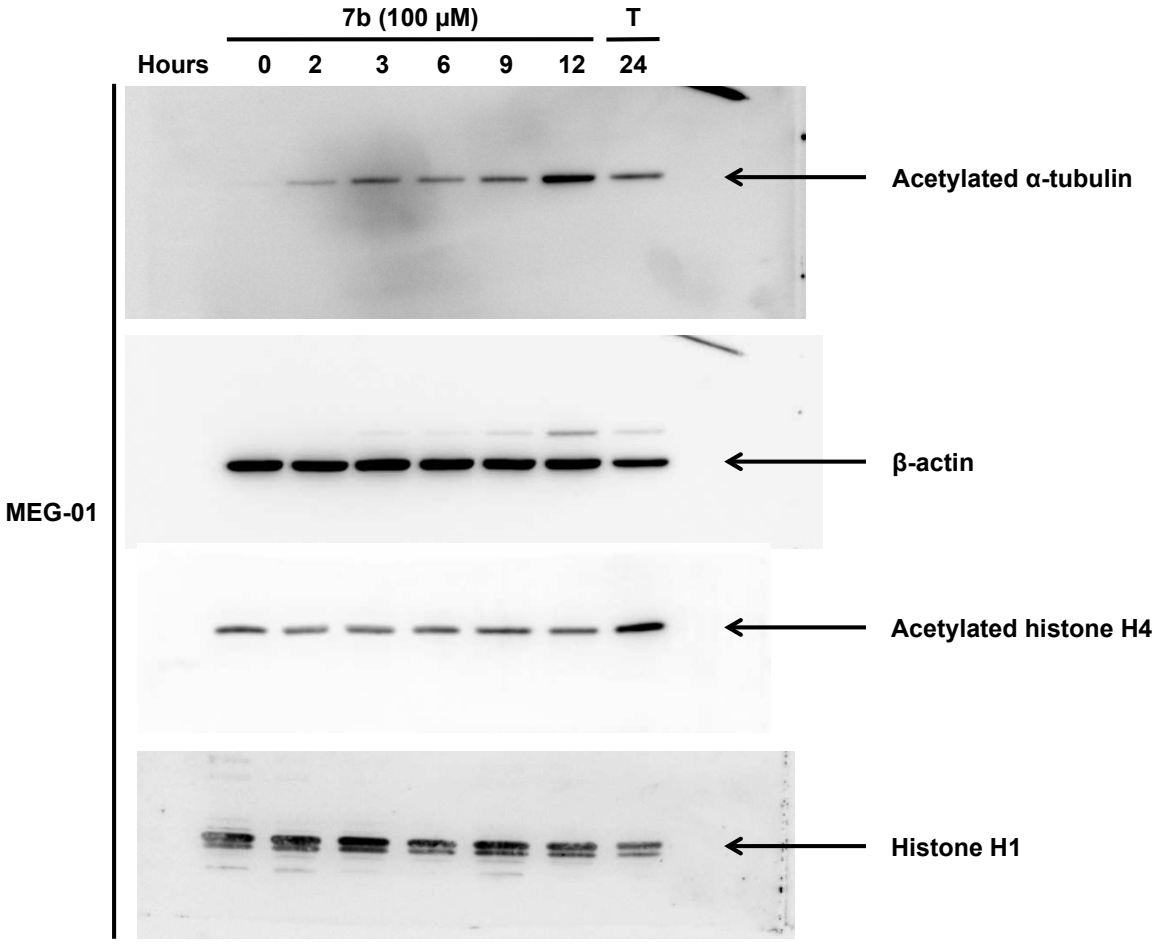


Figure legend on next page

Images of original Western Blots of Figure 1C

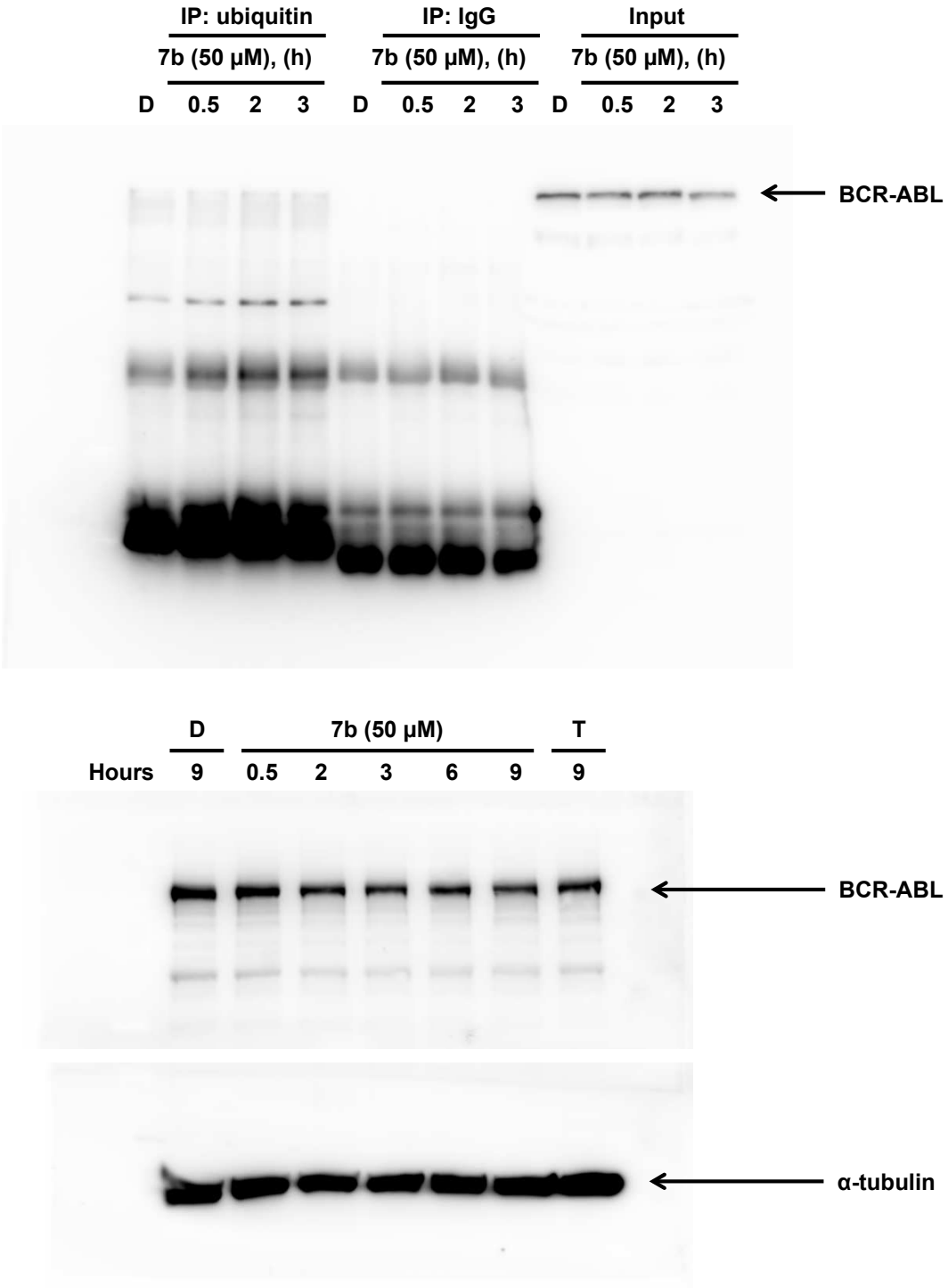


Figure legend on next page

Images of original Western Blots of Figure 1D

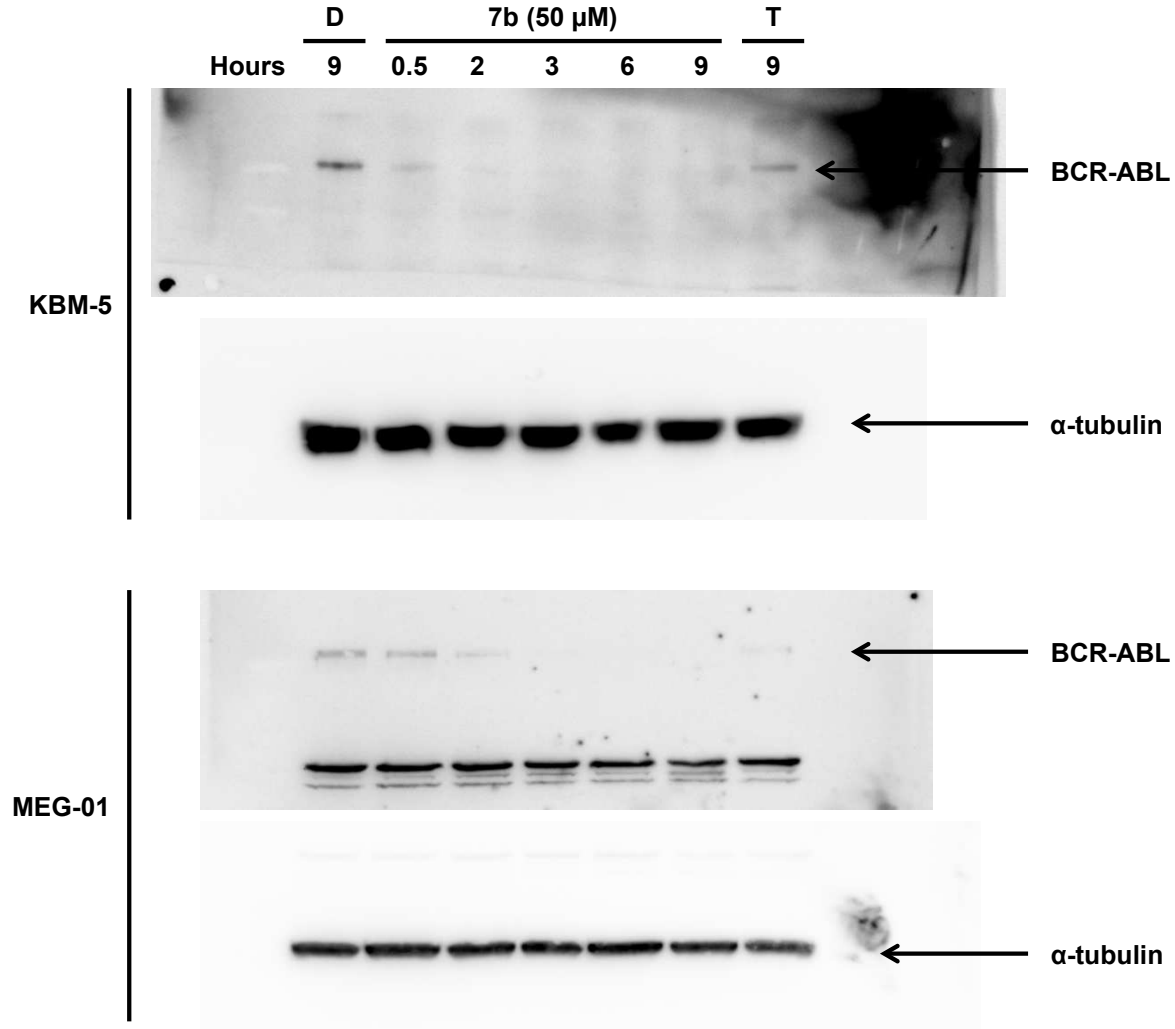


Figure legend on next page

Images of original Western Blots of Figure 3A

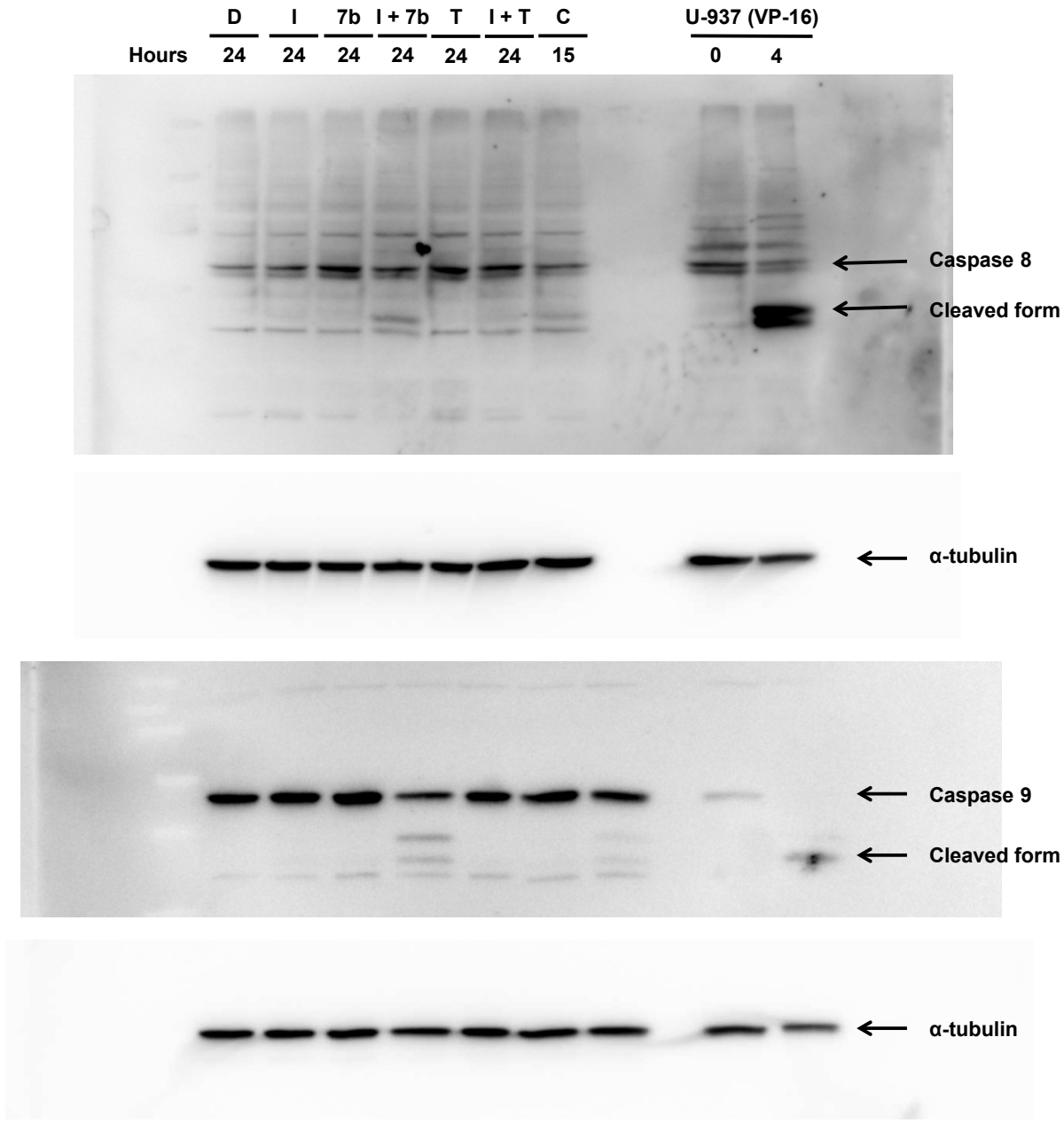


Figure legend on next page

Images of original Western Blots of Figure 3A

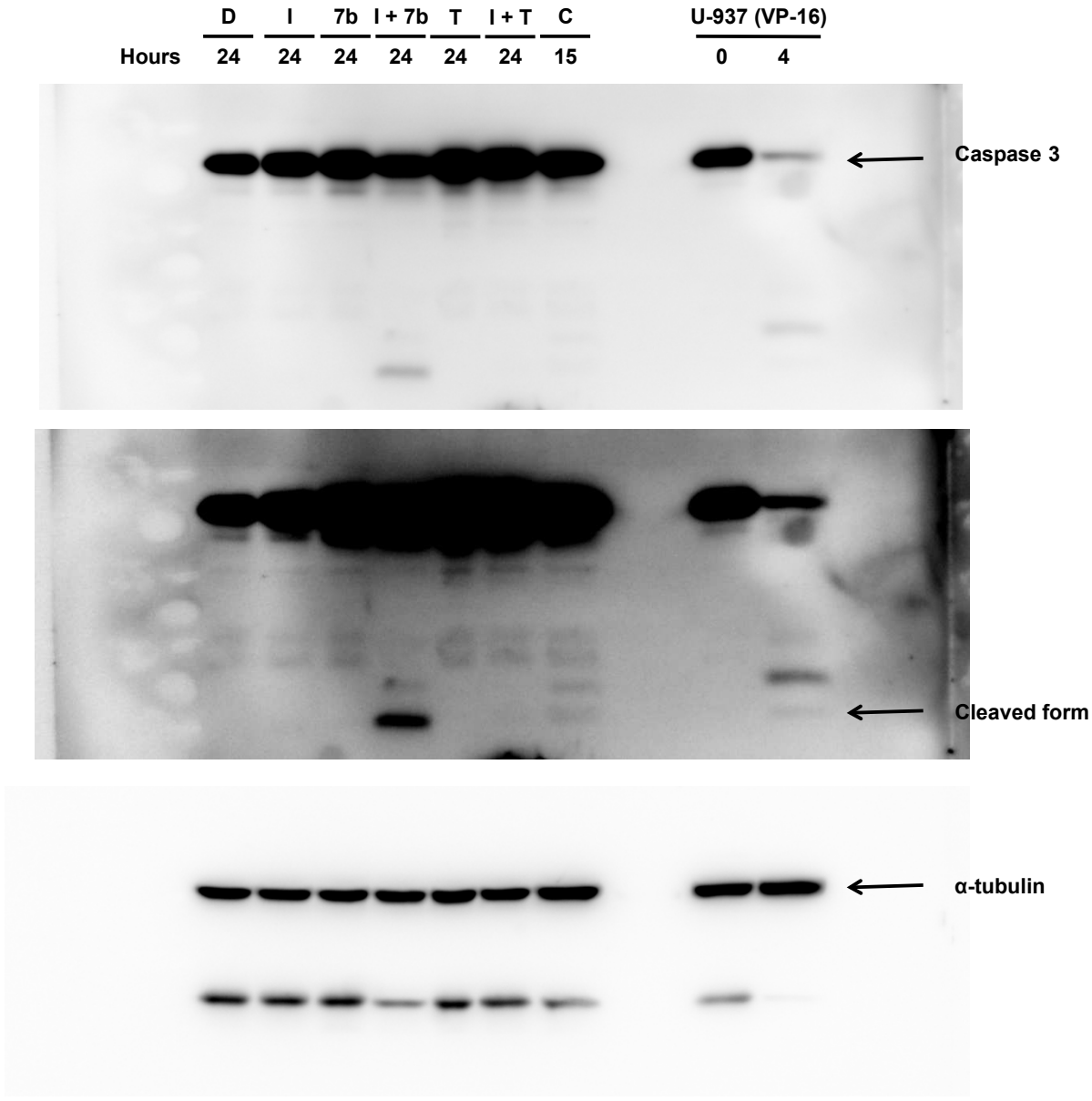


Figure legend on next page

Images of original Western Blots of Figure 3A

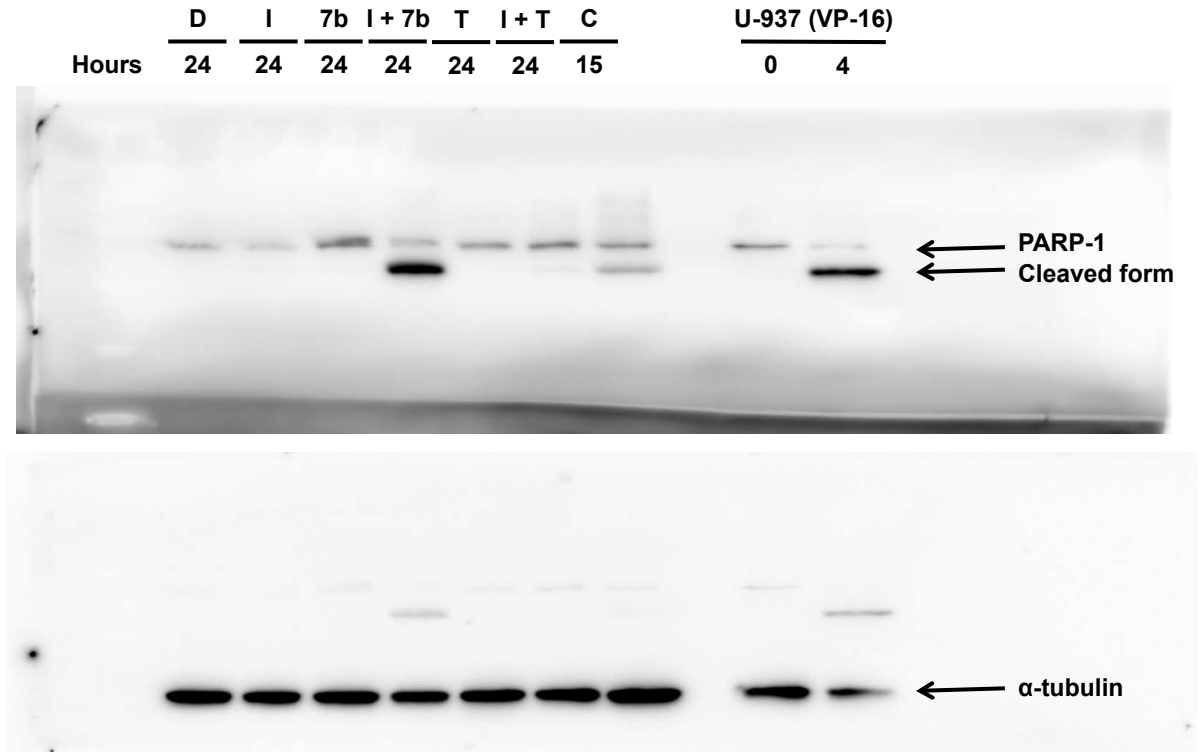


Figure legend on next page

Images of original Western Blots of Figure 3A

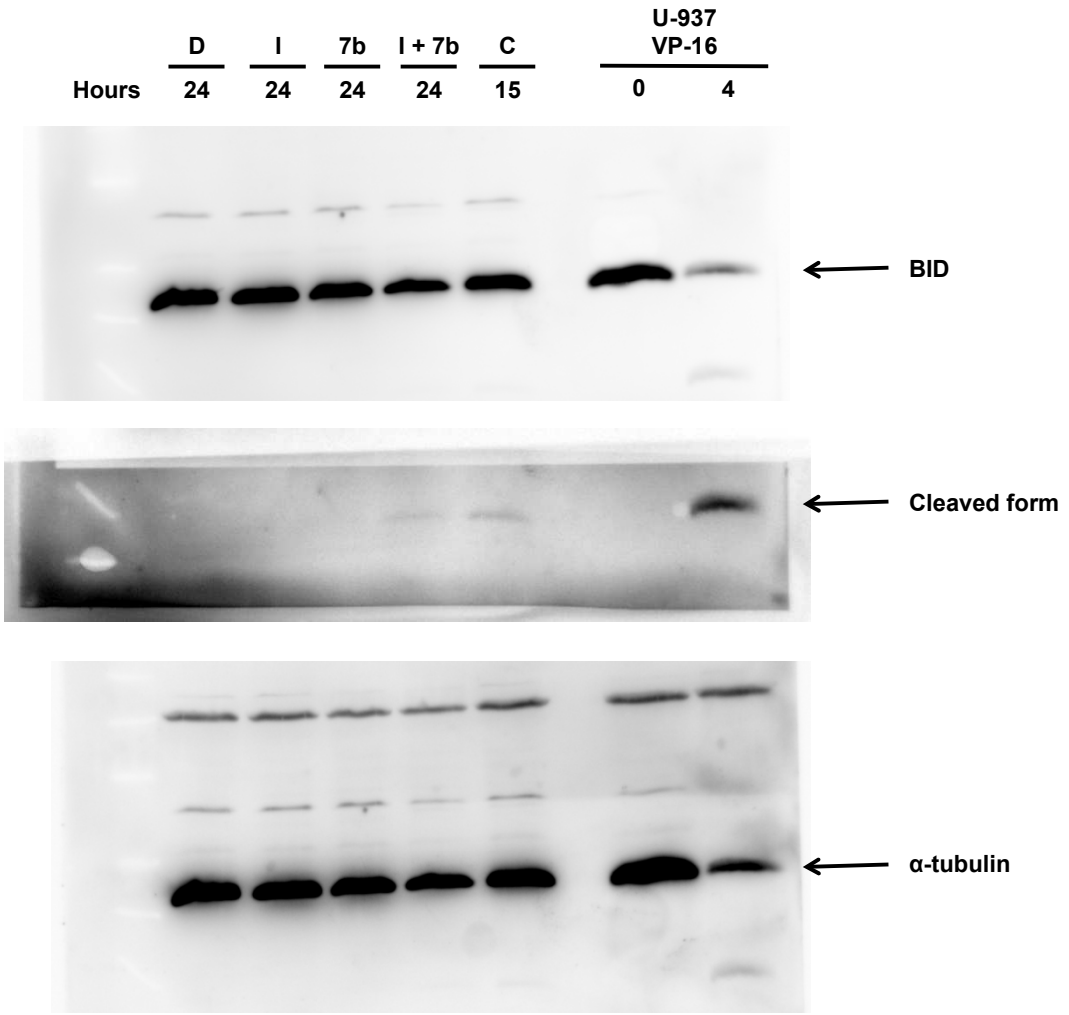


Figure legend on next page

Images of original Western Blots of Figure 4

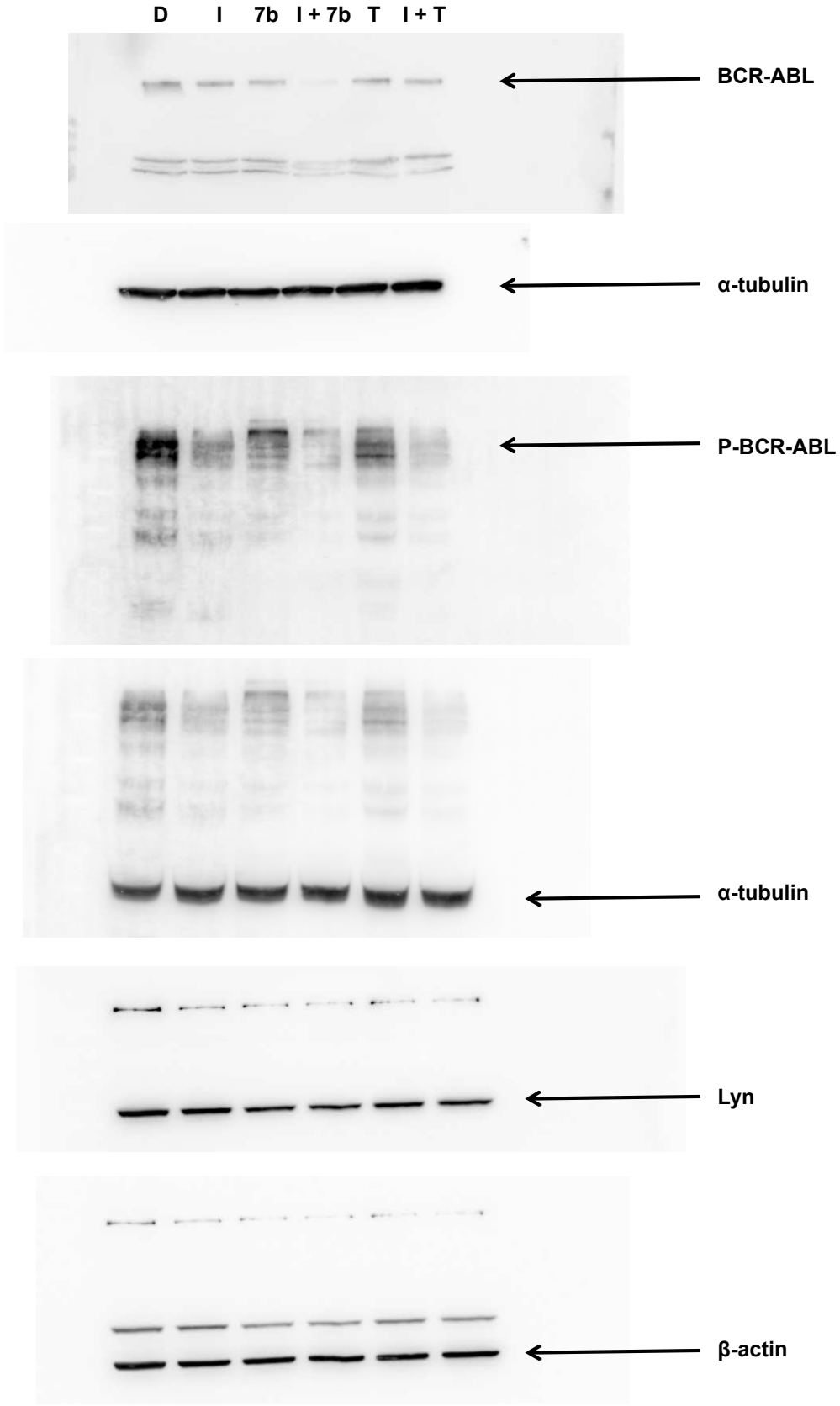


Figure legend on next page

Images of original Western Blots of Figure 4

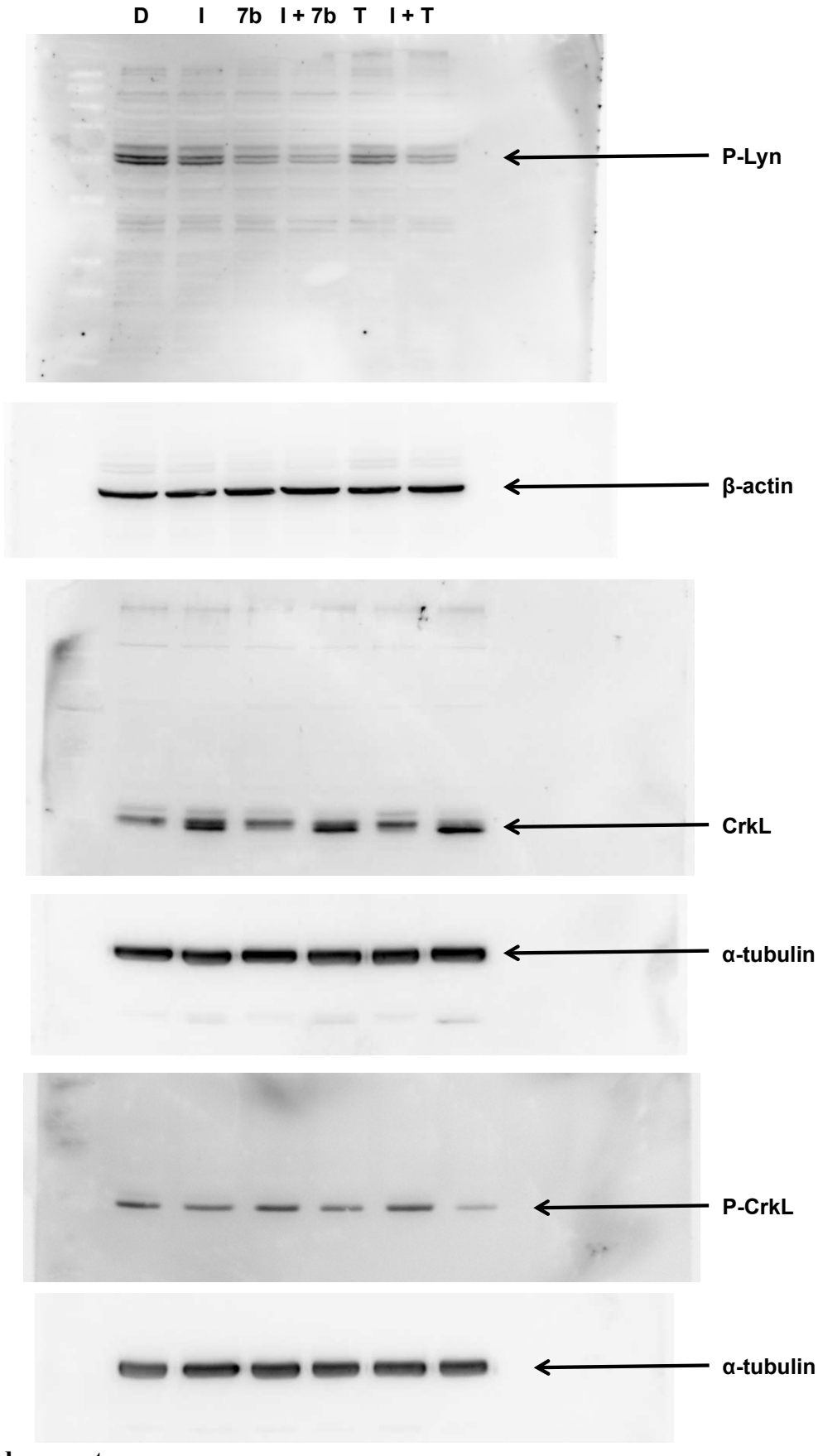


Figure legend on next page

Images of original Western Blots of Figure 4

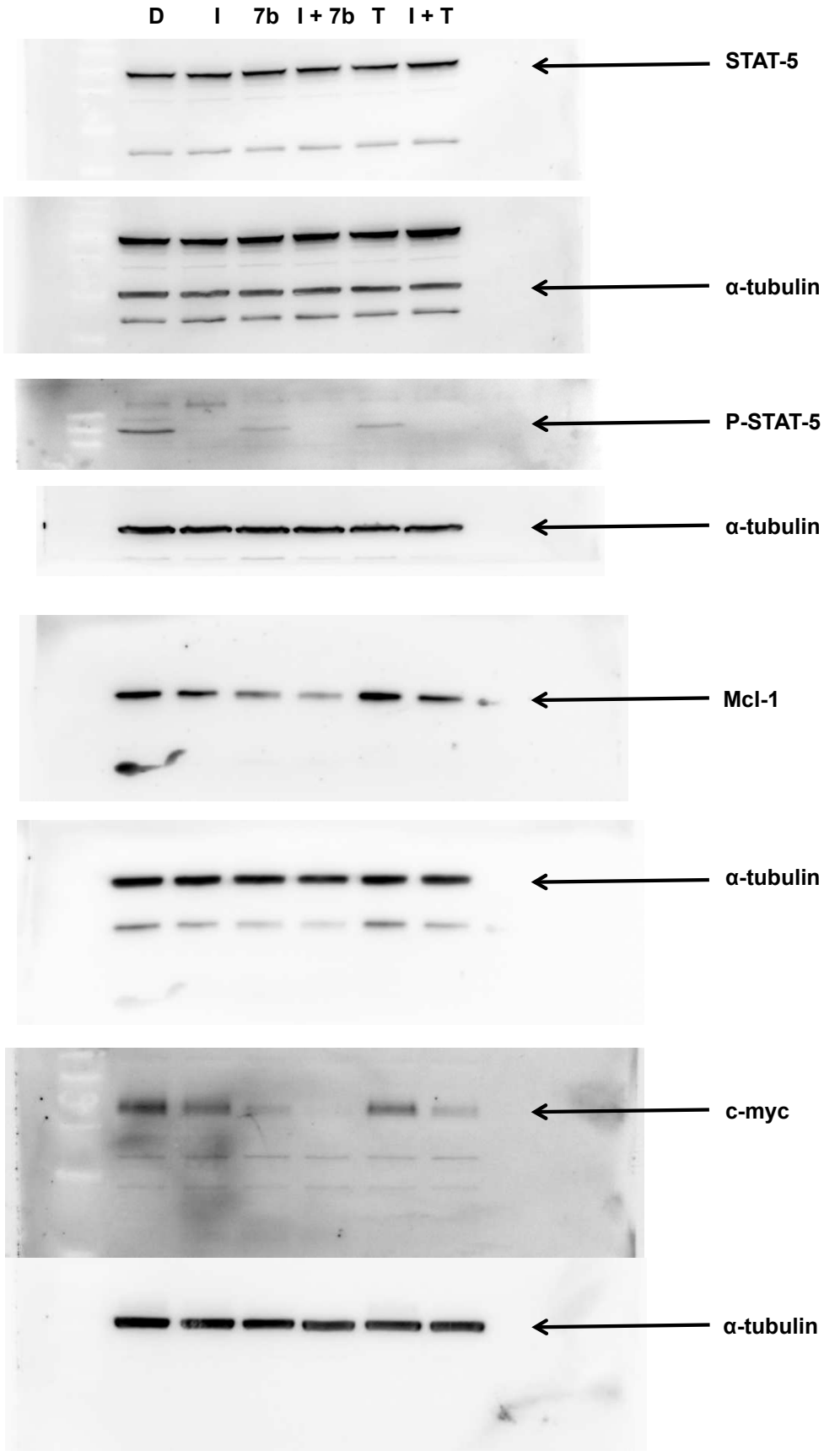


Figure legend on next page

Images of original Western Blots of Figure 4

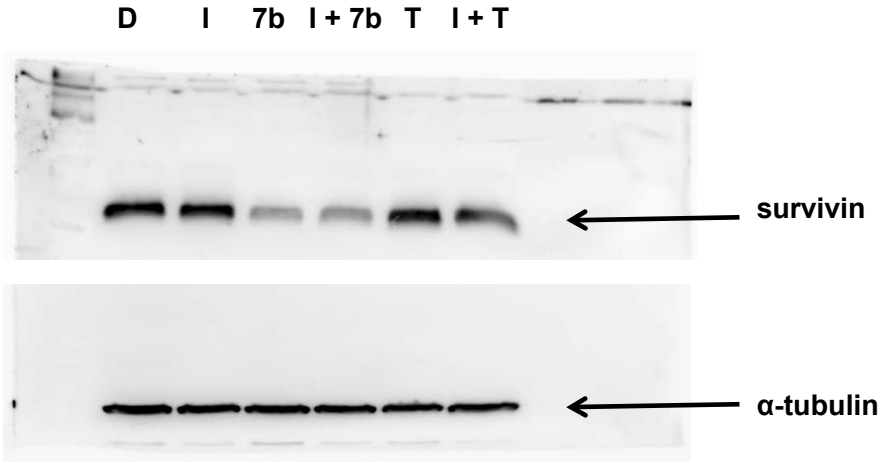


Figure S3: Images of original Western Blots presented in Figures.

An arrow indicates each protein of interest.

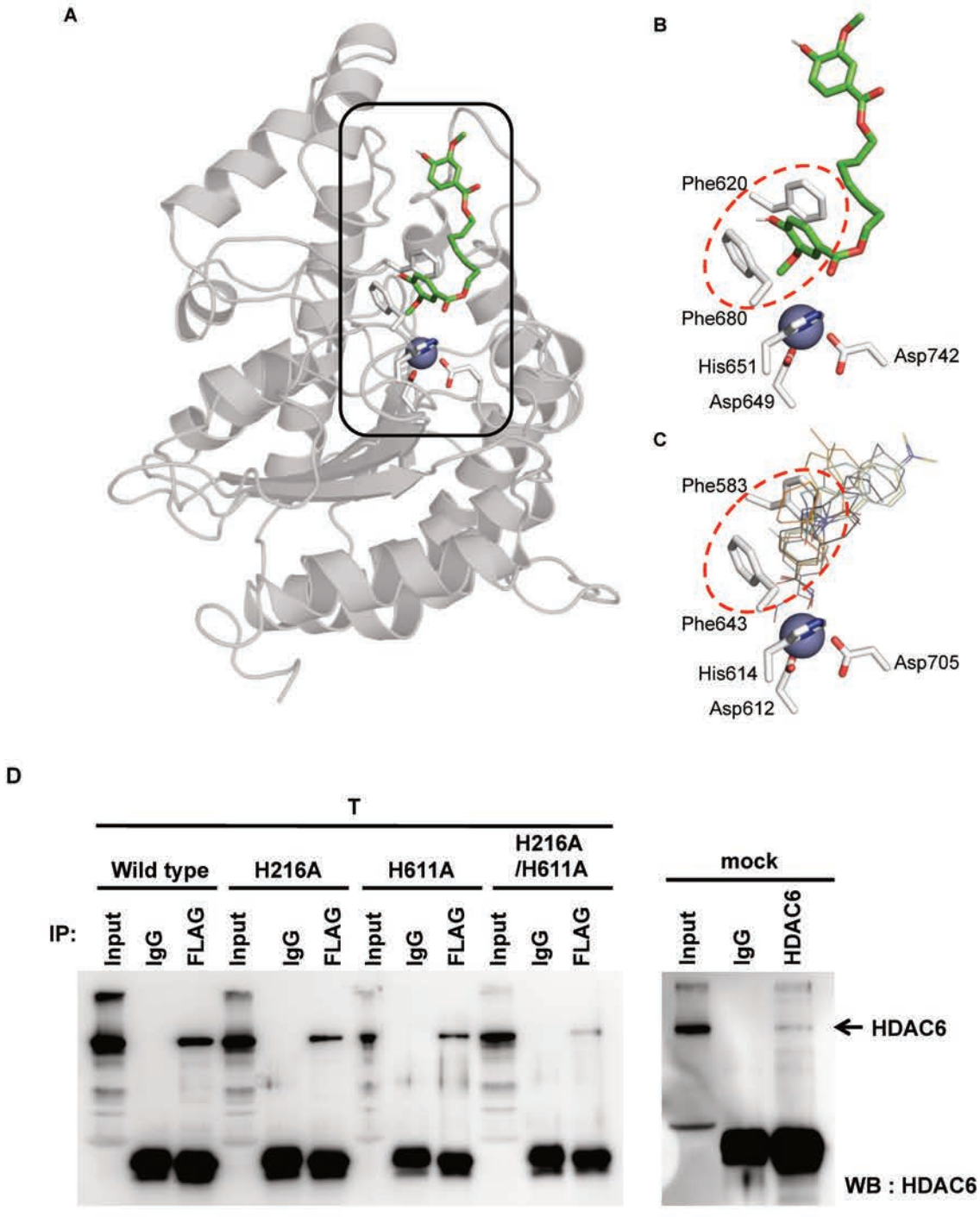


Figure legend on next page

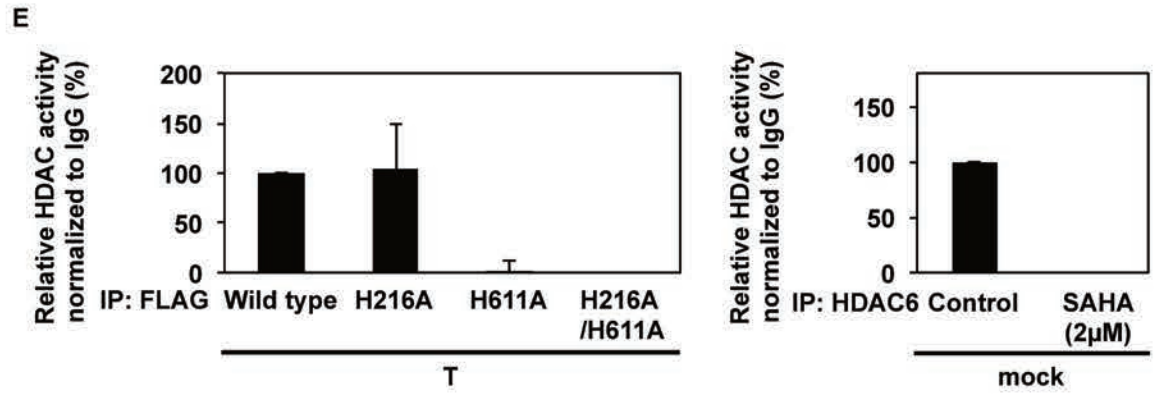


Figure S4: Compound 7b appears to target the second catalytic site of e HDAC6 protein. (A) Overall view of the human HDAC6 (light gray) docked with compound 7b (green stick representation). Compound 7b binds to the entrance of the ligand-binding site with a binding affinity of -6.3 kcal/mol. (B) Close-up view of the ligand-binding site showing a staggered π-stacking interaction (in red dashed circle) between the side chains of residues Phe620 and Phe680, and compound 7b. Residues coordinating active-site zinc atom (purple sphere) are also shown. (C) Similar staggered π-stacking interactions (in red dashed circle) are observed from zebrafish HDAC6 structures in complexes with phenylhydroxamate-based HDAC6 inhibitors, which are shown as orange, yellow, cyan, gray, and black lines (PDB codes: 6DVL, 6DVM, 6DVN, 6DVO, and 6CGP, respectively) [1 , 2]. (D, E) K-562 cells were mock- or FLAG-tagged (transfected with HDAC6 either wild type or mutated in the first catalytic site [H216A], in the second one [H611A], or at both sites [H216A/H611A]). (D) Western blot analysis of HDAC6 after immunoprecipitation with the indicated antibodies, and (E) an HDAC activity assay was performed 24 h post-transfection. SAHA served as a positive control for HDAC inhibition. Results were normalized to the IgG group. Histograms correspond to the mean ± SD of three independent experiments.

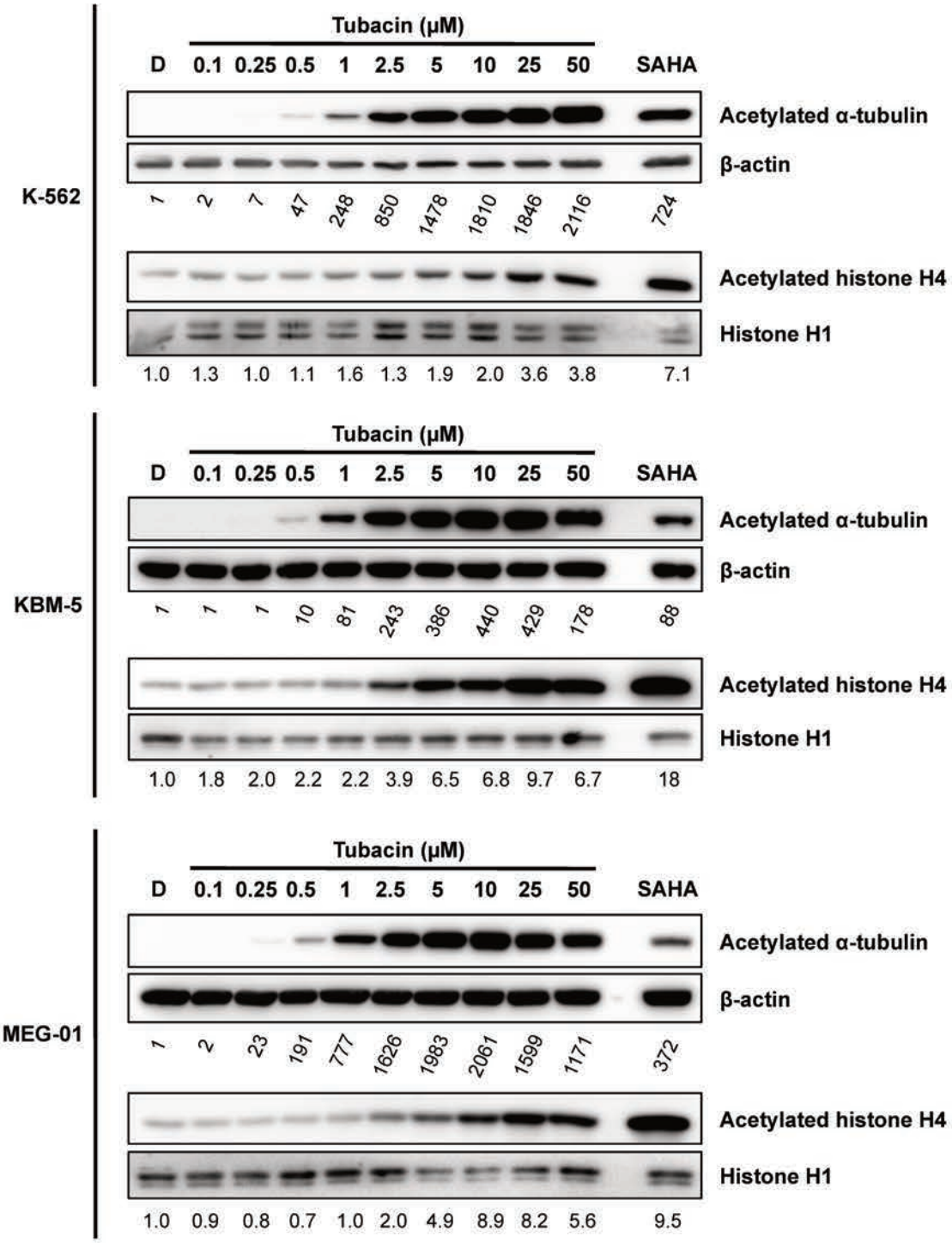


Figure S5: Effect of tubacin on α-tubulin and histone H4 acetylation levels in CML cells. Western blot analysis of α-tubulin and histone H4 acetylation levels in various CML cell models after 8h of treatment with tubacin. and 2 μM SAHA. β-actin and histone H1 were used as loading controls. Blots are representative of three independent experiments and quantifications are indicated under blots with values reported to the control.

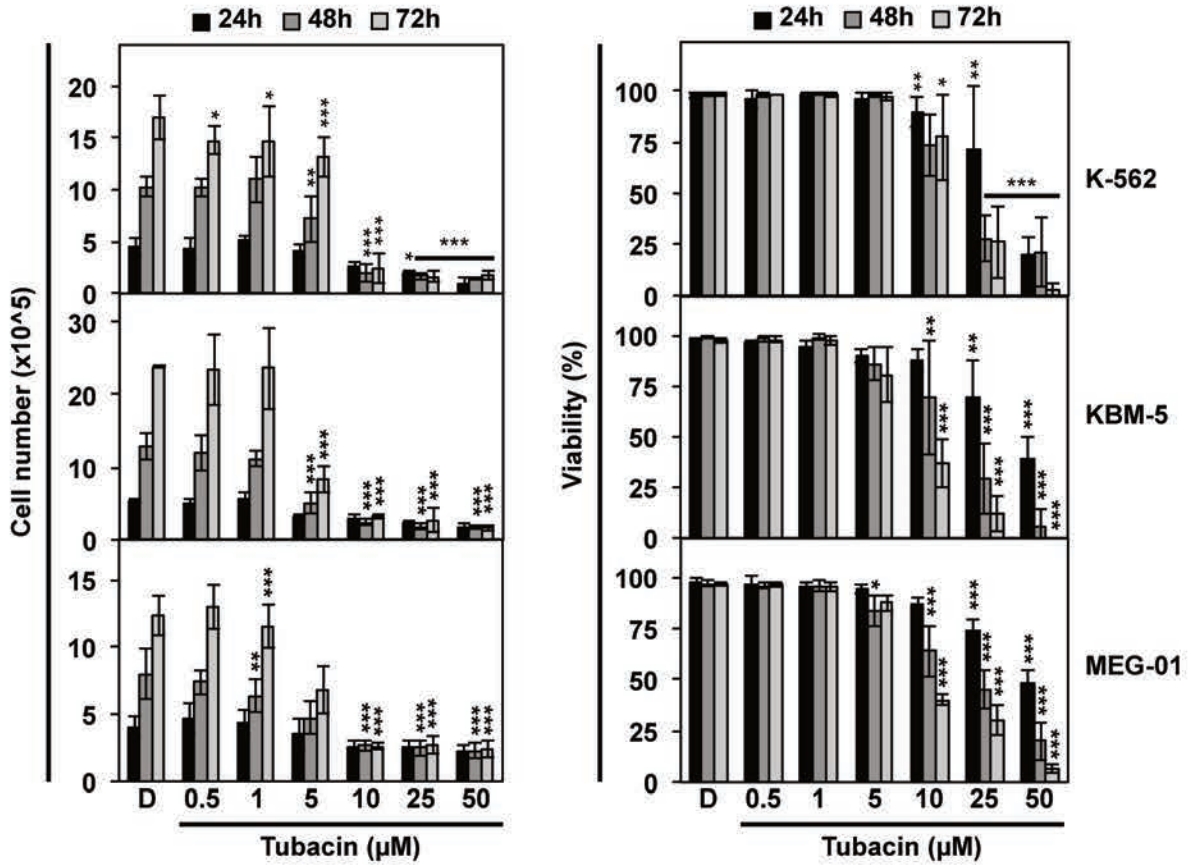


Figure S6: Effect of tubacin on CML cell growth and viability.

Cell number and viability of CML cells treated for up to 72h with increasing concentrations of tubacin. Histograms correspond to the mean ± SD of at least three independent experiments. *, **, *** indicate $p < 0.05$, $p < 0.01$, $p < 0.001$ versus control cells, respectively.

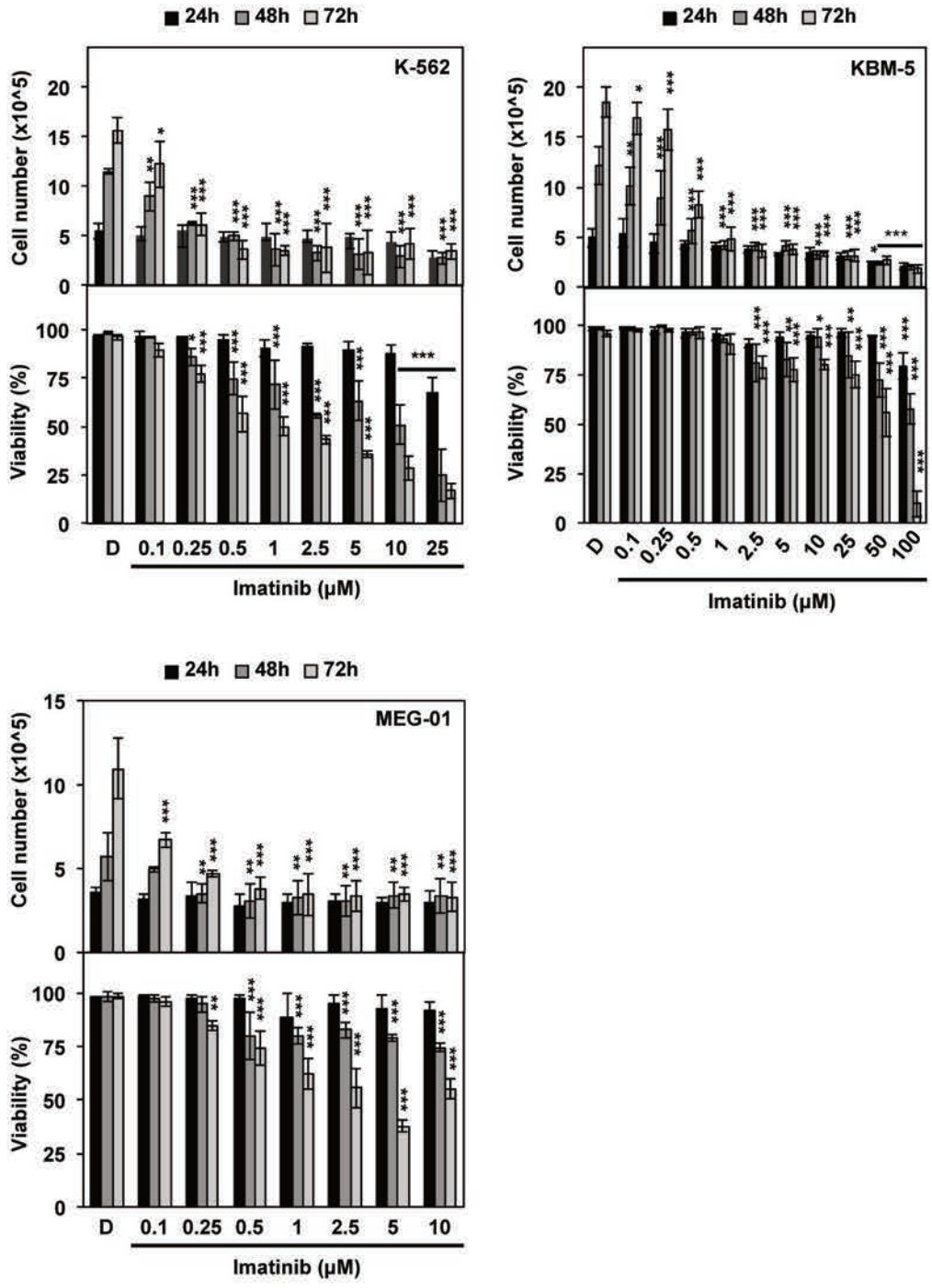


Figure S7: Effect of imatinib on CML cell growth and viability.

Cell number and viability of CML cells treated for up to 72h with increasing concentrations of imatinib. Histograms correspond to the mean ± SD of at least three independent experiments. *, **, *** indicate $p < 0.05$, $p < 0.01$, $p < 0.001$ versus control cells, respectively.

References

[1] N.J. Porter, J.D. Osko, D. Diedrich, T. Kurz, J.M. Hooker, F.K. Hansen, D.W. Christianson
Histone Deacetylase 6-Selective Inhibitors and the Influence of Capping Groups on Hydroxamate-Zinc Denticity
J. Med. Chem., (61) (2018), pp. 8054-8060

[2] M.K.W. Mackwitz, A. Hamacher, J.D. Osko, J. Held, A. Scholer, D.W. Christianson, M.U. Kassack, F.K. Hansen
Multicomponent Synthesis and Binding Mode of Imidazo[1,2- a]pyridine-Capped Selective HDAC6 Inhibitors
Org. Lett., (20) (2018), pp. 3255-3258

Combinaisons de nouveaux inhibiteurs de désacétylase d'histones 6 avec des inhibiteurs de tyrosine kinase pour le traitement de la leucémie myéloïde chronique

Les patients atteints de leucémie myéloïde chronique (LMC) *breakpoint cluster region-Abelson* $(BCR\text{-}ABL)^+$ sont traités avec des inhibiteurs de tyrosine kinase (ITK), comme l'imatinib, cependant certains développent des résistances et des effets secondaires sévères. Des traitements combinés à base d'inhibiteurs d'histone désacétylase (HDAC)6 (HDAC6i), pouvant potentiellement réduire l'expression de BCR-ABL, apparaît être une approche intéressante pour prévenir l'apparition de résistances aux ITK. De plus, l'implication d'HDAC6 dans les voies de dégradation des protéines rend son inhibition couplée à celle du protéasome susceptible de sensibiliser les cellules aux ITK. Notre hypothèse est que la combinaison ITK-HDAC6i pourrait être efficace pour le traitement de la LMC. Dans un premier temps, les effets anti-cancéreux d'un HDAC6i identifié dans notre laboratoire, le composé 7b, à celui de référence, la tubacine, en combinaison avec l'imatinib ont été comparés. La combinaison imatinib-7b a généré des effets anti-cancéreux plus importants que la combinaison imatinib-tubacine et a provoqué une mort synergique apoptotique dépendante des caspases dans les cellules K-562 et réduit la proportion de cellules souches leucémiques alors qu'elle n'a eu qu'un effet modéré sur des cellules saines. Enfin, la combinaison a diminué plus fortement la capacité de formation de colonies et la masse tumorale des cellules de LMC respectivement en milieu semi-solide et dans des poissons zèbres xénogreffés, par rapport aux composés seuls. D'un point de vue mécanistique, la combinaison induit l'ubiquitination et la dégradation de BCR-ABL, et la dérégulation de protéines de ses voies de signalisation impliquées dans la prolifération et la survie cellulaire. La protéine HDAC6 possédant deux sites catalytiques, nos résultats tendent à montrer que le composé 7b cible le deuxième. Dans un second temps, une étude a été initiée sur un nouvel HDAC6i de type hydroxamate, le MAKV-15, qui diminue l'expression de BCR-ABL, et qui en pré-traitement avec le bortezomib, sensibilise les cellules à l'imatinib, entrainant une augmentation de la mort apoptotique dépendante des caspases dans les cellules sensibles et résistantes à l'imatinib. Enfin, nos résultats suggèrent que l'inhibition d'HDAC6 potentialise l'effet de l'imatinib, pourrait prévenir l'apparition de résistances et que de telles combinaisons pourraient représenter une approche thérapeutique prometteuse pour les patients atteints de LMC.

Mots clés : inhibiteur d'HDAC6, inhibiteur de tyrosine kinase, traitements combinés, effet synergique cytotoxique, résistances à l'imatinib, cellules souches cancéreuses

Combinations of novel HDAC6 inhibitors with tyrosine kinase inhibitors for chronic myeloid leukemia treatment

Breakpoint cluster region-Abelson $(BCR\text{-}ABL)^+$ chronic myeloid leukemia (CML) patients receive tyrosine kinase inhibitors (TKIs) such as imatinib as the first-line treatment; however, some patients develop resistances and severe adverse effects. Combination treatments, especially with histone deacetylase (HDAC)6 inhibitors (HDAC6i), appear as an attractive option to prevent TKI resistances considering the capacity of HDAC6i to downregulate BCR-ABL. Moreover, HDAC6 is implicated in protein degradation pathways, so that its inhibition combined with that of the proteasome could sensitize cells to TKIs. Thus, we hypothesized that HDAC6i combined to TKIs could be effective for CML treatment. In the first part, we compared the anti-CML effects of a HDAC6i identified in our laboratory, compound 7b, to the reference HDAC6i tubacin, in combination with imatinib. Results showed that the imatinib-7b combination generated stronger anti-CML effects than imatinib-tubacin. Especially, the imatinib-7b combination elicited a potent synergistic caspase-dependent apoptotic cell death and drastically reduced the proportion of cancer stem cells in K562 CML cells, whereas it only moderately impacted various healthy cell models. Ultimately, the imatinib-7b combination decreased more potently the colony forming capacities and tumor mass formation of CML cells in a semisolid methylcellulose medium and in xenografted zebrafishes, respectively, compared to each compound alone. Mechanistically, the combination induced BCR-ABL ubiquitination and downregulation leading to a dysregulation of multiple key proteins of its downstream pathways involved in CML proliferation and survival. Results tend to demonstrate that 7b could target the second site. In the second part, we initiated a study of a novel hydroxamate-based HDAC6i, MAKV-15, and preliminary results demonstrated it triggered BCR-ABL downregulation. Accordingly, in pre-treatment with bortezomib it sensitizes CML cells to imatinib leading to enhanced caspase-dependent apoptotic death in imatinib-sensitive and imatinib-resistant CML cells. Considering that HDAC6 is reported to possess two functional catalytic sites, we finally attempted to determine which catalytic site is targeted by these HDAC6i. Taken together, our results suggest that HDAC6i potentiate the effect of imatinib and could overcome TKI resistance in CML cells and therefore such combination may represent a promising therapeutic approach for CML patients.

Keywords: HDAC6 inhibitor, tyrosine kinase inhibitor, combination treatments, synergistic cytotoxic effect, imatinib resistance, cancer stem cells