

Université de Montréal

Nouvelle thérapie épigénétique dans le traitement du neuroblastome pédiatrique

par Simon Jacques-Ricard

Département de pharmacologie et physiologie
Faculté de médecine

Mémoire présenté
en vue de l'obtention du grade de maîtrise
en pharmacologie

Août 2016

© Simon Jacques-Ricard, 2016

Résumé

Le neuroblastome pédiatrique est un des cancers extra-crâniens des plus fréquents chez les enfants. Malgré une amélioration du taux de survie avec les thérapies actuellement disponibles, les stades avancés de neuroblastome ou en rechute présentent un très mauvais pronostic. De nouvelles approches thérapeutiques doivent donc être développées afin d'augmenter la survie des patients. Une de ces approches est la thérapie épigénétique. Le neuroblastome, comme plusieurs autres cancers pédiatriques, contient plusieurs altérations épigénétiques au niveau de la méthylation de l'ADN et des modifications des histones. Lors d'un criblage de médicaments déjà approuvés par la FDA, nous avons découvert quelques molécules ayant des caractéristiques de médicaments épigénétiques jusqu'alors jamais découvertes. Notre étude cherche donc à démontrer l'efficacité de ces molécules dans le traitement de lignées cellulaires de neuroblastome. Suite à des tests préliminaires, une des molécules approuvées par la FDA s'est démarquée : le disulfirame, un médicament approuvé pour le traitement de l'alcoolisme chronique. Nous avons donc traité des lignées cellulaires de neuroblastomes (IMR-32, N91, SK-N-DZ, SK-N-SH et SK-N-AS) pendant 48 heures avec du disulfirame à des concentrations pertinentes sur le plan clinique (10nM à 50 μ M). Nos résultats démontrent une inhibition de croissance de 50 % (IC50) d'environ 80 nM pour les lignées cellulaires testées. De plus, après analyse par cytométrie de flux, on observe un blocage du cycle cellulaire en G2/M. Nous avons également observé une diminution du facteur de transcription MYCN ainsi qu'une baisse d'acétylation de plusieurs marques d'histones (H3K9ac, H3K14ac, H3K27ac). Une analyse par séquençage d'ARN a confirmé le bloc en G2/M par une baisse d'expression de gènes associés à cette phase ainsi que la

diminution de MYCN par une baisse de gènes cible de MYC. Des travaux sont en cours afin de déterminer le mécanisme d'action du disulfirame. Cette recherche permettra d'évaluer l'efficacité du disulfirame dans le traitement du neuroblastome

Mots-clés : Épigénétique, neuroblastome, MYCN, pharmacologie, disulfirame

Abstract

Pediatric neuroblastoma is one of the most common extracranial cancer in children. Despite an improvement in survival with the currently available therapies, neuroblastoma with an amplification of the transcription factor MYCN has a very poor prognosis. New therapeutic approaches must be developed to increase the survival of patients. One such approach is epigenetic drug therapy. Neuroblastoma, like many other pediatric cancers, contains several epigenetic alterations at the level of DNA methylation and histone modifications. In a screening of FDA-approved drugs, we discovered some molecules having characteristics of epigenetic drugs that were unknown until now. Our study seeks to demonstrate the efficacy of these molecules in the treatment of neuroblastoma cell lines. Following preliminary tests, one of the molecules approved by the FDA stood out: disulfiram, a medication approved for the treatment of chronic alcoholism. We treated neuroblastoma cell lines (MYCN amplified: IMR-32, N91 and SK-N-DZ; MYCN non-amplified: SK-N-AS and SK-N-SH) for 48 hours with disulfiram at clinically relevant concentrations (from 10 nM to 20 μ M). Our results demonstrate a 50% growth inhibition (IC₅₀) of 80nM for the cell lines tested. In addition, after analysis by flow cytometry, we found a cell cycle block in G2/M. RNA sequencing also revealed that disulfiram affects a many genes (downregulated n=508, upregulated n=207). We also observed a decrease in the transcription factor MYCN and a reduction in acetylation of several histone marks by Western blot's analysis. Further studies are underway to determine the mechanism of action of disulfiram. This study shows the potential of disulfiram in the treatment of neuroblastoma.

Keywords: Epigenetic, Neuroblastoma, MYCN, Disulfiram, pharmacology

Table des matières

Résumé.....	ii
Abstract.....	iv
Table des matières.....	v
Liste des tableaux.....	vii
Liste des figures	viii
Liste des sigles	ix
Liste des abréviations.....	ix
Remerciement	xi
Introduction.....	12
1.0 L'épigénétique	12
1.1 La méthylation de l'ADN	14
1.2 Les modifications post-traductionnelles des histones.....	16
1.2.1 Les histones désacétylases	20
1.2.2 Les histones acétyltransférases	21
2.0 Le neuroblastome.....	25
2.1 La classification du neuroblastome.....	26
2.2 Les traitements pour le neuroblastome	29
2.3 Amplification du facteur de transcription MYCN	33
2.4 Altération génétique et épigénétique dans le neuroblastome.....	36
3.0 Médicaments épigénétiques	42
3.1.1 Inhibiteurs des histones désacétylases	42
3.1.2 Les inhibiteurs des histones acétyltransférases.....	43
3.2 Inhibiteurs des ADN méthyltransférases	44
3.3 Combinaison de médicaments épigénétiques	45
4.0 Repositionnement de médicaments.....	46
4.1 Le pyrithione de zinc	48
4.2 La proscillaridine A	49
4.3 Le disulfirame	50

5.0 Objectif du projet	51
6.0 Article	52
6.1 Abstract.....	52
6.2 Introduction.....	53
6.3 Results and Discussion	54
6.4 Materials and methods	58
6.5 Conflict of interest	60
6.6 Acknowledgements.....	60
6.7 References.....	60
6.8 Figures.....	63
7.0 Discussion	71
8.0 Perspectives et conclusions.....	75
Bibliographie.....	i

Liste des tableaux

Tableau I. Membre de la famille des MYST.....	22
Tableau II. Membre de la famille des GNAT.....	23
Tableau III. Membre de la famille de CBP	24

Liste des figures

Figure 1.	Différentes modifications épigénétiques:	13
Figure 2.	Méthylation de l'ADN:	15
Figure 3.	Modification post-traductionnelle des histones:	17
Figure 4.	Les HDACs et HATs :	21
Figure 5.	Stade des tumeurs de neuroblastomes en fonction du INSS:	28
Figure 6.	MYC forme un complexe avec MAX et se lie à l'ADN	35
Figure 7.	Les aberrations chromosomiques dans le neuroblastome:	38
Figure 8.	Les CIMP dans le neuroblastome:	39
Figure 9.	Voie de signalisation de l'apoptose dans le neuroblastome:	41
Figure 10.	Représentation de la structure chimique du pyrithione de zinc.	49
Figure 11.	Représentation de la structure chimique de la proscillaridine A.	50
Figure 12.	Représentation de la structure chimique du disulfirame.	51

Liste des sigles

FDA : administration des médicaments et des aliments

INGRSS : système international de gradation des groupes de risque du neuroblastome

INSS : système de gradation du neuroblastome par système de comité

Liste des abréviations

ADN : acide désoxyribonucléique

ARN : acide ribonucléique

DNMT : ADN méthyltransférase

HMT : histone méthyltransférase

HDMT : histone déméthylase

HAT : histone acétyltransférase

HDAC : histone désacétylase

MeCP2 : protéine de liaison CpG méthyle 2

CpG : région cytosine-guanine

SAM : S-adénosyl-L-méthionine

MBD : domaines de liaison des groupes méthyles

MBP : protéines de liaison de groupes méthyles

H2, H3, H4 : histone 2,3 et 4

Ac : acétylé

Me : méthylé

P : phosphorylé

K : lysine

Zn²⁺ : ion zinc

NAD⁺ : nicotinamide adénine dinucléotide

GNAT : Amino-acétyltransférases reliées à GCN5

CBP : protéine de liaison à CREB

CREB : protéine de liaison d'élément en réponse à l'AMP cyclique

COA : coenzyme A

RA : acide rétinoïque
IV : intraveineux
ALLO : allogénique
AUTO : autologue
bHLH-Zip : facteurs hélice-boucle-hélice de transcription fermeture éclair à leucine
MBII : MYC Box II
TRAAP : protéine de transformation/transcription associée à un domaine
TBP : protéine de liaison à TATA
Pol II : polymérase II
LOH : perte d'hétérozygotie
CDH5 : domaine de liaison à l'ADN 5
CADM1 : molécule d'adhérence cellulaire 1
CIMP : îlots CpG avec phénotype de méthylation
DR : récepteur de mort
DCR : récepteur leurre
HDACi : inhibiteur des HDACs
HATi : inhibiteur des HAT
MB-3 : α -méthylène- γ -butyrolactone 3
DNMTi : inhibiteur des DNMT
US : États-Unis
GFP : protéine fluorescente verte
CMV : cytomégalovirus

Remerciement

Je tiens à remercier avant tous mon directeur de recherche, le Dr Noël Raynal, qui m'a permis d'effectuer ma maîtrise dans son laboratoire. Il m'a aidé tout au long de mon projet avec de précieux conseils et son incroyable support. Je tiens à remercier mes collègues de labo Gregory, Elodie et Annie pour avoir rendu ces deux ans si agréables, amusants et toujours plus fun que la journée précédente. Gregory, tu as toujours été là pour nous faire rire avec tes idées plus farfelues les unes que les autres. Sans toi, les journées au labo n'auraient jamais été aussi folles et divertissantes. Elodie, je te remercie d'avoir su supporter le vieux grand-père grincheux que je suis ainsi que mon sens de l'humour toujours aussi incroyable. Tu as toujours été là pour me donner de précieux conseils autant d'un point de vue professionnel que personnelle. Sans vous, mon passage au laboratoire n'aurait pas été aussi facile et agréable.

J'aimerais remercier toute ma famille et mes amis qui m'ont soutenu durant toutes mes études. Mon père et ma mère pour le support moral et financier durant tant d'années. Vous avez toujours cru en moi même dans les moments où moi je n'y croyais plus et vous avez toujours eu les bons mots pour m'encourager. Finalement, je voudrais remercier mes amis pour m'avoir donné votre sincère support tout au long de ma maîtrise, vous m'avez remonté le moral plus de fois que je peux m'en rappeler.

À tous, je vous dit simplement merci !

Introduction

1.0 L'épigénétique

L'épigénétique est l'étude des modifications de l'activité des gènes ou de l'expression des gènes sans modifier la séquence de l'ADN en elle-même [1]. Ces changements dans l'expression génique peuvent ensuite être transmis aux cellules filles lors de la méiose et la mitose [1-5]. De nombreux types de modifications épigénétiques existent pour mener à une reprogrammation cellulaire qui est réglementée par une variété de différentes enzymes. Les deux modifications les plus étudiées sont la méthylation et l'acétylation, mais la régulation épigénétique peut être réalisée également par la phosphorylation, l'ubiquitination et la sumoylation [1-3, 5].

Le domaine de l'épigénétique peut-être séparé en trois classes principales : la méthylation de l'ADN, les modifications de la chromatine, et microARN [1, 6]. Les deux classes de modifications épigénétiques les plus fréquemment étudiées sont la méthylation de l'ADN et des modifications post-traductionnelles de la chromatine [1, 6]. Dans l'ensemble, les changements épigénétiques sont nécessaires pour le développement des cellules, la différenciation et la survie cellulaire normale, par conséquent, toutes les dérégulations dans les voies épigénétiques peuvent avoir des conséquences importantes sur le phénotype de la cellule [1-3, 5]. Contrairement à des mutations somatiques, les modifications de l'épigénome d'une cellule sont réversibles et constituent donc des cibles thérapeutiques intéressantes [7].

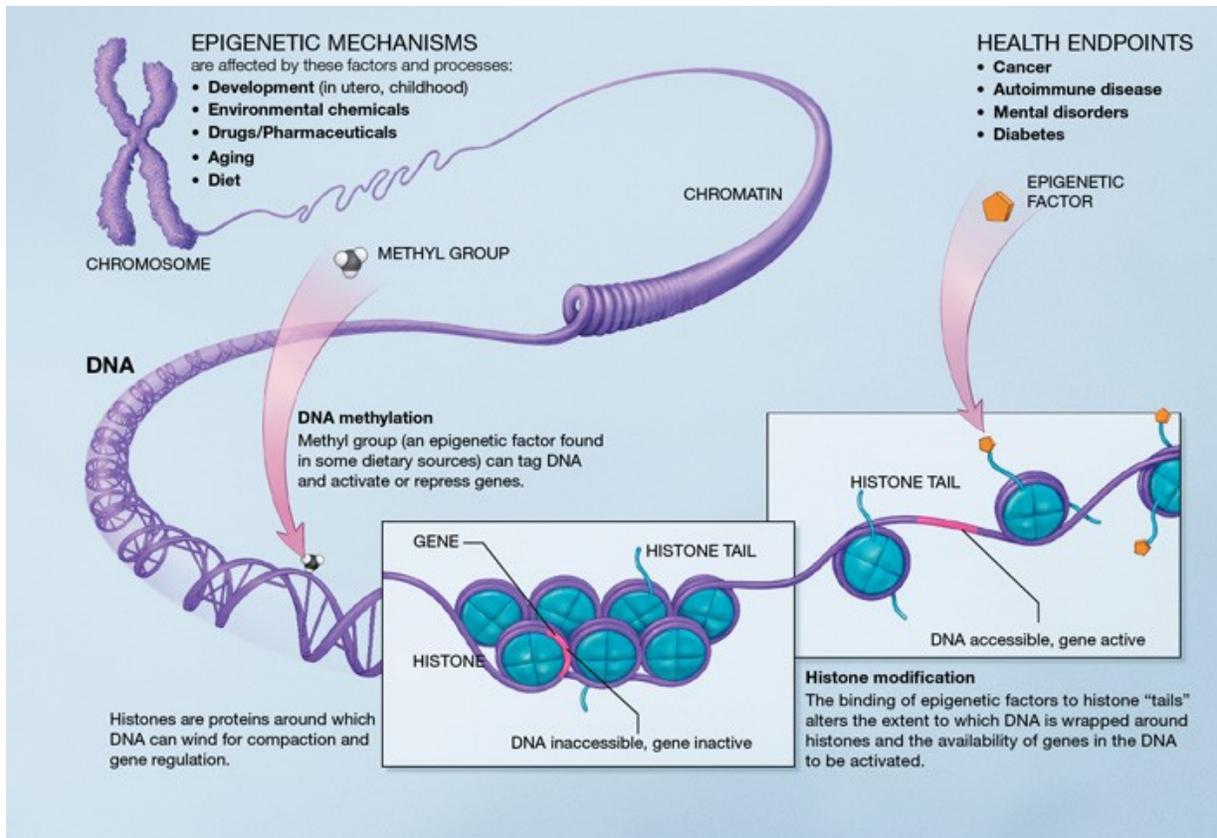


Figure 1. Différentes modifications épigénétiques :

Représentation de la méthylation de l'ADN au niveau des cytosines ainsi que des modification post-traductionnelles des histones qui se font au niveau des queues d'histones sur plusieurs résidus.

Les protéines épigénétiques peuvent être caractérisées fonctionnellement comme étant des marqueurs, des effaceurs, ou des lecteurs. Les marqueurs sont des enzymes qui transfèrent les marques épigénétiques sur les histones ou sur l'ADN [8, 9]. Les marqueurs les plus connus sont les ADN méthyltransférases (DNMTs) et les histones acétyltransférases (HAT). Au contraire, les effaceurs épigénétiques suppriment les marques épigénétiques de l'ADN et des

histones (ADN déméthylases et histone désacétylases HDAC) [8, 9]. Enfin, les lecteurs épigénétiques sont des protéines qui se lient sur ces marques épigénétiques, transmettant ainsi un signal, soit pour induire la transcription des gènes, soit pour réprimer de la transcription via le recrutement d'autres protéines. Il existe de nombreux types de lecteurs épigénétiques qui se lient à plusieurs marques épigénétiques mentionnées précédemment [9]. Par exemple, certaines protéines avec un bromodomaine reconnaissent les résidus acétylés des histones, tandis que d'autres protéines comme la protéine de liaison CpG méthyle 2 (MeCP2) qui se fixent sur l'ADN méthylé [9].

1.1 La méthylation de l'ADN

La méthylation de l'ADN est l'ajout d'un groupe méthyle par une enzyme DNMT aux cytosines situées principalement sur les dinucléotides CpG. Le donneur de groupement méthyle pour cette réaction est la S-adénosyl-L-méthionine (SAM) [10]. Certaines zones du génome sont enrichies pour des sites CpG, qui sont mentionnées comme des îlots CpG. Ces séquences d'ADN génomiques sont définies comme des tronçons d'environ 200 paires de bases comprenant plus de 50 % de répétitions de cytosine et guanine[11]. Les îlots CpG sont dispersés à travers le génome humain, mais sont plus concentrés dans des séquences répétées, les gènes d'empreintes, et dans plus de la moitié des promoteurs des gènes [12-14]. Dans les cellules normales, la méthylation de l'ADN est nécessaire pour le maintien d'un profil d'expression génique donné lorsque le matériel génétique est transmis de la cellule mère à des cellules filles [6]. Il est également nécessaire pour les empreintes génétiques et inactivations

du chromosome X. De plus, la méthylation des îlots CpG est nécessaire pour la différenciation cellulaire et le développement des cellules normales [12, 15-17]. Il a également été démontré que la méthylation joue un rôle important dans l'expression de gènes spécifiques à certains tissus [14].

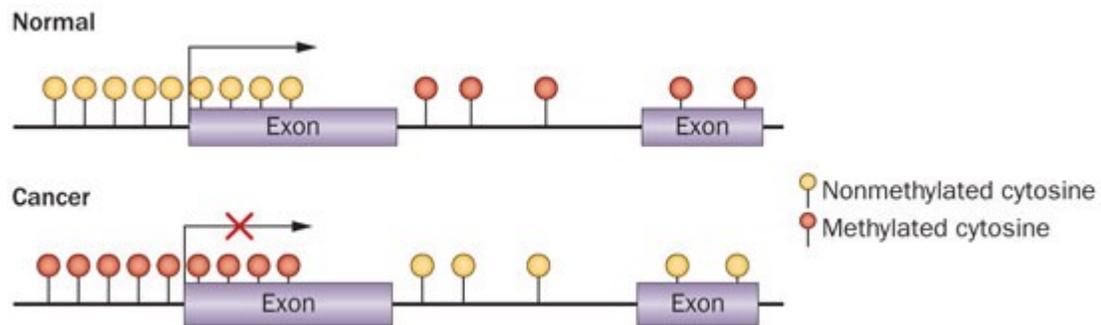


Figure 2. Méthylation de l'ADN :

Lorsque le promoteur d'un gène n'est pas méthylé, la machinerie transcriptionnelle peut fonctionner correctement et activer la transcription du gène. Par contre, lorsque le promoteur est hyperméthylé, il n'y a pas de transcription et donc le gène est réprimé [18].

La majorité de la méthylation de l'ADN est catalysée par trois types de DNMTs : DNMT1, DNMT3a et DNMT3b. Tout d'abord, DNMT1 est nécessaire pour maintenir les modèles de méthylation d'une cellule lorsqu'elle se divise en deux cellules filles transmettant ainsi l'information épigénétique d'une génération de cellules à l'autre [12, 19, 20]. Par conséquent, lorsque la cellule se divise, DNMT1 utilise le brin parental comme un modèle pour conserver de manière appropriée les profils de méthylation. Ensuite, DNMT3a et DNMT3b sont des enzymes responsables de l'ajout de nouveaux groupes méthyles aux cytosines qui ne sont pas méthylés précédemment, un phénomène aussi connu comme la méthylation de l'ADN « de novo » [12, 17].

La méthylation de l'ADN peut conduire à l'inactivation de gène par une variété de mécanismes différents. Tout d'abord, la méthylation de l'ADN agit comme un répresseur de la transcription directe principalement par le recrutement de lecteurs de méthylation d'ADN. Ces lecteurs sont des domaines de liaison aux groupes méthyles (MBD) et recrutent d'autres complexes répresseurs de la chromatine, sur les îlots CpG des promoteurs des gènes [5, 21-23]. Il y a cinq protéines MBD identifiées à ce jour, la plus étudiée étant MeCP2. Une fois liées sur les résidus de cytosine méthylés, ces protéines MBD sont capables de recruter des co-répresseurs supplémentaires qui induisent des changements dans la structure de la chromatine, conduisant à une répression génique [21]. Les types de corépresseurs recrutés par les protéines MBD comprennent les histones méthyltransférases (HMTS) et les histones désacétylases (HDAC). De cette manière, la méthylation de l'ADN modifie la chromatine ce qui va influencer l'expression génique [24]. Pour activer la transcription des gènes, les facteurs de transcription doivent se lier sur les îlots CpG non méthylés dans des régions promotrices. Par conséquent, par méthylation des îlots CpG, ces facteurs de transcription sont bloqués et ne peuvent accomplir leur fonction. Un autre moyen d'inactivation des gènes induits par méthylation de l'ADN, est le recrutement de protéines de liaison de groupes méthyle (MBPs), qui se lient sur des résidus cytosine méthylés et empêcher la liaison des facteurs de transcription [21, 22, 25].

1.2 Les modifications post-traductionnelles des histones

La capacité pour le noyau d'une cellule à contenir d'aussi longs brins d'ADN ne serait pas possible sans la présence de protéines nommées histones. En effet, l'ADN est étroitement

enroulé autour des histones pour former des nucléosomes [26, 27]. Le nucléosome est formé par un octamère d'histones. Chaque octamère est constitué de deux fois quatre histones (H2A, H2B, H3 et H4) qui forment le cœur du nucléosome. Les nucléosomes sont reliés les uns aux autres par l'ADN de liaison et sont emballés ensemble pour former la chromatine [2].

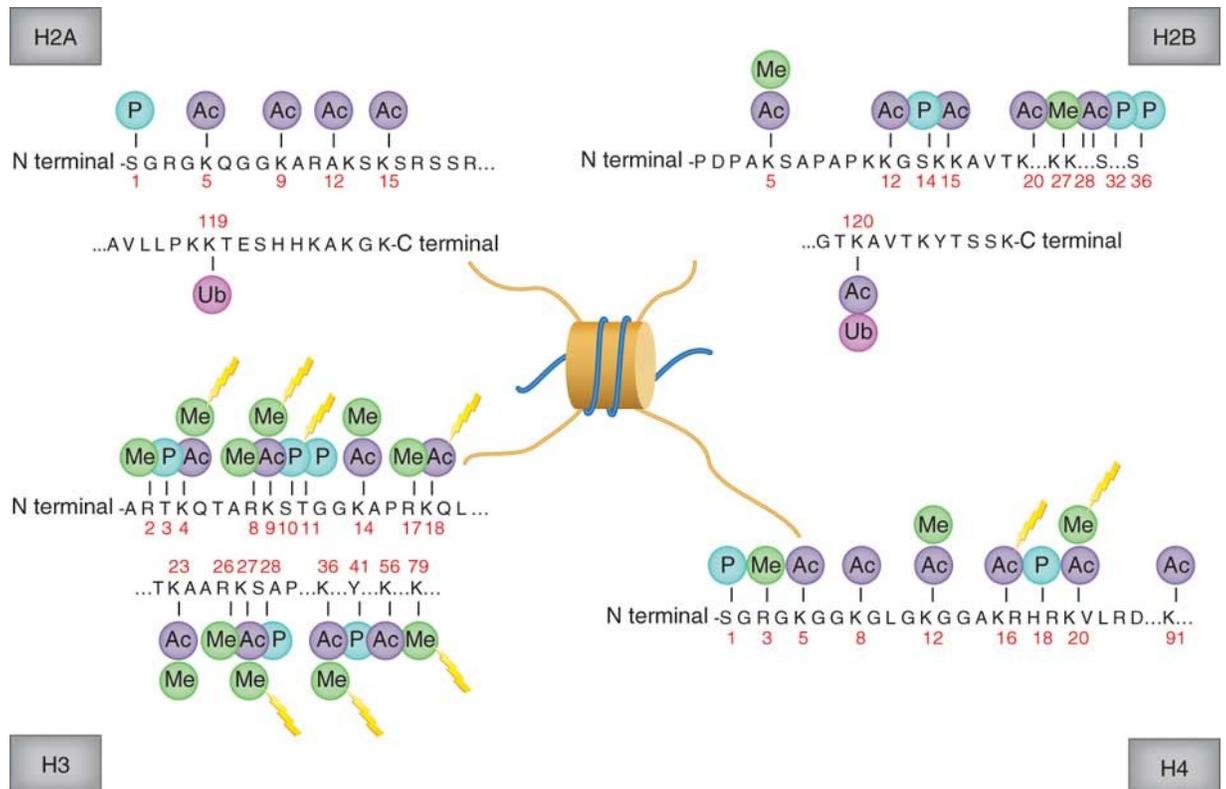


Figure 3. Modification post-traductionnelle des histones :

Listes des principales modifications possibles sur les queues des quatre sous-unités d'histone possible. Chaque sous-unité peut-être acétylée (Ac), méthylée (Me) ou encore phosphorylée (P) sur un résidu spécifique [28].

Chaque histone contient une région C-terminale qui forme la partie globulaire de chaque nucléosome, et une région N-terminale, formant une queue qui peut être modifiée après la synthèse de la protéine, de manière covalente, par une variété d'enzymes [2, 26]. Selon les modifications post-traductionnelles, la chromatine peut être relâchée nommée l'euchromatine ou bien compactée nommée l'hétérochromatine. Considérant que l'euchromatine favorise la transcription des gènes, l'hétérochromatine quant à elle est si étroitement compactée que la transcription des gènes est presque inexistante [2, 26, 29]. Les deux modifications des histones les plus couramment étudiées sont l'acétylation et la méthylation. Les autres modifications post-traductionnelles qui jouent un rôle dans les changements d'expression génique comprennent, entre autres, la phosphorylation, la sumoylation et l'ubiquitination [2, 26, 27, 30].

Il existe deux modèles en ce qui concerne les effets de l'acétylation des histones sur les changements structurels de la chromatine et la régulation de l'expression des gènes. Le premier modèle est l'acétylation des sous-unités d'histone H3 et H4 qui jouent un rôle clé dans le changement de polarité de la chromatine [2]. L'abondance de résidus lysines sur les queues d'histones rend la polarité positive de celle-ci. Par conséquent, lorsque des résidus de lysines ne sont pas acétylés, les histones sont fortement compactées avec les brins d'ADN chargés négativement, pour former de l'hétérochromatine [2]. D'autre part, lorsque les résidus de lysines sont acétylés, les charges positives sont neutralisées, favorisant ainsi la structure de la chromatine relâchée ce qui facilite la transcription des gènes [2]. Dans le second modèle, cependant, si on prend en exemple l'acétylation du résidu de lysine 14 de l'histone 3 (H3K14ac) par l'HAT P300. Cette acétylation induit une expulsion du nucléosome, médiée par la chaperone d'histones Nap1 [31]. Une fois que le nucléosome est éliminé, les complexes

de facteurs de transcription sont recrutés et assemblés pour induire l'expression du gène. L'importance de H3K14ac a été démontrée dans des études de mutation où les résidus de lysines sur l'histone H3 ont été mutés. La transcription devenait alors inexistante, ce qui démontre la nécessité de l'expulsion du nucléosome de H3K14ac pour favoriser la transcription des gènes [31].

L'acétylation et la méthylation des résidus de la queue des histones sont régulées par des réactions enzymatiques impliquant des marqueurs et des effaceurs épigénétiques [2, 32]. Les HAT et les HDAC sont des enzymes impliquées dans l'ajout et la suppression de groupes acétyles des résidus d'histones, respectivement. Les histones méthyltransférases (HMTS) et les histones déméthylases (HDMT), au contraire, sont impliquées dans l'ajout et la suppression des groupes méthyles [2, 32].

Par rapport à la méthylation de l'ADN, les modifications des histones sont plus complexes en termes d'activation ou de répression de la transcription des gènes. Deux facteurs entrent en jeu lorsque l'on étudie l'expression génique induite par des modifications des histones [5, 26]. Tout d'abord, le type de modification présent sur un résidu de la queue d'histone déterminera si la transcription du gène est activée ou réprimée. Deuxièmement, la position du résidu sur la queue modifiée va influencer la formation soit de l'euchromatine ou la formation de l'hétérochromatine [5, 26]. Dans la plupart des cas, l'acétylation de la queue histone est associée à une augmentation de l'expression génique. La méthylation des queues d'histone, pour sa part, peut être liée soit à une marque d'activation ou de répression, en fonction de la position du résidu d'histone modifié [2, 33]. En outre, lorsqu'on se réfère à la méthylation, les résidus d'histones (soit la lysine ou l'arginine) peuvent être soit mono -, di - ,

ou tri-méthylé, le nombre de groupe méthyle rajouté à un résidu donné peut également déterminer si les gènes sont transcriptionnellement actifs ou réprimés [2, 34].

1.2.1 Les histones désacétylases

Les HDACs sont des effaceurs épigénétiques qui éliminent l'acétylation des résidus de queue d'histone. Ils peuvent être divisés en quatre classes principales, en fonction de leurs séquences peptidiques tertiaires, la localisation cellulaire et de leurs fonctions [26, 32]. Les HDAC 1, 2, 3 et 8 sont situées dans le noyau de la cellule, ce qui représente la classe I. Classe I HDAC joue un rôle clé dans la désacétylation des protéines histones dans le noyau. Les HDACs de classe II (4, 5, 6, 7, 9 et 10) sont présentes dans le cytoplasme et le noyau, fonctionnant comme une enzyme de désacétylation des protéines non-histones [26, 32, 35, 36]. La famille des sirtuines (sirtuines 1-7) représente la classe de HDAC III. Enfin, HDAC11, une protéine cytoplasmique, est la seule enzyme qui constitue la classe IV [26, 32, 35, 36]. Comme elle présente une homologie de séquence aux classes I et II, HDAC11 est considérée comme une hybride entre les deux classes d'HDAC [26, 32, 35, 36]. Fait intéressant, les HDAC de classes différentes sont connues pour interagir les unes avec les autres lors de l'exécution de leurs fonctions et dans certains cas, elles forment des complexes de protéines sur les queues d'histone. Afin d'accomplir leur fonction de désacétylation, les HDAC nécessitent des cofacteurs. Pour les classes I, II et IV, elles nécessitent Zn^{2+} , tandis que la famille des sirtuines nécessite le NAD^+ [26, 32, 35, 36].

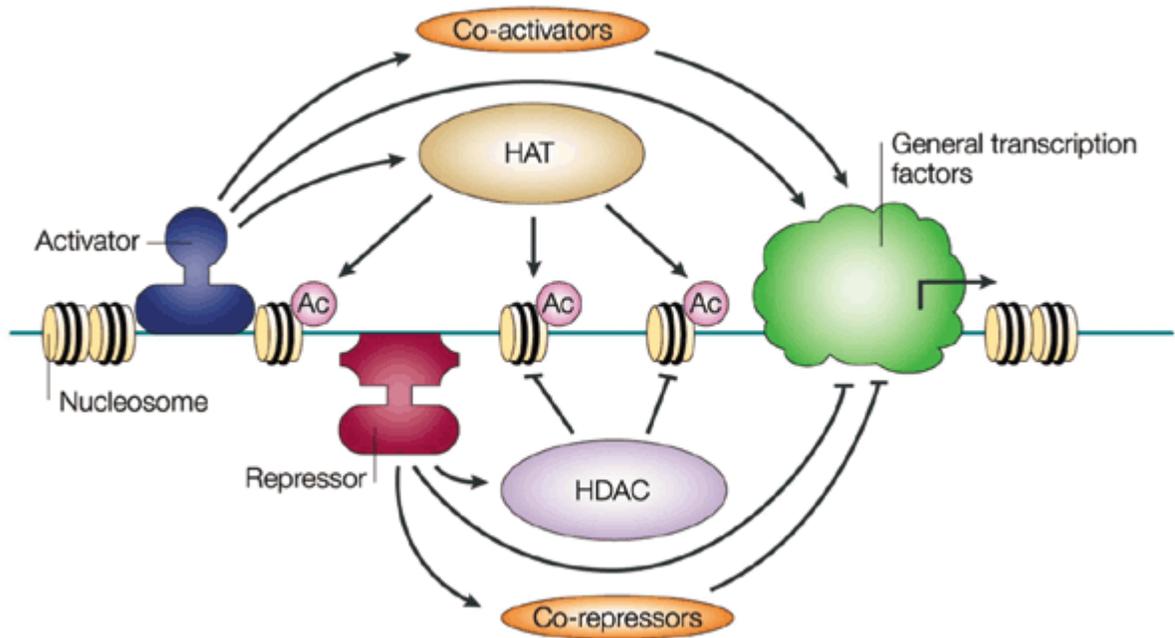


Figure 4. Les HDACs et HATs :

Effet des HDACs et HATs sur la machinerie transcriptionnelle. Les HDACs vont retirer les groupements acétyle (Ac) et réprimer l'expression génique tandis que les HATs vont ajouter des groupements Ac pour favoriser la transcription [37].

1.2.2 Les histones acétyltransférases

En ce qui concerne l'activation de la transcription génique, l'acétylation des histones est de loin la modification post-traductionnelle la plus étudiée. Les HAT sont classées selon les familles suivantes : MYST, GNAT, ou CBP [32, 33, 38]. En outre, toutes les HAT partagent une caractéristique commune : elles utilisent l'acétyl-CoA comme un groupe donneur d'acétyl dans leurs réactions enzymatiques [39, 40].

Premièrement, la famille MYST est composée de cinq membres clés chez les mammifères : HBO1, MOF, MORF, MOZ et TIP60 [38-41]. La caractéristique des HAT de

cette famille est la présence d'un domaine MYST et d'un domaine lecteur de l'acétylation d'histone appelé bromodomaine [39, 40]. En fonction de leurs partenaires de liaison, les HAT de type MYST présentent des fonctions différentes, soit oncogénique, soit suppresseur de tumeur [40]. Par exemple, les membres de cette famille sont en mesure d'agir comme co-activateurs de la transcription des protéines importantes dans la régulation des voies de prolifération cellulaire et de la survie tels que NF- κ B et l'oncogène C-MYC [39]. Ils peuvent également assumer des fonctions apoptotiques et anti-prolifératives en activant la voie de l'apoptose par l'acétylation de p53. Ils ont également été associés à des gènes d'activation impliqués dans la réponse aux dommages de l'ADN et à la réparation de l'ADN, comme l'ataxie télangiectasie mutée (ATM), une protéine impliquée dans la voie de p53 et la phosphorylation de γ -H2AX. Une fois phosphorylée, les deux protéines peuvent activer et recruter la machinerie de réparation de l'ADN vers les sites nécessaires [38-40].

Tableau I. Membre de la famille des MYST.

HAT	Histone ciblée
MOZ	H2A, H2B, H3, H4
TIP60	H4, H3, H2A
HBO1	H3, H4
MOF	H4, H3, H2A
MORF	H4, H3

Deuxièmement, il y a trois enzymes qui composent principalement la famille d'histone acétyltransférase GNAT chez les humains : GCN5, PCAF et HAT1 [38, 41, 42]. Les membres de la famille de GNAT contiennent un domaine HAT et un bromodomaine. Les résidus

préférentiellement acétylés sont sur la sous-unité d’histone H3. Comme dans le cas de la famille MYST, les GNAT acétylent entre autre le gène suppresseur de tumeur p53, activant ainsi ses fonctions apoptotiques [38, 43].

Tableau II. Membre de la famille des GNAT.

HAT	Histone ciblée
GCN5	H3, H4
PCAF	H3, H4
HAT1	H4, H2A

Finalement, les membres de la famille de CBP sont légèrement différents des membres des deux autres classes pour deux raisons principales. Tout d’abord, la structure de l’HAT CBP diffère par rapport aux deux autres classes [44, 45]. Contrairement aux autres HATs, CBP et P300 contiennent des régions riches en cystéine-histidine. Deuxièmement, des différences d’interaction entre protéines, et par conséquent des complexes de protéines, sont également observées [44, 45]. En plus de l’acétylation des résidus d’histones, ces protéines sont également impliquées dans l’acétylation du gène suppresseur de tumeur p53, médian ainsi l’apoptose. Il a été récemment montré que CBP et P300 sont également impliqués dans acétylation des protéines qui font la navette entre le noyau et le cytoplasme [46].

Tableau III. Membre de la famille de CBP.

HAT	Histone ciblée
CBP	H2A, H2B, H3, H4
P300	H2A, H2B, H3, H4

Bien que toutes les HAT partagent des structures de domaine de base très similaires dans les trois familles, chaque enzyme cible des histones et des résidus spécifiques sur les queues des histones, principalement les lysines des histones H3 ou H4 [38, 45, 47]. Par exemple, les membres de la famille de GNAT sont plus spécifiques pour les résidus de queue H3, alors que les membres de MYST préfèrent des substrats H4 [38, 45, 47]. La famille CBP/P300 n'a pas de préférence spécifique pour une sous-unité d'histones et acétyle les sous-unités H2A, H2B, H3, H4 et à des fréquences égales. De plus, les HAT ont la possibilité de former des complexes de protéines avec des membres d'une même famille afin d'augmenter encore plus leurs activités [38, 45, 47].

Une relation très importante existe entre l'acétylation des histones et les lecteurs épigénétiques, puisque le début de la transcription du gène est souvent dépendant de ces deux types de protéines [8, 48-50]. Trois principaux types de lecteurs d'histones acétylées sont actuellement connus, avec la famille la plus caractérisée étant les bromodomains. Récemment, deux autres types de lecteurs d'histones acétylés ont été découverts : le domaine PHD de la protéine à doigt de zinc DPF3b et le double domaine pleckstrine de la chaperone RTT106 [8]. Dans l'ensemble, les lecteurs épigénétiques ont une forte affinité pour

les résidus d'histones acétylées consécutifs et sont parfois nécessaires pour que l'activité des facteurs de transcriptions soit complète [8].

2.0 Le neuroblastome

Le neuroblastome est un cancer du système nerveux périphérique [51, 52]. Il dérive de la lignée de la crête neurale sympathicosurrénale et se retrouve donc principalement au niveau des glandes surrénales. Le neuroblastome est l'une des tumeurs extra-crâniennes les plus fréquentes chez les enfants en bas âge et représente de 8 à 10 % des cancers pédiatriques aux États-Unis et en Europe. C'est un cancer très agressif qui cause plus de 15 % des décès par cancer chez l'enfant. Plus de 50 % de ces tumeurs surviennent chez des enfants de moins de 2 ans [51, 53]. L'incidence du neuroblastome a augmenté ces dernières années. Il est associé à un mauvais pronostic chez les enfants de plus de 18 mois avec un taux de survie de 66 % [51, 54]. Le neuroblastome chez les enfants de 18 mois ou plus est souvent non résecable ou métastatique et nécessite une thérapie intensive multimodale comprenant la chimiothérapie, la chirurgie, la radiothérapie ainsi que l'immunothérapie. Dans la majorité des patients, une réponse initiale est observée, cependant, 35 à 40 % de ces patients font par la suite une rechute avec des tumeurs résistantes à la thérapie [55, 56]. Le neuroblastome chez les enfants de moins de 18 mois se comporte très différemment. La plupart des nourrissons (moins de 18 mois), même avec une maladie métastatique, peuvent être guéris avec la chimiothérapie, et certains patients avec un motif spécial de métastases ont une forte probabilité de subir une régression spontanée de la tumeur sans chimiothérapie [56]. Les bases moléculaires du développement du neuroblastome et de sa progression sont encore mal comprises. Les altérations génétiques les mieux caractérisées comprennent l'amplification du proto-oncogène

MYCN, les mutations activatrices du gène ALK, le gain du bras de chromosome 17q et les pertes des bras 1p, 3p et 11q. Le neuroblastome est un cancer connu pour avoir très peu de mutations héréditaires avec seulement 1-2 % des patients ayant des antécédents familiaux de cette maladie [54, 57]. De ces 2 % de neuroblastomes héréditaires, deux mutations sont particulièrement connues et fréquentes, la mutation activatrice dans le gène ALK (dans 75 % des neuroblastomes héréditaires) et la mutation inactivatrice du gène PHOX2B (dans 5 % des cas héréditaires) [57, 58]. Des études ont identifié plusieurs polymorphismes de gènes associés à un faible risque qui comprennent BARD1, LMO1 et LIN28B [54, 59]. Cependant, aucun cas de neuroblastome héréditaire n'a été associé à des mutations germinales des gènes autres que ALK et PHOX2B, et aucune mutation n'a été associée à la régression spontanée [54].

2.1 La classification du neuroblastome

Le neuroblastome peut-être classé selon deux méthodes, soit par son stade de progression, soit par des facteurs de risque. Tout d'abord, pour la classification par stade, elle se fait par le système international de gradation du neuroblastome (INSS). Selon ce système de gradation, il existe 6 stades de neuroblastome : stade 1, 2 a, 2 b, 3, 4 et 4 S [60-62]. Le stade 1 est une tumeur localisée confinée à la zone d'origine et peut être enlevé complètement lors d'une intervention chirurgicale. Les ganglions lymphatiques attachés à la tumeur retirée pendant la chirurgie peuvent ou non contenir des cellules malignes, mais d'autres ganglions lymphatiques proches de la tumeur ne doivent pas en contenir [60-62]. Le stade 2a est une tumeur unilatérale avec résection incomplète. La tumeur se trouve seulement dans la région d'origine et ne peut pas être complètement enlevée lors de la chirurgie. Les ganglions lymphatiques avoisinants ne contiennent pas de cellules malignes [60-62]. Le stade 2 b est une tumeur unilatérale avec résection complète ou incomplète. La tumeur se trouve uniquement dans la

zone où elle a commencé et peut, ou ne peut pas, être complètement enlevée lors de la chirurgie, mais les ganglions lymphatiques avoisinants contiennent des cellules cancéreuses. Le stade 3 est une tumeur infiltrant à travers la ligne médiane avec ou sans la participation des ganglions lymphatiques, ou une tumeur unilatérale avec atteinte ganglionnaire controlatérale, ou encore une tumeur infiltrant à travers la ligne médiane avec atteinte des ganglions lymphatiques bilatéraux [60-62]. La tumeur bilatérale ne peut pas être enlevée par chirurgie. Elle se propage aux ganglions lymphatiques régionaux (ganglions lymphatiques proches de la tumeur) ou d'autres zones proches de la tumeur, mais pas à d'autres parties du corps. Le stade 4 est une tumeur diffusée aux ganglions lymphatiques éloignés, les os, la moelle osseuse, le foie, la peau et/ou d'autres organes [60-62]. Finalement, pour le stade 4S, la tumeur primaire est constituée par un stade 1, 2a ou 2 b et les métastases se retrouvent uniquement sur la peau, le foie et/ou la moelle osseuse, chez les nourrissons de moins d'un an. La propagation au niveau de la moelle osseuse est minime et doit représenter moins de 10 % des cellules de la moelle osseuse pour pouvoir être classifié 4S [60-62].

International Neuroblastoma Staging System (INSS)

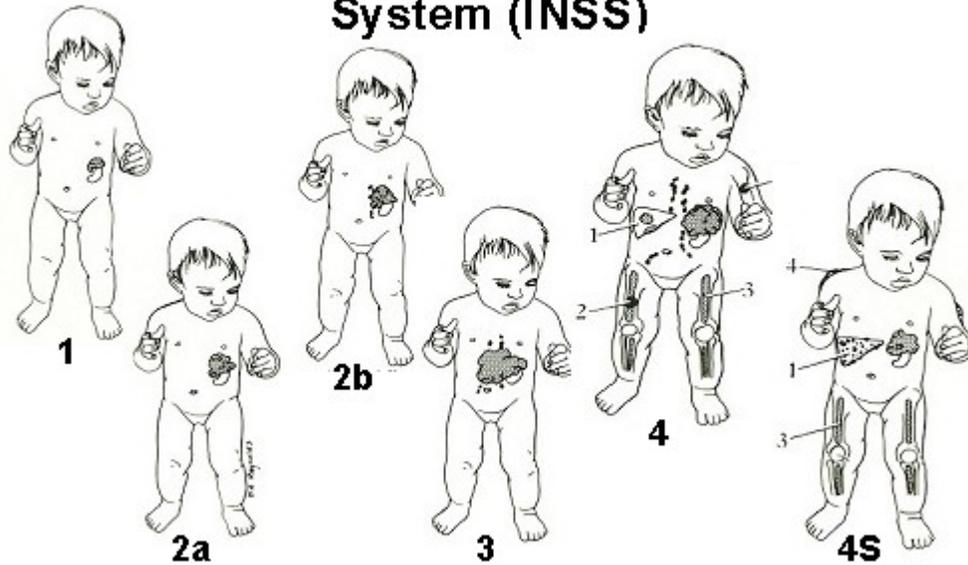


Figure 5. Stade des tumeurs de neuroblastomes en fonction du INSS :

Représentation des différents stades de neuroblastomes selon le système international de gradation du neuroblastome (INSS) ainsi que la localisation des tumeurs et les sites possibles de métastases (chiffre de 1 à 4).

De plus, le neuroblastome peut-être classé selon le système international de gradation du neuroblastome par groupes de risque (INGRSS) [63]. Ce système comporte 4 stades différents : L1, L2, M et MS. Le stade L est une tumeur localisée sans facteur de risque d'image définie. Le stade L2 est une tumeur localisée avec facteur de risque d'image définie. Le stade M est une tumeur métastatique et le stade MS est une tumeur métastatique spéciale équivalente au stade 4S [63, 64].

De plus, la classification par INSS et INGRSS est souvent associée à une gradation du risque de la tumeur : à très faible risque, à faible risque, à risque intermédiaire ou à haut

risque. Les facteurs déterminants le niveau de risque sont les suivants : l'âge au moment du diagnostic, la catégorie histologique, le grade de la tumeur ou comment la tumeur est différenciée, le statut d'amplification du gène MYCN, l'état du chromosome 11q et la ploïdie des cellules tumorales qui correspond au contenu en ADN des cellules tumorales [64, 65].

2.2 Les traitements pour le neuroblastome

De nos jours, on compte six traitements principaux soit : la chirurgie, la chimiothérapie, la radiothérapie, la transplantation de cellules souches/moelle osseuse, l'immunothérapie et la thérapie par l'acide rétinoïque [66-68].

Tout d'abord, la chirurgie est l'ablation de la tumeur et de certains tissus sains environnants pendant une opération. Si le cancer n'est pas propagé, la chirurgie peut parfois être utilisée pour enlever toute la tumeur [69, 70]. Cependant, la plupart des neuroblastomes sont diagnostiqués qu'après la propagation du cancer. Même si une tumeur ne peut pas être retirée en raison de son emplacement, une biopsie chirurgicale est effectuée pour déterminer le type de tumeur [69, 70]. Si la tumeur ne peut pas être complètement enlevée, l'enfant peut recevoir la radiothérapie et la chimiothérapie pour détruire les cellules cancéreuses restantes. En outre, le médecin peut faire une biopsie du foie ou de la moelle osseuse pour savoir si la maladie est propagée au foie ou la moelle osseuse [68, 69].

La chimiothérapie est l'utilisation de médicaments pour détruire les cellules cancéreuses, habituellement en arrêtant la capacité des cellules cancéreuses de se développer et à se diviser. La chimiothérapie systémique pénètre dans la circulation sanguine pour atteindre les cellules cancéreuses dans tout le corps [68, 71]. Un régime de chimiothérapie est généralement constitué d'un certain nombre de cycles donnés sur une période de temps

définie. La plupart des enfants atteints d'un neuroblastome devront avoir une chimiothérapie. La chimiothérapie peut être utilisée comme traitement principal pour le neuroblastome [68, 71]. Elle peut également être donnée avant la chirurgie pour réduire la charge tumorale ou après la chirurgie pour détruire les cellules cancéreuses restantes. Les médicaments utilisés pour la chimiothérapie sont les suivants : le busulfan (Busulfex, Myleran), le carboplatin (Paraplatin), le cisplatine (Platinol), la cyclophosphamide (Neosar), la doxorubicine (Adriamycine, Doxil), l'étoposide (VePesid, Toposar), l'ifosfamide (Ifex), le melphalan (Alkeran), le thiotépa, le topotecan (Hycamtin), la Vincristine (Vincasar) [66, 68, 69, 71].

La radiothérapie est l'utilisation de rayons X à haute énergie ou d'autres particules pour détruire les cellules cancéreuses. Le type le plus commun de traitement de radiothérapie est appelé la radiothérapie à faisceau externe, qui est un rayonnement donné à partir d'une machine à l'extérieur du corps [69-71]. Un régime de radiothérapie est généralement constitué d'un certain nombre de traitements donnés sur une période de temps définie. Les effets secondaires de la radiothérapie peuvent inclure la fatigue, les réactions cutanées légères, les maux d'estomac et les selles molles [69-71]. La plupart des effets secondaires disparaissent peu après que le traitement soit terminé.

Une greffe de cellules souches est une procédure médicale dans laquelle la moelle osseuse pathologique est remplacée par des cellules hautement spécialisées, appelées cellules souches hématopoïétiques [70-72]. Les cellules souches hématopoïétiques sont des cellules hématopoïétiques trouvées à la fois dans la circulation sanguine et dans la moelle osseuse. Aujourd'hui, cette procédure est plus communément appelée une greffe de cellules souches, plutôt qu'une greffe de moelle osseuse [70-72]. En effet, ce sont les cellules souches du sang qui sont typiquement transplantées, et non le tissu réel de la moelle osseuse. Avant de

recommander la transplantation, les médecins vont parler avec le patient sur les risques de ce traitement et tenir compte de plusieurs autres facteurs, tels que le type de cancer, les résultats de tout traitement antérieur, l'âge du patient et son état de santé générale [70-72]. Il existe 2 types de transplantation de cellules souches en fonction de la source des cellules souches du sang de remplacement : allogéniques (ALLO) et autologue (AUTO). Les transplants AUTO sont le plus souvent utilisés pour les enfants atteints d'un neuroblastome à haut risque. Dans une greffe AUTO, les propres cellules souches du patient sont utilisées. Les cellules souches sont obtenues à partir du patient quand il ou elle était en rémission d'un traitement antérieur. Les cellules souches sont ensuite congelées jusqu'à ce qu'elles soient nécessaires, généralement après que le traitement par immunothérapie à haute dose soit terminé [70-72]. L'objectif de la transplantation est de détruire les cellules cancéreuses dans la moelle osseuse, du sang et d'autres parties du corps et de permettre aux cellules souches de recréer une moelle osseuse saine. Dans la plupart des transplantations de cellules souches, le patient est traité avec des doses élevées de chimiothérapie pour détruire le plus grand nombre de cellules cancéreuses possible [70-72]. Cela détruit également les tissus de la moelle osseuse du patient et inhibe son système immunitaire. Après que le traitement à haute dose soit administré, les cellules souches du sang sont perfusées dans les veines du patient pour remplacer la moelle osseuse et restaurer la composition sanguine normale. Des études européennes suggèrent que le busulfan et le melphalan peuvent causer moins d'effets secondaires et peuvent également être plus efficaces que le carboplatine et l'étoposide [70-72]. Après la transplantation de cellules souches, de nouvelles cellules sanguines commencent à se faire, et se transforment en tissu sanguin sain en 10 jours à 3 semaines. Détruire la propre moelle du patient réduit les défenses naturelles du corps, laissant temporairement le patient à un risque accru d'infection.

Jusqu'à ce que le système immunitaire du patient soit de retour à la normale, les patients peuvent avoir besoin d'antibiotiques et des transfusions sanguines. Ils doivent également respecter certaines restrictions de sécurité fournies par l'équipe de soins pour éviter les infections [70-72].

Dans une greffe AUTO, il y a peu de risque de rejet de tissus, car les cellules souches de remplacement sont les propres cellules du patient. Cependant, il y a un risque dans une greffe autologue que certaines des cellules qui sont mises dans le patient puissent encore être cancéreuses [70-72].

Les rétinoïdes sont des substances qui sont semblables à la vitamine A. L'acide 13-cis-rétinoïque (RA) est donnée aux enfants atteints d'un neuroblastome à haut risque après l'achèvement du traitement de consolidation par greffe AUTO [70, 71]. Une étude a montré que lorsque des enfants qui étaient en rémission suite à une greffe de cellules souches ont reçu la RA, leurs risques de récurrences étaient réduits [70, 71].

Finalement, le dernier traitement couramment utilisé pour le neuroblastome à haut risque est l'immunothérapie [70, 71]. L'immunothérapie est conçue pour renforcer les défenses naturelles de l'organisme pour combattre le cancer. Elle utilise des composés faits soit par le corps, soit dans un laboratoire pour renforcer, cibler ou restaurer la fonction du système immunitaire. GD2 est un composé sur la surface des cellules, appelée disialoganglioside, que l'on trouve en grandes quantités dans la plupart des neuroblastomes [70, 71]. Une variété d'anticorps monoclonaux dirigés contre GD2 ont été utilisés pour traiter les patients atteints de neuroblastome [70-72]. Un anticorps monoclonal est une substance fabriquée dans un laboratoire qui agit comme les anticorps du système immunitaire de

l'organisme pour lutter contre des maladies telles qu'une tumeur. L'immunothérapie et la RA sont maintenant une partie du traitement standard pour les patients atteints d'un neuroblastome à haut risque [70-72].

2.3 Amplification du facteur de transcription MYCN

Depuis que MYCN a été découvert comme étant un facteur de transcription couramment amplifié dans le neuroblastome, les mécanismes par lesquels il contribue à la tumorigénèse du neuroblastome et des stratégies pour le cibler ont été étudiés intensivement [73, 74]. Il a été mis en évidence que l'amplification de MYCN dans les tumeurs est associée à de moins bons pronostics. Cela a conduit à l'intégration de MYCN dans les protocoles de stratification du risque pour le traitement du neuroblastome. Les gènes de la famille MYC (MYC, MYCN et MYCL) sont impliqués dans presque tous les processus biologiques [74, 75]. Les données indiquent que MYC et MYCN sont fonctionnellement interchangeables. MYCN a un rôle spatial et temporel plus restreint au cours du développement et principalement dans le développement neuronal [73-75].

MYC est un membre de la famille des facteurs hélice-boucle-hélice de transcription-fermeture éclair à leucine (bHLH-Zip) dont les membres se dimérisent avec MAX et se lient à des séquences d'ADN spécifiques appelées *E-box* [74, 76, 77]. MYC agit sur la transcription de 2 façons différentes. Tout d'abord par un mécanisme direct dans lequel le dimère MYC/MAX se lie avec la *E-box*, puis recrute des complexes de chromatine afin qu'ils activent ou répriment la transcription [76-78]. D'autre part, MYC peut agir par un mécanisme indirect dans lequel le dimère MYC/MAX entre en compétition avec d'autres facteurs de transcription bHLH-Zip pour se lier à la *E-box* et ainsi modifier l'activité d'un gène cible [78, 79]. MYC agit comme

un amplificateur direct de gènes transcriptionnellement actifs et ne provoque pas directement la transcription ou la répression *de novo* du gène exprimé. Compte tenu de l'absence d'une signature transcriptionnelle classique et de la dépendance apparente de MYC pour la chromatine, des études ont suggéré que MYC agit comme un régulateur épigénétique [73, 79].

MYC peut entraîner des modifications épigénétiques à un loci cible en relâchant la barrière nucléosomale, la rendant plus permissive pour la transcription. Il a été démontré que MYC se lie préférentiellement à l'euchromatine et aux locis sensibles à la DNase. MYC recrute des complexes macromoléculaires remodelant la chromatine à son loci cible [79, 80]. MYC cause ses effets oncogéniques en se liant à des cofacteurs via un domaine d'acides aminés hautement conservé dans son domaine de transactivation N-terminale appelé *MYC Box II* (MBII). Il a été démontré que la protéine de transformation/transcription associée à un domaine (TRRAP) se lie à MYC au site MBII. La suppression de MBII ou l'inhibition de TRRAP induit une transformation oncogénique [76, 79]. Grâce à TRRAP, MYC est en mesure de recruter les HAT GCN5 et Tip60 à ses cibles. En outre, MYC est également connu pour se lier à la protéine de liaison des motifs TATA (TBP), un membre du complexe de préinitiation de la transcription et à la protéine *cAMP-response-element-binding protein* (CBP), une moitié du complexe coactivateur CBP/p300, qui a des fonctions de HAT et de *scaffolding* [77, 79, 81]. Bien que TBP n'a pas d'activité de HAT, sa liaison à MYC suggère que MYC est en mesure de recruter l'ADN polymérase de type 2 (Pol II) pour activer la transcription. Par conséquent, grâce à ses partenaires de liaison, MYC est capable de réguler la chromatine pour exercer sa fonction. L'impact fonctionnel des histones acétylées est une réduction générale de la barrière nucléosomale, l'augmentation de la liaison de cofacteurs, et une activité accrue de Pol II, ce qui augmente l'activité transcriptionnelle [74, 79, 81]. GCN5 et Tip60 fonctionnent

de manière à favoriser la transcription par leur activité acétyltransférase, mais elle ne se limite pas aux histones. Il a également été démontré que MYC est un substrat de l'activité acétyltransférase et que GCN5, Tip60 et CBP/p300 peuvent tous acétyler MYC. L'acétylation de MYC stabilise la protéine et empêche sa dégradation par le protéasome augmentant ainsi l'activité de MYC [79, 82]. Cela démontre que non seulement les HAT recrutées par MYC sont essentielles à la transcription d'un gène cible, mais aussi qu'elles sont essentielles pour maintenir la fonction de MYC en le stabilisant [80, 83].

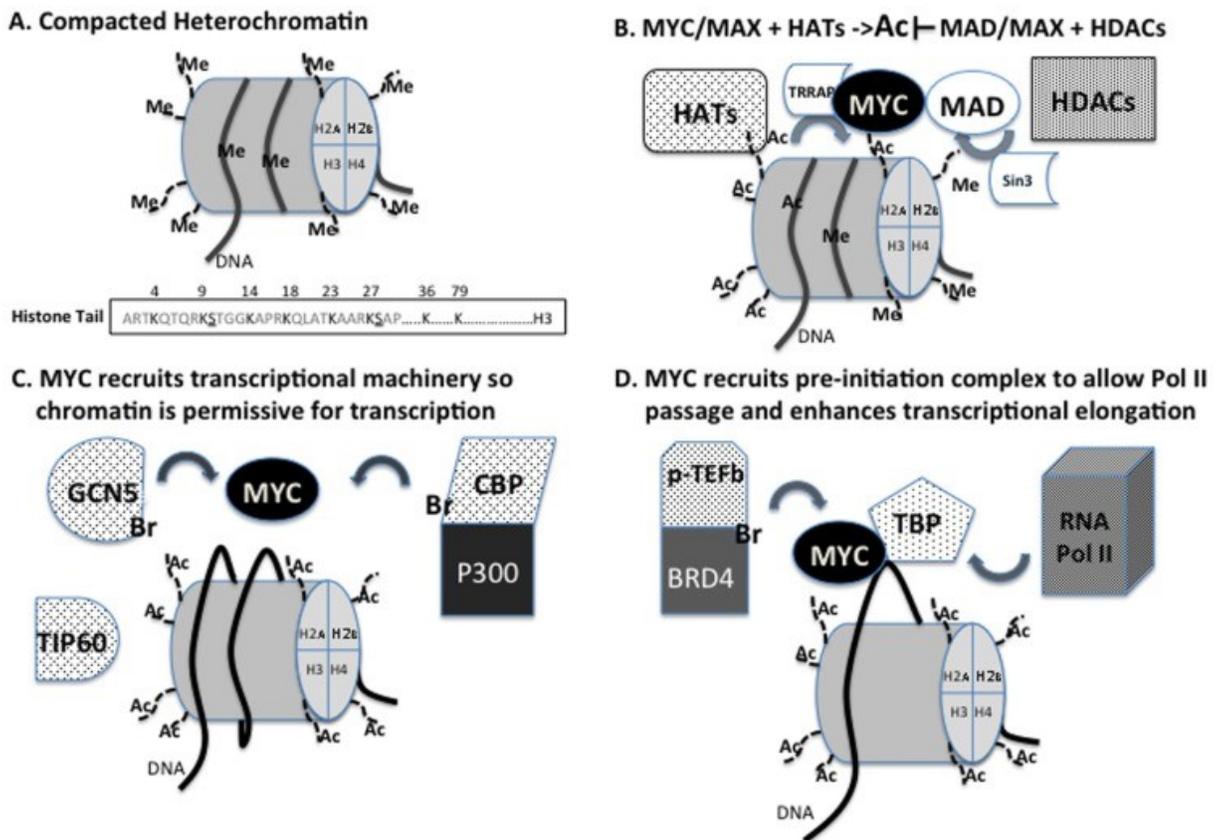


Figure 6. MYC forme un complexe avec MAX et se lie à l'ADN

Schéma représentant la formation du complexe MYC/MAX, ainsi que le recrutement de HATs par celui-ci au nucléosome(b,c). MYC recrute ensuite la machinerie transcriptionnelle à l'ADN décondensé(d) [79].

2.4 Altération génétique et épigénétique dans le neuroblastome

Le neuroblastome étant un cancer ayant très peu de mutations ponctuelles récurrentes, il est causé principalement par d'autres altérations génétiques et/ou épigénétiques. Tout d'abord pour les altérations génétiques, on retrouve deux types d'altérations différentes ayant le plus gros impact sur le neuroblastome [57, 58, 84]. Il y a l'amplification du facteur de transcription MYCN décrite précédemment ainsi que les aberrations chromosomiques. En général, les tumeurs de patients au stade 1 ou 2 sont hyperdiploïdes ou quasi-triploïde et ont peu, le cas échéant, d'aberrations de structure. Ce sous-type génétique de la tumeur est fréquent chez les patients de moins de 1 an, où les tumeurs sont localisées et ont un bon pronostic [84, 85]. Bien que la ploïdie peut prédire les effets chez les nourrissons, l'importance sur le pronostic de la ploïdie est perdue pour les patients âgés de 1 à 2 ans, probablement en raison des aberrations chromosomiques dans les tumeurs diploïdes qui contribuent à la dérégulation des voies liées au cancer [84, 85]. De nombreuses tumeurs de neuroblastome affichent un statut diploïde et ont des gains partiels, des pertes partielles, des amplifications ou d'autres aberrations chromosomiques. Des altérations chromosomiques structurelles récurrentes couramment associées à un stade avancé de la maladie et un mauvais pronostic comprennent la suppression des bras chromosomiques 1p, 3p, 4p et 11q, et le gain du bras de chromosome 17q [52, 54, 86].

La perte d'hétérozygotie (LOH) du bras court du chromosome 1p est identifiée dans 20 à 35 % des neuroblastomes. Cette aberration est fréquemment associée à l'amplification de MYCN. Elle est présente dans 70 % des neuroblastomes agressifs. Il a été rapporté que 1p LOH est indépendamment associée à un mauvais pronostic [67, 87, 88]. L'identification de gènes suppresseurs dans le sous-type génétique 1p LOH a été faite par l'identification de la

région la plus courte de la délétion hétérozygote (couvrant 261 kb) à 1p36.3. L'un des premiers gènes identifiés est le chromodomaine hélicase avec un domaine de liaison à l'ADN 5 (CHD5), situé sur la région 1p36.31 [67, 87, 88]. En outre, des études suggèrent fortement que l'inactivation du second allèle de CHD5 dans le neuroblastome produit une répression épigénétique. Un certain nombre de gènes suppresseurs de tumeur dans le neuroblastome ont été associés à 1p36 [84, 87-89].

Une autre aberration chromosomique commune associée à une tumeur agressive est 11q LOH, survenant dans environ 40-45 % des cas [52, 91, 92]. Bien qu'elle soit inversement corrélée avec l'amplification de MYCN, un petit sous-ensemble de tumeurs affiche à la fois une LOH 11q et une amplification de MYCN. De nombreuses études suggèrent que MYCN amplifié et une LOH 11q représentent deux sous-types distincts de tumeurs neuroblastomes, qui peuvent tous deux être associés à un mauvais pronostic. Actuellement, deux gènes ont été associés avec la perte de 11 q, soit : la perte du gène H2AFX, situé dans la région 11q23.3 [91-93]. Ce gène joue un rôle dans la modification de la stabilité génomique, et augmente le risque de cancer chez la souris. Le deuxième gène est la molécule d'adhérence cellulaire 1 (CADM1) qui transcrit une protéine d'adhésion cellulaire impliquée dans le développement des cellules nerveuses [91-93]. CADM1 était significativement régulée à la baisse dans les tumeurs avec 11q LOH et significativement associée aux stades avancés du neuroblastome et à un mauvais pronostic [91-93]. La surexpression de CADM1 a révélé une inhibition significative de la prolifération cellulaire et la formation de colonies ce qui démontre que l'expression CADM1 atténuée le phénotype malin des cellules en culture [91-93].

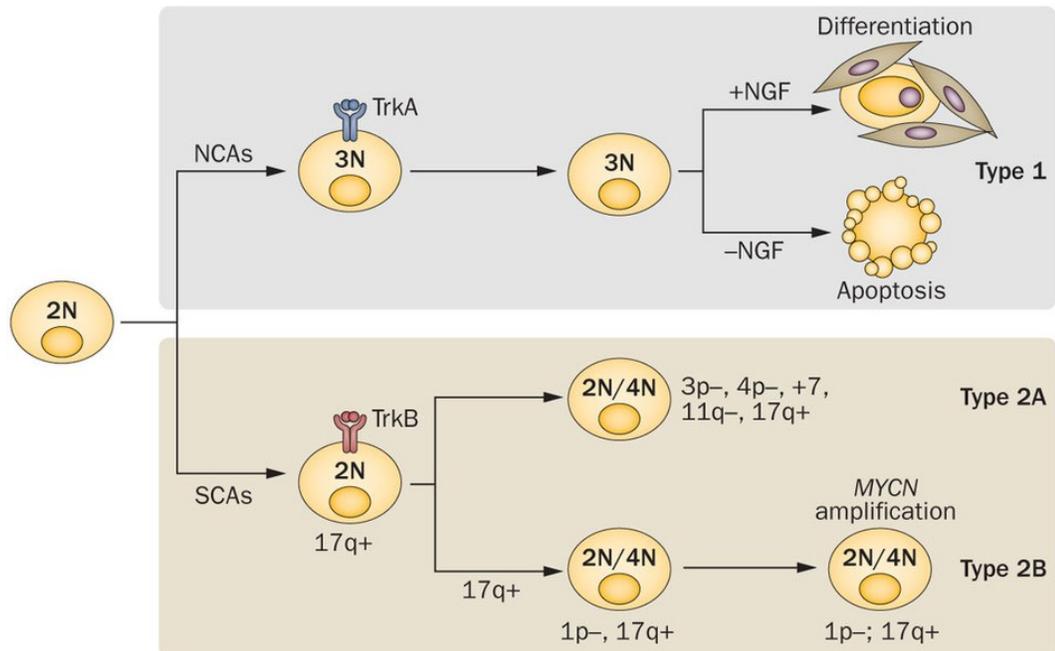


Figure 7. Les aberrations chromosomiques dans le neuroblastome :

Schéma de certaines aberrations chromosomiques menant au stade 1, 2A et 2B selon l'INSS dans le neuroblastome. Le type 1 est causé par une triploïdie lors de la division cellulaire alors que les types 2 sont causés par différents gain et perte de bras de chromosomes ainsi qu'une amplification de MYCN pour le type 2B [54].

L'aberration chromosomique la plus commune trouvée dans les tumeurs de neuroblastome est le gain déséquilibré de 17q (segment 17q21-qter), survenant dans environ 70 % des tumeurs [54, 94]. Fréquemment, cette aberration est causée par la translocation du secteur 17q21-qter et la partie distale des chromosomes 1p ou 11q [94, 95]. De nombreuses études ont rapporté qu'un gain de 17q est significativement associé à un stade avancé de la maladie, 1p LOH, 11q LOH et une amplification de MYCN [94, 95].

Ensuite, pour les altérations épigénétiques dans le neuroblastome, on retrouve principalement la méthylation de l'ADN. Comme mentionné précédemment, lorsqu'une région riche en cytosine et guanine appelée îlot CpG est méthylée dans le promoteur d'un gène, on observe une répression du gène [96, 97]. Or, le neuroblastome est un cancer connu pour être hyperméthylé et donc un grand nombre de gènes sont réprimés. Dans le neuroblastome, il y a des motifs spécifiques de méthylation qu'on peut détecter. Ces motifs sont appelés îlots CpG avec phénotype de méthylation (CIMP) [98, 99]. Ces CIMP auront un rôle très important dans le pronostic du neuroblastome comme on peut le voir à la figure 7 et ils peuvent servir comme marqueur de risque [98-100]. Dans le neuroblastome, on associe ces CIMP à la méthylation de plusieurs gènes impliqués dans le développement et la progression du cancer : RASSF1A, BLU, CYP26C1, FERD3L, CRYBA2, PCDHGC4, EMP3, HOXA9, NR1I2, CD44 et aussi CASP8 [98-101].

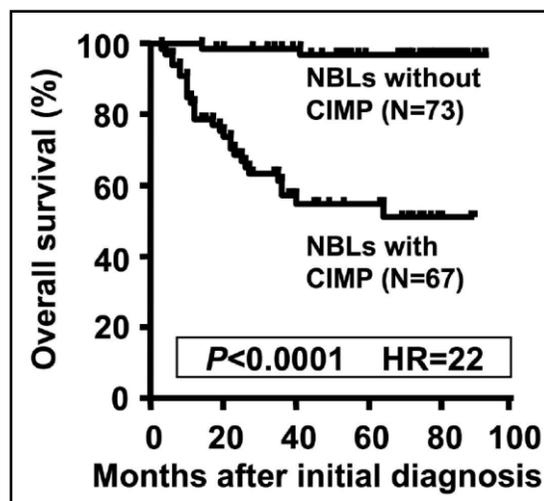


Figure 8. Les CIMP dans le neuroblastome:

Survie de patients atteints par le neuroblastome (NBLs) dans une cohorte japonaise montrant la différence de survie sur une période de 100 mois. Les patients ayant des CIMP ont une survie d'environ 50 % par rapport aux patients sans CIMP [98].

Une des voies de signalisation qui est grandement affectée par les CIMP est la voie de l'apoptose. Que se soit au niveau de la voie extrinsèque ou encore la voie intrinsèque, on retrouve des gènes hyperméthylés. Dans ces voies, les DR (death receptor) TRAILR1 et TRAILR2, les DCRs (decoy receptors) TRAILR3 et TRAILR4, CASP8, APAF1 et également RASSF1A sont méthylés dans les lignées cellulaires de tumeurs primaires et de neuroblastome [97, 102, 103]. Ainsi, la méthylation de l'ADN affecte les voies apoptotiques au niveau du récepteur et le niveau de la signalisation en aval, et inhibe donc l'apoptose [97, 102, 103].

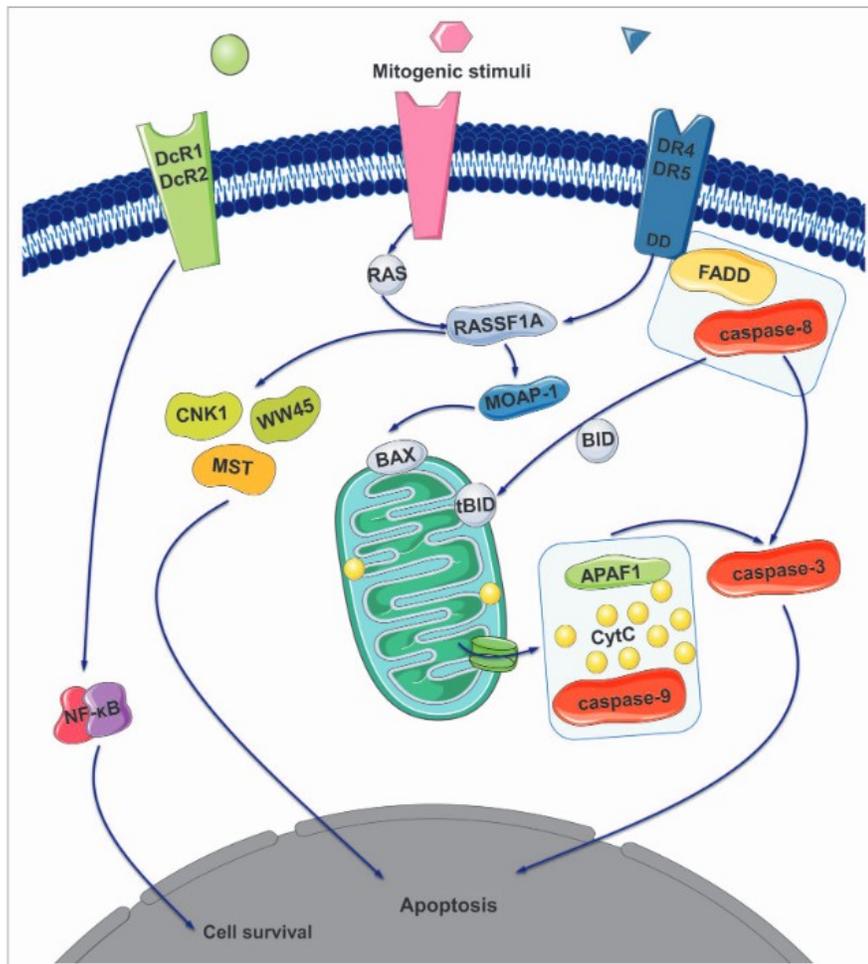


Figure 9. Voie de signalisation de l'apoptose dans le neuroblastome :

Les modifications épigénétiques qui répriment l'expression de la caspase 8 (Casp8), RASSF1A, TRAILR1 (DR4), TRAILR2 (DR5), TRAILR3 (DcR1) et TRAILR4 (DcR2) vont affecter plusieurs étapes de la cascade apoptotique et ainsi bloquer l'apoptose dans le neuroblastome [101].

3.0 Médicaments épigénétiques

3.1.1 Inhibiteurs des histones désacétylases

Les inhibiteurs des histones désacétylases (HDACi) sont divisés en quatre classes différentes en fonction de leur structure chimique [2, 104]. Les quatre classes de HDACi sont des acides gras à courte chaîne, des acides hydroxamiques, des peptides cycliques et des benzamides [105]. La grande majorité des HDACi qui sont déjà approuvés par la FDA ou qui sont actuellement en essais cliniques ciblent les classes d'HDAC I et II [104, 106]. Leur mécanisme d'action général est de bloquer le domaine catalytique des enzymes HDAC. Cet effet va empêcher les HDAC de reconnaître et de se lier sur ses cibles [2, 104]. Dans l'ensemble, les HDACi induisent une réactivation des gènes, la différenciation cellulaire et l'apoptose in vitro et in vivo [104, 107]. Ils inhibent aussi la formation de colonies et la progression du cycle cellulaire. Actuellement, il y a seulement quatre HDACi approuvés par la FDA pour le traitement du lymphome cutané à cellules T et le myélome multiple : le vorinostat (SAHA), la romidepsine, le belinostat et le panobinostat [104, 108, 109]. Les HDACi augmentent l'expression des gènes de différenciation et suppresseurs de tumeur dans de nombreux cancers [104, 105, 110]. Ils peuvent également inhiber la progression du cycle cellulaire en activant spécifiquement p21 et la voie de p53 [111]. Le Vorinostat et les autres HDACi exercent leurs effets par l'induction du stress oxydatif, et augmentent l'expression des gènes régulateurs du cycle cellulaire et les récepteurs de mort de surface cellulaire [36, 111]. Beaucoup de HDACi approuvés par la FDA et nouvellement développés sont actuellement en essais cliniques pour traiter différents types de cancers, incluant le mélanome, le méningiome, la leucémie et le cancer de la prostate (NCT01265953, NCT02032810, NCT01798901, NCT02282917) [112, 113]. Ces médicaments semblent bien fonctionner in vitro, mais

lorsqu'ils sont administrés à des patients, ils ont des effets limités. Par conséquent, des données récentes ont émergé interrogeant le mécanisme et l'efficacité des HDACi [112, 113]. Parce que ces composés augmentent l'acétylation des histones, ils peuvent en fait potentialiser les effets de recrutement de MYC par les bromodomains.

3.1.2 Les inhibiteurs des histones acétyltransférases

En comparaison avec les HDACi, les histone acétyltransférases (HATi) sont beaucoup moins caractérisées [105]. Le développement et l'évaluation de certains HATi in vitro sur des lignées cellulaires de leucémies ont démontré leur efficacité, mais seulement la curcumine, une molécule naturelle qui cible P300/CBP, est testée en essai clinique pour traiter des cancers du pancréas, du côlon et du sein (NCT02724202, NCT00094445, NCT00192842) [111]. La curcumine a montré des résultats prometteurs sur le cancer de la prostate in vitro. Les différences structurelles entre les familles de HAT ont permis le développement de molécules qui ciblent les HAT spécifiquement [114]. Par exemple, le α -méthylène- γ -butyrolactone 3 (MB-3) cible spécifiquement GCN5. MB-3 peut potentiellement être utilisé comme un supplément aux médicaments de chimiothérapie dans tous les patients porteurs de la translocation E2A-PBX1 puisque GCN5 stabilise cette translocation en l'acétylant [114]. Une autre molécule qui est actuellement étudiée est le garcinol, un inhibiteur de P300 et de PCAF d'origine naturelle. Il agit comme un HATi par liaison sur deux sites situés sur HAT, liant l'acétyl-CoA et le domaine de liaison de l'histone, supprimant ainsi la croissance des cellules [81, 115, 116]. En dehors de la curcumine, les inhibiteurs de CBP/P300 comprennent ICG-001, chetomin, et C646. ICG-001 inhibe les interactions entre CBP et la β -caténine spécifiquement, mais n'a aucun effet sur P300 [117, 118]. Lorsque testé contre la leucémie pré-B, ICG-001 induit la différenciation et élimine toutes les cellules cancéreuses résistantes

lorsqu'il est combiné avec des régimes de chimiothérapie conventionnels [117, 118]. Aussi, chetomin est une molécule qui bloque l'interaction entre CBP et P300 avec HIF-1, ce qui induit la différenciation cellulaire dans un modèle *in vitro* de gliome [119]. Enfin, le composé C646 cible spécifiquement ETO dans les leucémies myéloblastiques aiguës en induisant l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose. Il a également été démontré que C646 sensibilise les cellules de mélanome à des médicaments de chimiothérapie lors d'un traitement en combinaison [120, 121]. D'autres molécules ciblant TIP60 sont également en cours d'étude. Par exemple, l'acide anacardique sensibilise les cellules HeLa à la radiothérapie, alors que NU9056 et TH1834 diminuent la viabilité cellulaire dans des modèles *in vitro* de cancer de la prostate et du sein [122-124].

3.2 Inhibiteurs des ADN méthyltransférases

La décitabine (5-aza-deoxycytidine) et l'azacytidine (5-aza-cytidine) agissent comme des analogues nucléosidiques qui sont incorporés dans l'ADN des cellules qui se divisent et forment un complexe avec les DNMTs conduisant à leur dégradation, ce qui inhibe leurs fonctions [125-127]. Lors d'un traitement chez un patient avec un DNMTi, le traitement à faible dose induit un effet épigénétique, alors que les traitements à dose élevée induisent un effet cytotoxique dû à la formation d'adduits à l'ADN. Par conséquent, en traitant les patients avec une faible dose DNMTi, les effets cytotoxiques secondaires sont limités [128, 129]. Comme mentionné précédemment, des régions promoteurs de gènes suppresseurs de tumeur dans les cellules cancéreuses peuvent être hyperméthylées, conduisant à une répression épigénétique des gènes. Autres que la répression de gènes suppresseurs de tumeurs, des changements de méthylation de l'ADN affectent également les voies cellulaires clés [130]. Certains gènes souvent réprimés par une méthylation de l'ADN anormale dans le cancer

comme p16 et DAPK sont impliqués dans la régulation du cycle cellulaire et l'apoptose. En outre, les gènes impliqués dans la suppression de la voie de signalisation Wnt et la réparation de l'ADN sont deux cibles supplémentaires d'hyperméthylation de l'ADN conduisant à une répression génique [130]. Les DNMTi ont d'abord été introduits dans les années 1980 comme de nouveaux médicaments potentiels pour le traitement de maladies hématologiques, y compris la leucémie pédiatrique [131-133]. Malgré une augmentation de la survie et des effets globalement positifs, la décitabine a quelques points négatifs, tels que les effets anticancéreux non spécifiques, une très faible stabilité en solution et un temps de demi-vie court [2, 134]. Malheureusement, la durée de la rémission chez les patients traités avec les DNMTi est généralement de courte durée, et le développement de la résistance au traitement est souvent observé [134]. Afin de corriger les points négatifs, les chercheurs ont commencé à travailler sur plusieurs autres analogues de DNMTi qui sont plus stables, plus spécifiques et moins toxiques que les deux médicaments originellement approuvés par la FDA. Ces nouveaux médicaments, qui comprennent DHAC (dihydro-5-azacytidine), FCDR (5-fluoro-2-désoxycytidine) zebularine et SGI-110 sont actuellement en essais cliniques [105, 135]. Par conséquent, le besoin de combiner un traitement de DNMTi avec d'autres types de traitements épigénétiques ou cytotoxiques peut être la clé dans le traitement de certains sous-groupes de patients.

3.3 Combinaison de médicaments épigénétiques

En général, le traitement du cancer est impossible avec une thérapie simple à cause de l'hétérogénéité des tumeurs et le développement rapide de clones résistants. La même chose est vraie en ce qui concerne les thérapies épigénétiques. En tant qu'agent unique, les médicaments épigénétiques ne montrent pas de réponses fortes au traitement lorsqu'ils sont

administrés à des patients [136]. Cependant, en combinaison, le potentiel de la thérapie épigénétique peut être amplifié. Les cellules cancéreuses malignes deviennent dépendantes de niveaux de méthylation de l'ADN anormaux et de modifications spécifiques des histones afin de survivre. Par conséquent, en ciblant plus d'une marque épigénétique, les cellules malignes perdent la capacité d'exprimer certaines protéines clés nécessaires à leur survie [137, 138]. Plusieurs groupes ont montré des résultats prometteurs dans des études qui combinent des médicaments épigénétiques soit à l'immunothérapie ou soit à des traitements de chimiothérapie conventionnels.

4.0 Repositionnement de médicaments

Le chemin qui mène à un nouveau médicament disponible sur le marché est long et coûteux, impliquant en moyenne 15 ans et jusqu'à 1,8 milliard \$ US [150, 151]. Une stratégie plus efficace pour le développement de médicaments est d'utiliser de vieux médicaments pour de nouvelles indications [150, 151]. Bien que ce processus a gagné en popularité particulièrement pour le traitement de maladies infectieuses dans les pays en développement, sa portée et son potentiel ne sont pas très appréciés par de nombreux oncologues pédiatriques ou pédiatres en général [150, 151]. Le repositionnement devrait être particulièrement attrayant pour le traitement des enfants puisque l'utilisation de médicaments avec des profils de sécurité connus devrait permettre une accélération de nouvelles approches thérapeutiques [150, 151].

C'est dans cette optique que Raynal et ses collègues ont utilisé un modèle en 2012 pour évaluer la réactivation de l'expression de gènes dans des cellules du cancer du côlon après un traitement à la décitabine [152, 153]. Dans leur modèle, ils attachent une protéine fluorescente

verte (GFP) à un promoteur de cytomégalo virus hyperméthylée (CMV). Par conséquent, si l'expression de GFP est augmentée, cela implique que le traitement induit des modifications épigénétiques dans chaque structure de la chromatine d'une cellule ou de méthylation de l'ADN [153]. Ce modèle leur a permis de démontrer deux résultats importants. Tout d'abord, ils ont caractérisé les niveaux de méthylation de l'ADN comme le signal épigénétique à long terme pour déterminer si l'expression du gène est activée ou désactivée. Deuxièmement, ils ont démontré l'importance des modifications de la chromatine dans les changements d'expression des gènes transitoires, ce qui implique que la chromatine peut potentiellement être une cible importante dans les thérapies épigénétiques contre différents cancers [153]. Le même modèle CMV-GFP hyperméthylé a été utilisé en 2016, lorsque Raynal et ses collègues ont examiné plus de 1100 médicaments approuvés par la FDA pour évaluer leurs potentiels épigénétiques et anticancéreux avec deux types posologiques différents [154]. Ils ont identifié onze médicaments comme étant les plus efficaces pour réexprimer la GFP et les ont séparés en trois classes différentes. La première classe contient des médicaments qui ont induit l'expression la plus forte de la GFP, les trois médicaments épigénétiques approuvés par la FDA, la décitabine, l'azacytidine et le vorinostat [154]. Ensuite, le deuxième groupe de médicaments induisant la plus grande réexpression contenait cinq glucosides cardiaques (ouabaine, lanatoside C, digoxine, digitoxine et proscillaridine A) [154]. Fait intéressant, tous les glucosides cardiaques utilisés dans leur étude ont stimulé la réexpression de GFP. Enfin, la troisième classe contenait un antibiotique (oxyquinoline), un médicament anti-cancer (trioxyde d'arsenic) et un médicament utilisé dans le traitement de l'abus d'alcool chronique (disulfirame) [154]. Ils ont démontré également des changements dans les niveaux de calcium intracellulaire en tant que mécanisme anticancéreux potentiel des médicaments présentant des

propriétés épigénétiques nouvellement identifiées ; ces mêmes changements dans les niveaux de calcium ne sont pas observés dans les médicaments épigénétiques approuvés par la FDA. Par conséquent, ils ont suggéré que la signalisation du calcium est un régulateur clé dans l'activation de l'expression de gènes suppresseurs de tumeur dans les cellules cancéreuses [154].

Dans le cadre du projet de recherche sur le neuroblastome, l'équipe de Raynal a donc testé l'efficacité et les effets de trois des médicaments qui ont été retenus après le criblage des 1100 molécules. Ces médicaments sont les suivants : le pyrithione de zinc, la proscillaridine A et le disulfirame.

4.1 Le pyrithione de zinc

Le pyrithione de zinc est un complexe de zinc. Il a des propriétés antifongiques qui inhibent la division des champignons et bactériostatiques qui inhibe la division cellulaire bactérienne et il est utilisé dans le traitement de la dermatite séborrhéique et des pellicules [155-157]. Les ligands de pyrithione, qui sont des monoanions, sont chélatés au zinc via l'oxygène et le soufre. Dans l'état cristallin, la pyrithione de zinc existe sous la forme d'un dimère centrosymétrique, où chaque zinc est lié à deux soufres et trois oxygènes. Le pyrithione de zinc a une longue histoire de nombreuses applications médicales, scientifiques et industrielles. Il a un fichier maître enregistré auprès de la FDA [156]. Plus récemment, une de ces multiples applications est dans le cadre de traitement du cancer [157, 158]. En effet, le maintien de la concentration en zinc est un élément critique pour la survie des cellules. L'augmentation ou la diminution des niveaux de zinc peut déclencher l'apoptose dans une variété de types de cellules. La dérégulation de l'homéostasie du zinc est également liée au développement du

cancer [157, 158]. La carence en zinc est associée à un mauvais pronostic du carcinome à cellules squameuses buccal, du cancer de l'œsophage, du cancer de la prostate et le cancer du sein [155, 157, 158].



Figure 10. Représentation de la structure chimique du pyritione de zinc.

4.2 La proscillaridine A

La proscillaridine A est un membre de la famille de bufadiénolide glycoside cardiotonique extrait de la plante *Scilla* [159]. Au cours de plusieurs études de repositionnement de médicament, il a été démontré que ce glycoside cardiotonique avait des activités anticancéreuses dans de nombreuses lignées cellulaires [160-162]. Par exemple, la proscillaridine A induit l'apoptose et des effets anti-prolifératifs dans diverses lignées cellulaires de cancer du sein *in vitro*, principalement par des fluctuations des taux de calcium [160, 162]. De plus, il a été démontré que la proscillaridine A inhibe les enzymes topoisomérases dans les cellules cancéreuses du sein, ce qui conduit à la mort cellulaire. Il a été montré que la proscillaridine A inhibe la croissance de lignées cellulaires de glioblastomes *in vitro*, en plus de diminuer considérablement le volume des tumeurs et d'augmenter la survie des souris greffées [161]. Malheureusement, proscillaridine A, ainsi que d'autres bufedienolides, ont une très petite fenêtre thérapeutique avec des concentrations plasmatiques entre 1 et 10 nM chez les humains et les doses doivent être très faible pour limiter la

cardiotoxicité et la neurotoxicité. En dépit du risque de toxicité élevée, proscillaridine A a des effets antitumoraux évidents qui peuvent être utilisés pour traiter les patients atteints de cancers [161, 162].

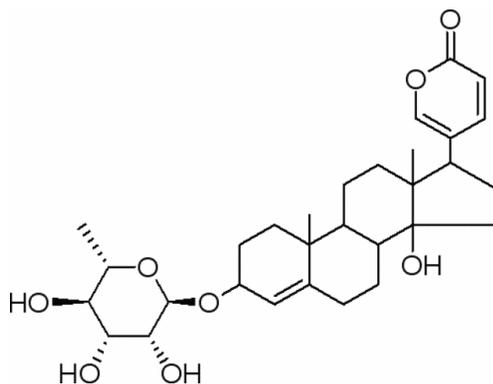


Figure 11. Représentation de la structure chimique de la proscillaridine A.

4.3 Le disulfirame

Le disulfirame est un médicament de dissuasion contre l'alcoolisme chronique. Il a été découvert en 1920 et approuvé par la FDA en 1951. Le disulfirame inhibe l'aldéhyde déshydrogénase et empêche le métabolisme du métabolite principal de l'alcool, l'acétaldéhyde [163-165]. Boire de l'alcool dans les deux semaines suivant la prise de disulfirame mène à une accumulation d'acétaldéhyde dans le sang. Cela provoque des effets secondaires désagréables tels que la transpiration, des maux de tête, des dyspnées, des bouffées vasomotrices, l'hyperactivité sympathique, des palpitations, des nausées et des vomissements [163-165]. La dose adulte normale de disulfirame dans le traitement de l'alcoolisme est de 500 mg par jour, ce qui correspond à une concentration approximative de 20 μ M chez un individu de 100 kg [164]. Depuis quelques années, des études ont montré que le disulfirame pouvait avoir des effets anticancéreux [165-168]. Le disulfirame a été démontré pour avoir un

effet direct sur au moins trois voies importantes dans le cancer. Il peut induire l'apoptose, agir comme un agent antiangiogénique et empêcher la formation de métastases et réduire l'invasion des tissus sains [164, 168, 169]. Il a également des effets synergiques avec les médicaments anticancéreux actuels en désactivant la pompe MDR [163, 164, 169].

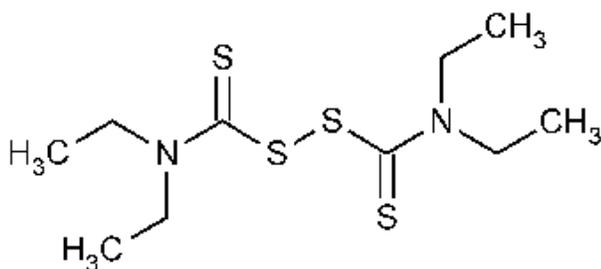


Figure 12. Représentation de la structure chimique du disulfirame.

5.0 Objectif du projet

Mon projet de maîtrise a pour but d'évaluer le potentiel de trois médicaments déjà approuvé par la FDA dans le traitement du neuroblastome. Ces trois médicaments sont le disulfirame, le zinc de pyrithione et la proscillaridine A. Puis, dans un second temps, de déterminer le mécanisme d'action par lequel le médicament le plus efficace fonctionne.

6.0 Article

NEW EPIGENETIC THERAPY WITH DISULFIRAM FOR THE TREATMENT OF NEUROBLASTOMA

Simon JACQUES-RICARD^{1,2}, Gregory ARMAOS^{1,2}, Elodie DA COSTA^{1,2}, Annie BEAUDRY², Noël J-M RAYNAL^{1,2*}

1. Département de pharmacologie, Faculté de médecine, Université de Montréal
2. Centre de recherche du CHU Sainte-Justine

*Corresponding author : noel.raynal@recherche-ste-justine.qc.ca

(in preparation for Oncogene short-communication)

6.1 Abstract

Pediatric neuroblastoma is one of the most common extracranial cancers in children. Despite an improvement in survival with the currently available therapies, neuroblastoma with an amplification of the transcription factor *MYCN* has a very poor prognosis. New therapeutic approaches must be developed to increase the survival of patients. One such approach is epigenetic drug therapy. Neuroblastoma, like many other pediatric cancers, contains several epigenetic alterations at the level of DNA methylation and histone modifications. In a screening of FDA-approved drugs, we discovered some molecules having characteristics of epigenetic drugs that were unknown until now. Our study demonstrated the efficacy of these molecules in the treatment of neuroblastoma cell lines. Following preliminary tests, one of the

molecules approved by the FDA stood out: disulfiram, a medication approved for the treatment of chronic alcoholism. We treated neuroblastoma cell lines (*MYCN* amplified: IMR-32, N91 and SK-N-DZ; *MYCN* non-amplified: SK-N-AS and SK-N-SH) for 48 hours with disulfiram at clinically relevant concentrations (from 10 nM to 20 μ M). Our results demonstrated a 50% growth inhibition (IC₅₀) of 80nM for the cell lines tested. In addition, after analysis by flow cytometry, we found a cell cycle block in G2/M. RNA sequencing also revealed that disulfiram affects many genes (downregulated n=508, upregulated n=207). We also observed a decrease in the transcription factor *MYCN* and a reduction in acetylation of several histone marks by Western blot's analysis. Further studies are underway to determine the mechanism of action of disulfiram. This study shows the potential of disulfiram in the treatment of neuroblastoma.

Key words: Epigenetic, Neuroblastoma, *MYCN*, Disulfiram, pharmacology

6.2 Introduction

Neuroblastoma is one of the most frequent extracranial cancer in children and account for 8–10% of pediatric cancers in the USA and Europe. Furthermore, neuroblastoma is a very aggressive tumor accounting for more than 15% of childhood cancer mortality and have a poor prognosis in children over the age of two years old with a survival rate of only 40% [51, 54, 86]. Neuroblastoma is rarely due to hereditary mutations of *ALK* and *PHOX2B* (1–2% of neuroblastoma) [54] and is mostly regulated by epigenetic deregulation, chromosome aberrations and an amplification of the transcription factor *MYCN* [51, 54, 86, 94]. *MYCN* is present in 20–30% of neuroblastoma and is associated with advance stages of disease, high malignant phenotype and a very poor outcome in patients [170, 171]. When *MYCN* bind with

MAX to form a dimer *MYCN/MAX*, it can regulate a very large number of genes involve in many different pathways such as cell proliferation, differentiation and apoptosis [51, 79]. *MYCN* can regulate gene transcription by modifying the chromatin structure. Indeed, after *MYCN* form a dimer with *MAX* it can recruit histone acetyltransferase (HATs) to the promoter of a specific gene and activate their transcription [78, 79]. Unfortunately, despite an improvement in survival with the current therapies, neuroblastoma has a poor prognosis [51, 70, 99]. New therapeutic approaches must be developed to increase the survival of patients. One such approach is epigenetic drug therapy. In a screening of FDA-approved drugs, we discovered some molecules having characteristics of epigenetic drugs that were unknown until now [154]. Our study seeks to demonstrate the efficacy of these molecules in the treatment of neuroblastoma cell lines. Following preliminary tests, one of the molecules approved by the FDA stood out: disulfiram, an inhibitor of aldehyde dehydrogenase approved for the treatment of chronic alcoholism since 1951 [165, 169].

6.3 Results and Discussion

First, we investigated the effects of disulfiram in multiple neuroblastoma cell lines with an amplification of *MYCN* (IMR-32, SK-N-DZ and IGR-N91 hereafter named N-91) and without it (SK-N-AS and SK-N-SH) (Fig.1A). Surprisingly, disulfiram had a 50% growth inhibition concentration (IC50) of around 80nM in all cell lines with the exception of IMR-32 who had an IC50 at 26 nM which was more than a thousand times lower than the concentration of 20 μ M currently given to patients [164]. For practical reasons, the N-91 cell line was used to do most of the experiments hereafter. Next, we studied the cell cycle at concentration around the IC50 and we observed a block in G2/M and depletion of cells in S phase (Fig. 1C, D). The block in G2/M and the low percent of cells in the sub G1 phase

indicated that cells stop to grow but didn't necessarily die by apoptosis. Trying to understand this, we studied cell differentiation and we found that a small population of N-91 cells did differentiate as shown by the formation of neurites and changes in morphology induced by disulfiram (Fig. 1B). Finally, we did clonogenic assays to investigate if disulfiram could affect the colony formation. As shown in (Fig. 1E, F), disulfiram completely inhibited the colony formation at a concentration of 300 nM. These results suggested that disulfiram has a great potential in the treatment of neuroblastoma by inhibition of cell proliferation.

To have a better understanding of the mechanism of action of disulfiram in the N-91 cell line and how the cells are affected, we performed RNA sequencing. Interestingly, after treating the cells for 48h at a concentration of 50 nM more than 715 genes had a significant change in expression. 207 were upregulated and 508 were downregulated (fig. 2 A) showing that disulfiram had a large range of action. Doing gene set enrichment analysis, the data revealed that many pathways were modified by disulfiram. Indeed, in untreated cells, we observed an enrichment for G2/M checkpoint as well as for *E2F* targets, both involved in the cell cycle pathways (Fig. 1B, C). Of those gene sets, 2 upregulated genes stood out: *TGFβ1* and *CDKN1A* (p21) both genes negatively regulating cell proliferation. Also, we observed a downregulation of many genes that positively regulate cell proliferation such as *E2F1*, *E2F8*, *CDC25a* and *CDKN2C* (Fig. 2D). Another pathway changed by disulfiram was the proteins involved in chromatin structure (Fig. 2F). Surprisingly, a very interesting gene was downregulated, *TERT*, known to be deregulated in neuroblastoma and favoring tumor progression [172]. Other genes downregulated in this gene set were the proto-oncogene *JUNB*, chromatin assembling *CHAF1A*, two variants of histone 2A *H2AFX* and *H2AFY* and also DNA

polymerase *POLA1* (Fig 2E). All genes downregulated in this set were involved in the DNA transcription and replication supporting cell duplication.

To understand the changes in gene expression saw after the RNA sequencing, we investigated many different chromatin modifiers. More specifically, we studied methylation and acetylation of histone 3 (H3) and histone 4 (H4) on many residues. After treating *MYCN* amplified N-91 and non-*MYCN* amplified SK-N-AS cells at two concentrations and three time points, we observed a decrease of acetylation on lysine (K) residues 9, 14 and 27 of H3 only (Fig. 3 A, B, C and D). Furthermore, the methylation of H3 as well as acetylation and methylation of H4 at global level did not changed on any of the lysine residues tested (data not shown). All three histone marks that decreased significantly played a role in gene activation and resulted in gene expression. These results were in accordance with data obtain by the RNA sequencing. To investigate whether disulfiram interacts directly with histone marks or not, we looked at histone acetyltransferase (HAT) and histone deacetylase (HDAC) expression. All HDACs and HATs (*GCN5*, *TIP60*, *HBO1*) that we investigated did not change significantly with the exception of *CBP* (Fig. 3E, F). After 48h of treatment, *CBP* was drastically decreased and could explain the change on histone residue H3K27ac.

Finally, we asked whether or not disulfiram could affect *MYCN* expression. Since it was known that *MYCN* could hardly be targeted by current drugs [50, 173]. Furthermore, *MYCN* is also known to play a role in the acetylation of histones by recruiting HATs such as *CBP* to gene promoters [82, 174]. As shown on (Fig. 4 A, C), disulfiram significantly decreased the level of *MYCN* by half after 48h of treatment at a concentration of 250 nM. However, when non-amplified *MYCN* cell line SK-N-AS was treated with disulfiram no changes were observed. To expand our understanding of *MYCN* in neuroblastoma, we

immunoprecipitated (IP) *MYCN* after short-term treatment and looked at pan-acetylation of lysine. Surprisingly, after only two hours, the acetylation of *MYCN* was drastically decreased (Fig. 4D) but we also saw an increase in acetylation at 24h. This increase of acetylation of *MYCN* once quantified could be explained due to the decrease of *MYCN*. Also, looking at multiple genes set from the RNA sequencing, *MYC* and *MYC* target genes seemed to be downregulated in cells after disulfiram treatment (Fig. 4 E, F). Of those gene sets, *MYCN*, *MXD3*, *MXD4* and *MNT* were all downregulated and involved in the complex formation of *MYCN/MAX*. From that gene set, three more genes were interesting, *CBX3*, involved in the formation of heterochromatin, *WDR4* and *WDR43*, involved in the formation of protein complex.

In this study, we used the neuroblastoma cell line N-91 as our model to evaluate the efficiency of disulfiram. Interestingly, we found that disulfiram could inhibit proliferation and block the cell cycle in G2/M at concentration that is more than a thousand times lower than the concentration measured in the plasma of patients [164]. Still in the same range of concentration, we demonstrated that the colony formation was completely inhibited and that a small population of cells differentiated after treatment. Our RNA sequencing results show that disulfiram affected the regulation of many of genes (n=715) and most of them were downregulated (n=508). Genes involved in the G2/M checkpoint and *E2F* target are downregulated after treatment. Furthermore, RNA sequencing allowed us to identify a downregulation of *JUNB* and more interestingly of *TERT* who is involved in the elongation of telomeres and highly deregulated in neuroblastoma [172]. Seeing such important genes downregulation, we studied the epigenome and we identified three histone lysine residues to

be deacetylated. The H3K27ac mark deacetylation could be explained by a decrease in the protein level of HAT *CBP*. Finally, we demonstrated that disulfiram could decrease RNA and protein levels of *MYCN*. Furthermore, *MYCN* acetylation was decreasing rapidly after treatment destabilizing even more the function of *MYCN*. Taken together, these results showed that disulfiram had a lot of potential in the treatment of not only neuroblastoma but also other cancers with an amplification of *MYCN* such as glioblastoma and medulloblastoma.

6.4 Materials and methods

Cell Culture and Drug Treatments

Neuroblastoma cell lines SK-N-AS, SK-N-SH, IMR-32 and SK-N-DZ were purchased from American Type Culture Collection. IGR-N91 cell line was provided from Dr. Michel Duval laboratory. SK-N-DZ, SK-N-AS and IGR-N91 cell lines were cultured in Gibco DMEM medium supplemented with 10% fetal bovine serum at 37 °C and 5% CO₂. IMR-32 and SK-N-SH cell lines were cultured in Gibco MEM medium supplemented with 10% fetal bovine serum at 37 °C and 5% CO₂. Disulfiram was dissolved in 100% dimethyl sulfoxide (DMSO) at stock concentration of 10 mM and stored in -20 °C for one month. ORFLO MOXI Mini Automated Cell Counter was used to analyze growth inhibition after treatment.

Cell Cycle Analysis

To analyze effects of disulfiram on the cell cycle by Fluorescence-activated Cell Sorting (BD FACS Canto II), cells were treated with for 48 hours at three different concentrations (25, 50, or 100 nM). Cells were then harvested, fixed, and stained with bromodeoxyuridine (BrdU) and/or 7-amino-actinomycin (7-AAD) (BD Pharmingen BrdU Flow Kit). Untreated, BrdU-only, and 7-AAD-only stained cells were used to set up compensation controls.

Analysis of Whole Cell Proteins and Histones by Western Blot

Cell pellets were lysed in cold whole cell lysis buffer (50mM Tris-Cl pH7.4, 5mM EDTA, 250mM NaCl, 50mM NaF, 0.1% Triton, 0.1mM Na₃VO₄, and 1mM PMSF). Lysis buffer was supplemented with protease inhibitor cocktails (PIC) and phosphatase inhibitor cocktail (phospho-stop).

For histone extraction, cell pellets were lysed in cold Triton Extraction Buffer (TEB) (0.5% Triton, 2mM PMSF, 0.02% NaN₃, 10mM sodium butyrate) used for histone acid extraction (ABCAM protocol). TEB was supplemented with protease inhibitor cocktails (PIC) and phosphatase inhibitor cocktail (phospho-stop). Protein extracts were separated by SDS-PAGE and transferred onto a polyvinyl difluoride (PVDF) membrane. Membranes were tagged with rabbit (goat anti-rabbit HRP from BIO RAB) or mouse (goat anti-mouse HRP from BIO RAD) primary antibodies and incubated overnight at 4 °C. Proteins of interest were detected by either rabbit or mouse secondary antibodies and visualized using BIO RAD ECL. Quantification of western blots were conducted using the ImageJ program.

RNA Extraction and RNA sequencing

QIAshredder (catalog number: 75654) was used prior to RNA extraction to homogenize cell lysates and eliminate any debris. Total RNA was extracted using RNeasy Mini Kit (catalog number: 74104) according to instruction manual. Upon RNA extraction, 10 µg of purified extract were treated with DNase to eliminate any potential DNA contamination. Upon DNase treatment, RNA quality and yield were verified with Bioanalyser chips using Agilent RNA 6000 Nano kit according to manufacturer's instructions. The mRNA libraries were created using TruSeq Stranded mRNA LT using 25 ng of mRNA extract (catalog number: RS-122-2101). RNA sequencing was performed using HiSeq2500 on "rapid

run” mode. Gene set enrichment analysis was conducted using the “GSEA – Broad Institute” program available online: www.broadinstitute.org/gsea

6.5 Conflict of interest

The author declares no conflicts of interest.

6.6 Acknowledgements

We would like to kindly thanks Dr. Michel Duval for providing the cell lines SK-N-DZ, SK-N-AS and IGR-N91. We would also like to thank Dr. Daniel Sinnett labs for performing the RNA sequencing and Dr. Serge McGraw for assisting us in the analysis.

6.7 References

- 1 Abe M, Ohira M, Kaneda A, Yagi Y, Yamamoto S, Kitano Y *et al.* CpG island methylator phenotype is a strong determinant of poor prognosis in neuroblastomas. *Cancer Res* 2005; 65: 828-834.
- 2 Brodeur GM, Seeger RC, Schwab M, Varmus HE, Bishop JM. Amplification of N-myc in untreated human neuroblastomas correlates with advanced disease stage. *Science* 1984; 224: 1121-1124.
- 3 Brodeur GM. Neuroblastoma: biological insights into a clinical enigma. *Nat Rev Cancer* 2003; 3: 203-216.
- 4 Brodeur GM, Bagatell R. Mechanisms of neuroblastoma regression. *Nat Rev Clin Oncol* 2014; 11: 704-713.
- 5 Chick J. Safety issues concerning the use of disulfiram in treating alcohol dependence. *Drug Saf* 1999; 20: 427-435.
- 6 Corvetta D, Chayka O, Gherardi S, D'Acunto CW, Cantilena S, Valli E *et al.* Physical interaction between MYCN oncogene and polycomb repressive complex 2 (PRC2) in neuroblastoma: functional and therapeutic implications. *J Biol Chem* 2013; 288: 8332-8341.

- 7 Domingo-Fernandez R, Watters K, Piskareva O, Stallings RL, Bray I. The role of genetic and epigenetic alterations in neuroblastoma disease pathogenesis. *Pediatr Surg Int* 2013; 29: 101-119.
- 8 Frank SR, Parisi T, Taubert S, Fernandez P, Fuchs M, Chan HM *et al.* MYC recruits the TIP60 histone acetyltransferase complex to chromatin. *EMBO Rep* 2003; 4: 575-580.
- 9 Gustafson WC, Meyerowitz JG, Nekritz EA, Chen J, Benes C, Charron E *et al.* Drugging MYCN through an allosteric transition in Aurora kinase A. *Cancer Cell* 2014; 26: 414-427.
- 10 He S, Liu Z, Oh DY, Thiele CJ. MYCN and the epigenome. *Front Oncol* 2013; 3: 1.
- 11 Johansson B. A review of the pharmacokinetics and pharmacodynamics of disulfiram and its metabolites. *Acta Psychiatr Scand Suppl* 1992; 369: 15-26.
- 12 Katzenstein HM, Kent PM, London WB, Cohn SL. Treatment and outcome of 83 children with intraspinal neuroblastoma: the Pediatric Oncology Group experience. *J Clin Oncol* 2001; 19: 1047-1055.
- 13 Ogiwara H, Sasaki M, Mitachi T, Oike T, Higuchi S, Tominaga Y *et al.* Targeting p300 Addiction in CBP-Deficient Cancers Causes Synthetic Lethality by Apoptotic Cell Death due to Abrogation of MYC Expression. *Cancer Discov* 2016; 6: 430-445.
- 14 Peifer M, Hartwig F, Roels F, Dreidax D, Gartlgruber M, Menon R *et al.* Telomerase activation by genomic rearrangements in high-risk neuroblastoma. *Nature* 2015; 526: 700-704.
- 15 Puissant A, Frumm SM, Alexe G, Bassil CF, Qi J, Chanthery YH *et al.* Targeting MYCN in neuroblastoma by BET bromodomain inhibition. *Cancer Discov* 2013; 3: 308-323.
- 16 Raynal NJ, Lee JT, Wang Y, Beaudry A, Madireddi P, Garriga J *et al.* Targeting Calcium Signaling Induces Epigenetic Reactivation of Tumor Suppressor Genes in Cancer. *Cancer Res* 2016; 76: 1494-1505.
- 17 Sauna ZE, Shukla S, Ambudkar SV. Disulfiram, an old drug with new potential therapeutic uses for human cancers and fungal infections. *Mol Biosyst* 2005; 1: 127-134.
- 18 Seeger RC, Brodeur GM, Sather H, Dalton A, Siegel SE, Wong KY *et al.* Association of multiple copies of the N-myc oncogene with rapid progression of neuroblastomas. *N Engl J Med* 1985; 313: 1111-1116.

- 19 Stafman LL, Beierle EA. Cell Proliferation in Neuroblastoma. *Cancers (Basel)* 2016; 8.

6.8 Figures

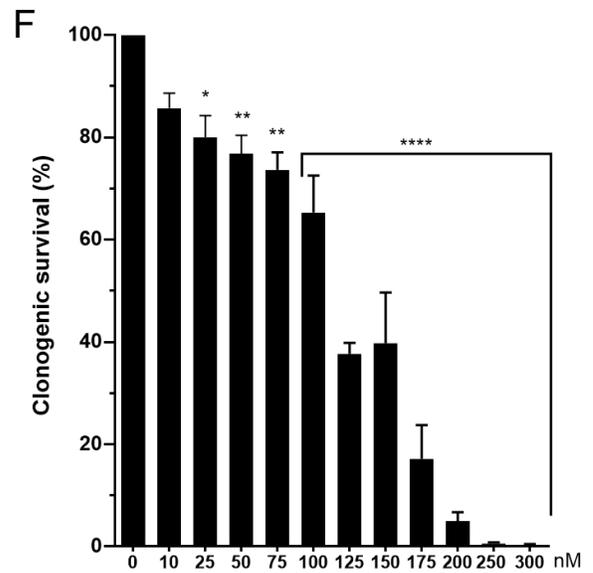
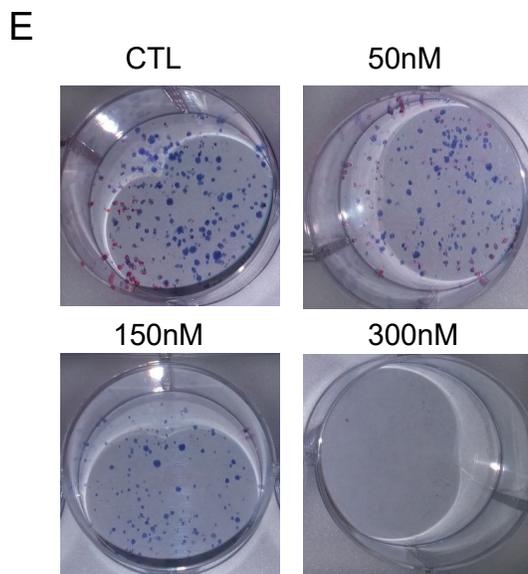
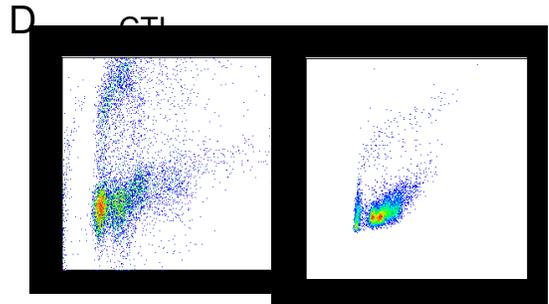
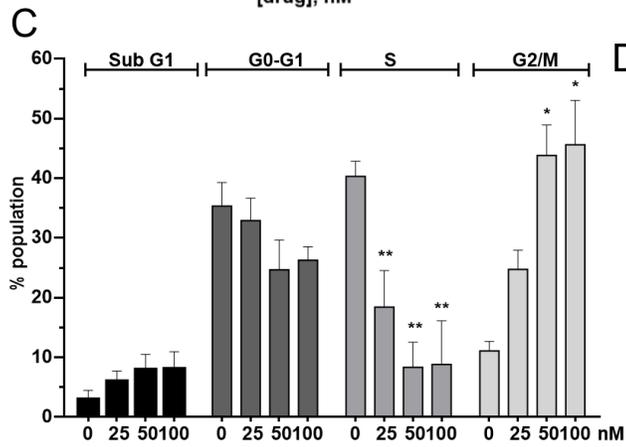
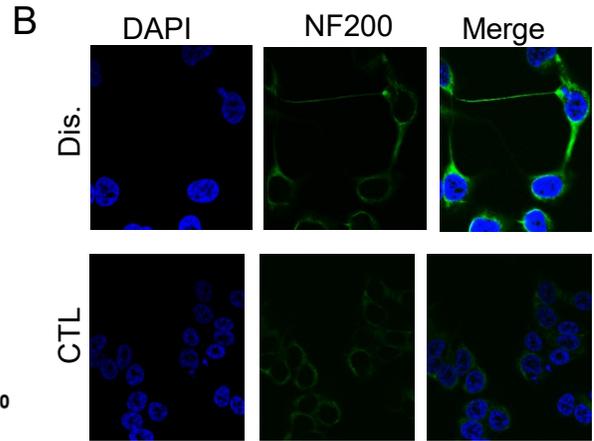
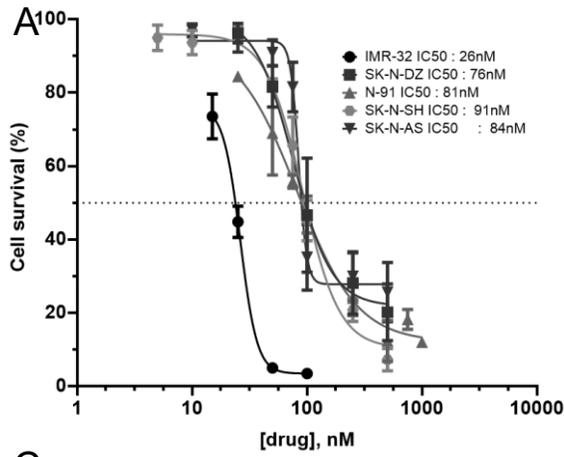


Figure 1: **Disulfiram affects cell viability in neuroblastoma cell lines:** MYCN amplified cells (SK-N-DZ, N-91 and IMR-32) as well as non-MYCN amplified (SK-N-AS and SK-N-SH) cell lines were treated with disulfiram for 48h at concentration from 1 nM to 1 μ M (A). Cell differentiation was evaluated using the neuroblastoma differentiation marker NF200 the N-91 cells after 48h of disulfiram treatment at 50 nM (B). The cell cycle analysis was performed by flow cytometry using a BrdU kit after treating N-91 cells for 48h at concentration of 25, 50 and 100nM of disulfiram (C, D). The clonogenic assay, 6 wells plates were seeded with 500 N-91 cells and treated with disulfiram for 48h at concentration from 10 to 300 nM, colonies were then counted (E, F).

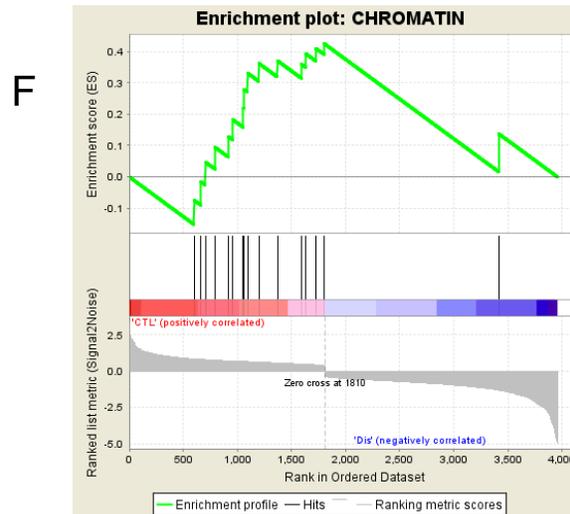
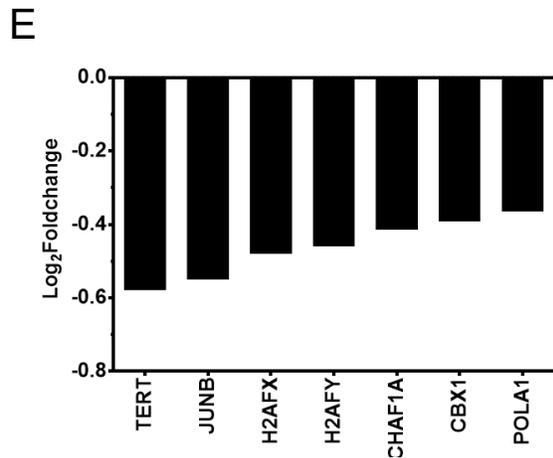
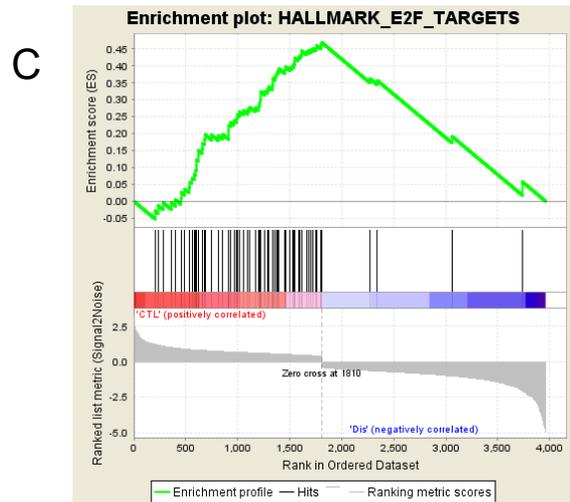
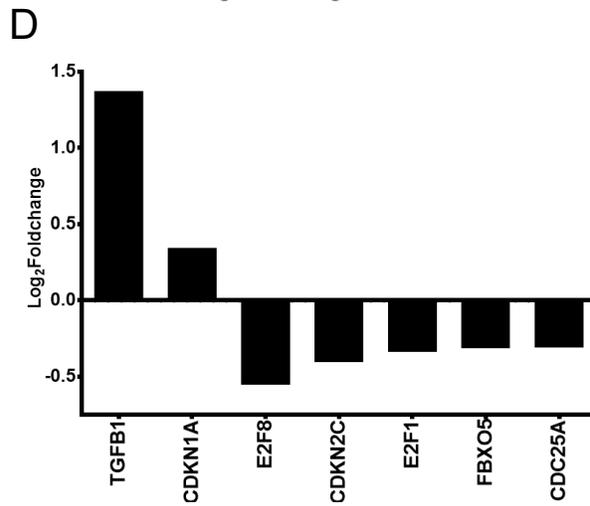
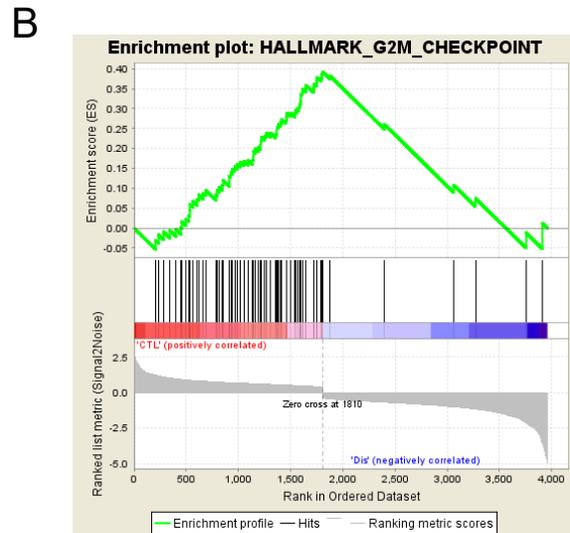
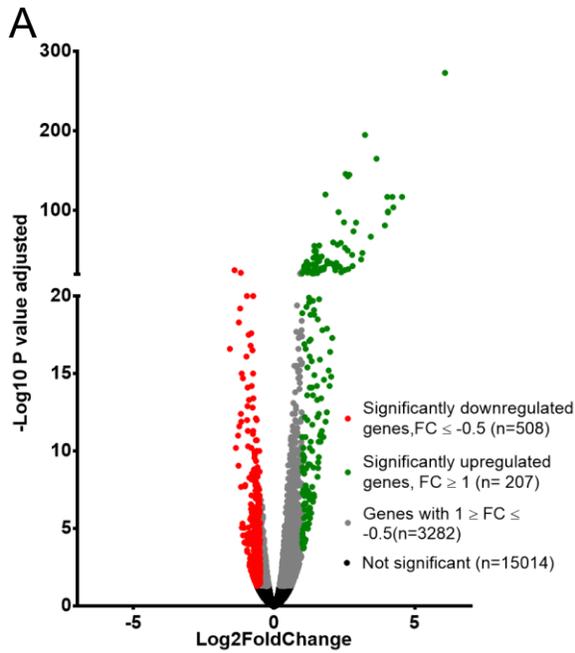


Figure 2: **RNA sequencing of neuroblastoma cells after disulfiram treatment:** N-91 cell line was treated with 50 nM of disulfiram for 48h. After analysis, a volcano plot was used to show genes distribution between significantly regulated (p value adjusted ≤ 0.05) and not significantly regulated (p value ≥ 0.05). Downregulated genes with a foldchange (FC) ≤ -0.5 are shown in red and upregulated genes with a foldchange ≥ 1 is shown in green (A). RNA sequencing data depicting three gene expression data of G2/M checkpoint, E2F targets and chromatin. The red color indicates untreated cells while the blue color indicates treated cells. Each black vertical line is a gene in the list (B, C and F). Representation of the foldchange of interesting genes from the G2/M and E2F target gene list (D) and chromatin gene list (E).

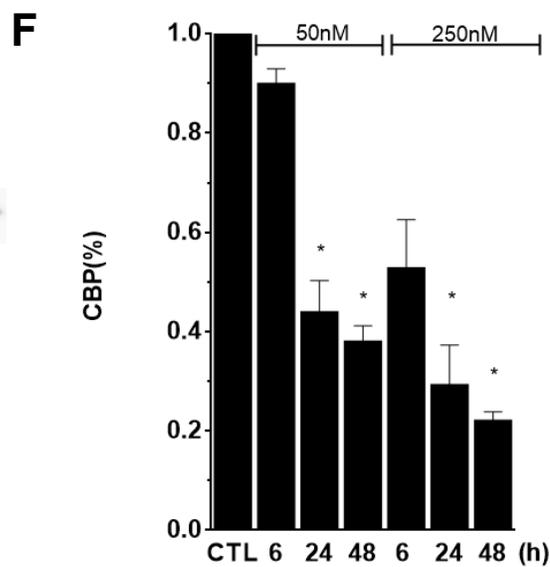
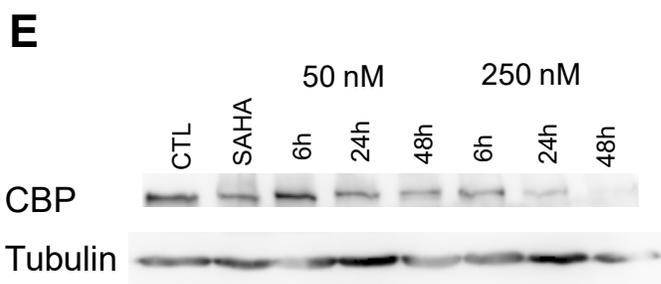
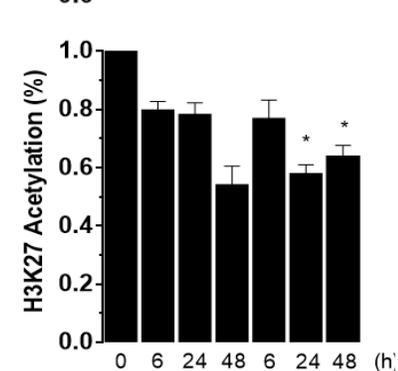
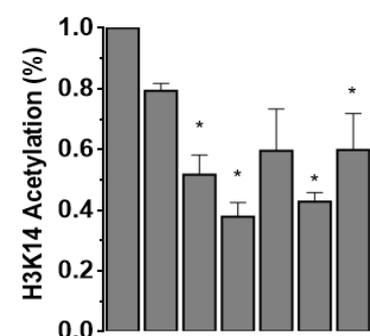
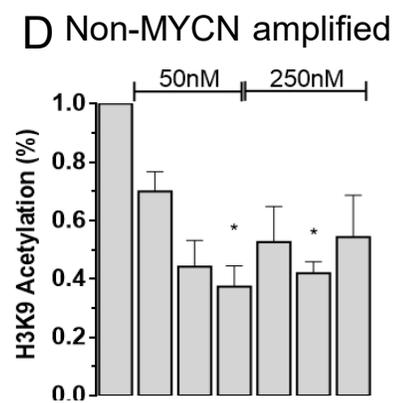
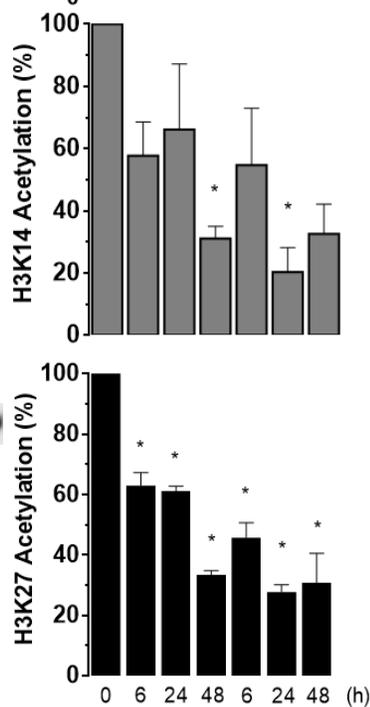
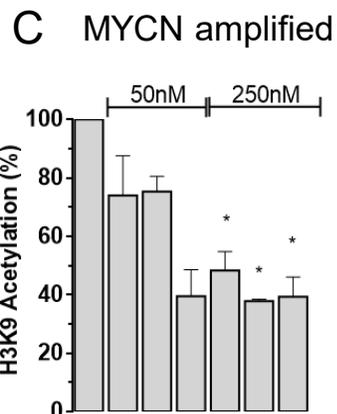
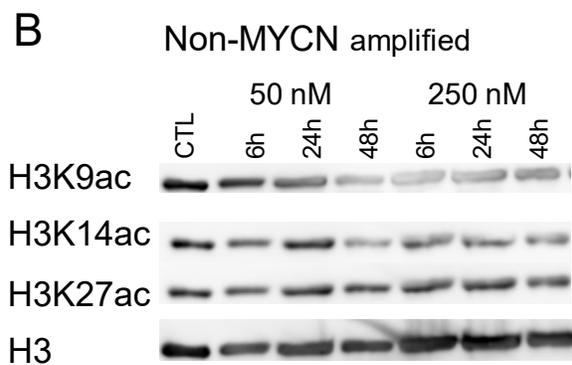
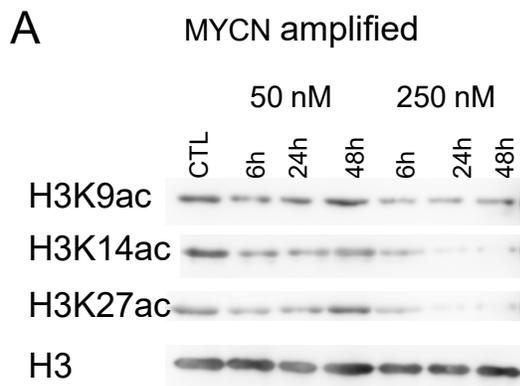


Figure 3 **Epigenetic modifications after disulfiram treatment:** Western blots analysis depicting acetylation of H3 lysine residue 9, 14 and 27 and their quantification on N-91 cells (MYCN amplified) (A, C) and SK-N-AS (non-MYCN amplified) (B, D) were treated with 50 and 250 nM of disulfiram for 6, 24 and 48h. Western blots analysis of HAT CBP in N-91 cells after disulfiram treatment of 50 and 250nM for 6,24 and 48h and quantification (E, F).

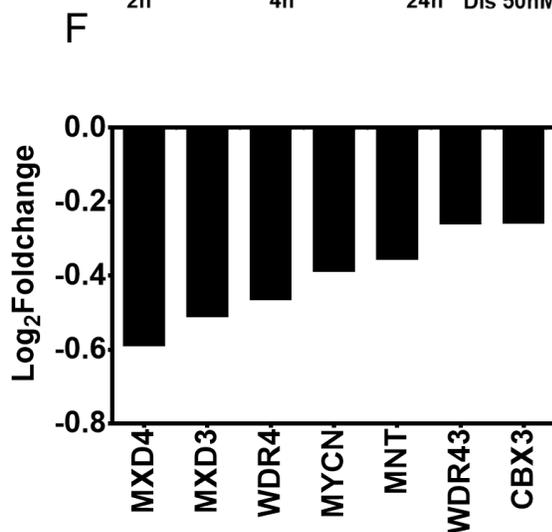
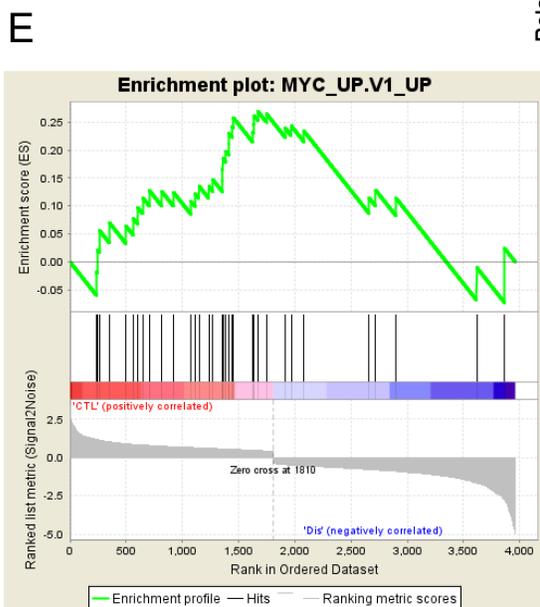
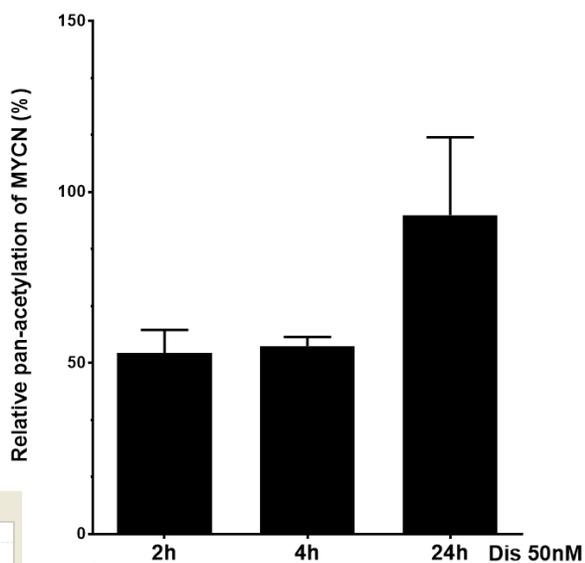
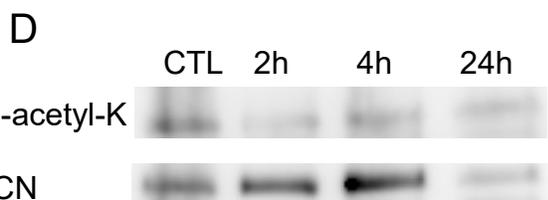
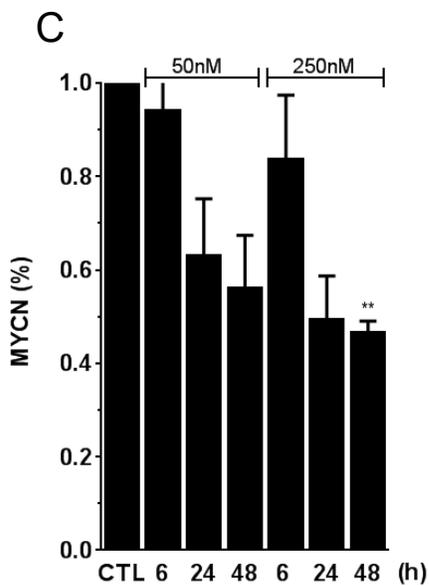
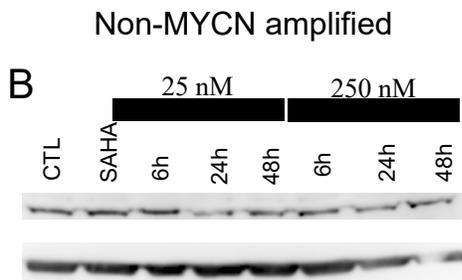
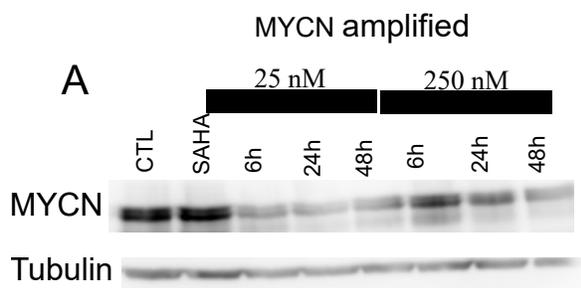


Figure 4 Disulfiram affects MYCN in MYCN amplified neuroblastoma: Western blots analysis of MYCN after treatment with 50 and 250 nM of disulfiram for 6, 24 and 48h in N-91 (MYCN amplified) (A, C) and SK-N-AS (non-MYCN amplified) (B). Western blots analysis of pan-acetylation of lysine after IP of MYCN. N-91 cells were treated at 50 nM disulfiram for 2, 4 and 24h and quantified (d). Gene set enrichment analysis (GSEA) of RNA seq for genes list of MYC targets. The red color indicates untreated cells while the blue color indicates treated cells for 48h at 50nM. Each black vertical line is a gene in the list (E). Representation of the foldchange of interesting genes from the MYC target gene list (F).

7.0 Discussion

Malgré les avancées thérapeutiques récentes et les taux de guérison généralement élevés, le neuroblastome demeure une des principales causes de décès (10 à 15 %) par cancer chez les enfants[51, 94]. Afin de traiter la maladie, les patients doivent recevoir des doses extrêmement élevées de chimiothérapie, de radiothérapie et de traitements d'immunothérapie afin d'atteindre une guérison éventuelle. Ces composés toxiques produisent de nombreux effets secondaires à court et à long terme qui sont nuisibles pour le patient tels que la toxicité, les problèmes de fertilité, des cancers secondaires [175, 176]. La nécessité de développer des médicaments moins toxiques est donc évidente. En outre, les patients souffrant de rechute ou de neuroblastome résistants sont caractérisés comme ayant un très mauvais pronostic. Les dérégulations épigénétiques, y compris la méthylation de l'ADN et les modifications des histones post-traductionnelles, sont des acteurs importants dans le développement du cancer en rechute ou résistant. Ces modifications épigénétiques sont des réactions chimiques réversibles. Par conséquent, en ciblant ces marques épigénétiques dérégulées, on peut induire la différenciation des cellules cancéreuses et finalement la mort cellulaire. Ici, nous démontrons que le disulfirame a des propriétés épigénétiques et anticancéreuses dans des lignées cellulaires de neuroblastome. Nous avons observé une diminution significative de l'acétylation des histones (H3K9, H3K14 et H3K27) en corrélation avec une diminution de l'HAT CBP. En plus, nous avons observé une diminution significative des niveaux de protéine oncogène MYCN et de ses gènes cibles. Fait intéressant, nous avons également observé une baisse de l'acétylation de MYCN, une modification post-traductionnelle impliquée dans la stabilisation de l'oncogène MYCN qui prévient sa dégradation. En plus de cibler la voie oncogénique de MYCN, le disulfirame affecte aussi le point de contrôle de G2/M et les gènes cibles de E2F,

deux voies de signalisation impliquées dans le cycle cellulaire. Lors de tests sur la viabilité cellulaire avec le disulfirame à des concentrations pertinentes d'un point de vue clinique, nous avons observé un bloc du cycle cellulaire à la phase G2/M.

Dans le neuroblastome, MYCN est très souvent amplifiée et est un des acteurs principaux impliqués dans la maladie. Dans les cellules normales, l'expression de MYCN est très étroitement contrôlée. Par contre, dans les cellules tumorales, tous les mécanismes de régulation sont dysfonctionnels [177]. De plus, des changements dans les modifications post-traductionnelles favorisant la stabilité de MYCN ou encore par une augmentation des niveaux d'expression de la protéine MYCN permettent aux cellules de proliférer extrêmement rapidement [178]. Pour que MYCN puisse réguler à la hausse l'expression de ses gènes cibles, il doit être recruté par des protéines de la famille des bromodomains pour ainsi acétylées les queues d'histones [175, 178]. MYCN se dimérise avec MAX et forme un complexe d'initiation de la transcription. Dans les cellules normales, l'expression du régulateur de MYCN est régulée principalement par des modifications post-traductionnelles telles que l'ubiquitination, l'acétylation et la phosphorylation des résidus spécifiques de la protéine [75, 76, 83]. Certaines de ces modifications induisent une courte demi-vie ou réduisent la stabilité de la protéine, tandis que d'autres ont des effets inverses. Dans les cellules cancéreuses, ces mécanismes de régulation sont dérégulés et conduisent finalement à l'augmentation de l'expression et à la stabilité de MYCN. Par exemple, l'acétylation de sept résidus de lysines différentes (K143, K157, K275, K317, K323, K371 et K417) réalisées par des HAT tels que TIP60, CBP ou encore GCN5, sont impliquées pour stabiliser la protéine et empêcher sa dégradation dans les cellules cancéreuses [111, 179]. Deux de ces résidus, les lysines K323 et K417, sont des sites d'ubiquitination qui, lorsqu'elles sont ubiquitinées, dirigent MYCN vers

le protéasome pour être dégradés [179]. Lorsque ces résidus sont acétylés, ils empêchent l'attachement de l'ubiquitine. Par conséquent, la diminution observée de l'acétylation de MYCN induite par le disulfirame peut potentiellement libérer ces sites pour l'ubiquitine ainsi entraîner une diminution des niveaux de protéines MYCN que nous avons observée.

Au cours des dernières années, de nombreux chercheurs ont tenté de cibler MYC de façon thérapeutique. Cependant, l'absence d'un site actif ou d'un domaine de liaison de ligand a empêché le développement d'inhibiteurs efficaces. Par conséquent, certains groupes ont tenté de cibler des protéines impliquées dans le recrutement de MYC par les bromodomaines comme un moyen pour réduire les effets de MYC [50, 180]. Il y a trois membres dans la famille des bromodomaines et extraterminal (BET) qui sont impliqués dans le recrutement de MYC, appelé BRD2, BRD3 et BRD4. BRD4 est le plus pertinent en termes d'association et d'activation de MYC. Le lien entre les protéines BET et le recrutement de MYC a incité le développement de JQ1, le premier inhibiteur sélectif de BET (BETi), qui bloque le recrutement de MYC sur BRD4 permettant de bloquer MYC et la transcription des gènes cibles de MYC [50, 180]. En fait, de nombreux essais cliniques achevés ou en cours étudient les effets de ces BETi sur une variété de cancers humains (NCT02543879, NCT01949883, NCT02157636 et NCT01987362).

Malgré tous ces résultats prometteurs, il semble que les BETi ne sont pas aussi efficaces qu'initialement pensé. Récemment, des études ont montré que certaines cellules ne répondent pas à JQ1 ou développent une résistance au traitement [181]. Par exemple, une étude a démontré que les souris traitées avec JQ1 finissent par mourir de la leucémie et que, lors de l'analyse de ces souris, il existe une régulation positive de la protéine MYC. Dans une autre étude, ils ont déterminé que lors d'un traitement JQ1, des lignées de cellules cancéreuses

et des échantillons des patients surexpriment Wnt, un gène qui confère une résistance au traitement [181, 182].

Une façon de développer de nouveaux médicaments pour le traitement du neuroblastome est par le repositionnement de médicaments et molécules déjà approuvée par la FDA. Afin d'éviter le processus long et coûteux, le repositionnement de médicaments peut mener au développement de nouvelles thérapies anticancéreuses [183]. Parce que les médicaments utilisés dans le repositionnement ont un historique d'utilisation chez l'humain, ils peuvent rapidement être intégrés dans le traitement de cancer sans passer par des tests longs et rigoureux. Les principaux avantages dans le criblage et le repositionnement de ces molécules approuvées par la FDA comprend des coûts beaucoup plus faibles et des effets secondaires connus et avec moins d'impact sur la santé en comparaison aux thérapies cytotoxiques actuellement utilisées [183].

Dans son ensemble, nous démontrons que le disulfirame agit comme un médicament épigénétique sur les lignées cellulaires de neuroblastome et induit une importante reprogrammation de l'expression de gènes. Le disulfirame affecte MYCN au niveau de l'expression de la protéine et de son acétylation, ce qui peut en partie diminuer la liaison de MYCN aux résidus d'ADN acétylés. De plus, le disulfirame affecte aussi l'acétylation de plusieurs résidus de H3 (H3K9, H3K14 et H3K27). D'autres études seront nécessaires pour pleinement comprendre le mécanisme d'action du disulfirame et pour découvrir des combinaisons de médicaments efficaces pouvant être utilisées en essai clinique.

8.0 Perspectives et conclusions

En introduisant des médicaments épigénétiques dans les régimes de chimiothérapie, nous espérons accomplir deux choses très importantes. En premier lieu, l'addition de médicaments épigénétiques peut potentiellement sensibiliser les cellules cancéreuses à la chimiothérapie. Par la suite, en induisant une reprogrammation épigénétique, ces médicaments sont capables de modifier l'expression génique dans les cellules cancéreuses ce qui les rend plus sensibles à des doses plus faibles de chimiothérapie [130, 137]. Par ailleurs, ces effets peuvent également réduire les effets secondaires sévères des traitements. Deuxièmement, il a été démontré que les cellules cancéreuses sont grandement dépendantes des marques et modifications épigénétiques pour leur survie, leur résistance aux médicaments, et leur maintien d'un phénotype malin. Puisque l'épigénétique régit l'expression des gènes, les cellules cancéreuses sont donc dépendantes de leurs épigénomes pour l'activation/inactivation de certaines protéines nécessaire à leur survie. Avec des médicaments induisant des changements épigénétiques, nous sommes capables de cibler des protéines impliquées dans la prolifération et la survie des cellules, tout en activant simultanément la différenciation et l'apoptose. Par le criblage de médicaments approuvés par la FDA, nous pouvons identifier les candidats possibles afin de les repositionner pour traiter de nombreux types de cancers. Comme l'a démontré Raynal et ses collègues dans leur criblage de médicaments, de nombreux composés approuvés par la FDA ont des propriétés épigénétiques et anticancéreuses insoupçonnées. Dans notre étude, nous avons testé trois de ces médicaments identifiés (le disulfirame, le pyrithione de zinc et la proscillaridine A) dans des lignées cellulaires de neuroblastome. Nous avons découvert que le disulfirame, un inhibiteur de l'aldéhyde déshydrogénase qui est administré à des patients depuis

plus de 60 ans, induit des changements épigénétiques et anticancéreux les plus importants et nous avons décidé de poursuivre le projet de recherche avec ce médicament[164, 165]. Le repositionnement de médicaments a plusieurs points positifs. Par exemple, les connaissances antérieures sur les effets secondaires, les doses administrées et les taux plasmatiques du médicament donné sont tous connus en raison d'une grande quantité d'essais précliniques et cliniques précédents. En plus, des études sur la toxicologie, la pharmacocinétique, la pharmacodynamie ont déjà été faites.

Le mécanisme d'action du disulfirame dans des lignées cellulaires de neuroblastome n'a pas encore été entièrement caractérisé. Raynal et ses collègues ont démontré que le disulfirame module les changements des taux de calcium intracellulaire dans leur modèle cellulaire de cancer du côlon[153, 154]. Nous croyons que ces augmentations de taux de calcium intracellulaire se produisent également dans des lignées cellulaires de neuroblastome, qui à son tour induisent des effets en aval sur les niveaux d'histone acétylation, expression de HATS et l'oncogène MYCN. Dans leur étude, Raynal et ses collègues ont démontré l'importance et la nécessité de l'activation la protéine calmoduline dépendante de kinase (CaMK) après un traitement au disulfirame. Leur étude a également montré l'importance des canaux calciques Orai dans le déclenchement de la voie du calcium affectant CaMK. Lorsque les niveaux de calcium dans le réticulum endoplasmique sont faibles, une interaction entre STIM1 et 2 et les canaux calciques Orai1, 2, 3 est formée, ce qui provoque un afflux d'ions calcique à partir de l'extérieur de la cellule dans le cytoplasme. Sur la base de leurs résultats, nous croyons qu'une relation entre les canaux Orai et activation des voies de signalisation en aval de calcium médie le mécanisme du disulfirame[153, 154].

Enfin, l'utilisation d'un médicament en monothérapie n'est pas une bonne approche lors du traitement de tous types de cancers. Par conséquent, nous voudrions étudier les effets de combinaison du disulfirame, une molécule qui cible les histones, avec des agents déméthylant l'ADN comme la décitabine pour deux raisons. Tout d'abord, cibler les histones et la méthylation de l'ADN pourrait potentiellement conduire à des interactions médicamenteuses synergiques qui mèneraient à une régulation positive de gènes suppresseurs de tumeurs et voies de différenciation. En second lieu, parce qu'une cellule cancéreuse est dépendante à ses modifications épigénétiques, cibler à la fois les histones et l'ADN pourrait potentiellement inverser un phénotype cancéreux en déclenchant l'arrêt de croissance et la différenciation cellulaire. Beaucoup de gens croient que l'administration de médicaments induisant des changements épigénétiques provoque un effet systémique, mais cela n'est pas nécessairement vrai, les cellules cancéreuses dépendent de leurs épigénomes pour leur survie alors que les cellules normales non. Par conséquent, quand un médicament induit une reprogrammation épigénétique, une cellule normale est capable de s'adapter à ces changements alors qu'une cellule cancéreuse ne peut pas. Cet événement oblige la cellule cancéreuse à changer ses comportements, qui peuvent potentiellement déclencher l'apoptose, la sénescence, ou même la différenciation. Après avoir terminé les expériences nécessaires pour connaître le mécanisme d'action du disulfirame, les prochaines étapes seront de valider ces résultats in vivo. Dans l'ensemble, les résultats que nous avons obtenus à ce jour sont très prometteurs en termes de propriétés anticancéreuses du disulfirame.

Bibliographie

1. Weinhold, B., *Epigenetics: the science of change*. Environ Health Perspect, 2006. **114**(3): p. A160-7.
2. Taby, R. and J.P. Issa, *Cancer epigenetics*. CA Cancer J Clin, 2010. **60**(6): p. 376-92.
3. Virani, S., et al., *Cancer epigenetics: a brief review*. ILAR J, 2012. **53**(3-4): p. 359-69.
4. Fox, B.A., et al., *Defining the critical hurdles in cancer immunotherapy*. J Transl Med, 2011. **9**: p. 214.
5. Sharma, S., T.K. Kelly, and P.A. Jones, *Epigenetics in cancer*. Carcinogenesis, 2010. **31**(1): p. 27-36.
6. Chuang, J.C. and P.A. Jones, *Epigenetics and microRNAs*. Pediatr Res, 2007. **61**(5 Pt 2): p. 24R-29R.
7. Momparler, R.L., *Cancer epigenetics*. Oncogene, 2003. **22**(42): p. 6479-83.
8. Musselman, C.A., et al., *Perceiving the epigenetic landscape through histone readers*. Nat Struct Mol Biol, 2012. **19**(12): p. 1218-27.
9. de Groote, M.L., P.J. Verschure, and M.G. Rots, *Epigenetic Editing: targeted rewriting of epigenetic marks to modulate expression of selected target genes*. Nucleic Acids Res, 2012. **40**(21): p. 10596-613.
10. Parry, L. and A.R. Clarke, *The Roles of the Methyl-CpG Binding Proteins in Cancer*. Genes Cancer, 2011. **2**(6): p. 618-30.
11. Takai, D. and P.A. Jones, *Comprehensive analysis of CpG islands in human chromosomes 21 and 22*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(6): p. 3740-5.
12. Bird, A., *DNA methylation patterns and epigenetic memory*. Genes Dev, 2002. **16**(1): p. 6-21.
13. Ehrlich, M., *DNA hypomethylation in cancer cells*. Epigenomics, 2009. **1**(2): p. 239-59.
14. Jones, P.A. and D. Takai, *The role of DNA methylation in mammalian epigenetics*. Science, 2001. **293**(5532): p. 1068-70.
15. Li, E., et al., *DNA methylation, genomic imprinting, and mammalian development*. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 1993. **58**: p. 297-305.
16. Li, E., C. Beard, and R. Jaenisch, *Role for DNA methylation in genomic imprinting*. Nature, 1993. **366**(6453): p. 362-5.
17. Bestor, T.H., *Activation of mammalian DNA methyltransferase by cleavage of a Zn binding regulatory domain*. EMBO J, 1992. **11**(7): p. 2611-7.
18. Kandimalla, R., A.A. van Tilborg, and E.C. Zwarthoff, *DNA methylation-based biomarkers in bladder cancer*. Nat Rev Urol, 2013. **10**(6): p. 327-35.
19. Riggs, A.D., *X inactivation, differentiation, and DNA methylation*. Cytogenet Cell Genet, 1975. **14**(1): p. 9-25.
20. Holliday, R. and J.E. Pugh, *DNA modification mechanisms and gene activity during development*. Science, 1975. **187**(4173): p. 226-32.
21. Miranda, T.B. and P.A. Jones, *DNA methylation: the nuts and bolts of repression*. J Cell Physiol, 2007. **213**(2): p. 384-90.

22. Prendergast, G.C. and E.B. Ziff, *Methylation-sensitive sequence-specific DNA binding by the c-Myc basic region*. Science, 1991. **251**(4990): p. 186-9.
23. Watt, F. and P.L. Molloy, *Cytosine methylation prevents binding to DNA of a HeLa cell transcription factor required for optimal expression of the adenovirus major late promoter*. Genes Dev, 1988. **2**(9): p. 1136-43.
24. Harikrishnan, K.N., et al., *Brahma links the SWI/SNF chromatin-remodeling complex with MeCP2-dependent transcriptional silencing*. Nat Genet, 2005. **37**(3): p. 254-64.
25. Comb, M. and H.M. Goodman, *CpG methylation inhibits proenkephalin gene expression and binding of the transcription factor AP-2*. Nucleic Acids Res, 1990. **18**(13): p. 3975-82.
26. Ellis, L., P.W. Atadja, and R.W. Johnstone, *Epigenetics in cancer: targeting chromatin modifications*. Mol Cancer Ther, 2009. **8**(6): p. 1409-20.
27. Strahl, B.D. and C.D. Allis, *The language of covalent histone modifications*. Nature, 2000. **403**(6765): p. 41-5.
28. Rodriguez-Paredes, M. and M. Esteller, *Cancer epigenetics reaches mainstream oncology*. Nat Med, 2011. **17**(3): p. 330-9.
29. Dawson, M.A. and T. Kouzarides, *Cancer epigenetics: from mechanism to therapy*. Cell, 2012. **150**(1): p. 12-27.
30. Jenuwein, T. and C.D. Allis, *Translating the histone code*. Science, 2001. **293**(5532): p. 1074-80.
31. Luebben, W.R., N. Sharma, and J.K. Nyborg, *Nucleosome eviction and activated transcription require p300 acetylation of histone H3 lysine 14*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(45): p. 19254-9.
32. Florean, C., et al., *Epigenomics of leukemia: from mechanisms to therapeutic applications*. Epigenomics, 2011. **3**(5): p. 581-609.
33. Kouzarides, T., *Chromatin modifications and their function*. Cell, 2007. **128**(4): p. 693-705.
34. Greer, E.L. and Y. Shi, *Histone methylation: a dynamic mark in health, disease and inheritance*. Nat Rev Genet, 2012. **13**(5): p. 343-57.
35. Gallinari, P., et al., *HDACs, histone deacetylation and gene transcription: from molecular biology to cancer therapeutics*. Cell Res, 2007. **17**(3): p. 195-211.
36. Bolden, J.E., M.J. Peart, and R.W. Johnstone, *Anticancer activities of histone deacetylase inhibitors*. Nat Rev Drug Discov, 2006. **5**(9): p. 769-84.
37. Garber, K., *Purchase of Aton spotlights HDAC inhibitors*. Nat Biotechnol, 2004. **22**(4): p. 364-5.
38. Lee, K.K. and J.L. Workman, *Histone acetyltransferase complexes: one size doesn't fit all*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2007. **8**(4): p. 284-95.
39. Avvakumov, N. and J. Cote, *The MYST family of histone acetyltransferases and their intimate links to cancer*. Oncogene, 2007. **26**(37): p. 5395-407.
40. Avvakumov, N. and J. Cote, *Functions of myst family histone acetyltransferases and their link to disease*. Subcell Biochem, 2007. **41**: p. 295-317.
41. Kimura, A., K. Matsubara, and M. Horikoshi, *A decade of histone acetylation: marking eukaryotic chromosomes with specific codes*. J Biochem, 2005. **138**(6): p. 647-62.
42. Verreault, A., et al., *Nucleosomal DNA regulates the core-histone-binding subunit of the human Hat1 acetyltransferase*. Curr Biol, 1998. **8**(2): p. 96-108.

43. Poux, A.N. and R. Marmorstein, *Molecular basis for Gcn5/PCAF histone acetyltransferase selectivity for histone and nonhistone substrates*. *Biochemistry*, 2003. **42**(49): p. 14366-74.
44. Hodawadekar, S.C. and R. Marmorstein, *Chemistry of acetyl transfer by histone modifying enzymes: structure, mechanism and implications for effector design*. *Oncogene*, 2007. **26**(37): p. 5528-40.
45. Marmorstein, R., *Structure and function of histone acetyltransferases*. *Cell Mol Life Sci*, 2001. **58**(5-6): p. 693-703.
46. Sadoul, K., et al., *The tale of protein lysine acetylation in the cytoplasm*. *J Biomed Biotechnol*, 2011. **2011**: p. 970382.
47. Roth, S.Y., J.M. Denu, and C.D. Allis, *Histone acetyltransferases*. *Annu Rev Biochem*, 2001. **70**: p. 81-120.
48. Knoechel, B., et al., *An epigenetic mechanism of resistance to targeted therapy in T cell acute lymphoblastic leukemia*. *Nat Genet*, 2014. **46**(4): p. 364-70.
49. Yun, M., et al., *Readers of histone modifications*. *Cell Res*, 2011. **21**(4): p. 564-78.
50. Puissant, A., et al., *Targeting MYCN in neuroblastoma by BET bromodomain inhibition*. *Cancer Discov*, 2013. **3**(3): p. 308-23.
51. Stafman, L.L. and E.A. Beierle, *Cell Proliferation in Neuroblastoma*. *Cancers (Basel)*, 2016. **8**(1).
52. Yanez, Y., et al., *Two independent epigenetic biomarkers predict survival in neuroblastoma*. *Clin Epigenetics*, 2015. **7**(1): p. 16.
53. Selmi, A., et al., *TWIST1 is a direct transcriptional target of MYCN and MYC in neuroblastoma*. *Cancer Lett*, 2015. **357**(1): p. 412-8.
54. Brodeur, G.M. and R. Bagatell, *Mechanisms of neuroblastoma regression*. *Nat Rev Clin Oncol*, 2014. **11**(12): p. 704-13.
55. Smith, M.A., et al., *Declining childhood and adolescent cancer mortality*. *Cancer*, 2014. **120**(16): p. 2497-506.
56. *American Academy of Pediatrics. Guidelines for the pediatric cancer center and role of such centers in diagnosis and treatment. Section on oncology-hematology*. *Pediatrics*, 1986. **77**(6): p. 916-7.
57. Shojaei-Brosseau, T., et al., *Genetic epidemiology of neuroblastoma: a study of 426 cases at the Institut Gustave-Roussy in France*. *Pediatr Blood Cancer*, 2004. **42**(1): p. 99-105.
58. Mosse, Y.P., et al., *Germline PHOX2B mutation in hereditary neuroblastoma*. *Am J Hum Genet*, 2004. **75**(4): p. 727-30.
59. Molenaar, J.J., et al., *LIN28B induces neuroblastoma and enhances MYCN levels via let-7 suppression*. *Nat Genet*, 2012. **44**(11): p. 1199-206.
60. Kushner, B.H. and N.K. Cheung, *Treatment reduction for neuroblastoma*. *Pediatr Blood Cancer*, 2004. **43**(6): p. 619-21.
61. Navarro, S., et al., *Prognostic value of International Neuroblastoma Pathology Classification in localized resectable peripheral neuroblastic tumors: a histopathologic study of localized neuroblastoma European Study Group 94.01 Trial and Protocol*. *J Clin Oncol*, 2006. **24**(4): p. 695-9.
62. Kushner, B.H., et al., *Liver involvement in neuroblastoma: the Memorial Sloan-Kettering Experience supports treatment reduction in young patients*. *Pediatr Blood Cancer*, 2006. **46**(3): p. 278-84.

63. Monclair, T., et al., *The International Neuroblastoma Risk Group (INRG) staging system: an INRG Task Force report*. J Clin Oncol, 2009. **27**(2): p. 298-303.
64. Cecchetto, G., et al., *Surgical risk factors in primary surgery for localized neuroblastoma: the LNESG1 study of the European International Society of Pediatric Oncology Neuroblastoma Group*. J Clin Oncol, 2005. **23**(33): p. 8483-9.
65. Simon, T., et al., *Review of image defined risk factors in localized neuroblastoma patients: Results of the GPOH NB97 trial*. Pediatr Blood Cancer, 2008. **50**(5): p. 965-9.
66. Moroz, V., et al., *Changes over three decades in outcome and the prognostic influence of age-at-diagnosis in young patients with neuroblastoma: a report from the International Neuroblastoma Risk Group Project*. Eur J Cancer, 2011. **47**(4): p. 561-71.
67. Look, A.T., et al., *Clinical relevance of tumor cell ploidy and N-myc gene amplification in childhood neuroblastoma: a Pediatric Oncology Group study*. J Clin Oncol, 1991. **9**(4): p. 581-91.
68. Matthay, K.K., et al., *Successful treatment of stage III neuroblastoma based on prospective biologic staging: a Children's Cancer Group study*. J Clin Oncol, 1998. **16**(4): p. 1256-64.
69. Adkins, E.S., et al., *Efficacy of complete resection for high-risk neuroblastoma: a Children's Cancer Group study*. J Pediatr Surg, 2004. **39**(6): p. 931-6.
70. Katzenstein, H.M., et al., *Treatment and outcome of 83 children with intraspinal neuroblastoma: the Pediatric Oncology Group experience*. J Clin Oncol, 2001. **19**(4): p. 1047-55.
71. Baker, D.L., et al., *Outcome after reduced chemotherapy for intermediate-risk neuroblastoma*. N Engl J Med, 2010. **363**(14): p. 1313-23.
72. Brodeur, G.M., et al., *International criteria for diagnosis, staging, and response to treatment in patients with neuroblastoma*. J Clin Oncol, 1988. **6**(12): p. 1874-81.
73. Schleiermacher, G., I. Janoueix-Lerosey, and O. Delattre, *Recent insights into the biology of neuroblastoma*. Int J Cancer, 2014. **135**(10): p. 2249-61.
74. Chayka, O., et al., *Identification and pharmacological inactivation of the MYCN gene network as a therapeutic strategy for neuroblastic tumor cells*. J Biol Chem, 2015. **290**(4): p. 2198-212.
75. Aubry, S. and J. Charron, *N-Myc shares cellular functions with c-Myc*. DNA Cell Biol, 2000. **19**(6): p. 353-64.
76. Eilers, M. and R.N. Eisenman, *Myc's broad reach*. Genes Dev, 2008. **22**(20): p. 2755-66.
77. Cetinkaya, C., et al., *Combined IFN-gamma and retinoic acid treatment targets the N-Myc/Max/Mad1 network resulting in repression of N-Myc target genes in MYCN-amplified neuroblastoma cells*. Mol Cancer Ther, 2007. **6**(10): p. 2634-41.
78. Corvetta, D., et al., *Physical interaction between MYCN oncogene and polycomb repressive complex 2 (PRC2) in neuroblastoma: functional and therapeutic implications*. J Biol Chem, 2013. **288**(12): p. 8332-41.
79. He, S., et al., *MYCN and the epigenome*. Front Oncol, 2013. **3**: p. 1.
80. Cheng, S.W., et al., *c-MYC interacts with INI1/hSNF5 and requires the SWI/SNF complex for transactivation function*. Nat Genet, 1999. **22**(1): p. 102-5.

81. Chan, H.M. and N.B. La Thangue, *p300/CBP proteins: HATs for transcriptional bridges and scaffolds*. J Cell Sci, 2001. **114**(Pt 13): p. 2363-73.
82. Frank, S.R., et al., *MYC recruits the TIP60 histone acetyltransferase complex to chromatin*. EMBO Rep, 2003. **4**(6): p. 575-80.
83. Cotterman, R., et al., *N-Myc regulates a widespread euchromatic program in the human genome partially independent of its role as a classical transcription factor*. Cancer Res, 2008. **68**(23): p. 9654-62.
84. Mosse, Y.P., et al., *Neuroblastomas have distinct genomic DNA profiles that predict clinical phenotype and regional gene expression*. Genes Chromosomes Cancer, 2007. **46**(10): p. 936-49.
85. Schleiermacher, G., et al., *Segmental chromosomal alterations have prognostic impact in neuroblastoma: a report from the INRG project*. Br J Cancer, 2012. **107**(8): p. 1418-22.
86. Domingo-Fernandez, R., et al., *The role of genetic and epigenetic alterations in neuroblastoma disease pathogenesis*. Pediatr Surg Int, 2013. **29**(2): p. 101-19.
87. Caron, H., *Allelic loss of chromosome 1 and additional chromosome 17 material are both unfavourable prognostic markers in neuroblastoma*. Med Pediatr Oncol, 1995. **24**(4): p. 215-21.
88. Lampert, F., et al., *Identical chromosome 1p breakpoint abnormality in both the tumor and the constitutional karyotype of a patient with neuroblastoma*. Cancer Genet Cytogenet, 1988. **34**(2): p. 235-9.
89. Naraparaju, K., et al., *Role of microRNAs in epigenetic silencing of the CHD5 tumor suppressor gene in neuroblastomas*. Oncotarget, 2016. **7**(13): p. 15977-85.
90. Fong, C.T., et al., *Loss of heterozygosity for the short arm of chromosome 1 in human neuroblastomas: correlation with N-myc amplification*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. **86**(10): p. 3753-7.
91. Cohn, S.L., et al., *The International Neuroblastoma Risk Group (INRG) classification system: an INRG Task Force report*. J Clin Oncol, 2009. **27**(2): p. 289-97.
92. Spitz, R., et al., *Loss in chromosome 11q identifies tumors with increased risk for metastatic relapses in localized and 4S neuroblastoma*. Clin Cancer Res, 2006. **12**(11 Pt 1): p. 3368-73.
93. Borriello, L., et al., *More than the genes, the tumor microenvironment in neuroblastoma*. Cancer Lett, 2015.
94. Brodeur, G.M., *Neuroblastoma: biological insights into a clinical enigma*. Nat Rev Cancer, 2003. **3**(3): p. 203-16.
95. Laureys, G., et al., *Constitutional translocation t(1;17)(p36.31-p36.13;q11.2-q12.1) in a neuroblastoma patient. Establishment of somatic cell hybrids and identification of PND/A12M2 on chromosome 1 and NF1/SCYA7 on chromosome 17 as breakpoint flanking single copy markers*. Oncogene, 1995. **10**(6): p. 1087-93.
96. Sugino, Y., et al., *Epigenetic silencing of prostaglandin E receptor 2 (PTGER2) is associated with progression of neuroblastomas*. Oncogene, 2007. **26**(53): p. 7401-13.
97. Teitz, T., et al., *Caspase 8 is deleted or silenced preferentially in childhood neuroblastomas with amplification of MYCN*. Nat Med, 2000. **6**(5): p. 529-35.
98. Asada, K., M. Abe, and T. Ushijima, *Clinical application of the CpG island methylator phenotype to prognostic diagnosis in neuroblastomas*. J Hum Genet, 2013. **58**(7): p. 428-33.

99. Abe, M., et al., *CpG island methylator phenotype is a strong determinant of poor prognosis in neuroblastomas*. *Cancer Res*, 2005. **65**(3): p. 828-34.
100. Abe, M., et al., *Marked and independent prognostic significance of the CpG island methylator phenotype in neuroblastomas*. *Cancer Lett*, 2007. **247**(2): p. 253-8.
101. Decock, A., et al., *Neuroblastoma epigenetics: from candidate gene approaches to genome-wide screenings*. *Epigenetics*, 2011. **6**(8): p. 962-70.
102. van Noesel, M.M. and R. Versteeg, *Pediatric neuroblastomas: genetic and epigenetic 'danse macabre'*. *Gene*, 2004. **325**: p. 1-15.
103. Astuti, D., et al., *RASSF1A promoter region CpG island hypermethylation in pheochromocytomas and neuroblastoma tumours*. *Oncogene*, 2001. **20**(51): p. 7573-7.
104. Kristensen, L.S., H.M. Nielsen, and L.L. Hansen, *Epigenetics and cancer treatment*. *Eur J Pharmacol*, 2009. **625**(1-3): p. 131-42.
105. Mai, A. and L. Altucci, *Epi-drugs to fight cancer: from chemistry to cancer treatment, the road ahead*. *Int J Biochem Cell Biol*, 2009. **41**(1): p. 199-213.
106. Lipscomb, W.N. and N. Strater, *Recent Advances in Zinc Enzymology*. *Chem Rev*, 1996. **96**(7): p. 2375-2434.
107. Johnstone, R.W., *Histone-deacetylase inhibitors: novel drugs for the treatment of cancer*. *Nat Rev Drug Discov*, 2002. **1**(4): p. 287-99.
108. West, A.C. and R.W. Johnstone, *New and emerging HDAC inhibitors for cancer treatment*. *J Clin Invest*, 2014. **124**(1): p. 30-9.
109. Lee, H.Z., et al., *FDA Approval: Belinostat for the Treatment of Patients with Relapsed or Refractory Peripheral T-cell Lymphoma*. *Clin Cancer Res*, 2015. **21**(12): p. 2666-70.
110. Schmidt, K., et al., *Histone deacetylase inhibition improves differentiation of dendritic cells from leukemic blasts of patients with TEL/AML1-positive acute lymphoblastic leukemia*. *J Leukoc Biol*, 2009. **85**(3): p. 563-73.
111. Zhang, C., et al., *Histone acetylation: novel target for the treatment of acute lymphoblastic leukemia*. *Clin Epigenetics*, 2015. **7**: p. 117.
112. Santoro, F., et al., *A dual role for Hdac1: oncosuppressor in tumorigenesis, oncogene in tumor maintenance*. *Blood*, 2013. **121**(17): p. 3459-68.
113. Farria, A., W. Li, and S.Y. Dent, *KATs in cancer: functions and therapies*. *Oncogene*, 2015. **34**(38): p. 4901-13.
114. Holmlund, T., et al., *GCN5 acetylates and regulates the stability of the oncoprotein E2A-PBX1 in acute lymphoblastic leukemia*. *Leukemia*, 2013. **27**(3): p. 578-85.
115. Arif, M., et al., *Mechanism of p300 specific histone acetyltransferase inhibition by small molecules*. *J Med Chem*, 2009. **52**(2): p. 267-77.
116. Balasubramanyam, K., et al., *Polyisoprenylated benzophenone, garcinol, a natural histone acetyltransferase inhibitor, represses chromatin transcription and alters global gene expression*. *J Biol Chem*, 2004. **279**(32): p. 33716-26.
117. Emami, K.H., et al., *A small molecule inhibitor of beta-catenin/CREB-binding protein transcription [corrected]*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. **101**(34): p. 12682-7.
118. Gang, E.J., et al., *Small-molecule inhibition of CBP/catenin interactions eliminates drug-resistant clones in acute lymphoblastic leukemia*. *Oncogene*, 2014. **33**(17): p. 2169-78.

119. Lu, H., et al., *Hypoxia-inducible factor-1alpha blocks differentiation of malignant gliomas*. FEBS J, 2009. **276**(24): p. 7291-304.
120. Yan, G., et al., *Selective inhibition of p300 HAT blocks cell cycle progression, induces cellular senescence, and inhibits the DNA damage response in melanoma cells*. J Invest Dermatol, 2013. **133**(10): p. 2444-52.
121. Gao, X.N., et al., *A histone acetyltransferase p300 inhibitor C646 induces cell cycle arrest and apoptosis selectively in AML1-ETO-positive AML cells*. PLoS One, 2013. **8**(2): p. e55481.
122. Sun, Y., et al., *Inhibition of histone acetyltransferase activity by anacardic acid sensitizes tumor cells to ionizing radiation*. FEBS Lett, 2006. **580**(18): p. 4353-6.
123. Coffey, K., et al., *Characterisation of a Tip60 specific inhibitor, NU9056, in prostate cancer*. PLoS One, 2012. **7**(10): p. e45539.
124. Gao, C., et al., *Rational design and validation of a Tip60 histone acetyltransferase inhibitor*. Sci Rep, 2014. **4**: p. 5372.
125. Santi, D.V., A. Norment, and C.E. Garrett, *Covalent bond formation between a DNA-cytosine methyltransferase and DNA containing 5-azacytosine*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1984. **81**(22): p. 6993-7.
126. Issa, J.P. and H.M. Kantarjian, *Targeting DNA methylation*. Clin Cancer Res, 2009. **15**(12): p. 3938-46.
127. Yang, X., et al., *Targeting DNA methylation for epigenetic therapy*. Trends Pharmacol Sci, 2010. **31**(11): p. 536-46.
128. Kantarjian, H., et al., *Results of a randomized study of 3 schedules of low-dose decitabine in higher-risk myelodysplastic syndrome and chronic myelomonocytic leukemia*. Blood, 2007. **109**(1): p. 52-7.
129. Issa, J.P., et al., *Phase I study of low-dose prolonged exposure schedules of the hypomethylating agent 5-aza-2'-deoxycytidine (decitabine) in hematopoietic malignancies*. Blood, 2004. **103**(5): p. 1635-40.
130. Baylin, S.B. and P.A. Jones, *A decade of exploring the cancer epigenome - biological and translational implications*. Nat Rev Cancer, 2011. **11**(10): p. 726-34.
131. Rivard, G.E., et al., *Phase I study on 5-aza-2'-deoxycytidine in children with acute leukemia*. Leuk Res, 1981. **5**(6): p. 453-62.
132. Chabot, G.G. and R.L. Momparler, *Effects of 5-aza-2'-deoxycytidine on survival and cell cycle progression of L1210 leukemia cells*. Leuk Res, 1986. **10**(5): p. 533-7.
133. Momparler, R.L., et al., *5-AZA-2'-deoxycytidine synergistic action with thymidine on leukemic cells and interaction of 5-AZA-dCMP with dCMP deaminase*. Adv Exp Med Biol, 1986. **195 Pt B**: p. 157-63.
134. Estey, E.H., *Epigenetics in clinical practice: the examples of azacitidine and decitabine in myelodysplasia and acute myeloid leukemia*. Leukemia, 2013. **27**(9): p. 1803-12.
135. Datta, J., et al., *A new class of quinoline-based DNA hypomethylating agents reactivates tumor suppressor genes by blocking DNA methyltransferase I activity and inducing its degradation*. Cancer Res, 2009. **69**(10): p. 4277-85.
136. Goto, H., *Childhood relapsed acute lymphoblastic leukemia: Biology and recent treatment progress*. Pediatr Int, 2015. **57**(6): p. 1059-66.
137. Baylin, S.B. and J.E. Ohm, *Epigenetic gene silencing in cancer - a mechanism for early oncogenic pathway addiction?* Nat Rev Cancer, 2006. **6**(2): p. 107-16.

138. De Carvalho, D.D., et al., *DNA methylation screening identifies driver epigenetic events of cancer cell survival*. *Cancer Cell*, 2012. **21**(5): p. 655-67.
139. de Vries, I.J., et al., *Immunomonitoring tumor-specific T cells in delayed-type hypersensitivity skin biopsies after dendritic cell vaccination correlates with clinical outcome*. *J Clin Oncol*, 2005. **23**(24): p. 5779-87.
140. Jacobs, J.E. and C. Hastings, *Isolated extramedullary relapse in childhood acute lymphocytic leukemia*. *Curr Hematol Malig Rep*, 2010. **5**(4): p. 185-91.
141. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation*. *Cell*, 2011. **144**(5): p. 646-74.
142. Goodyear, O., et al., *Induction of a CD8+ T-cell response to the MAGE cancer testis antigen by combined treatment with azacitidine and sodium valproate in patients with acute myeloid leukemia and myelodysplasia*. *Blood*, 2010. **116**(11): p. 1908-18.
143. Norde, W.J., et al., *PD-1/PD-L1 interactions contribute to functional T-cell impairment in patients who relapse with cancer after allogeneic stem cell transplantation*. *Cancer Res*, 2011. **71**(15): p. 5111-22.
144. Natsume, A., et al., *The DNA demethylating agent 5-aza-2'-deoxycytidine activates NY-ESO-1 antigenicity in orthotopic human glioma*. *Int J Cancer*, 2008. **122**(11): p. 2542-53.
145. Magner, W.J., et al., *Activation of MHC class I, II, and CD40 gene expression by histone deacetylase inhibitors*. *J Immunol*, 2000. **165**(12): p. 7017-24.
146. Khan, A.N., C.J. Gregorie, and T.B. Tomasi, *Histone deacetylase inhibitors induce TAP, LMP, Tapasin genes and MHC class I antigen presentation by melanoma cells*. *Cancer Immunol Immunother*, 2008. **57**(5): p. 647-54.
147. Setiadi, A.F., et al., *Epigenetic enhancement of antigen processing and presentation promotes immune recognition of tumors*. *Cancer Res*, 2008. **68**(23): p. 9601-7.
148. Armeanu, S., et al., *Natural killer cell-mediated lysis of hepatoma cells via specific induction of NKG2D ligands by the histone deacetylase inhibitor sodium valproate*. *Cancer Res*, 2005. **65**(14): p. 6321-9.
149. Konkankit, V.V., et al., *Decitabine immunosensitizes human gliomas to NY-ESO-1 specific T lymphocyte targeting through the Fas/Fas ligand pathway*. *J Transl Med*, 2011. **9**: p. 192.
150. Blatt, J. and S.J. Corey, *Drug repurposing in pediatrics and pediatric hematology oncology*. *Drug Discov Today*, 2013. **18**(1-2): p. 4-10.
151. Wang, Z.Y. and H.Y. Zhang, *Rational drug repositioning by medical genetics*. *Nat Biotechnol*, 2013. **31**(12): p. 1080-2.
152. Si, J., et al., *Chromatin remodeling is required for gene reactivation after decitabine-mediated DNA hypomethylation*. *Cancer Res*, 2010. **70**(17): p. 6968-77.
153. Raynal, N.J., et al., *DNA methylation does not stably lock gene expression but instead serves as a molecular mark for gene silencing memory*. *Cancer Res*, 2012. **72**(5): p. 1170-81.
154. Raynal, N.J., et al., *Targeting Calcium Signaling Induces Epigenetic Reactivation of Tumor Suppressor Genes in Cancer*. *Cancer Res*, 2016. **76**(6): p. 1494-505.
155. *Martindale: The Complete Drug Reference Brayfield Alison (Ed) Martindale: The Complete Drug Reference pound459 4,688pp Pharmaceutical Press 9780857111395 0857111396 [Formula: see text]*. *Emerg Nurse*, 2014. **22**(5): p. 12.

156. B. L. Barnett, H.C.K., F. A. Hartman, *Structural characterization of bis(N-oxopyridine-2-thionato)zinc(II)*. Inorganic Chemistry, 1977. **16**(8): p. 1834–1838.
157. Guthery, E., L.A. Seal, and E.L. Anderson, *Zinc pyrithione in alcohol-based products for skin antiseptics: persistence of antimicrobial effects*. Am J Infect Control, 2005. **33**(1): p. 15-22.
158. Tailler, M., et al., *Antineoplastic activity of ouabain and pyrithione zinc in acute myeloid leukemia*. Oncogene, 2012. **31**(30): p. 3536-46.
159. Facci, M., [Study of the therapeutic effect of a cardioactive glycoside extracted from scilla (proscillaridin A), by means of polygraphic investigations]. Minerva Med, 1966. **57**(43 Suppl): p. 1978-82.
160. Winnicka, K., et al., *Antiproliferative activity of derivatives of ouabain, digoxin and proscillaridin A in human MCF-7 and MDA-MB-231 breast cancer cells*. Biol Pharm Bull, 2008. **31**(6): p. 1131-40.
161. Denicolai, E., et al., *Proscillaridin A is cytotoxic for glioblastoma cell lines and controls tumor xenograft growth in vivo*. Oncotarget, 2014. **5**(21): p. 10934-48.
162. Winnicka, K., et al., *Apoptosis-mediated cytotoxicity of ouabain, digoxin and proscillaridin A in the estrogen independent MDA-MB-231 breast cancer cells*. Arch Pharm Res, 2007. **30**(10): p. 1216-24.
163. Sinclair, J.M., et al., *Safety and Tolerability of Pharmacological Treatment of Alcohol Dependence: Comprehensive Review of Evidence*. Drug Saf, 2016. **39**(7): p. 627-45.
164. Sauna, Z.E., S. Shukla, and S.V. Ambudkar, *Disulfiram, an old drug with new potential therapeutic uses for human cancers and fungal infections*. Mol Biosyst, 2005. **1**(2): p. 127-34.
165. Chick, J., *Safety issues concerning the use of disulfiram in treating alcohol dependence*. Drug Saf, 1999. **20**(5): p. 427-35.
166. Triscott, J., et al., *Disulfiram, a drug widely used to control alcoholism, suppresses the self-renewal of glioblastoma and over-rides resistance to temozolomide*. Oncotarget, 2012. **3**(10): p. 1112-23.
167. Hothi, P., et al., *High-throughput chemical screens identify disulfiram as an inhibitor of human glioblastoma stem cells*. Oncotarget, 2012. **3**(10): p. 1124-36.
168. Rae, C., et al., *The role of copper in disulfiram-induced toxicity and radiosensitization of cancer cells*. J Nucl Med, 2013. **54**(6): p. 953-60.
169. Johansson, B., *A review of the pharmacokinetics and pharmacodynamics of disulfiram and its metabolites*. Acta Psychiatr Scand Suppl, 1992. **369**: p. 15-26.
170. Seeger, R.C., et al., *Association of multiple copies of the N-myc oncogene with rapid progression of neuroblastomas*. N Engl J Med, 1985. **313**(18): p. 1111-6.
171. Brodeur, G.M., et al., *Amplification of N-myc in untreated human neuroblastomas correlates with advanced disease stage*. Science, 1984. **224**(4653): p. 1121-4.
172. Peifer, M., et al., *Telomerase activation by genomic rearrangements in high-risk neuroblastoma*. Nature, 2015. **526**(7575): p. 700-4.
173. Gustafson, W.C., et al., *Drugging MYCN through an allosteric transition in Aurora kinase A*. Cancer Cell, 2014. **26**(3): p. 414-27.
174. Ogiwara, H., et al., *Targeting p300 Addiction in CBP-Deficient Cancers Causes Synthetic Lethality by Apoptotic Cell Death due to Abrogation of MYC Expression*. Cancer Discov, 2016. **6**(4): p. 430-45.

175. Askins, M.A. and B.D. Moore, 3rd, *Preventing neurocognitive late effects in childhood cancer survivors*. J Child Neurol, 2008. **23**(10): p. 1160-71.
176. Osterberg, E.C., et al., *Current practices in fertility preservation in male cancer patients*. Urol Ann, 2014. **6**(1): p. 13-7.
177. Vervoorts, J., J. Luscher-Firzlaff, and B. Luscher, *The ins and outs of MYC regulation by posttranslational mechanisms*. J Biol Chem, 2006. **281**(46): p. 34725-9.
178. Miller, D.M., et al., *c-Myc and cancer metabolism*. Clin Cancer Res, 2012. **18**(20): p. 5546-53.
179. Zhang, K., F. Faiola, and E. Martinez, *Six lysine residues on c-Myc are direct substrates for acetylation by p300*. Biochem Biophys Res Commun, 2005. **336**(1): p. 274-80.
180. Filippakopoulos, P., et al., *Selective inhibition of BET bromodomains*. Nature, 2010. **468**(7327): p. 1067-73.
181. Shu, S., et al., *Response and resistance to BET bromodomain inhibitors in triple-negative breast cancer*. Nature, 2016. **529**(7586): p. 413-7.
182. Rathert, P., et al., *Transcriptional plasticity promotes primary and acquired resistance to BET inhibition*. Nature, 2015. **525**(7570): p. 543-7.
183. Bertolini, F., V.P. Sukhatme, and G. Bouche, *Drug repurposing in oncology--patient and health systems opportunities*. Nat Rev Clin Oncol, 2015. **12**(12): p. 732-42.