

Université de Montréal

**Action anti-leucémique des inhibiteurs de la méthylation de l'ADN et de la  
déacétylation des histones**

par

**Maryse Lemaire**

Département de Pharmacologie

Faculté de médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures

en vue de l'obtention du grade de

**Philosophiæ Doctor (Ph.D.)**

**en Pharmacologie**

Avril 2009

©Maryse Lemaire, 2009

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :

**Action anti-leucémique des inhibiteurs de la méthylation de l'ADN et de la  
déacétylation des histones**

Présentée par :  
Maryse Lemaire

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Jean-François Gauchat  
président-rapporteur

Dr Richard L. Momparler  
directeur de recherche

Dre Audrey Claing  
membre du jury

Dr Lawrence Panasci  
examineur externe

Dre Maja Krajinovic  
représentante de la F.E.S.

## RÉSUMÉ

Les gènes suppresseurs de tumeurs (TSGs) contrôlent la prolifération cellulaire et leur inactivation joue un rôle important dans la leucémogénèse. Deux mécanismes épigénétiques majeurs sont impliqués dans la répression des TSGs: 1- la méthylation de l'ADN et 2- la déacétylation des histones des chromosomes. On les dit épigénétiques car ils n'affectent pas la séquence de l'ADN. Ces phénomènes sont réversibles, faisant donc d'eux des cibles thérapeutiques de choix. Dans le cadre de cette thèse, nous avons évalué le potentiel chimiothérapeutique de différents agents qui visent ces mécanismes épigénétiques et nous les avons administrés seuls et en combinaison dans le but d'améliorer leur efficacité.

La 5-aza-2'-désoxycytidine (5-Aza-CdR) est un inhibiteur de la méthylation de l'ADN qui permet la ré-expression des TSGs. Cet agent s'est avéré efficace contre certaines maladies hématologiques et est d'ailleurs approuvé aux États-Unis dans le traitement du syndrome myélodysplasique depuis 2006. Cependant, le protocole d'administration optimal de cet agent, en termes de doses et de durée, n'est toujours pas établi. Nos recherches suggèrent que le celui-ci devrait être plus intensif que ce que rapporte la littérature.

Les inhibiteurs des déacétylases des histones (HDACi) ont également montré une activité antinéoplasique intéressante. De récentes recherches ont montré que la combinaison d'agents ciblant à la fois la méthylation de l'ADN et la déacétylation des histones produit une réactivation synergique des TSGs, ce à quoi nous nous sommes intéressé. Nous avons observé que la co-administration d'un HDACi avec la 5-Aza-CdR potentialise son action anti-leucémique.

Il est aussi possible d'augmenter l'activité de la 5-Aza-CdR en inhibant sa dégradation par l'enzyme cytidine (CR) désaminase. Nous avons observé que la co-administration du zebularine, un inhibiteur de la CR désaminase, avec la 5-Aza-CdR accroît son efficacité. Le zebularine est aussi un inhibiteur de la méthylation de

l'ADN, ce qui pourrait contribuer à la potentialisation de la réponse anti-leucémique observée lors de la co-administration de ces deux agents.

En résumé, il est possible d'augmenter l'efficacité anti-leucémique de la 5-Aza-CdR en : 1- intensifiant son protocole d'administration, en termes de doses et de durée, 2- la combinant avec un HDACi, et 3- diminuant sa dégradation par la CR désaminase. L'utilisation de ces résultats précliniques dans l'élaboration de protocoles cliniques pourrait être bénéfique à beaucoup de patients.

**Mot clés :** leucémie, cancer, 5-Aza-2'-désoxycytidine, zebularine, phénylbutyrate, SAHA, LAQ824, cytidine désaminase

## ABSTRACT

The silencing of tumor suppressor genes (TSG) that normally regulate cells proliferation plays an important role in leukemogenesis. Two major mechanisms are involved in TSG's silencing: DNA methylation and histones deacetylation. Because those phenomenons are reversible, it makes them interesting therapeutic targets for chemotherapeutic agents. We evaluated the antineoplastic potential of different agents that target those events and we administered them alone or in combination with the goal of improving their efficiency.

5-aza-2'-deoxycytidine (5-Aza-CdR) is a DNA methylation inhibitor that can re-express TSGs that are silenced by methylations. This agent demonstrated its efficacy against hematological malignancies. Therefore, 5-Aza-CdR is used since 2006 in United States of America against myelodysplastic syndrome; but its optimal dose-schedule still needs to be established. Our researches suggest that the dose-schedule of 5-Aza-CdR should be more intensive than what is reported from the literature.

Inhibitors of histones deacetylation (HDACi) also demonstrated some interesting antineoplastic activity. Recently, observations showed that combination of chemotherapeutic agent that targets both DNA methylation and histones deacetylation lead to a synergic reactivation of silenced TSG. This finding allowed us to observe that the co-administration of an HDACi with 5-Aza-CdR improve its antileukemic potential.

Moreover, it is possible to increase the activity of 5-Aza-CdR by preventing its degradation by cytidine (CR) deaminase. We demonstrated that the co-administration of zebularine, an inhibitor of CR deaminase, with 5-Aza-CdR increases its activity. Zebularine is also an inhibitor of DNA methylation, which may contribute to the enhancement of the antileukemic action of this combination.

In summary, our preclinical data indicate that the antileukemic activity of 5-Aza-CdR can be enhanced by: 1- increasing his dosage, 2- combining it with HDACi, and 3- preventing its inactivation by CR deaminase. The translation of those preclinical observations into clinical protocols may be effective in patients with advanced leukemia.

**Key words:** leukemia, cancer, 5-aza-2'-deoxycytidine, zebularine, phenylbutyrate, SAHA, LAQ824, cytidine deaminase

## TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ .....	iii
ABSTRACT .....	v
LISTE DES TABLES ET TABLEAUX.....	xiii
LISTE DES FIGURES.....	xiv
ABRÉVIATIONS .....	xvii
DÉDICACE .....	xviii
REMERCIEMENTS.....	xix
AVANT-PROPOS.....	1

### PREMIÈRE PARTIE

#### REVUE DE LA LITTÉRATURE

CHAPITRE 1 LA LEUCÉMIE.....	4
CHAPITRE 2 LES MODIFICATIONS ÉPIGÉNÉTIQUES.....	6
CHAPITRE 3 LES MODIFICATIONS ÉPIGÉNÉTIQUES: LA MÉTHYLATION DE L'ADN.....	7
3.1 CONSÉQUENCES DE LA MÉTHYLATION DE L'ADN.....	9
3.2 RÔLES DE LA MÉTHYLATION DE L'ADN DANS LA LEUCÉMIE.....	10

<b>CHAPITRE 4 RÉPRESSION DES GÈNES SUPPESSEURS DE TUMEURS PAR LA MÉTHYLATION DE L'ADN - IMPLICATION DANS LA LEUCÉMIE .....</b>	<b>12</b>
<b>4.1 IMPLICATION DU CYCLE CELLULAIRE .....</b>	<b>14</b>
<b>4.2 p15INK4B (p15).....</b>	<b>15</b>
<b>4.3 p57KIP2 (p57).....</b>	<b>16</b>
<b>CHAPITRE 5 LES ANALOGUES DES NUCLÉOSIDES UTILISÉS EXPÉRIMENTALEMENT DANS LE TRAITEMENT DE LA LEUCÉMIE.....</b>	<b>17</b>
<b>5.1 LA 5-AZA-2'-DÉSOXYCYTIDINE.....</b>	<b>18</b>
5.1.1 HISTORIQUE DU COMPOSÉ .....	18
5.1.2 STRUCTURE CHIMIQUE.....	20
5.1.3 MÉTABOLISME.....	20
5.1.4 MÉCANISMES D'ACTION.....	21
5.1.5 EFFETS SECONDAIRES.....	24
5.1.6 PROTOCOLES D'ADMINISTRATION UTILISÉS CHEZ L'HUMAIN.....	25
<b>5.2 LE ZEBULARINE.....</b>	<b>29</b>
5.2.1 HISTORIQUE DU COMPOSÉ.....	29
5.2.2 STRUCTURE CHIMIQUE.....	30
5.2.3 MÉTABOLISME.....	31
5.2.4 MÉCANISMES D'ACTION.....	32
5.2.5 EFFETS SECONDAIRES.....	34
<b>5.3 RÉSISTANCE AUX ANALOGUES DE LA DÉSOXYCYTIDINE.....</b>	<b>35</b>
<b>5.4 AUTRES INHIBITEURS DE LA MÉTHYLATION DE L'ADN.....</b>	<b>38</b>
<b>CHAPITRE 6 LES MODIFICATIONS ÉPIGÉNÉTIQUES: LA DÉACÉTYLATION DES HISTONES.....</b>	<b>39</b>
<b>6.1 CONSÉQUENCES DE L'ACÉTYLATION/ DÉACÉTYLATION DES HISTONES.....</b>	<b>40</b>
<b>6.2 RÔLES DE LA DÉACÉTYLATION DES HISTONES DANS LA LEUCÉMIE.....</b>	<b>41</b>
<b>CHAPITRE 7 LES INHIBITEURS DE LA DÉACÉTYLATION DES HISTONES.....</b>	<b>42</b>



<b>7.1 LE PHÉNYLBUTYRATE DE SODIUM.....</b>	<b>44</b>
7.1.1 HISTORIQUE DU COMPOSÉ.....	44
7.1.2 STRUCTURE CHIMIQUE.....	45
7.1.3 MÉTABOLISME.....	45
7.1.4 MÉCANISMES EXPLICANTS SON ACTION ANTINÉOPLASIQUE.....	46
7.1.5 EFFETS SECONDAIRES.....	46
<b>7.2 LE NVP-LAQ824.....</b>	<b>47</b>
7.2.1 STRUCTURE CHIMIQUE.....	47
7.2.2 MÉTABOLISME.....	48
7.2.3 MÉCANISMES EXPLICANTS SON ACTION ANTINÉOPLASIQUE.....	48
7.2.4 EFFETS SECONDAIRES.....	48
<b>7.3 L'ACIDE SUBEROYLOHYDROXAMIQUE .....</b>	<b>49</b>
7.3.1 STRUCTURE CHIMIQUE.....	50
7.3.2 MÉTABOLISME.....	50
7.3.3 MÉCANISMES EXPLICANTS SON ACTION ANTINÉOPLASIQUE.....	50
7.3.4 EFFETS SECONDAIRES.....	51
<b>7.5 AUTRES INHIBITEURS DE LA DÉACÉTYLATION DES HISTONES.....</b>	<b>52</b>
<b>CHAPITRE 8 POTENTIALISATION DES DEUX PHÉNOMÈNES ÉPIGÉNÉTIQUES.....</b>	<b>53</b>

## DEUXIÈME PARTIE

### LES OBJECTIFS DE CETTE ÉTUDE

<b>CHAPITRE 9 .....</b>	<b>57</b>
-------------------------	-----------

## TROISIÈME PARTIE

### L'EXPÉRIMENTATION

<b>CHAPITRE 10 .....</b>	<b>60</b>
<b>10.1 ÉVALUATION DES EFFET DES INHIBITEURS DE LA MÉTHYLATION DE L'ADN ET DE LA DÉACÉTYLATION DES HISTONES SUR LES CELLULES UTILISÉES (Tableau 10-1).....</b>	<b>60</b>
<b>10.2 ÉVALUATION BIOMOLÉCULAIRE DE L'EFFET DES INHIBITEURS DE LA MÉTHYLATION DE L'ADN ET DE LA DÉACÉTYLATION DES HISTONES .....</b>	<b>62</b>

<b>CHAPITRE 11 ÉTUDE SUR UN MODÈLE LEUCÉMIQUE MURIN.....</b>	<b>64</b>
<b>CHAPITRE 12 ANALYSE DES DONNÉES - CONSIDÉRATIONS STATISTIQUES ET PRÉSENTATION DES RÉSULTATS.....</b>	<b>67</b>

### QUATRIÈME PARTIE

#### RÉSULTATS - PRÉSENTATION DES MANUSCRITS

<b>CHAPITRE 13 ENHANCEMENT OF ANTINEOPLASTIC ACTION OF 5-AZA-2'-DEOXYCYTIDINE BY PHENYL BUTYRATE ON L1210 LEUKEMIC CELLS.....</b>	<b>70</b>
13.1 CONTRIBUTION DES AUTEURS.....	70
13.2 RÉSUMÉ FRANÇAIS DE L'ARTICLE.....	71
13.3 PRÉSENTATION DE L'ARTICLE.....	72
<b>CHAPITRE 14 ENHANCEMENT OF ANTINEOPLASTIC ACTION OF 5'-AZA-2'-DEOXYCYTIDINE BY ZEBULARINE ON L1210 LEUKEMIA.....</b>	<b>96</b>
14.1 CONTRIBUTION DES AUTEURS.....	96
14.2 RÉSUMÉ FRANÇAIS DE L'ARTICLE.....	97
14.3 PRÉSENTATION DE L'ARTICLE.....	98
<b>CHAPITRE 15 INHIBITION OF CYTIDINE DEAMINASE BY ZEBULARINE ENHANCES THE ANTINEOPLASTIC ACTION OF 5-AZA-2'-DEOXYCYTIDINE.....</b>	<b>123</b>
15.1 CONTRIBUTION DES AUTEURS.....	123
15.2 RÉSUMÉ FRANÇAIS DE L'ARTICLE.....	124
15.3 PRÉSENTATION DE L'ARTICLE.....	125
<b>CHAPITRE 16 IMPORTANCE OF DOSE-SCHEDULE OF 5-AZA-2'-DEOXYCYTIDINE FOR EPIGENETIC THERAPY OF CANCER.....</b>	<b>143</b>
16.1 CONTRIBUTION DES AUTEURS.....	143
16.2 RÉSUMÉ FRANÇAIS DE L'ARTICLE.....	144
16.3 PRÉSENTATION DE L'ARTICLE.....	145

**CINQUIÈME PARTIE**  
**DISCUSSION GÉNÉRALE / CONCLUSIONS**

<b>DISCUSSION .....</b>	<b>172</b>
<b>DISCUSSION SUR LA MÉTHODOLOGIE UTILISÉE .....</b>	<b>172</b>
<b>DISCUSSION SUR LES RÉSULTATS .....</b>	<b>176</b>
Les inhibiteurs des déacétylases des histones potentialisent l'effet de la 5-Aza-CdR .....	176
Le zebularine potentialise l'effet anti-leucémique de la 5-Aza-CdR .....	180
Protocole d'administration optimal de la 5-Aza-CdR .....	185
<b>DISCUSSION GÉNÉRALE .....</b>	<b>192</b>
Hyperméthylation versus hypométhylation ; paradoxe ? .....	192
La 5-Aza-CdR, un carcinogène ? .....	193
L'utilisation des analogues de la CdR dans la prévention des cancers? .....	193
Les histones participent activement à la régulation de l'expression des gènes .....	194
<b>CONCLUSIONS .....</b>	<b>196</b>
<b>CONTRIBUTION À L'AVANCEMENT DES CONNAISSANCES ET     APPLICATIONS FUTURES .....</b>	<b>197</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>	<b>199</b>

## ANNEXES

ANNEXE 1	CALCULS PHARMACOCINETIQUES DE LA 5-AZA-CDR.....	220
ANNEXE 2	MODELE DE SKIPPER-SCHABEL-WILCOX, LE <i>LOG KILL</i> ; EXPLICATIONS ET CALCULS.....	221
ANNEXE 3	LA METHODE DE VALERIOTE ET LIN.....	222
ANNEXE 4	LA METHODE DE KAPLAN MEIER.....	223
ANNEXE 5	PERMISSIONS DES COAUTEURS ET DES EDITEURS POUR CHACUN DES ARTICLES PRESENTES DANS CETTE THESE.....	224
ANNEXE 6	ACTIVATION OF EXPRESSION OF P15, P73 AND E-CADHERIN IN LEUKEMIC CELLS BY DIFFERENT CONCENTRATIONS OF 5'-AZA-2'-DEOXYCYTIDINE (DECITABINE) .....	225
ANNEXE 7	POTENTIALISATION DE L'ACTION ANTINÉOPLASIQUE DE LA 5-AZA-2'-DÉSOXYCYTIDINE PAR DIFFÉRENTS INHIBITEURS DES DÉACÉTYLASES DES HISTONES DANS LE TRAITEMENT DE LA LEUCÉMIE.....	226
ANNEXE 8	CURRICULUM VITAE.....	248

## LISTE DES TABLES ET TABLEAUX

Tableau 5-1. Différents protocoles expérimentaux avec de faibles doses la 5-Aza-CdR .....	27
Tableau 10-1. Cellules utilisées.....	61
Table 13-1. Inhibition of DNA synthesis by different concentrations of 5-Aza-CdR or PB on L1210 leukemic cells.....	83
Table 13-2. Effect of 5-Aza-CdR and/or PB on survival time of CD2F <sub>1</sub> .....	87
Table 14-1. Effect of 5-Aza-CdR or Zeb on loss of clonogenicity on L1210 and HL-60 leukemic cells .....	111
Table 14-2. Effect of different dose schedules of 5-Aza-CdR and/or Zeb on survival time of CD2F <sub>1</sub> mice with L1210 leukemia.....	115
Table 15-1. CR deaminase activity in 3T3 and V5 cells <sup>a</sup> .....	132
Table 15-2. Effect of different concentrations and exposure times of 5-Aza-CdR on loss of clonogenicity of 3T3 and V5 cells .....	133
Table 15-3. Pharmacokinetic analysis of 5-Aza-CdR during i.v. infusion in mice.....	134
Table 16-1. Effect of different concentrations and exposure times of DAC on loss of clonogenicity of human HL-60 myeloid leukemic cells....	156
Table 16-2. Effect of different concentrations and exposure times of DAC on loss of clonogenicity of human Calu-6 lung carcinoma cells .....	157
Table 16-3. Effect of different concentrations of DAC on loss of clonogenicity by L1210 murine lymphoblastic leukemia, or by EMT6 murine mammary tumor cells <sup>a</sup> .....	158
Table 16-4. Pharmacokinetics of DAC in mice .....	162
Table 17-1. Effect of 5-Aza-CdR, LAQ or SAHA on loss of clonogenicity on HL-60 leukemic cells.....	237

## LISTE DES FIGURES

Figure 3-1.	Méthylation des cytosines du brin fille de l'ADN par l'ADN méthyltransférase au moment de la réplication cellulaire. ....	8
Figure 3-2.	La méthylation de l'ADN régule l'expression des gènes. ....	9
Figure 4-1.	Variante de l'hypothèse de Knudsen. ....	12
Figure 4-2.	Contrôle du cycle cellulaire par les cyclines dépendantes kinases et leurs inhibiteurs. ....	14
Figure 5-1.	Structure chimique de la 5-aza-2'-désoxycytidine <i>versus</i> celle de la désoxycytidine. ....	20
Figure 5-2.	Métabolisme de la 5-aza-2'-désoxycytidine. ....	21
Figure 5-3.	Séquestration de l'ADN méthyltransférase en C6 de la 5-Aza-CdR. ....	22
Figure 5-4.	La séquestration de l'ADN méthyltransférase par la 5-Aza-CdR induit l'hypométhylation subséquent du génome. ....	23
Figure 5-5.	Structure chimique du zebularine <i>versus</i> celles de la 5-aza-2'-désoxycytidine et de la désoxycytidine. ....	30
Figure 6-1.	Arrangement structural de la chromatine. ....	39
Figure 6-2.	Acétylation / déacétylation des résidus lysines situés sur la "queue" N-terminale des différentes sous-unités de l'histone. ....	41
Figure 7-1.	Action des inhibiteurs des déacétylases des histones. ....	43
Figure 7-2.	Structure du phénylbutyrate de sodium. ....	45
Figure 7-3.	Structure du NVP-LAQ824. ....	47
Figure 7-4.	Structure de l'acide suberoylohydroxamique. ....	50
Figure 8-1.	Complémentarité entre la méthylation de l'ADN et la déacétylation des histones. ....	54
Figure 8-2.	Effet de la co-administration d'un inhibiteur de la méthylation de l'ADN (5-aza-2'-désoxycytidine) et d'un inhibiteur des déacétylases des histones. ....	55

Figure 11-1. Administration en infusion par voie intraveineuse de différents agents aux souris. ....	66
Figure 13-1. Effect of 5-Aza-CdR and PB alone or in combination on DNA synthesis inhibition in L1210 leukemic cells.....	84
Figure 13-2. Effect of 5-Aza-CdR and/or PB on growth inhibition in L1210 leukemic cells. ....	85
Figure 13-3. Effect of 5-Aza-CdR and PB alone or in combination on loss of clonogenicity of L1210 or HL-60 leukemic cells.....	86
Figure 13-4. Effect of 5-Aza-CdR and PB alone or in combination on the expression of p15 gene in L1210 leukemic cells.....	88
Figure 14-1. Metabolism of 5-Aza-CdR. ....	102
Figure 14-2. Effect of 5-Aza-CdR and/or Zeb on growth of L1210 or HL-60 leukemic cells. ....	110
Figure 14-3. Effect of 5-Aza-CdR and/or Zeb on loss of clonogenicity of L1210 and HL-60 leukemic cells. ....	112
Figure 14-4. Effect of 5-Aza-CdR and Zeb alone or in combination on the expression of the p57KIP2 gene in HL-60 leukemic cells. ....	113
Figure 14-5. Effect of 5-Aza-CdR and Zeb alone or in combination on the methylation status of the promoter of the p57KIP2 gene in HL-60 leukemic cells.....	114
Figure 15-1. Lineweaver-Burk plot of the effect of zebularine on the deamination of different concentrations of 5-Aza-CdR by CR deaminase.....	135
Figure 15-2. Effect of zebularine on antineoplastic action of 5-Aza-CdR on 3T3 cells and V5 cells transduced with CR deaminase gene.....	136
Figure 15-3. Kaplan-Meier survival curve of mice with L1210 leukemia treated with zebularine and 5-Aza-CdR. ....	137
Figure 16-1. Effect of DAC concentration on DNA methylation and reactivation of p57 and p16 tumor suppressor genes.....	159
Figure 16-2. Effect of DAC on the survival time of mice with L1210 lymphoid leukemia;.....	160
Figure 16-3. Effect of DAC therapy on mice on the survival of EMT6 mammary tumor cells .....	161

Figure 17-1.	Effect on loss of clonogenicity of a simultaneous exposure of HL-60 cells to 5-Aza-CdR and LAQ (A) or SAHA (B).....	238
Figure 17-2.	Effect of LAQ and SAHA on loss of clonogenicity on HL-60 cells exposed to a higher concentration of 5-Aza-CdR. ....	239
Figure 17-3.	Effect of 5-Aza-CdR and LAQ on global methylation of the LINE element on HL-60 cells.....	240
Figure 17-4.	Expression of the small RNA hY1 gene in presence of 5-Aza-CdR and LAQ.....	241



**ABRÉVIATIONS**

5-Aza-CdR	5-aza-2'-désoxycytidine
5-Aza-CMP, -CDP, -CTP	formes mono-, di- et triphosphate
5-Aza-UdR, 5-Aza-UMP	5-Aza-2'-désoxyuridine, forme monophosphaté
5-mC	5-méthylcytosine
ADN	acide désoxyribonucléique
Ara-C	cytosine arabinoside
CDK	cycline dépendante kinase
CdR	désoxycytidine
CR	cytidine
CSC	cellule souche cancéreuse
DNMT	ADN méthyltransférase
EBV	Epstein-Barr virus
HAT	acétyltransférase des histones
HDAC	déacétylase des histones
HDACi	inhibiteur des déacétylases des histones
HIV	virus de l'immunodéficience humaine
HMT	méthyltransférase des histones
IC	concentration inhibitrice
K	lysine
K <sub>i</sub>	constante de dissociation du complexe enzyme-inhibiteur
K <sub>m</sub>	constante de Michaelis-Menten
LAL	leucémie aiguë lymphoblastique
LAM	leucémie aiguë myéloïde
LAQ	NVP-LAQ824
LLC	leucémie lymphoïde chronique
LMC	leucémie myéloïde chronique
pb	paire de bases
PB	phénylbutyrate de sodium
SAHA	acide suberoylohydroxamique
TSG	gène suppresseur de tumeur

À mes enfants,

## REMERCIEMENTS

Je remercie sincèrement,

Dr Richard L. Momparler pour son accueil et son support au sein du laboratoire, et pour m'avoir accompagné dans mon cheminement scientifique.

Madame Louise Momparler pour sa précieuse aide et pour les bons moments passés ensemble.

Mes collègues de laboratoire pour les bons moments passés en leur présence et pour leur aide tout au long de ces années.

Madame Annie Hurtubise en qui j'ai trouvé une grande amie.

Mes parents, mon frère, ma sœur ainsi que ma belle-famille pour leurs encouragements.

Mon conjoint, Benoit, pour son appui, son écoute, sa présence et ses encouragements depuis le tout début.

Mes enfants, Thomas et Corinne, qui ont partagé bien malgré eux leur maman avec la science ces dernières années.

Le département de Pharmacologie de l'Université de Montréal et le Centre de Recherche Pédiatrique de l'Hôpital Sainte-Justine pour ma formation scientifique.

Le Fonds de recherche en santé du Québec (FRSQ), le Centre de Recherche de l'Hôpital Sainte-Justine, le Département de Pharmacologie de l'Université de Montréal, la fondation J.A. DeSève et la Faculté des études supérieures de l'Université de Montréal pour leur support financier.

Et finalement, les membres du jury pour avoir donné de leur temps pour lire cet ouvrage.

## AVANT-PROPOS

L'inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs (TSGs) qui régularisent la prolifération normale des cellules joue un rôle important dans la leucémogénèse. Des modifications épigénétiques sont impliquées dans la répression de ces gènes. On les nomme épigénétiques, puisque l'inactivation génique qu'elles engendrent n'est pas due à une modification de la séquence de l'ADN. Deux mécanismes épigénétiques tendent à réprimer l'expression des TSGs: la méthylation des résidus cytosines de la région promotrice des gènes et la déacétylation des histones des chromosomes. L'ajout d'un groupement méthyle dans le promoteur des TSGs permet l'attachement de protéines qui bloquent l'accès aux facteurs de transcription. De plus, ces protéines recrutent des enzymes déacétylases des histones qui elles favorisent une condensation de la chromatine qui devient alors difficilement accessible aux facteurs de transcription, le tout favorisant la répression des TSGs. Il est possible d'exploiter cette complémentarité observée entre les deux phénomènes en co-administrant un inhibiteur de la méthylation de l'ADN (5-aza-2'-désoxycytidine (5-Aza-CdR)) à un inhibiteur des déacétylases des histones (HDACi) (phénylbutyrate, SAHA et LAQ). De plus, étant donné que la dégradation de la 5-Aza-CdR par la cytidine (CR) désaminase résulte en une perte complète de son activité anti-leucémique, l'ajout du zebularine, un inhibiteur à la fois de la méthylation de l'ADN et de la CR désaminase, augmenterait son activité antinéoplasique. Toutes ces combinaisons permettraient d'améliorer l'efficacité anti-leucémique de la 5-Aza-CdR.

La 5-Aza-CdR utilisée lors d'essais cliniques s'est avérée efficace contre des maladies hématologiques et a montré une certaine activité contre des tumeurs. Cet agent expérimental est approuvé au États-Unis depuis 2006 dans le traitement du syndrome myélodysplasique. Cependant, le protocole d'administration optimal de cet agent n'est pas établi; les thérapies expérimentales actuelles n'étant basées que sur des données empiriques.

Dans le cadre de cette thèse, nous voulons : 1- définir un protocole d'administration adéquat de la 5-Aza-CdR et 2- potentialiser l'action de la 5-Aza-CdR en la combinant à différents agents chimiothérapeutiques ayant des mécanismes d'action complémentaires. L'optimisation de l'effet de la 5-Aza-CdR permettrait de diminuer les risques de résistance qui lui sont associés ainsi que ses effets secondaires.

Nos recherches suggèrent que les protocoles d'administration de la 5-Aza-CdR en monothérapie devraient être plus intensifs que ce que rapporte la littérature. De plus, la co-administration de cet agent avec un HDACi ou avec un inhibiteur de la de la CR désaminase potentialise son action anti-leucémique. Comme les mécanismes épigénétiques ciblés par la 5-Aza-CdR sont présents dans plusieurs types de cancer ; nos observations pourraient être bénéfiques à beaucoup de patients.

Cette thèse sera présentée en cinq parties. Tout d'abord, une revue de la littérature portera successivement sur la leucémie, les modifications épigénétiques et puis sur les agents pharmacologiques utilisés. Ensuite, une présentation des objectifs de l'étude sera faite suivie d'une brève description de la méthodologie. Puis lui succèdera une présentation des résultats, sous forme d'articles publiés. Enfin, la dernière partie portera sur une discussion des résultats obtenus et de la contribution de ceux-ci à l'avancement des connaissances sur la thérapie épigénétique contre le cancer.

**PREMIÈRE PARTIE**  
**REVUE DE LA LITTÉRATURE**

## CHAPITRE 1

### LA LEUCÉMIE

Au Canada, on dénombre chaque année environ 4 500 nouveaux cas de leucémie chez l'adulte avec un taux de survie à cinq ans de 50%. Chez les enfants, la leucémie est responsable de plus du tiers des diagnostics de cancers avec un taux de survie à cinq ans de 85% (Société canadienne du cancer, 2008).

La leucémie est un processus malin qui affecte les tissus hématopoïétiques. Quelques-unes de ses causes sont caractérisées ; notons par exemple l'instabilité génomique, les translocations chromosomiques et les modifications épigénétiques. Ces dernières seront abordées dans cet ouvrage.

Quelles que soient les étiologies de la leucémie, il semble que la transformation maligne apparaisse d'abord dans une seule cellule dont la multiplication et l'expansion clonale sera responsable de l'apparition de la maladie ; c'est la cellule souche cancéreuse (CSC). Les cellules leucémiques engendrées par cette CSC interféreront alors avec l'hématopoïèse normale, ce qui entraînera diverses conséquences. Le nombre d'événements nécessaires à l'initiation du processus malin et à la transformation cellulaire est inconnu à ce jour, mais les cellules atteintes présentent les caractéristiques tumorales habituelles, soit la capacité d'échapper à l'apoptose, de se multiplier anarchiquement, de se contrôler elle-même, ...

Le type cellulaire affecté par la modification maligne (lignée myéloïde ou lymphoïde) détermine le type de leucémie. Elle sera aiguë lymphoblastique (LAL), aiguë myéloïde (LAM), myéloïde chronique (LMC) ou lymphoïde chronique (LLC). Chaque type de leucémie a sa propre prévalence et morbidité. Par exemple, la LAL est la maladie maligne la plus commune de l'enfance avec une incidence maximale entre 3 et 5 ans, puis diminue en fréquence en fonction de l'âge, alors que la LAM s'observe à tout âge. L'identification cellulaire est actuellement fondamentale pour établir le pronostic et le traitement du patient.

Les protocoles de traitements actuels sont basés sur les risques encourus, c'est-à-dire que les malades dont les facteurs de risques sont défavorables reçoivent un traitement plus intensif; le rapport bénéfices/risques étant plus élevé. Le traitement de la leucémie se fait généralement en deux temps : la première thérapie vise la rémission, puis la seconde, qu'on dit de consolidation, vise à prévenir la rechute. Les échecs thérapeutiques sont généralement attribuables à la résistance médicamenteuse, ou à l'infection et/ou à l'hémorragie survenant pendant la période d'hypoplasie cellulaire consécutive à la chimiothérapie. La découverte de nouveaux traitements permettrait d'améliorer la qualité et la durée de vie des patients.



## **CHAPITRE 2**

### **LES MODIFICATIONS ÉPIGÉNÉTIQUES**

Une modification épigénétique réfère à des changements dans l'expression des gènes causés par des mécanismes qui n'affectent pas la séquence de l'ADN (Jones & Laird, 1999 ; Momparler, 2003 ; Yoo & Jones, 2006). Son rôle dans le cancer est connu depuis les années '80s, mais ce n'est que récemment que divers groupes ont fait la démonstration que les modifications épigénétiques ne sont pas une conséquence, mais bien une cause de la transformation maligne. Par exemple, Hochedlinger et coll. (2004) ont montré que la transplantation d'un noyau ayant les mêmes mutations que l'hôte dans un nouvel oocyte conduit à la perte du phénotype néoplasique du blastocyte. Ils conclurent alors que les modifications épigénétiques sont au moins partiellement responsables du phénotype initial. Aussi, des chercheurs ont montré que la répression par des phénomènes épigénétiques d'un gène de réparation de l'ADN prédisposait les individus à développer certains types de cancer. Cette répression génique était d'abord présente dans les cellules germinales de l'individu et conséquemment transmissible à sa descendance (Suter et coll., 2004).

Parmi les mécanismes épigénétiques caractérisés, nous traiterons de 1- la méthylation des résidus cytosines de la région promotrice des gènes de l'ADN et 2- de la déacétylation des histones des chromosomes.

### CHAPITRE 3

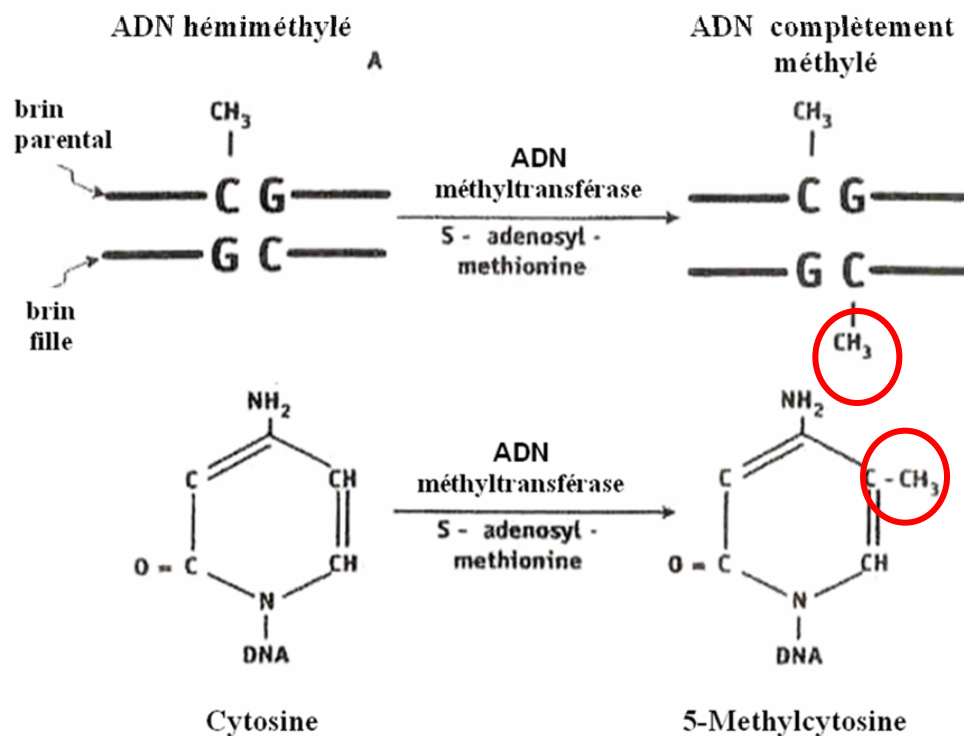
#### LES MODIFICATIONS ÉPIGÉNÉTIQUES: LA MÉTHYLATION DE L'ADN

Chez l'eucaryote, seules les cytosines de l'ADN peuvent être méthylées. L'ajout d'un groupement méthyle ( $\text{CH}_3$ ) se produit sur le carbone 5 d'une cytosine occupant une position précise dans l'ADN, soit à côté de nucléotides à guanine ( $^5\text{CpG}^3$ ) (Razin & Riggs, 1980). De 3 à 5% des résidus cytosines du génome sont méthylés (Ehrlich et coll., 1982). Dans 70-80% des cas, cela se produit dans des îlots CpG (Ehrlich et coll., 1982 ; Bird, 1986), région longue de 500-2000 pb qui est riche en cytosine-guanine que l'on retrouve au niveau des promoteurs, des exons et de la région 3' de certains gènes (Gardiner-Garden & Frommer, 1987). Par ailleurs, 50% de tous les gènes ont des îlots CpG dans leur promoteur (Jones & Baylin, 1982). Chaque gène et chaque tissu ont leur patron de méthylation spécifique (Razin & Cedar, 1977).

Ce sont les ADN méthyltransférases (DNMTs) qui catalysent la méthylation en transférant un  $\text{CH}_3$  de la S-adénosyl-méthionine sur une cytosine (Wu & Santi, 1985). On dénombre au moins trois familles de DNMTs. C'est normalement la DNMT1 qui méthyle le brin fille de l'ADN des cellules post-répliquées selon le patron hémiméthylé du brin parental (Razin & Riggs, 1980 ; Bouchard & Momparler, 1983; Turker & Bestor ; 1997) (figure 3-1). Cependant, la viabilité de cellules souches DNMT1  $-/-$  et la présence de méthylation dans l'ADN de ces mêmes cellules, suggèrent que d'autres DNMTs, tel que les DNMTs 3a et 3b, peuvent méthyler *de novo* l'ADN lors de la division cellulaire (Lei et coll., 1996 ; Xie et coll., 1999 ; Velicescu et coll., 2002).

La méthylation joue un rôle important dans la protection de l'ADN (Doerfler, 1995), par exemple contre certains virus (Robertson, 2000) ou contre l'expression d'éléments répétés du génome qui pourraient induire des mutations dans le génome

(Goll & Bestor, 2005). La méthylation est aussi impliquée dans la régulation de l'expression des gènes (Razin & Riggs, 1980), dans la différenciation cellulaire (Kochanek et coll., 1990), dans l'inactivation du chromosome X (Riggs & Pfeifer, 1992), dans l'embryogenèse (Kafri et coll., 1992), dans le développement après la naissance (Jones & Takai, 2001) et dans le vieillissement (Toyota et coll., 1999). Nous nous attarderons à son rôle dans la régulation de l'expression des gènes.



**Figure 3-1. Méthylation des cytosines du brin fille de l'ADN par l'ADN méthyltransférase au moment de la réplication cellulaire. La méthylation se fait selon le patron hémiméthylé établi par le brin parental. Le donneur de groupement méthyle est la S-adénosyl-méthionine.**

### 3.1 CONSÉQUENCES DE LA MÉTHYLATION DE L'ADN

La méthylation de l'ADN régule l'expression génique (figure 3-2) de deux façons :

1. Les facteurs de transcription se lient difficilement et avec moins d'affinité aux promoteurs contenant des 5-méthylcytosines (5-mC) (Iguchi-Arigo & Schaffner, 1989 ; Goll & Bestor, 2005).
2. La méthylation permet l'attachement de protéines, telles des *sequence specific-methylated DNA binding protein* (MBDs, KAISO) ou des *5-methylcytosine-binding protein* (MECP<sub>1</sub> et <sub>2</sub>) qui bloquent l'accès aux facteurs de transcription. La nature du lien moléculaire entre la 5-mC et les protéines mentionnées est mal connue.

L'expansion de la transcription de part et d'autre des sites de fixation des facteurs de transcription induit la répression génique (Turker, 2002). On ignore si un patron spécifique est nécessaire à cette répression.

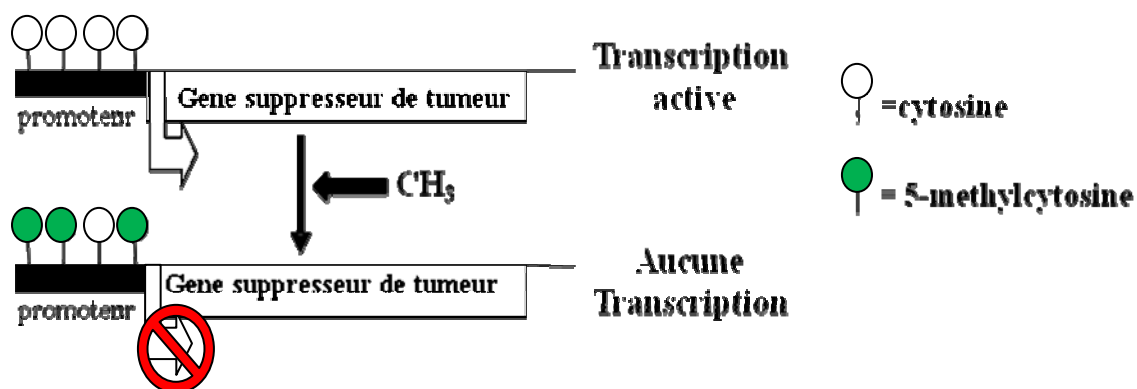


Figure 3-2. La méthylation de l'ADN régule l'expression des gènes.

(adapté de Momparler, 2005a)

### 3.2 RÔLES DE LA MÉTHYLATION DE L'ADN DANS LA LEUCÉMIE

On connaît peu les raisons pour lesquelles les méthylations aberrantes surviennent dans les cellules. Une fois la cellule dite cancéreuse, on observe généralement une augmentation du niveau d'ARNm et de l'activité de la DNMT dans les cellules en division (Kautiainen & Jones, 1986 ; Ramchandani et coll., 1997), sans pour autant établir un lien entre cette augmentation et la perte d'expression génique (Eads et coll., 1999 ; Cervoni & Szyf 2001). Par contre, typiquement, le patron de méthylation est alors caractérisé comme suit : une hypométhylation globale du génome et de certains éléments répétitifs coexiste avec une hyperméthylation régionale des TSGs (Gama-Sosa et coll., 1983 ; Baylin et coll., 1998 ; Ehrlich, 2002 ; Gaudet et coll., 2003). L'explication probable de ce phénomène résiderait en la possible affinité qu'auraient les DNMTs pour les palindromes asymétriques retrouvés dans les îlots CpG et méthyleraient alors préférentiellement ces sites. De plus, la surabondance des dommages à l'ADN des cellules cancéreuses crée différentes régions asymétriques dans le génome qui pourraient aussi être le siège de méthylation. Ainsi, une augmentation marquée des sites de liaisons aux DNMTs diminuerait conséquemment l'efficacité de l'enzyme, créant une hypométhylation subséquente du génome (Robertson et coll., 1999). Cette dernière hypothèse est controversée. La surexpression d'une ADN déméthylase présente dans les cellules pourrait aussi engendrer une hypométhylation du génome (Bhattacharya et coll., 1999 ; Ramchandani et coll., 1999 ; Cervoni & Szyf 2001). La présence d'une ADN déméthylase ferait de la méthylation des cytosines un phénomène biologique réversible, mais l'existence de cet enzyme reste à ce jour contestée.

En temps normal, on croit que les îlots CpG sont protégés de la méthylation aberrante par la présence de *Spl-binding motifs* (Brandeis et coll., 1994 ; Mummaneni et coll., 1998). Toutefois, s'il y a méthylation, le nouveau patron établi sera transmis à chaque cellule fille de façon très stable par la DNMT1 qui est nécessaire au maintien du patron de méthylation (Robert et coll., 2003).

L'hyperméthylation des régions riches en CpG se traduit dans le cancer par la répression de plusieurs gènes (Mompalao & Bovenzi, 2000). Ces gènes sont impliqués soit dans le contrôle du cycle cellulaire (TSGs), dans la réparation de l'ADN, dans l'apoptose, dans l'angiogénèse, etc. Nous nous attarderons ici aux TSGs impliqués dans la leucémie. Leur inactivation mène à la préparation d'un terrain propice au développement des cellules cancéreuses ou à une prolifération cellulaire incontrôlée (Sherr, 2000 ; Chen et coll., 2004).

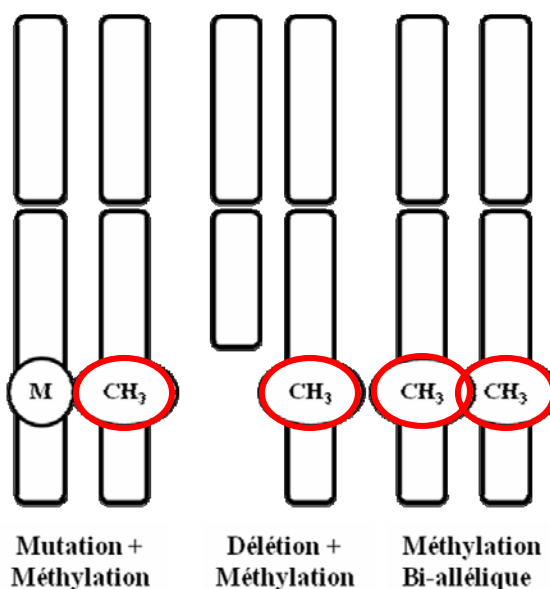
Pour ajouter à la complexité du phénomène, la 5-mC peut facilement être désaminée en thymine (Denissenko et coll., 1997), ce qui en fait un site de prédilection pour les mutations. En effet, les transitions de C à T des CpG sont les mutations les plus fréquentes dans le cancer et les maladies génétiques humaines (Morgan et coll., 2004).

La localisation de la méthylation dans l'îlot CpG semble avoir une certaine influence sur le niveau d'expression du gène. L'étendue de la région méthylée autour du site de transcription semble critique pour l'expression du gène, ce qui indiquerait que les modifications en *cis* ou en *trans* des facteurs qui protègent normalement cette région pourraient être responsables de sa méthylation (Mummaneni et coll., 1995). Aussi, il est possible qu'une 5-mC située dans un promoteur qui ne contient pas d'îlot CpG puisse contrôler la transcription du gène (Toyota & Issa, 1999). On ignore cependant si un patron de méthylation est nécessaire à la répression génique. Lorsque la méthylation survient en aval du site de transcription, cela n'affecte pas l'expression des TSGs (Jones & Laird, 1999). Notons aussi que la méthylation d'exons semble avoir peut d'effet sur l'apparition de cellules cancéreuses (Bender et coll., 1999).

## CHAPITRE 4

### RÉPRESSION DES GÈNES SUPPRESSEURS DE TUMEURS PAR LA MÉTHYLATION DE L'ADN - IMPLICATION DANS LA LEUCÉMIE

Le TSG est présent en deux copies, soit une sur le brin maternel et une sur le brin paternel du chromosome. Cela réduit les risques de répression, car les modifications doivent être bi-alléliques pour arriver à réprimer les fonctions biologiques des gènes (Hypothèse de Knudsen (1971)). L'inactivation d'un gène peut impliquer en même temps une modification épigénétique et/ou génétique (figure 4-1). Alors que seules les délétions et les mutations chromosomiques étaient considérées dans l'inactivation des TSGs, plusieurs groupes ont clairement démontré que les TSGs peuvent être inactivés par la méthylation de leur promoteur (Veigl et coll., 1998 ; Jones & Laird, 1999). La suppression de l'expression des gènes suite à la méthylation de leur promoteur est associée à l'hypoacétylation de leurs histones.



**Figure 4-1. Variante de l'hypothèse de Knudsen.**

Différentes modifications bi-alléliques qui mènent à la répression génique. M = mutation; CH<sub>3</sub> = méthylation (adapté de Momparler, 2005a)

Dans la leucémie, 26 gènes sont rapportés réprimés par des méthylations (Kuang et coll., 2008). Le patron de méthylation de ces différents gènes peut servir à la classification des leucémies en différents sous-groupes (Toyota et coll., 1999 ; Gutierrez et coll., 2003). Parmi les TSGs réprimés, notons :

- *CDKN2A* (p16INK4A) (Esteller, 2003)
- *CDKN2B* (p15INK4B) (Esteller, 2003 ; Herman et coll., 1996)
- p73 (Corn et coll., 1999 ; Esteller et coll., 2001)
- CDH1 (E-cadherine) (Melki et coll., 2000 ; Gutierrez et coll., 2003)
- p57KIP2 (Kikuchi et coll., 2002).

L'importance relative de l'inhibition de chacun de ces gènes dans le développement de la leucémie, dans la réponse au traitement et dans l'apparition de la rechute n'est pas claire, mais ils peuvent être modulés par certains agents chimiothérapeutiques (Oki et coll., 2008).



#### 4.1 IMPLICATION DU CYCLE CELLULAIRE

La transition des cellules dans le cycle cellulaire est régulée par la balance des activités des cyclines dépendantes kinases (CDKs) et de leurs inhibiteurs. La production de CDKs en phase G1 sous le contrôle de signaux mitogènes permet la phosphorylation de la protéine Rb et la libération du facteur de transcription E2F. Ce dernier est nécessaire à l'expression des CDKs qui permettent le passage à la phase S du cycle (Hunter & Pines, 1994 ; Morgan & Reuter, 2006) (figure 4-2).

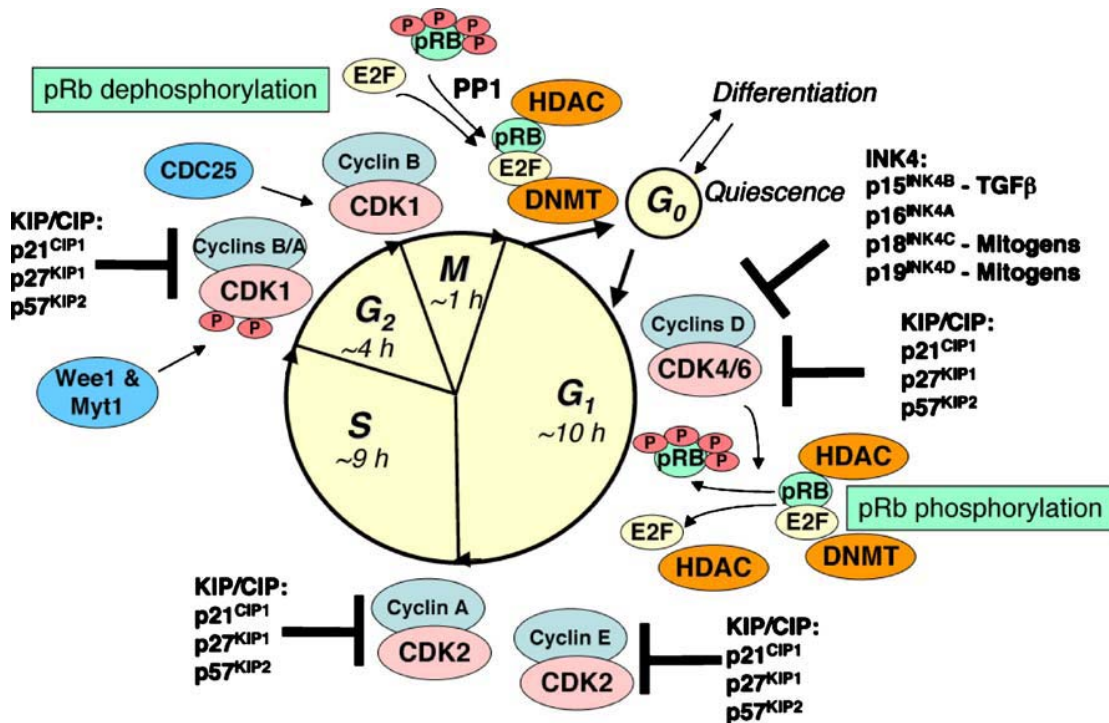


Figure 4-2. Contrôle du cycle cellulaire par les cyclines dépendantes kinases et leurs inhibiteurs.

(Morgan & Reuter, 2006)

## 4.2 p15INK4B (p15)

Situé sur le chromosome 9p21, p15 encode une protéine qui inhibe les complexes 4 et 6 de la cycline dépendante kinase (famille des inhibiteurs CDK4s). Ces cyclines kinases dépendantes permettent le passage des cellules à la phase S du cycle cellulaire en phosphorylant la protéine Rb qui elle initie la relâche de facteurs de transcription nécessaires au changement de phase (figure 4-2). p15 empêche donc le passage des cellules en phase S. p15 est riche en GC.

Herman et coll. (1996) observèrent pour la première fois la répression de p15 par des méthylations dans la leucémie. Plus de 61% des cas de leucémie myéloïde présentent une répression par des méthylations dans ce gène (Wong et coll., 2000 ; Esteller et coll., 2001). De plus, la progression de la maladie et l'apparition de rechutes de type LAL concorde avec l'hyperméthylation de son promoteur (Quesnel et coll., 1998 ; Maloney et coll., 1999). L'inactivation par mutation, délétion ou par méthylations de p15 corrèle avec un mauvais pronostic dans certaines leucémies, notamment celles d'origine myéloïdes (Heyman et coll., 1996 ; Wong et coll., 2000 ; Teofili et coll., 2003).

La perte d'expression de p15 dans certains modèles cellulaires semble progressive (Cameron et coll., 1999) et existerait à terme selon 2 patrons distincts (Dodge et coll., 2001). La répression du gène serait due à une densité de méthylations sur chaque allèle plutôt qu'en une seule méthylation en un point précis du promoteur (Cameron et coll., 1999). Lorsque plus de 40% des sites sont méthylés, le gène p15 est complètement silencieux (Cameron et coll., 1999).

### 4.3 p57KIP2 (p57)

Situé sur le chromosome 11p15, p57 encode une protéine qui inhibe les complexe cyclines/cyclines dépendante kinases (famille des inhibiteurs des protéines kinases (KIPs)) (Lee et coll., 1995 ; Li et coll., 2002) (figure 4-2). Sa répression favorise la prolifération cellulaire tout en diminuant la différenciation (Zhang et coll., 1997) et semble avoir une implication dans plusieurs pathologies, tel que les tumeurs de Wilms, le cancer de la vessie (Fearon et coll., 1985) et le syndrome de Beckwith-Wiedemann (Zhang et coll., 1997). L'expression de p57 semble aussi être normalement modulée à la baisse lors du vieillissement, sans qu'on en connaisse les mécanismes (Park & Chung, 2001).

p57 est préférentiellement exprimé par l'allèle maternel, mais comme aucune méthylation n'est normalement présente dans ce gène chez l'humain, un autre mécanisme que la méthylation de l'ADN serait impliqué dans sa ségrégation (Matsuoka et coll., 1996 ; Chung et coll., 1996).

La perte d'expression de p57 due à des méthylations dans son promoteur est rapportée dans certains lymphomes (Li et coll., 2002), dans certaines lignées cellulaires hématopoïétiques (Kikuchi et coll., 2002 ; Shen et coll., 2003) et dans 28 % des LMA hématopoïétiques (Kikuchi et coll., 2002). Les lignées cellulaires présentant des méthylations dans la région promotrice du gène montrent aussi une hypoacétylation des histones H3 et H4 de leurs chromosomes (Kikuchi et coll., 2002). Cependant, la déméthylation du gène semble nécessaire à sa ré-expression, la déacétylation de ses histones ne permettant pas à elle seule sa ré-expression (Kikuchi et coll., 2002). Ce dernier point semble confirmer l'existence d'au moins deux mécanismes par lesquels la méthylation régule l'expression génique ; soit un dépendant et un indépendant de la déacétylation des histones.

L'inactivation de ce gène par méthylation corrèle avec un mauvais pronostic (Toyota et coll., 2001).

## **CHAPITRE 5**

### **LES ANALOGUES DES NUCLÉOSIDES UTILISÉS EXPÉRIMENTALEMENT DANS LE TRAITEMENT DE LA LEUCÉMIE**

Le traitement de la leucémie vise à éradiquer toutes les cellules atteintes, incluant les cellules souches cancéreuses (CSC) qui sont souvent résistantes à la plupart des traitements (Oakley & Van Zant, 2007). Ces CSC ont un pouvoir clonogénique et peuvent donc théoriquement initier de nouveau la maladie (Clarke & Becker, 2006 ; Oakley & Van Zant, 2007). En plus d'atteindre les CSC et les cellules leucémiques proprement dites, le traitement doit aussi maintenir une toxicité acceptable envers les cellules normales.

Plusieurs gènes sont rapportés méthylés et réprimés dans la leucémie (Wong et coll., 2000 ; Esteller et coll., 2001 ; Kikuchi et coll., 2002). Le traitement avec un inhibiteur de la méthylation qui permettrait la ré-expression de ces gènes s'avère donc une stratégie thérapeutique intéressante.

La 5-aza-2'-désoxycytidine et le zebularine sont des inhibiteurs de la méthylation de l'ADN qui sont au stade expérimental dans le traitement de la leucémie. Ces deux composés sont des antimétabolites qui sont incorporés dans l'ADN des cellules en répllication, normales et cancéreuses. Certaines cellules en haut taux de répllication sont donc aussi affectées, d'où l'apparition d'effets secondaires (Rustum et coll., 1980).

Parmi les antimétabolites, notons aussi la cytosine arabinoside (Cytarabine, ara-C), un inhibiteur de la répllication de l'ADN utilisé dans le traitement de la leucémie. L'ara-C et la 5-Aza-CdR sont des analogues du nucléoside désoxycytidine (CdR) alors que le zebularine est un analogue d'un ribonucléotide. L'activité anti-leucémique de ces analogues est tributaire de leur protocole d'administration, étant donné la spécificité d'action de ces agents pour les cellules en phase S du cycle cellulaire (Skipper & Schabel, 1967 ; Momparler et coll., 1984c).

## 5.1 LA 5-AZA-2'-DÉSOXYCYTIDINE

### 5.1.1 HISTORIQUE DU COMPOSÉ

La 5-aza-2'-désoxycytidine (5-Aza-CdR, Decitabine, Dacogen) a été synthétisé en 1964 par Pliml et Sorm. 4 ans plus tard, Sorm et Vesely (1968) montrèrent pour la première fois que cet agent avait une activité anti-leucémique chez l'animal. Cette activité antinéoplasique a aussi été observée par la suite chez des enfants et des adultes atteints de leucémie lors d'essai clinique de phase I/II (Rivard et coll., 1981; Momparler et coll., 1985c ; Richel et coll., 1991). En 1980, Jones et Taylor montrèrent pour la première fois que la 5-Aza-CdR inhibait la méthylation de l'ADN. Puis, Wilson et coll. (1983) ont fait état de l'existence d'une corrélation entre l'effet anti-leucémique *in vivo* produite par la 5-Aza-CdR et sa capacité d'inhiber la méthylation de l'ADN. De plus, certains auteurs ont observé que ce composé était plus actif *in vivo* (Onetto et coll., 1987) et chez la souris (Momparler et coll., 1984a) que l'ara-C, un antimétabolite utilisé dans le traitement de la leucémie. Momparler et coll. (1985c) ont aussi montré que la 5-Aza-CdR pouvait induire une rémission chez des patients leucémiques en période de rechute. L'intérêt grandissant pour ce composé a par la suite mené à des centaines de publications.

Parmi les découvertes les plus intéressantes concernant la 5-Aza-CdR, il faut noter la démonstration :

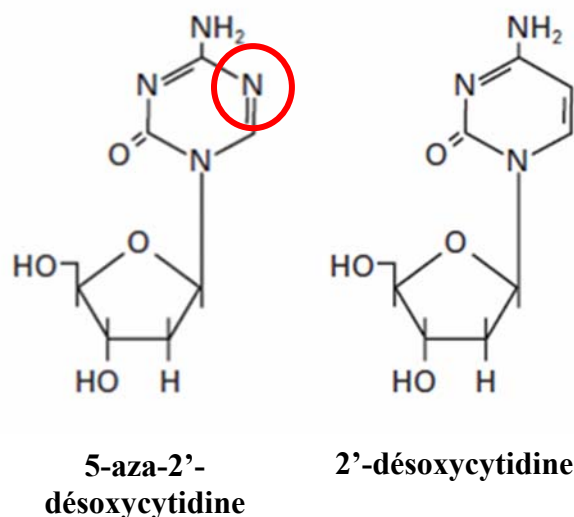
- A) de sa capacité à induire la différenciation cellulaire *in vitro* des cellules leucémiques (Jones & Taylor, 1980 ; Pinto et coll., 1984 ; Momparler et coll., 1985b; Momparler et coll., 1990).
- B) de son action en phase S du cycle cellulaire (Skipper & Schabel, 1967; Momparler et coll., 1984c ; Momparler et coll., 1997b).
- C) de sa capacité à traverser la barrière hémato-encéphalique et d'atteindre des concentrations cytotoxiques dans le liquide cébrospinal (Chabot et coll., 1983b ; Chabot & Momparler, 1984).
- D) de son efficacité dans le traitement du syndrome myélodysplasique (Zagonel et coll., 1993 ; Wijermans et coll., 1997 ; Daskalakis et coll., 2002 ; Issa et coll., 2004). Des essais cliniques concluants avec la 5-Aza-CdR ont mené à

son approbation clinique dans le traitement de ce syndrome aux États-Unis en 2006.

- E) de son activité anti-tumorale modérée (van Groeningen et coll., 1986; Braakhuis et coll., 1988; Momparler et coll., 1997a ; Thibault et coll., 1998).
- F) de sa capacité à ré-exprimer des gènes réprimés par la méthylation. Cette ré-expression se fait d'une façon synergique lorsque que la 5-Aza-CdR est co-administrée avec un inhibiteur des déacétylases des histones *in vitro* (Cameron et coll., 1999). Nous discuterons de cette observation au chapitre 8.
- G) du conditionnement de patients ayant rejeté une transplantation de moelle osseuse. L'administration de la 5-Aza-CdR à dose modérément élevée permet à ces patients (~ 57% d'entre eux) d'obtenir une rémission complète ou partielle (Ravandi et coll., 2001).
- H) qu'un prétraitement à la 5-Aza-CdR peut sensibiliser des cellules résistantes à un autre agent (ex : cisplatine) (Gifford et coll. 2004).
- I) que l'absence de la protéine p53 dans les cellules semble nécessaire à l'induction de l'apoptose par la 5-Aza-CdR et à une meilleure réponse pharmacologique à cet agent. Dans les cellules qui expriment préalablement p53, la 5-Aza-CdR entraîne surtout leur accumulation en phase G2/M (Nieto et coll., 2004).
- J) de sa capacité à induire un changement dans la différenciation et dans la capacité clonogénique des progéniteurs de la lignée myéloïde (Sakashita et coll., 2001 ; Guo et coll., 2006).

### 5.1.2 STRUCTURE CHIMIQUE

Le nom chimique de la 5-Aza-CdR est le 4-amino-1-(2-désoxy- $\beta$ -D-erythro-pentofuranosyl)-1,3,5-triazin-2(1H)-one. Sa base cytosine possède un atome d'azote (N) à la place d'un carbone en position 5, alors que le désoxyribose est identique au nucléoside naturel. Son poids moléculaire est de 228,2 g/mol. La 5-Aza-CdR provient de *Pharmachemie* (Haarlem, Pays-Bas), est dissoute dans du PBS 1X stérile à pH 6.8 (0.2 gm/l de KCl, 0.2 gm/l de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 8 gm/l de NaCl et 2.16 gm/l de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> •7H<sub>2</sub>O) et est conservé à -70°C pour prévenir sa dégradation. La 5-Aza-CdR est très instable (demi-vie de 12 heures à 37°C à pH 7). Sa décomposition se produit par la rupture du lien entre les carbones en position 1 et 6 (Momparler, 2005b).



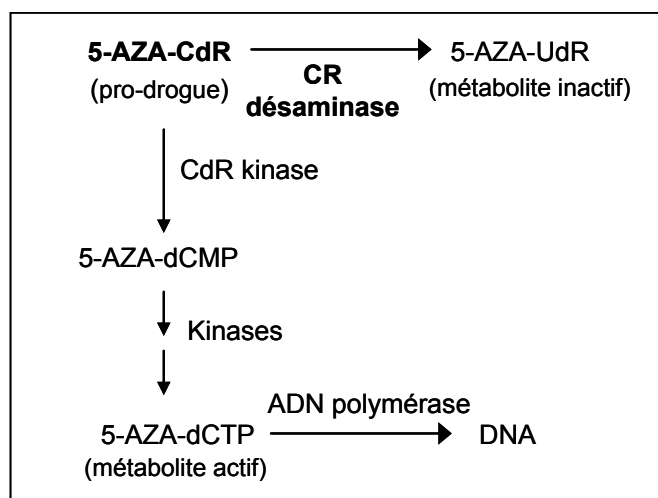
**Figure 5-1. Structure chimique de la 5-aza-2'-désoxycytidine versus celle de la désoxycytidine.**

### 5.1.3 MÉTABOLISME

La 5-Aza-CdR pénètre d'abord la cellule par les transporteurs de nucléotides et par diffusion simple. Elle est ensuite phosphorylée en un précurseur monophosphaté, la 5-aza-2'-désoxycytidine 5'-monophosphate (5-Aza-dCMP), par l'enzyme désoxycytidine (CdR) kinase cytosolique (Momparler & Derse, 1979) (Figure 5-2). Cette étape est cruciale, et les cellules leucémiques déficientes en CdR

kinase sont complètement résistante à la 5-Aza-CdR (Vesely et coll., 1968; Momparler et coll., 1982). Rapidement, la 5-Aza-dCMP est à nouveau phosphorylée d'abord en 5'-diphosphate puis en un dérivé 5'-triphosphate (5-Aza-dCTP). La 5-Aza-dCTP est un substrat actif de l'ADN polymérase (Bouchard & Momparler, 1983).

La désamination de la 5-Aza-dCMP par la dCMP désaminase (Momparler et coll., 1984c) ou celle de la 5-Aza-CdR par la cytidine (CR) désaminase (EC 3.5.4.5) résulte en une perte complète de son activité anti-leucémique (Bouffard et coll., 1993 ; Chabot et coll., 1983a ; Camiener & Smith, 1965) (figure 5-2). La CR désaminase est présente dans le foie et la rate en grande quantité (Ho, 1973) et est responsable en partie de l'échec du traitement et de la courte demi-vie de la 5-Aza-CdR, soit moins de 20 minutes (Rivard et coll., 1981 ; Momparler et coll., 1997b). La régulation des voies métaboliques joue un rôle essentiel dans l'activité de la 5-Aza-CdR (Chabner et coll., 1982).



**Figure 5-2. Métabolisme de la 5-aza-2'-désoxycytidine.**

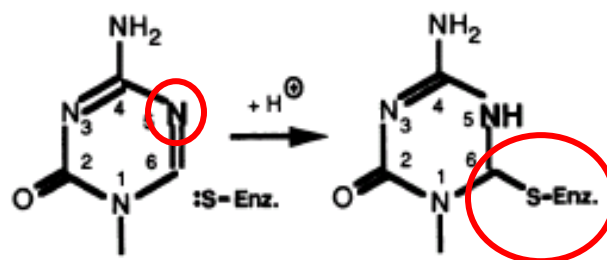
#### 5.1.4 MÉCANISMES D'ACTION

L'activité anti-leucémique de la 5-Aza-CdR dépend de son incorporation dans l'ADN et est liée à sa capacité de séquestrer l'ADN méthyltransférase. En effet, la DNMT reconnaît la 5-Aza-CdR incorporée dans l'ADN comme site potentiel de

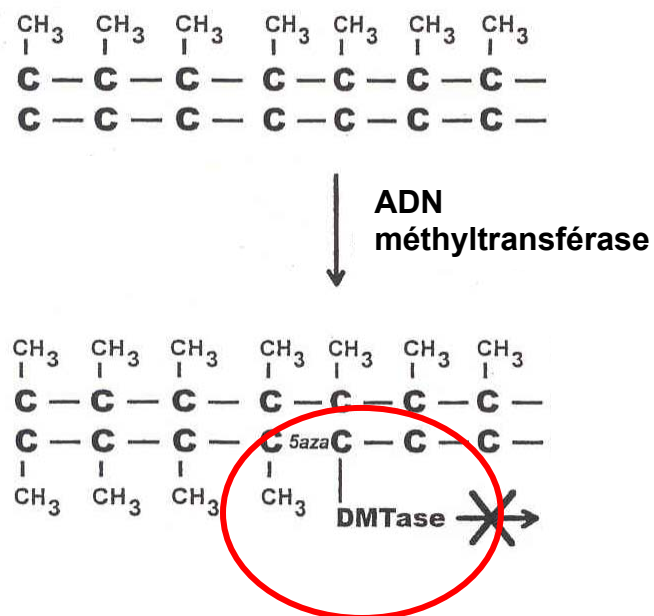


méthylation sans pour autant pouvoir la méthyler, étant donné la présence d'un atome d'azote en C5 plutôt qu'un méthyle. La DNMT se lie à la 5-Aza-CdR par une liaison covalente permanente en C6 (figure 5-3) (Jüttermann et coll., 1994). L'enzyme sera par la suite dégradée par les voies du protéosome. L'hypométhylation subséquente permet alors la lecture des gènes par les facteurs de transcription (figure 5-4). Les gènes réprimés par les méthylation impliqués dans la leucémie peuvent alors être exprimés (Jones & Taylor, 1980). Notons parmi ces gènes, ceux ayant un rôle dans l'apoptose, la sénescence, la différenciation terminale (Jones & Taylor, 1980 ; Razin & Riggs, 1980 ; Pinto et coll., 1984 ; Momparler et coll., 1985b) et la progression des cellules dans le cycle cellulaire. Notons que l'absence de la protéine p53 semble nécessaire à l'induction de l'apoptose par la 5-Aza-CdR (Nieto et coll., 2004).

L'activité antinéoplasique de la 5-Aza-CdR est cependant complexe à étudier étant donné son délai d'action. En effet, les 2 brins d'ADN doivent être déméthylés, donc la cellule doit avoir doublé au moins deux fois (Momparler, 1985a ; Momparler, 2005b). La déméthylation induit l'inhibition de croissance cellulaire menant à une perte de la clonogénicité, la différenciation cellulaire, la sénescence et la mort cellulaire.



**Figure 5-3. Séquestration de l'ADN méthyltransférase en C6 de la 5-Aza-CdR.** La présence de l'azote en C5 ne permet pas le transfert de méthyle.  
S-Enz. = ADN méthyltransférase (Jüttermann et coll., 1994)



**Figure 5-4. La séquestration de l'ADN méthyltransférase par la 5-Aza-CdR induit l'hypométhylation subséquente du génome.**

5aza = 5-Aza-CdR

(adapté de Momparler, 2005a)

### 5.1.5 EFFETS SECONDAIRES

Les effets secondaires principaux de la 5-Aza-CdR sont liés à la spécificité d'action de cet agent pour les cellules en phase S du cycle cellulaire (Skipper & Schabel, 1967 ; Rustum et coll., 1980 ; Momparler et coll., 1984c). Les cellules à haut taux de réplication, telles les cellules hématopoïétiques et digestives, seront touchées de la même façon que les cellules cancéreuses. Le traitement induit la différenciation des cellules progénitrices dans la moelle, provoquant conséquemment une diminution de leur prolifération et une myélosuppression dépendante de la dose, ce qui limite l'utilisation de la 5-Aza-CdR (Momparler et coll., 1997a). Ceci est particulièrement problématique dans le traitement des tumeurs où l'agent doit pénétrer au cœur de celles-ci. Par exemple, 8 h d'infusion à la 5-Aza-CdR induiront l'apparition d'une leucopénie entre les semaines 2 et 4 (Momparler et coll., 1997a). La neutropénie est cependant réversible en quelques semaines, car les cellules hématopoïétiques souches, c'est-à-dire les cellules quiescentes qui sont en G0/G1 ne sont pas atteintes par la 5-Aza-CdR (Rivard et coll., 1981; Kantarjian et coll., 1997).

Une partie de ses effets secondaires pourraient aussi être attribuée à sa non-spécificité pour les différentes DNMTs (Gilbert et coll., 2004).

Plusieurs stratégies sont à l'étude pour diminuer les effets secondaires :

- Rendre les cellules hématopoïétiques normales résistantes à la 5-Aza-CdR par thérapie génique en insérant le gène de la CR désaminase, dont la protéine est responsable en partie de l'inactivation de la 5-Aza-CdR (Eliopoulos et coll., 1998).
- Administrer des facteurs de croissances après le traitement à la 5-Aza-CdR pour favoriser la production de cellules sanguines.
- Potentialiser la dose de la 5-Aza-CdR en la co-administrant avec des composés ayant des mécanismes d'action complémentaires (inhibiteurs de la déacétylation des histones ou de la cytidine désaminase, dont nous discuterons plus loin).

### 5.1.6 PROTOCOLES D'ADMINISTRATION UTILISÉS CHEZ L'HUMAIN

*Conversion pour le dosage de la 5-Aza-CdR (calculs à l'annexe 1)*

$1 \text{ mg/kg/h} = 30 \text{ mg/m}^2/\text{h} \rightarrow \text{concentration plasmatique de } \sim 0,3 \text{ } \mu\text{g/ml} = \sim 1,3 \text{ } \mu\text{M}$

$\text{PM} = 228,2 \text{ g/mol}$

#### *Protocoles utilisés*

Le protocole d'administration optimal de la 5-Aza-CdR reste à être déterminé ; il y a d'ailleurs plus de 30 études cliniques actives (phase I/II/III) avec cet agent présentement répertoriées (*U.S. National Institutes of Health* (<http://www.nih.gov/>)). L'activité anti-leucémique de la 5-Aza-CdR, tout comme celle des autres analogues de la CdR, est tributaire de son protocole d'administration, car cette substance doit être incorporée dans l'ADN et a donc une spécificité d'action sur les cellules en phase S du cycle cellulaire (Skipper & Schabel, 1967; Momparler et coll., 1984c ; Momparler et coll., 1997b) et a une très courte demi-vie (Momparler et coll., 1997b). Un mauvais dosage mènera à l'échec du traitement (Onetto et coll., 1987).

La 5-Aza-CdR a produit peu de résultats sur les tumeurs solides avec les différents protocoles utilisés (Aparicio & Weber, 2002 ; Samlowski et coll., 2005 ; Schrupp et coll., 2006). On observe dans plusieurs études un sous-dosage de l'agent, soit par sa dose, soit par sa durée d'administration. C'est probablement le cas dans les études de van Groeningen et coll., (1986) qui n'ont obtenu que peu de résultat sur des patients atteints de différents cancers. Suite à leurs travaux, ils suggérèrent l'administration optimale future de trois doses de  $75 \text{ mg/m}^2/\text{h}$  en infusion d'une heure aux 5 semaines pour 3 cycles. Abele et coll. (1987) et Clavel et coll. (1992) utilisèrent ce protocole sur des patients atteints de différentes tumeurs (au cou, à la tête, à l'intestin, aux reins et aux testicules) et ils n'ont obtenu aucune réponse. Curieusement, Thibault et coll. (1998) ont observé une réponse objective sur 2 patients d'origine afro-américaine atteints d'un cancer de la prostate avec ce protocole, alors qu'aucun caucasien n'a répondu au traitement. Momparler et coll. (1997a) ont pour leur part observé une réponse intéressante en traitant plus longtemps

avec 82,5 mg/m<sup>2</sup>/h en infusion de 8 h (dose totale de 660 mg/m<sup>2</sup>). Par la suite, la 5-Aza-CdR a été administrée pendant 4 cycles d'entretien (495 mg/m<sup>2</sup>/cycle). La concentration plasmatique moyenne était alors de ~0,6 µg/ml (2.6 µM). Il est possible que la pénétration de la 5-Aza-CdR dans la tumeur soit meilleure à cette dose (Tannock et coll., 2002). Un patient atteint d'un cancer du poumon était d'ailleurs toujours en vie 5 ans après la chimiothérapie (Momparler et coll., 1997a ; Momparler et Ayoub, 2001).

En 1981, Rivard et coll. observèrent certaines réponses avec la 5-Aza-CdR sur de jeunes patients ayant une leucémie résistante aux chimiothérapies conventionnelles. Une dose totale de 2 400 mg/m<sup>2</sup> (60 mg/m<sup>2</sup>/h en infusion X 40 h = concentration plasmatique de ~1 µg/ml durant environ 38 h) a permis de réduire la douleur osseuse perçue par ces enfants et de diminuer la présence de la leucémie méningée, tout en limitant les effets secondaires (nausée, vomissement, diarrhée). Par contre, ce protocole n'a pas permis d'atteindre des rémissions. Ce même groupe modifia l'expérimentation et observa une réponse dans 80% des cas, et même une rémission de 6 mois avec le protocole suivant : 2 010 mg/m<sup>2</sup> (30 mg/m<sup>2</sup>/h en infusion X 60 h + 7 injections de 1 mg/kg aux 10 h), suggérant que de plus longues infusions amènent de meilleurs résultats (Momparler, 1985a). Petti et coll. (1993) ont obtenu des résultats similaires, soit 83% de réponse avec une dose totale de 1 080 mg/m<sup>2</sup> (30 mg/m<sup>2</sup>/h en infusion X 4 h aux 8 heures pendant 3 jours). Dans ce protocole, et dans bien d'autres subséquents avec des doses comparables (Kantarjian et coll., 2003), l'allongement de la durée de l'infusion semble influencer la réponse. La diminution du dosage diminue aussi le nombre de réponses (Kantarjian et coll., 1997).

D'autre part, de plus en plus de groupes misent sur l'administration de petites doses de la 5-Aza-CdR (5 - 15 mg/m<sup>2</sup>/j) réparties sur de plus longues périodes dans le temps (10 à 20 jours) avec des cycles d'environ 6 semaines. Ce protocole d'utilisation permettrait de réduire la toxicité de la 5-Aza-CdR et de modifier l'épigénome de la tumeur tout en ayant un bon pourcentage de réponses objectives. Plusieurs protocoles ont récemment fait l'objet de publications (résumé au tableau 5-1).

Tableau 5-1

## Différents protocoles expérimentaux avec de faibles doses la 5-Aza-CdR.

Dose totale (mg/m <sup>2</sup> )	Dose (mg/m <sup>2</sup> /h)	Temps d'infusion	Réponses (RC / RP) (%)	Baisse globale de la méthylation *	Déméthylation d'un gène*	Réf.
<b>A- Différentes leucémies (majoritairement LMA et LCM)</b>						
150	15	1 h/j, 5/7 j 2 cycles	83 (18/2)	nd	non (0, 5, 12)*	Issa et coll., 2004
150	15	1 h/j, 5/7 j 2 cycles	nd	oui (0, 14)* (↓ 14%) plateau à cette dose	p15 oui, sans corrélation avec la réponse	Yang et coll., 2006
<b>B- Différentes tumeurs d'origine variées (reins, ovaires, colon, seins, carcinome tête et cou, mélanome ...)</b>						
14	0,08	168 h	aucune	nd	gène MAGE-1 oui (14)* non (28-35)* (déméthylation temporaire)	Samlowski et coll., 2005
90	1.25	72 h	aucune	oui (0,7)*	non (0, 7)*	Aparicio et coll., 2003

RC : rémission complète ; RP : rémission partielle ; Réf. : référence ; LAM : leucémie aiguë myéloïde ; LCM : leucémie myéloïde chronique

\* : au jour évalué après le début de l'expérience

La 5-Aza-CdR administrée à faible dose sur de longues périodes semble modifier la méthylation globale (Yang et coll., 2006) et l'expression de différents gènes. Certains de ces gènes présentent une déméthylation immédiate, mais il semble que cette modification ne soit pas stable dans le temps (Samlowski et coll., 2005). La méthylation de l'ADN est un phénomène réversible qui peut donc réapparaître suite à l'arrêt du traitement. De plus, certains gènes (MAGE-3) ne sont seulement exprimés qu'après plusieurs mois de traitement (Schrumpp et coll., 2006), ce qui justifierait l'exposition prolongée des patients aux agents déméthylants.

La 5-Aza-CdR est donc présentement administrée en étude clinique de deux façons, soit :

- 1) à haute dose sur de courte période (1 - 72 h), ce qui produit une cytotoxicité cellulaire désirée accompagnée d'une myélosuppression parfois sévère.
- 2) à faible dose sur de plus longue période (10 - 20 jours), ce qui produit une différenciation cellulaire et une réactivation de gènes suppresseurs de tumeurs (instable et parfois à long terme), tout en produisant peu de toxicité.

## 5.2 LE ZEBULARINE

### 5.2.1 HISTORIQUE DU COMPOSÉ

Le zebularine a été synthétisé par Funakoshi et coll. en 1961. En 1989, Frick et coll. montrèrent pour la première fois que cet analogue de la cytidine inhibe la CR désaminase, enzyme responsable de la dégradation de la 5-Aza-CdR. Bien que certains auteurs aient suggéré la co-administration de ces deux composés, la communauté scientifique resta froide devant cette découverte; l'administration d'un composé adjuvant qui n'a pas d'effet antinéoplasique intrinsèque ne plaît pas.

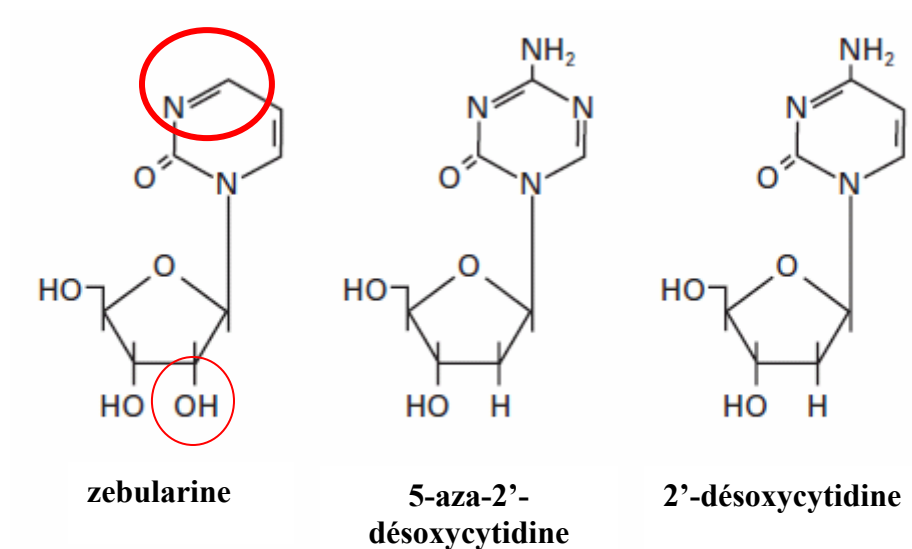
En 1991, Driscoll et coll. ravivent l'intérêt pour le zebularine en lui reconnaissant une activité anti-tumorale à forte dose dont le mécanisme d'action reste alors inconnu. Ils montrèrent aussi que la co-administration du zebularine avec l'ara-C double l'efficacité de cette dernière. C'est en 2002 que Zhou et coll. expliquèrent l'activité du zebularine en montrant qu'il se lie à la DNMT bactérienne et inhibe ainsi la méthylation de l'ADN. Cheng et coll. (2003) firent la même démonstration sur des cellules humaines. Depuis, différents groupes lui ont attribué une activité anti-tumorale (Cheng et coll., 2003 ; Cheng et coll., 2004a) et anti-leucémique (Herranz et coll., 2006 ; Scott et coll., 2007) *in vitro* et *in vivo*.

Le zebularine présente donc deux mécanismes d'action complémentaires à celui de la 5-Aza-CdR, soit l'inhibition de la CR désaminase et de la méthylation de l'ADN. Aussi, il est stable en milieu acide (Kim et coll., 1986 ; Barchi et coll., 1992) et peut donc être administré oralement. Au surplus, le zebularine semble même avoir une préférence pour les cellules tumorales, ces dernières étant plus sensibles à son action (Cheng et coll., 2004b). L'administration prolongée du composé est ainsi facilitée, les cellules normales étant peu affectées. Toutes ces particularités font du zebularine un agent intéressant à utiliser en combinaison avec la 5-Aza-CdR dans le traitement de la leucémie.



### 5.2.2 STRUCTURE CHIMIQUE

Le nom chimique du zebularine est le 1-( $\beta$ -D-ribofuranosyl)-1,2-dihydropyrimidin-2-one. Il a un poids moléculaire de 228,2 g/mol. Il a été obtenu grâce à la générosité de Dr Victor E. Marquez, *Laboratory of Medicinal Chemistry* (NCI-NIH, Maryland, États-Unis). Il est conservé à  $-20^{\circ}\text{C}$  et est dissout dans du PBS 1X stérile pour les essais *in vitro* et dans l'eau pour les essais *in vivo*.



**Figure 5-5. Structure chimique du zebularine *versus* celles de la 5-aza-2'-désoxycytidine et de la désoxycytidine.**

### 5.2.3 MÉTABOLISME

Le zebularine, tout comme la 5-Aza-CdR, doit être phosphorylé par des kinases et incorporé dans l'ADN par une polymérase sous forme de 2'-désoxyzebularine triphosphate. La voie de la phosphorylation est complexe et comporte plusieurs intermédiaires étant donné que le zebularine est un ribonucléotide. La conversion du précurseur diphosphate en désoxydiphosphate semble particulièrement difficile et est de toute évidence une étape limitante (Marquez et coll., 2005). Aussi, il semble que l'incorporation des métabolites du zebularine soit plus grande dans l'ARN que dans l'ADN (Ben-Kasus et coll., 2005). Toutes ces observations pourraient expliquer l'efficacité moindre, à doses égales, du zebularine par rapport à la 5-Aza-CdR (Marquez et coll., 2003).

Le métabolisme du zebularine serait aussi responsable de sa préférence d'action sur les cellules cancéreuses (Cheng et coll., 2004b). En effet, le zebularine subit une première phosphorylation par l'enzyme uridine/cytidine kinase. Comme cette enzyme est présente en plus grande quantité dans les cellules tumorales, celles-ci y sont davantage sensibles (Cheng et coll., 2004b).

Le zebularine est catabolisé en uridine par l'aldéhyde oxydase hépatique (Kleckler et coll., 2006). Son temps de demi-vie chez la souris est de 40 minutes suite à l'administration i.v. de 100 mg/kg et de 91 minutes après l'administration orale de 1 000 mg/kg de zebularine (biodisponibilité limitée de 6.7%) (Holleran et coll., 2005). Le métabolisme du zebularine se fait plus rapidement chez les souris mâles que chez les femelles, probablement dû à une activité enzymatique différente (Yoo et coll., 2006). En plus d'être espèce- dépendante, l'aldéhyde oxydase hépatique est aussi sexe- dépendante, ce qui limite l'évaluation métabolique clinique du zebularine.

Contrairement à la 5-Aza-CdR, le 2'-désoxyzebularine ne peut pas être désaminé par la CR désaminase, étant donné l'absence du groupement amino en position C4 (figure 5-5).

## 5.2.4 MÉCANISMES D'ACTION

### 1- *Le zebularine inhibe la cytidine (CR) désaminase*

La CR désaminase catalyse l'hydrolyse de la CdR en désoxyuridine (Camiener & Smith, 1965). Cette enzyme a donc un rôle important dans le métabolisme des analogues de la CdR utilisés dans la thérapie de la leucémie, puisqu'elle catalyse également leur désamination, ce qui résulte en la perte de leur activité anti-leucémique (Camiener & Smith, 1965 ; Chabot et coll., 1983a ; Bouffard et coll., 1993). L'activité de la CR désaminase chez l'humain est très importante dans le foie et dans la rate (Camiener & Smith, 1965; Ho, 1973) ; les cellules leucémiques qui se réfugient dans ces organes arrivent alors à échapper à l'effet antinéoplasique des analogues de la CdR. Le taux de CR désaminase est aussi élevé dans les granulocytes alors que cette enzyme est peu présente dans les cellules sanguines immatures (Shröder et coll., 1996). L'induction de la différenciation de cellules leucémiques humaines (HL-60) par la 5-Aza-CdR produit d'ailleurs une augmentation significative de l'activité de la CR désaminase (Momparker & Laliberté, 1990).

Le zebularine inhibe la CR désaminase. C'est vraisemblablement un métabolite hydraté de celui-ci, le 3,4-dihydrouridine ( $H_2O$  en C4), qui se lierait au site actif de la CR désaminase. Cette liaison se ferait de deux façons : 1- Il y aurait une faible interaction entre le groupement OH en C4 du dihydrouridine et un H d'un glutamate de l'enzyme et 2- Une interaction se ferait aussi entre le zebularine hydraté et l'ion zinc et une cystéine que l'on retrouve dans le site actif de l'enzyme. Ces liaisons et leurs rôles dans l'activité catalytique de l'enzyme sont cependant incertains (Xiang et coll., 1996). Notons qu'une fois liée, la CR désaminase ne peut pas désaminer le zebularine, étant donné l'absence du groupement amino en position C4 (figure 5-5).

Des expériences ont montré que le zebularine prévient la désamination de la 5-Aza-CdR ( $K_i = 0,054 \mu M$ ) en compétitionnant avec elle pour la CR désaminase et

ce, plus efficacement qu'avec la cytidine elle-même (Laliberté et coll., 1992 ; Carlow & Wolfenden, 1998 ; Frick et coll., 1989).

## 2- *Le zebularine inhibe la méthylation de l'ADN*

Zhou et coll. (2002) ont montré que le zebularine, en plus d'inhiber la CR désaminase, peut former un complexe covalent avec l'ADN méthyltransférase bactérienne. Une fois liée au zebularine, l'enzyme est séquestrée et s'en suit alors une hypométhylation subséquente du génome. Cheng et coll. (2003) ont démontré que le zebularine peut aussi, de la même façon, inhiber la méthylation de l'ADN sur des cellules humaines (cellules T24 d'un carcinome de la vessie). La DNMT reconnaît le zebularine comme site potentiel de méthylation (selon le patron établi par le brin parental), s'y lie d'une façon covalente via un groupement thiol d'une cystéine situé au site actif de l'enzyme (Ivanetich & Santi, 1992). L'attaque nucléophile se fait en C-6 du zebularine lorsque celui-ci tourne hors de l'ADN par un processus appelé "*protein-induced base flipping*" (Klimasauskas et coll., 1994). Contrairement à la 5-Aza-CdR, le zebularine ne peut pas être méthylé par une DNMT lorsqu'elle s'y lie, et ce même après une exposition prolongée à la S-adenosyl-L-méthionine, le donneur de méthyle (Zhou et coll., 2002).

Cheng et coll. (2003) ont de plus montré que le zebularine induit une différenciation des cellules embryogéniques de mammifères en un phénotype myogénique similaire à celui produit par la 5-Aza-CdR. Ils ont aussi démontré que le zebularine active le TSG p16 préalablement réprimé par des méthylation dans les cellules T24 *in vitro* et *in vivo* et que le traitement en continu de ces cellules à faible dose prévient la re-méthylation du gène (Cheng et coll., 2004a). Aussi, le zebularine engendre la déméthylation et la ré-expression du TSG p15 *in vitro* d'une façon dose-dépendante (Scott et coll., 2007).

### 3- *Autres effets du zebularine*

Certains auteurs ont rapporté que le zebularine induit un arrêt cellulaire en G2/M et dirige les cellules vers l'apoptose, ce qui induit un changement morphologique marqué (Scott et coll., 2007).

#### **5.2.5 EFFETS SECONDAIRES**

Lee et coll. (2004) ont montré que le zebularine induit modestement, mais significativement, des mutations par substitution (G : C → A : T) et un changement de cadre de lecture à des doses produisant un effet antinéoplasique (100 - 300 ng/ml) chez *Escherichia coli*. Même si aucun métabolite du zebularine ne semble avoir d'effets mutagènes *in vivo* chez la souris (Beumer et coll., 2006), on ignore si des mutations se produiraient chez l'humain. Aussi, de grandes quantités de zebularine sont nécessaires pour l'obtention de l'effet antinéoplasique en monothérapie, ce qui pourrait avoir certaines conséquences biologiques. L'administration orale prolongée semble cependant ne présenter aucun effet secondaire important (Yoo et coll., 2006).

### 5.3 RÉSISTANCE AUX ANALOGUES DE LA DÉSOXYCYTIDINE

Plusieurs mécanismes de résistance des cellules leucémiques aux analogues de la désoxycytidine, telle la 5-Aza-CdR, ont été observés :

- Un déficit en transporteurs de nucléosides entraîne une diminution de la disponibilité de l'agent dans les cellules (Wiley et coll., 1982).
- Les cellules déficientes en CdR kinase, enzyme responsable de son anabolisme, sont résistantes à la 5-Aza-CdR (Momparler et coll., 1982).
- Les cellules ayant un pool de dCTP naturel trop élevé sont aussi résistantes, car les dCTP mobilisent l'ADN polymérase entraînant une diminution de l'incorporation de la 5-Aza-dCTP dans l'ADN et diminue aussi l'action de la désoxycytidine kinase par rétro inhibition (Momparler et coll., 1997b).
- Une augmentation de l'activité de certaines protéines, comme la glycoprotéine P, diminue aussi l'efficacité des agents (Bradley, 1988).
- Les cellules qui sur-expriment la CR désaminase, enzyme impliquée dans le métabolisme de la 5-Aza-CdR, sont aussi résistantes à la 5-Aza-CdR (Momparler & Onetto-Pothier, 1989). En effet, le transfert du gène de la CR désaminase dans des cellules d'abord sensibles à la 5-Aza-CdR leur confère une résistance importante aux analogues de la CdR (Eliopoulos et coll., 1998).
- Il est possible que la résistance soit régulée par des phénomènes épigénétiques (Gifford et coll., 2004).

La résistance cellulaire peut être innée ou acquise suite au traitement. Par exemple, certaines personnes ont la capacité de désaminer les analogues de la CdR plus rapidement que d'autres, étant donné la présence d'un polymorphisme dans leurs granulocytes (Gilbert et coll., 2006). D'autre part, certains patients traités avec de l'ara-C et de la 5-Aza-CdR ont par la suite présenté une augmentation de l'activité enzymatique de la CR désaminase au moment de la rechute, devenant ainsi résistants à ces agents (Onetto et coll., 1987). Des résultats similaires ont été observés *in vitro* sur des lignées cellulaires de la leucémie (Momparler & Laliberté, 1990). Notons que la résistance peut être liée ou non aux mécanismes d'action de l'agent utilisé et qu'elle mènera à l'échec du traitement.

Il est possible, à l'aide de tests biochimiques, de déterminer la résistance relative d'un patient aux analogues de la CdR avant le traitement (Onetto et coll., 1987). On peut alors diriger correctement le traitement. Voici quelques stratégies pharmacologiques qui permettent de contrer la résistance au traitement aux analogues de la CdR :

*Administrer la 5-Aza-CdR conjointement avec un inhibiteur de l'enzyme CR désaminase.*

La co-administration d'un analogue avec un inhibiteur de la CR désaminase permettrait de diminuer la propagation des cellules leucémiques qui échappent à la cytotoxicité de ces derniers en se réfugiant dans les organes qui contiennent un haut taux de CR désaminase. Dans ce cas-ci, le pouvoir d'action des inhibiteurs de la CR désaminase dépendra de l'activité cellulaire de cette dernière. Notons que l'activité de la CR désaminase peut être naturellement élevée ou être induite par le traitement (Mompalmer & Onetto-Pothier, 1989; Gilbert et coll., 2006).

Le 3,4,5,6-tétrahydrouridine (THU) et le zebularine sont des inhibiteurs de la CR désaminase. Le THU est le premier inhibiteur de la CR désaminase à avoir été étudié (Camiener, 1968) ; il augmente significativement la concentration plasmatique de l'ara-C et produit une bonne réponse chez certains patients leucémiques (Kreis et coll, 1977). Pour ce qui est du zebularine, bien qu'il ne soit pas l'inhibiteur de la CR désaminase le plus efficace, il a l'avantage d'être aussi un inhibiteur de la méthylation de l'ADN qui peut en plus être administré oralement (Driscoll et al, 1991 ; Cheng et coll., 2003). La co-administration de ce dernier avec la 5-Aza-CdR pourrait être une thérapie intéressante dans le traitement de la leucémie.

*Administrer la 5-Aza-CdR conjointement avec un inhibiteur des déacétylases des histones.*

Lorsque la résistance est causée par le traitement, il est possible de la prévenir en diminuant l'exposition à l'agent causal. Ainsi, la combinaison la 5-Aza-CdR avec un agent qui potentialise son action, comme un inhibiteur des déacétylases des histones (Cameron et coll., 1999), diminue la dose effective et permet donc de prévenir la résistance. Nous discuterons plus loin de cette dernière classe d'agents pharmacologiques.

*Administrer la 5-Aza-CdR en prétraitement pour modifier la résistance "innée".*

Il est possible que la résistance soit régulée par des phénomènes épigénétiques, comme la méthylation de l'ADN, et qu'un traitement avec un inhibiteur de la DNMT rende les cellules résistantes plus sensibles à l'agent en question. Par exemple, il est possible de sensibiliser des cellules tumorales résistantes à la cisplatine en les prétraitant avec la 5-Aza-CdR (Gifford et coll., 2004).



## 5.4 AUTRES INHIBITEURS DE LA MÉTHYLATION DE L'ADN

Il existe plusieurs autres inhibiteurs de la méthylation de l'ADN ; en voici un résumé non exhaustif (Chuang et coll., 2005 ; Stresemann et coll., 2006) :

### Analogues de base

5-azacytidine	(phase I/II/III)
5-fluoro-2'-désoxycytidine	(phase I) génère un métabolite toxique
dihydro-5-azacytidine	(phase I/II) n'a donné aucun résultat clinique
pseudoisocytidine	n'a donné aucun résultat clinique
...	

### Non analogues de base

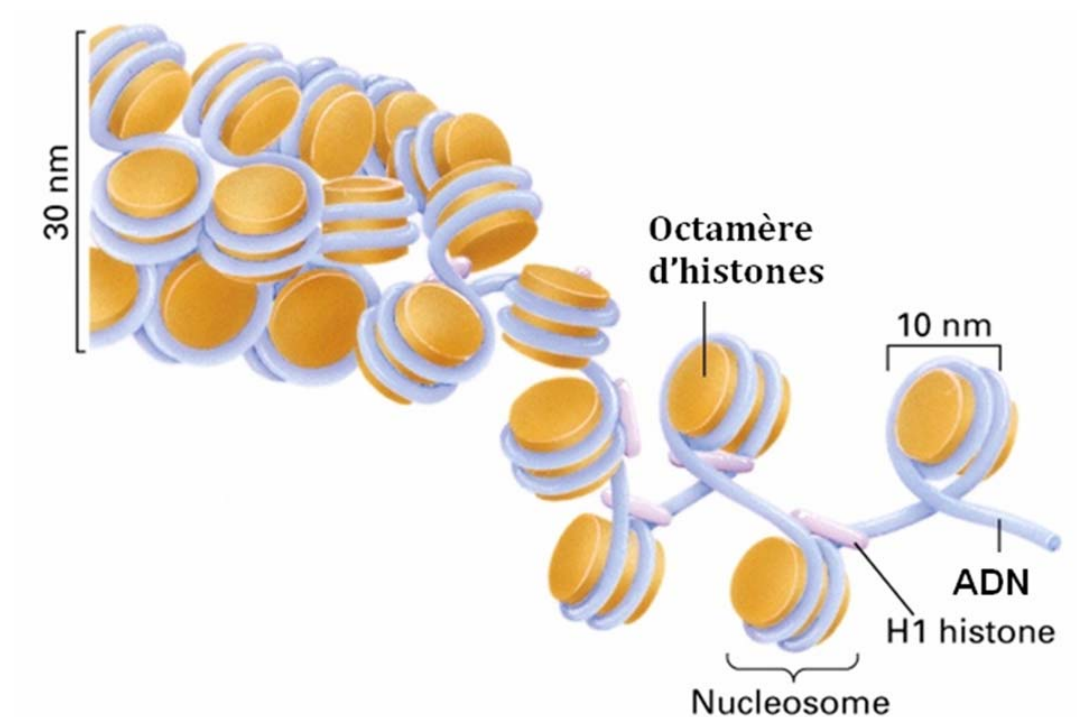
mitoxantrone	antinéoplasique
psammaplin A	(préclinique)
N-acétylaprocaïnamide	(préclinique) anti-arythmique
hydralazine	(Phase I) vasodilatateur
epigallocatechin-3galate (EGCG)	(préclinique) polyphénol du thé vert
RG108	inhibe l'enzyme d'une façon directe
les antisenses (ex : MG98 )	(phase I) dirigé contre l'ARNm de la DNMT1
génistéine	(phase III) isoflavone du soja, phytoestrogène
...	

Aucun non-analogue de base n'inhibe aussi efficacement la méthylation de l'ADN que le 5-Aza-CdR. De plus, aucun de ces agents n'a réussi à ré-exprimer un gène silencieux (Chuang et coll., 2005 ; Stresemann et coll., 2006 ; Fang et coll., 2005).

## CHAPITRE 6

### LES MODIFICATIONS ÉPIGÉNÉTIQUES: LA DÉACÉTYLATION DES HISTONES

Dans la cellule, l'ADN est structurellement organisé autour d'histones en un ensemble qui porte le nom de chromatine. Cette chromatine consiste en une suite de nucléosomes, qui eux sont formés de 146 pb d'ADN enroulées autour d'un regroupement de 8 histones (2H2A, 2H2B, 2H3 et 2H4) (figure 6-1). Cette organisation dynamique de la chromatine se fait grâce à différentes interactions électrostatiques entre les histones et les groupements phosphates chargés négativement de l'ADN (Margueron et coll., 2005).



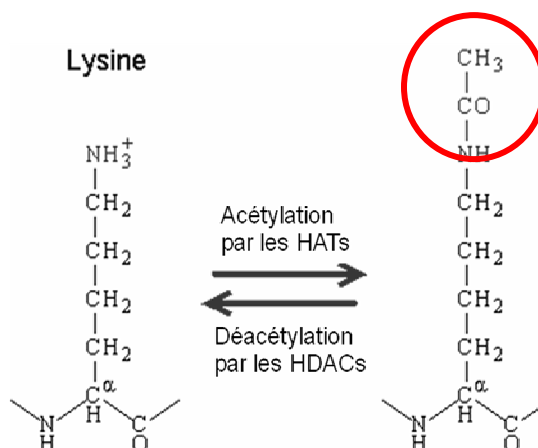
**Figure 6-1. Arrangement structural de la chromatine.**

(tiré de : <http://www.ebiologie.fr/index.php?file=Page&op=article&id=14>)

Les histones subissent différentes modifications post-transcriptionnelles ; l'ubiquitination, l'ADP-ribosylation, la phosphorylation, la méthylation et l'acétylation. Celles-ci sont complexes et impliquent plusieurs acteurs (Strahl & Allis, 2000). Les différentes modifications agissent tel un code qui sera "lu" par des complexes protéiques (Strahl & Allis, 2000). Elles réguleront alors la structure de la chromatine elle-même (Wolffe & Hayes, 1999) ou différents processus cellulaires, tels que le contrôle de la transcription (Davie & Hendzel, 1994), la mitose ou la prolifération cellulaire (Davie et coll., 1999). Nous nous attarderons au rôle de l'acétylation dans la régulation de l'expression des gènes.

## **6.1 CONSÉQUENCES DE L'ACÉTYLATION / DÉACÉTYLATION DES HISTONES**

Les acétyltransférases des histones (HATs) sont responsables de l'acétylation de plusieurs protéines, dont les histones et les facteurs de transcription. Les HATs transfèrent un groupement acétyle provenant de l'acétylcoenzyme A vers différents résidus lysines (typiquement K9, 14, 18, 23 et 27 de H3) situés sur la "queue" N-terminale des différentes sous-unités de l'histone (Thorne et coll., 1990) (figure 6-2). Cette acétylation modifie la conformation de la chromatine en réduisant les charges positives des histones. L'interaction histones-ADN est alors plus faible, cette dernière étant chargée négativement ( $\text{PO}_4^-$ ), ce qui résulte en une configuration de la chromatine plus ouverte. Les facteurs de transcriptions ont alors accès à leur site de liaison sur les promoteurs des gènes. Les déacétylases des histones (HDACs) catalysent le phénomène inverse, favorisant alors la condensation de la chromatine et la répression génique. De plus, certains groupes ont démontré que la déacétylation des queues des histones favorise la méthylation des résidus lysines de ces mêmes queues, conduisant à une répression génique stable (Czermin & Imhof, 2003).



**Figure 6-2. Acétylation / déacétylation des résidus lysines situés sur la "queue" N-terminale des différentes sous-unités de l'histone.**

Il existerait de plus une spécificité du mécanisme de répression génique. Celle-ci semble être régulée par des co-activateurs et des co-répresseurs retrouvés dans les mêmes complexes de protéines que les HATs et HDACs, comme les MECP, Sin3, N-Cor, SMRT,... (Jones & Saha, 2002). Ces co-activateurs et ces co-répresseurs recrutent des protéines ayant un domaine de reconnaissance à l'ADN (ex : des facteurs de transcription) et induisent un activation/répression de la transcription ciblée. Les histones ont donc un rôle participatif au sein de la machinerie transcriptionnelle.

## **6.2 RÔLES DE LA DÉACÉTYLATION DES HISTONES DANS LA LEUCÉMIE**

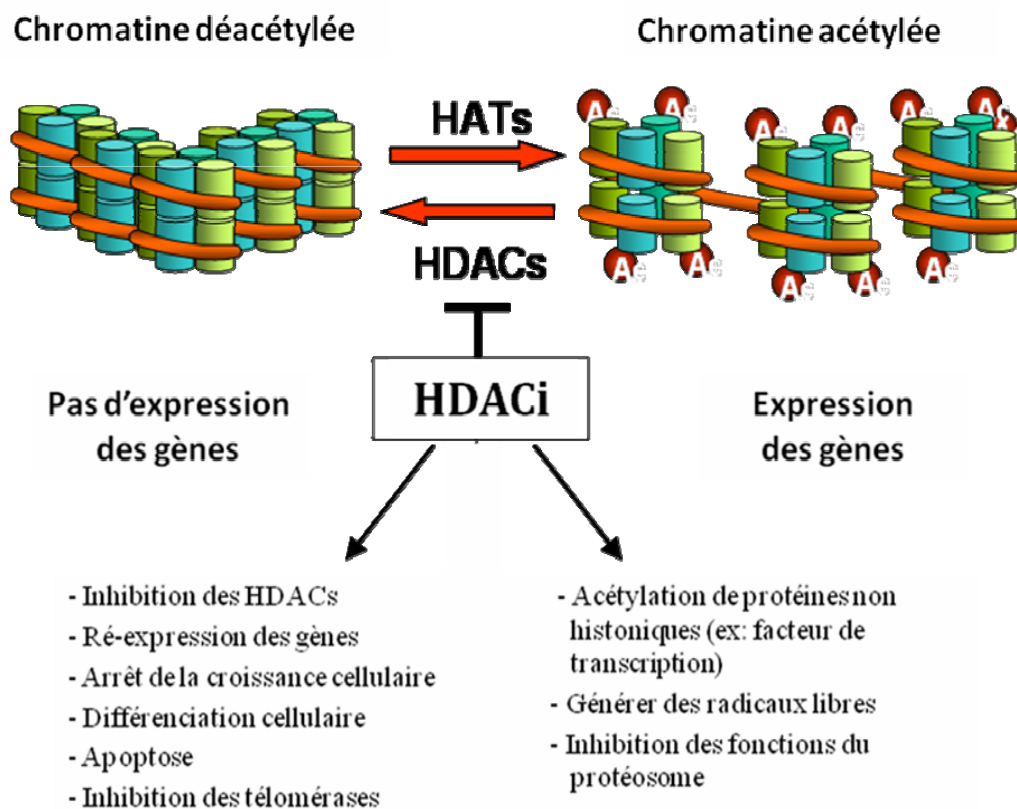
Le niveau d'acétylation des histones des chromosomes est régulé par plusieurs acteurs dont on ne connaît pas tous les rôles. Ni ce qui contrôle le niveau d'acétylation à prime abord ni ce qui dirige sa spécificité envers une région donnée n'est bien caractérisé. Cependant, dans certaine leucémie on note qu'un dysfonctionnement des HDACs joue un rôle clef dans la genèse de la maladie (Warrell et coll., 1998 ; Johnstone, 2002).

## **CHAPITRE 7**

### **LES INHIBITEURS DE LA DÉACÉTYLATION DES HISTONES**

Les inhibiteurs des déacétylases des histones (HDACi) ont une activité antinéoplasique intéressante. Par exemple, les HDACi peuvent réactiver certains gènes réprimés par la déacétylation des histones (Yang et coll., 2000) (figure 7-1). Ces gènes peuvent ou non présenter des méthylations des cytosines dans leurs promoteurs (Suzuki et coll., 2002). Aussi, il a été montré que les HDACi peuvent arrêter la croissance cellulaire, favoriser la différenciation, diriger les cellules vers l'apoptose ou inhiber l'activité des télomérases (Nakamura et coll., 2001). Il existe trois classes d'HDACs, et il est possible que la diversité des effets produits par les HDACi s'explique par une inhibition préférentielle d'une de ces classes (Drummond et coll., 2005). Il se peut aussi que l'action de l'inhibiteur soit dépendant du type cellulaire utilisé ou même de la dose. Par ailleurs, les effets pléiotropiques observés pourraient aussi être la conséquence d'autres mécanismes d'action des HDACi; en plus d'inhiber les HDACs, certains inhibiteurs peuvent acétyler des protéines non-histoniennes (ex : facteurs de transcription) (Yu et coll., 2002), générer des radicaux libres (Ruefli et coll., 2001) ou encore inhiber les fonctions du protéosome (Mitsiades et coll., 2004). De plus, les HDACi ne semblent pas affecter les cellules normales (Marks et coll., 2001b). Toutes ces observations font que ces composés sont très intéressants à étudier en vue d'un traitement contre la leucémie.

Six classes de HDACi sont caractérisées et ils inhibent les HDACs de classe I et II en se liant à différents endroits de leur site catalytique qui contient une molécule de zinc. Une liste non exhaustive se retrouve à la fin de ce chapitre.



**Figure 7-1. Action des inhibiteurs des déacétylases des histones.** (adapté de Gillet et coll., 2007). L'acétylation des histones modifie la conformation de la chromatine en réduisant l'interaction histones-ADN, ce qui favorise une structure plus ouverte. Les facteurs de transcriptions ont alors accès à leur site de liaison sur les promoteurs des gènes. Les déacétylases des histones catalysent le phénomène inverse, favorisant alors la condensation de la chromatine et la répression génique. Les inhibiteurs des déacétylases des histones permettent la lecture de l'euchromatine. HATs = acétyltransférases des histones ; HDACs = déacétylases des histones ; HDACi = inhibiteurs des déacétylases des histones.

## 7.1 LE PHÉNYLBUTYRATE DE SODIUM

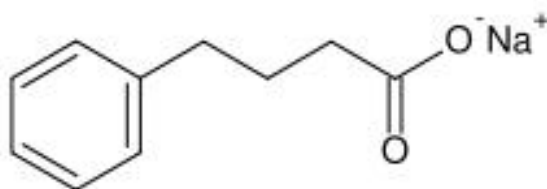
### 7.1.1 HISTORIQUE DU COMPOSÉ

Le phénylbutyrate de sodium (PB, *Buphenyl*) est utilisé aux États-Unis dans le traitement de l'hyperammonémie observée dans certaines pathologies du cycle de l'urée. Cet agent a cependant d'autres effets qui sont présentement évalués expérimentalement. Par exemple, Collins et coll. (1995) ont montré que cet agent pourrait être employé dans le traitement de certaines thalassémies, car il stimule la production d'hémoglobine fœtale, et ce, peut-être en inhibant les HDACs (Perrine et coll., 1990).

Le PB est aussi utilisé expérimentalement comme agent anti-tumoral ; *in vitro*, il inhibe les HDACs (Candido et coll., 1978), il induit la cytotase (DiGiuseppe et coll., 1999), la différenciation (Gore et coll., 2002) et l'apoptose (DiGiuseppe et coll., 1999) des cellules leucémiques à des concentrations similaires à celles utilisées en clinique dans le traitement des pathologies du cycle de l'urée (Brusilow et coll., 1984). Des doses assez fortes de PB sont par contre nécessaires pour obtenir une réponse à peine significative en clinique lorsque celui-ci est utilisé seul (Gore et coll., 2002). Il est cependant relativement bien toléré en infusion prolongée à faible dose (Gore et coll., 2002 ; Camacho et coll., 2007). Étant donné sa pléiotropie d'action et son approbation actuelle (Food and drug administration), le PB est un composé intéressant à utiliser en combinaison avec la 5-Aza-CdR (Gore & Carducci, 2000).

### 7.1.2 STRUCTURE CHIMIQUE

Le PB est un acide gras phénylé. Il a un poids moléculaire de 186,19 g/mol. Il provient de *Triple Crown America Inc.* (PA, USA), est dissout dans du PBS 1X stérile et est conservé à -20°C. Sa chaîne d'acide gras est nécessaire à son activité anti-tumorale est courte ce qui limite l'interaction avec le site catalytique des HDACs (DiGiuseppe et coll., 1999).



**Figure 7-2. Structure du phénylbutyrate de sodium.**

### 7.1.3 MÉTABOLISME

Le PB peut être administré oralement. Il est rapidement assimilé et transformé dans le foie et les reins en phénylacétate de sodium (PA) par  $\beta$ -oxydation. Le PA se conjugue alors avec la glutamine par acétylation pour former le phénylacétylglutamine, un déchet nitré, qui lui est excrété par les reins. Ainsi, le niveau plasmatique d'ammoniaque et de glutamine diminue chez les patients traités (*Food and Drug Administration*, États-Unis ; Carducci et coll., 2001).



#### 7.1.4 MÉCANISMES EXPLICANTS SON ACTION ANTINÉOPLASIQUE

Le PB inhibe les HDACs en interagissant probablement avec l'ion zinc du site catalytique de l'enzyme. PB induit alors l'hyperacétylation des histones H3 et H4 (Gore et coll., 2001). L'inhibition des HDACs permet aussi au complexe HDACs-HACs de recruter certains facteurs de transcription. Ces facteurs permettent au PB de réguler à la hausse le gène p21 (inhibiteur de cycline dépendante kinase), indépendamment de p53, ce qui conduit en une hypophosphorylation de la protéine Rb. Rb ne permet alors pas la relâche de facteurs de transcription nécessaires au passage des cellules en phase S. PB favorise donc l'accumulation des cellules en phase G1, diminuant du même coup le nombre de cellule en phase S (figure 4-2).

On sait aussi que PB active certains récepteurs nucléaires qui agissent comme facteur de transcription pour certains gènes contenant l'élément PPAR (Pili et coll., 2001). PB permet aussi la ré-expression du gène CDKN1A, dont la protéine inhibe le passage des cellules dans le cycle cellulaire (Johnstone, 2002). Cette réactivation génique explique aussi probablement une partie de son activité anti-tumorale (figure 4-2).

#### 7.1.5 EFFETS SECONDAIRES

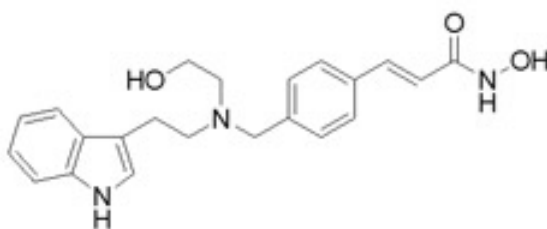
Les principaux effets secondaires du PB sont plutôt modérés. Ils comprennent un dérèglement du cycle menstruel, de l'anémie, de l'hypoalbuminémie, de l'acidose métabolique, la leucopénie, une thrombocytopénie, des nausées et des vomissements (grade 1). Il est cependant difficile de déterminer la cause exacte de ces maux, car ceux-ci peuvent aussi résulter de la maladie elle-même (*Food and Drug Administration*, États-Unis). Même si des doses assez fortes de PB sont nécessaires lorsqu'il est utilisé en monothérapie comme inhibiteur des HDACs (concentration plasmatique de l'ordre du mM ; dose maximale tolérée = 410 mg/kg/j X 120h), la toxicité du PB est assez limitée (toxicité au niveau du système nerveux central : nausée, vomissement, somnolence, confusion, maux de tête, fatigue, ...) et elle est réversible (Carducci et coll., 2001 ; Gore et coll., 2002).

## 7.2 LE NVP-LAQ824

Le NVP-LAQ824 (LAQ) est un inhibiteur des déacétylases des histones *in vitro* (Remiszewski, 2003 ; Atadja et coll., 2004 ; Moradei et coll., 2005) avec lequel quelques études cliniques de phase I ont été initiées (Moradei et coll., 2005 ; Monneret, 2005). Le pouvoir d'inhibition des HDACs par le LAQ est environ 50 000 fois plus puissant que celui du PB (Richon et coll., 1996). Le LAQ inhibe la croissance cellulaire des cellules leucémiques et tumorales, dirige les cellules tumorales vers l'apoptose, induit l'arrêt des cellules en phase G2/M du cycle cellulaire (Atadja et coll., 2004) et augmente significativement le temps de survie des souris d'un modèle leucémique (Weisberg et coll., 2004).

### 7.2.1 STRUCTURE CHIMIQUE

Le LAQ est un composé de la famille des acides hydroxamiques de deuxième génération. Il a été obtenu grâce à la générosité de Dr Peter Atadja *de Novartis Institutes* (New Jersey, États-Unis). Il est dissout dans l'eau et est stable à température pièce, mais est conservé à -20°C.



**Figure 7-3. Structure du NVP-LAQ824.**

### 7.2.2 MÉTABOLISME

Typiquement, les HDACi ont un haut taux de liaison protéiques, un métabolisme et une clearance rapide. Ils requièrent donc une administration régulière pour leur permettre d'atteindre une concentration intracellulaire efficace, ce qui limite le développement de tout HDACi qui ne peut pas être administré oralement. Le LAQ requiert une concentration plasmatique de l'ordre du  $\mu\text{M}$  pour atteindre son efficacité. Drummond et coll. (1999) ont essayé d'améliorer la biodisponibilité du LAQ en l'encapsulant dans des liposomes et ont obtenus de meilleurs résultats antitumoraux comparativement à l'administration intraveineuse (Drummond et coll., 1999).

### 7.2.3 MÉCANISMES EXPLICANTS SON ACTION ANTINÉOPLASIQUE

Le LAQ, tout comme le PB, inhibe les HDACs, permettant ainsi au complexe HDACs-HACs de recruter certains facteurs de transcription. Ces facteurs permettent de réguler à la hausse le gène p21 (inhibiteur de cycline dépendante kinase) ce qui conduit en une hypophosphorylation de la protéine Rb. Rb ne permet alors pas la relâche de facteurs de transcription nécessaire au passage des cellules en phase S (figure 4-2). Le LAQ induit alors l'arrêt des cellules en phase G2/M du cycle cellulaire.

Les HDACi induisent la mort des cellules tumorales via l'apoptose en activant les caspases, soit par la voie de la mitochondrie/cytochrome *c* ou par celle du récepteur *death* (Johnstone, 2002).

### 7.2.4 EFFETS SECONDAIRES

Les HDACi semblent induire la mort des cellules tumorales uniquement, ce qui limite leur toxicité (Marks et coll., 2001b). On connaît peut la toxicité du LAQ ; les études cliniques de phase I initiées ont donné peu de résultats.

### 7.3 L'ACIDE SUBEROYLOHYDROXAMIQUE

L'acide suberoylohydroxamique (SAHA, Zolinza™, vorinostat) est le premier inhibiteur des déacétylases des histones approuvé par la *Food and Drug Administration* (États-Unis). Il est présentement utilisé dans le traitement de seconde ligne des patients atteints de lymphomes cutanés à cellules T récurrents. Cet agent inhibe les HDACs *in vitro* (Richon et coll., 1998 ; Moradei et coll., 2005) et est présentement étudié en essai clinique contre différents cancers (Marks et coll., 2000 ; Kelly et coll., 2003 ; Moradei et coll., 2005 ; Monneret, 2005). Il y a d'ailleurs une quinzaine d'études actives contre la leucémie enregistrées au près de la *U.S. National Institutes of Health* avec ce composé. Le SAHA, tout comme le LAQ, a un pouvoir d'inhibition des HDACs bien supérieur à celui du PB (Richon et coll., 1996). Il induit la différenciation cellulaire et l'arrêt des cellules en phase G1, (Richon et coll., 1996), supprime la croissance tumorale (Butler et coll., 2000), induit l'apoptose et la différenciation cellulaire (Vrana et coll., 1999; Moradei et coll., 2005) dans différentes lignées tumorales (Butler et coll., 2000; Marks et coll., 2001a). Il permet de plus la ré-expression du gène CDK1A, impliqué dans la régulation du cycle cellulaire (Johnstone, 2002). Le SAHA peut aussi diminuer la résistance au traitement en inhibant la P-glycoprotéine (Ruefli et coll., 2002).

### 7.3.1 STRUCTURE CHIMIQUE

Le SAHA est un composé de la même famille que le LAQ (acides hydroxamiques de deuxième génération).



**Figure 7-4. Structure de l'acide suberoylohydroxamique.**

### 7.3.2 MÉTABOLISME

Comme les autres HDACi, le SAHA a un haut taux de liaisons protéiques, un métabolisme et une *clearance* rapide. Il requiert donc, lui aussi, une administration régulière pour lui permettre d'atteindre une concentration intracellulaire efficace qui est dans l'ordre du  $\mu\text{M}$  (Kelly et coll., 2003). Certains groupes de recherche travaillent d'ailleurs à l'élaboration et à l'évaluation clinique d'une formulation orale du SAHA avec une biodisponibilité d'environ 50% et un  $t_{1/2} = 1\text{h}$  (Kelly et coll., 2005).

### 7.3.3 MÉCANISMES EXPLICANTS SON ACTION ANTINÉOPLASIQUE

SAHA induit l'accumulation d'histones acétylés dans les cellules en inhibant les déacétylases des histones en bloquant l'accès de leur substrat au site catalytique (Finnin et coll., 1999). Ainsi, SAHA permet la ré-expression du gène CDKN1A, dont la protéine inhibe le passage des cellules dans le cycle cellulaire (Richon et coll., 2000 ; Johnstone, 2002). Cette réactivation génique explique probablement une partie de l'activité anti-tumorale du SAHA (figure 4-2) (Marks et coll., 2001b).

De plus, SAHA semble induire la mort cellulaire via l'apoptose en activant les caspases, soit par la voie de la mitochondrie/cytochrome *c* ou par celle du récepteur *death* (Johnstone, 2002). L'activation de la voie des caspases peut aussi mener à de l'autophagie des cellules tumorales (Shao et coll., 2004).

Les cellules normales ne semblent pas affectées par les effets des HDACi (Marks et coll., 2001b). Cette observation peut s'expliquer par le fait que les HDACi augmentent la concentration cellulaire de thioredoxin, et ce uniquement dans les cellules normales. La thioredoxin séquestre les radicaux libres ce qui protégerait les cellules normales contre les effets des HDACi (Rosato et coll., 2003).

#### **7.3.4 EFFETS SECONDAIRES**

Les HDACi semblent induire la mort des cellules tumorales uniquement, ce qui limite leur toxicité (Marks et coll., 2001b). Les principaux effets secondaires rapportés lors de l'utilisation du SAHA (300 mg/m<sup>2</sup>/j) sont la fatigue, l'anorexie et la myélosuppression (tous réversibles), ce qui limite la dose (Kelly et coll., 2003).

## 7.5 AUTRES INHIBITEURS DE LA DÉACÉTYLATION DES HISTONES

- |                                 |  |
|---------------------------------|--|
| Trichostatin A (TSA)            | - induit l'arrêt des cellules en phase G1 du cycle cellulaire et induit l'apoptose (Strait et coll., 2002).  |
| Desipeptide (FK228, Romidepsin) | - induit l'arrêt des cellules en phase G1 du cycle cellulaire, induit l'apoptose et une réponse anti-leucémique lors d'essais cliniques (Odenike et coll., 2008) |
| MS-27-275                       | - induit l'arrêt des cellules en phase G1 du cycle cellulaire, et peut être administré oralement (Saito et coll., 1999).   |
| Apicidin                        | - induit l'arrêt des cellules en phase G1 du cycle cellulaire et inhibe la prolifération tumorale (Han et coll., 2000).  |
| Acide valproïque                | - anticonvulsivant montrant des propriétés inhibitrices des HDACs (Göttlicher et coll., 2001).   |
| ...                             |  |

## CHAPITRE 8

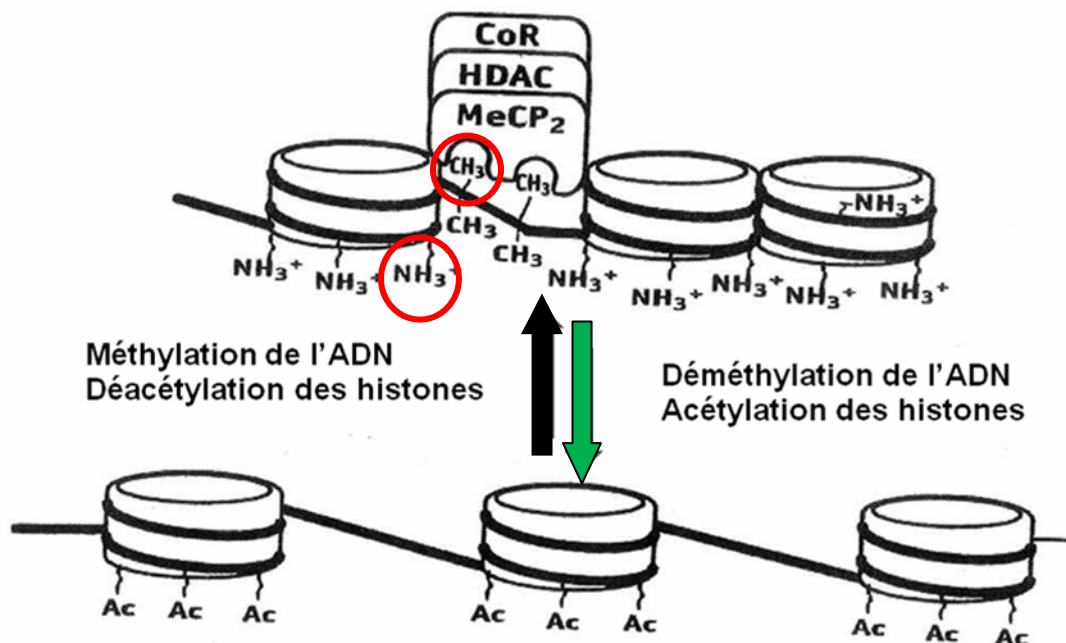
### POTENTIALISATION DES DEUX PHÉNOMÈNES ÉPIGÉNÉTIQUES

Dès 1977, Razin et Cedar observèrent que l'ADN méthylé était associé à de la chromatine inactive et condensée. Cependant, ce n'est qu'en 1999 que Cameron et coll. firent pour la première fois la démonstration de l'existence d'une complémentarité entre la méthylation de l'ADN et la déacétylation des histones. Ils observèrent que la co-administration *in vitro* sur des cellules leucémiques d'un inhibiteur de la méthylation de l'ADN (5-Aza-CdR) et d'un HDACi permettait de ré-exprimer le TSG p15 réprimés d'une façon synergique.

Quelques hypothèses expliquent la complémentarité observée entre la méthylation de l'ADN et la déacétylation des histones. Le modèle classique veut que certaines protéines qui lient l'ADN méthylé (ex : MECP<sub>2</sub>, DNMT1...) recrutent par la suite des HDACs (Eden et coll., 1998). Ces dernières favorisent alors une condensation de la chromatine en catalysant la perte du groupement acétyle sur les "queues" N-terminales des lysines des histones (Jones et coll., 1998). Cette complémentarité réduit d'autant plus l'expression des gènes en empêchant l'attachement des facteurs de transcription à leur promoteur, étant donné :

- 1- la présence de méthylations qui diminue leur affinité pour leurs sites de reconnaissances.
- 2- la présence de protéines liées aux 5-mC (ex : MECP<sub>1</sub> et <sub>2</sub>) qui empêche leur liaison à l'ADN.
- 3- la présence de co-répresseurs transcriptionnels (ex : Sin3, N-Cor, SMRT) associés aux protéines qui lient l'ADN méthylé (ex : MECP<sub>2</sub>).
- 4- la condensation de la chromatine qui empêche leur liaison à l'ADN (Bird & Wolffe, 1999) (figure 8-1).

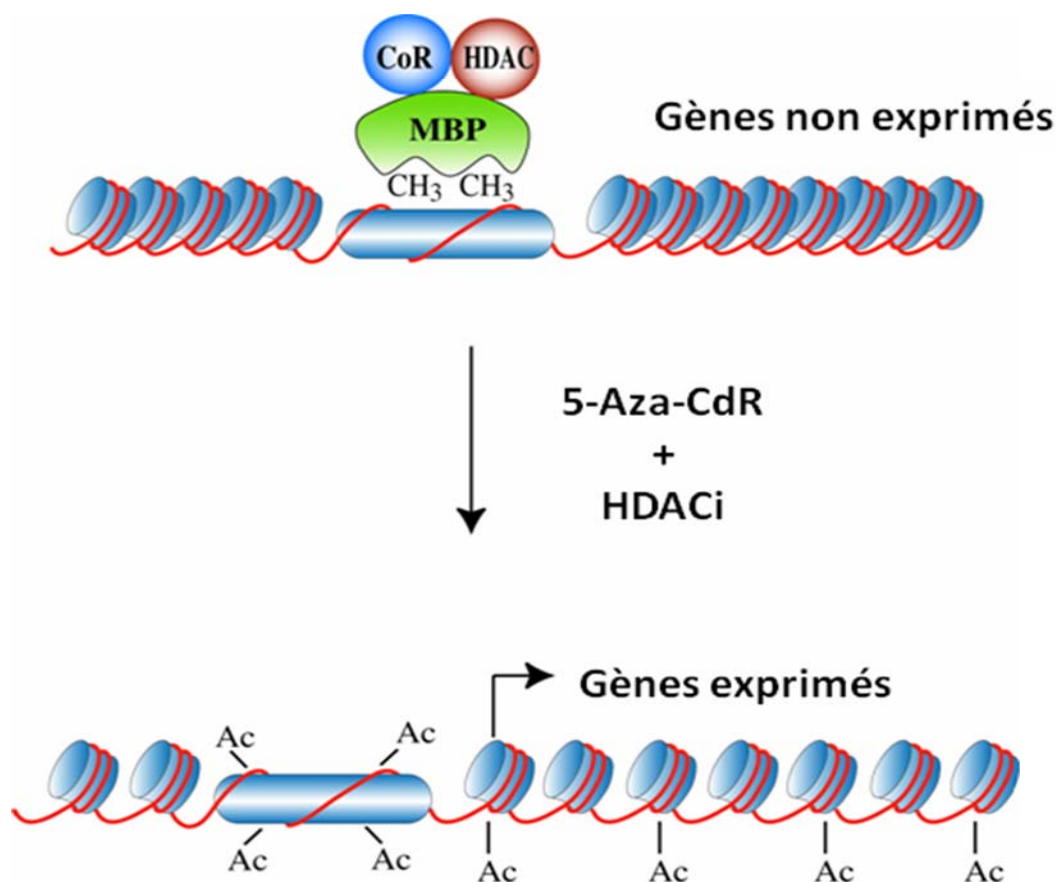




**Figure 8-1. Complémentarité entre la méthylation de l'ADN et la déacétylation des histones.** Ac = acétyle; CH<sub>3</sub> = méthyle; HDAC = déacétylase des histones; MeCP<sub>2</sub> = 5-méthylbinding protein; CoR = co-répresseur transcriptionnel

Par ailleurs, de récentes données suggèrent que ce serait plutôt la chromatine inactive qui induirait l'augmentation de la méthylation de l'ADN (Ben-Porath & Cedar, 2001) et inversement, que la chromatine active mènerait à une déméthylation (Szyf, 2003). Gibbons et coll. (2000) ont d'ailleurs montré que des mutations génétiques survenant sur des gènes qui jouent un rôle dans l'arrangement structural de la chromatine peuvent influencer la méthylation de l'ADN. On observe aussi ce phénomène avec la protéine de fusion PML-RAR impliquée dans la leucémie qui recrute des histones déacétylases et des DNMTs à un site de transcription précis du promoteur (Di Croce et coll., 2002). Ce modèle hypothétique alternatif, bien que marginal, pourrait fournir certaines explications tant qu'à la spécificité de la méthylation pour un gène donné.

On ignore si les deux modèles coexistent, mais il semble évident qu'il y a une complémentarité entre la méthylation de l'ADN et la déacétylation des histones (Herman et coll., 1997). Depuis la première démonstration par Cameron et coll. (1999), d'autres groupes ont confirmé cette interaction à l'aide d'inhibiteurs de la méthylation de l'ADN et d'HDACi sur différents cancer (Bovenzi & Momparler, 2001 ; Boivin et coll., 2002 ; Gagnon et coll., 2003) (Figure 8-2).



**Figure 8-2. Effet de la co-administration d'un inhibiteur de la méthylation de l'ADN (5-aza-2'-désoxycytidine) et d'un inhibiteur des déacétylases des histones.** Ac = acétyle; HDACi = inhibiteur des déacétylases des histones; 5-Aza-CdR = 5-aza-2'-désoxycytidine; CH<sub>3</sub> = méthyle; HDAC = déacétylase des histones; MBD = methylbinding protein; CoR = co-répresseur transcriptionnel

**DEUXIÈME PARTIE**  
**LES OBJECTIFS DE CETTE ÉTUDE**

## CHAPITRE 9

### **Objectifs généraux :**

1. Potentialiser l'action de la 5-Aza-CdR en combinant ce composé à différents agents chimiothérapeutiques ayant des mécanismes d'action complémentaires, tels les HDACi et les inhibiteurs de la CR désaminase. La co-administration permettrait de diminuer les risques de résistance associée à la 5-Aza-CdR ainsi que ses effets secondaires.
2. Quantifier la ré-expression génique de différents gènes induite par le 5-Aza-CdR, seule ou lorsque co-administrée avec différents agents.
3. Évaluer la déméthylation globale de ces gènes.
4. Définir un protocole d'administration adéquat de la 5-Aza-CdR lorsqu'il est utilisé en monothérapie chez l'humain, et ce, en extrapolant les résultats obtenus à l'aide d'un modèle murin.

### **Objectifs plus précis ayant fait l'objet de différentes publications :**

Le premier objectif est de potentialiser l'action de la 5-Aza-CdR en combinant ce composé à différents agents chimiothérapeutiques ayant des mécanismes d'action complémentaires, permettant alors une ré-expression génique et une déméthylation globale de l'ADN intéressante pour le traitement de la leucémie. Cette potentialisation permettrait de diminuer les risques de résistance associés à la 5-Aza-CdR ainsi que ses effets secondaires. Les résultats de ces études ont fait l'objet de trois publications intitulées *Enhancement of antineoplastic action of 5-aza-2'-deoxycytidine by phenylbutyrate on L1210 leukemic cells (2004)*, *Enhancement of antineoplastic action of 5-aza-2'-deoxycytidine by zebularine on L1210 leukemic cells (2005)*, *Inhibition of cytidine deaminase by zebularine enhances the antineoplastic action of 5-aza-2'-deoxycytidine (2008)* et d'un article prêt à être soumis intitulé *Enhancement of antineoplastic action of 5-aza-2'-deoxycytidine by different histone deacetylase inhibitors in the treatment of leukemia* présenté à l'annexe 7.

Le deuxième objectif est de caractériser le protocole d'administration idéal de la 5-Aza-CdR en monothérapie. L'évaluation de l'activité antinéoplasique de la 5-Aza-CdR sur des cellules leucémiques et tumorales par essais clonogéniques, par l'évaluation de la réactivation de TSGs, et par la quantification de l'inhibition de la méthylation de l'ADN *in vitro* nous a permis d'élaborer différents protocoles de traitements pour la souris. La corrélation entre ces résultats *in vitro* et *in vivo* a fait l'objet d'une quatrième publication intitulé *Importance of dose-schedule of 5-aza-2'-deoxycytidine for epigenetic therapy of cancer*.

**TROISIÈME PARTIE**  
**L'EXPÉRIMENTATION**

## CHAPITRE 10

Cette section consiste en un bref résumé d'aspects méthodologiques importants non traités dans les articles présentés dans la quatrième section de cet ouvrage.

### **10.1 ÉVALUATION DES EFFET DES INHIBITEURS DE LA MÉTHYLATION DE L'ADN ET DE LA DÉACÉTYLATION DES HISTONES SUR LES CELLULES UTILISÉES (Tableau 10-1)**

#### - Inhibition de croissance cellulaire

Cette méthode très rapide permet d'obtenir un pourcentage d'inhibition cellulaire en comparant, à un temps donné, le compte cellulaire des cellules traitées au contrôle de cellules non traitées.

#### - Essais clonogéniques

Bien que plus longues à réaliser que les essais d'inhibition de croissance, les essais clonogéniques permettent de faire de meilleures prédictions quant à l'effet *in vivo* attendu. Étant donné que seules les cellules à potentiel clonogénique peuvent engendrer un cancer (Oakley & Van Zant, 2007), il est important de pouvoir évaluer la capacité de l'agent à inhiber la formation de ces clones.

De plus, les essais clonogéniques effectués sur les cellules récupérées *in vivo* après une chimiothérapie nous permettent d'évaluer plus précisément le pouvoir d'inhibition clonogénique de l'agent que si on évaluait son efficacité en fonction du volume de la tumeur (Rockwel, 2002).

**Tableau 10-1. Cellules utilisées.**

Lignées cellulaires	Caractéristiques
<b>L1210</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- leucémiques lymphoïdes murines (DBA/2) générées après l'application cutanée de 0,2% de méthylcholanthrène dans de l'éthyle-éther</li> <li>- TD<sup>a</sup> = 12 h.</li> </ul>
<b>HL-60</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- leucémiques promyélocytiques aiguës humaines</li> <li>- TD = 16 h.</li> <li>- myc +</li> <li>- p73 partiellement méthylés (Corn et coll., 1999)</li> <li>- exprime p15 (Cameron et coll., 1999)</li> <li>- p53 non-fonctionnel (Shao RG et al. Exp cell res 1997)</li> </ul>
<b>NIH 3T3</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- fibroblastes murins</li> <li>- TD = 30 - 35 h.</li> </ul>
<b>3T3-CD3-V5</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- fibroblastes murins</li> <li>- TD = 30 - 35 h.</li> <li>- surexprime le gène de la CR désaminase</li> </ul>
<b>EMT6</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- tumeurs mammaires murines</li> <li>- TD = 12 h.</li> </ul>
<b>Calu-6</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- carcinome pulmonaire</li> <li>- TD = 30 h.</li> </ul>

<sup>a</sup> TD = temps de doublement



## 10.2 ÉVALUATION BIOMOLÉCULAIRE DE L'EFFET DES INHIBITEURS DE LA MÉTHYLATION DE L'ADN ET DE LA DÉACÉTYLATION DES HISTONES

### *Méthodes utilisées pour quantifier la ré-expression des TSGs.*

#### - Réaction en chaîne par la polymérase (PCR)

Après avoir extrait l'ARN total des cellules et utilisé la reverse transcriptase, on peut amplifier et étudier la ré-expression des gènes d'intérêts. Une standardisation de la quantité est alors effectuée grâce à un *house keeping gene*. Ces gènes sont exprimés dans les cellules d'une façon constitutionnelle et leur expression ne varie pas en fonction des traitements utilisés ; ils servent donc de contrôle interne pour normaliser la quantité d'ADN d'un échantillon. Nous utilisons le gène qui code pour l'ARNm 18S ribosomal. La quantité d'ADNc qui amplifie la même concentration du *house keeping gene* est déterminée. La quantification de la ré-expression peut alors se faire de différentes façons :

#### *1. semi-quantitativement*

- Standardisation de l'intensité du *house keeping gene* par électrophorèse, puis comparaison de l'intensité des bandes du gène d'intérêt.

#### *2. quantitativement*

- La quantité d'un *house keeping gene* est évaluée grâce à une électrophorèse par capillarité et à une détection par fluorescence très sensible. Le gène d'intérêt peut alors être quantifié relativement à la concentration du *house keeping gene*.

- Quantification en temps réel de la quantité d'un gène d'intérêt en comparant celui-ci avec un *house keeping gene* amplifié et révélé par fluorescence (*Real Time PCR*).

## ***Méthodes utilisées pour évaluer la méthylation de l'ADN***

### ***- Quantification de la méthylation globale de l'ADN***

L'étude d'élément répétitif dans l'ADN, tel que Long Interspersed Nucleotide Element (LINE-1) (Yang et coll., 2004) nous permet d'évaluer la méthylation globale d'une lignée cellulaire. Le génome contient environ un demi million de séquences LINE-1 (Kazazian & Goodier, 2002), soit environ 15% du génome. Une méthylation sur trois se produit sur LINE-1, faisant de cette région un bon marqueur pour quantifier la méthylation globale du génome (Yang et coll., 2004). L'ADN génomique est extrait des cellules traitées (ou non) avec les agents désirés. Un traitement au bisulfite permet ensuite de transformer les résidus cytosines non méthylés en uracile, alors que les 5-mC restent inchangées. Les éléments LINE-1 sont ensuite amplifiés par PCR en utilisant des amorces différentes qui s'apparient préférentiellement soit à l'ADN méthylé ou à l'ADN non méthylé. Les produits PCR sont purifiés et digérés par l'enzyme Hinf I qui ne coupe que les éléments qui étaient originellement méthylés, donc inchangés. Les produits de fragmentation sont ensuite quantifiés et le ratio ADN méthylé / ADN non méthylé est déterminé.

### ***- Quantification de la méthylation du promoteur d'un gène***

L'essai par "*methylation specific PCR*" (MSP) nous permet d'évaluer la méthylation d'un gène d'intérêt, car elle permet de faire la distinction entre de l'ADN méthylé et non méthylé, suite à un traitement au bisulfite. Les gènes d'intérêts sont alors amplifiés par PCR en utilisant des amorces différentes qui s'apparient préférentiellement soit à l'ADN méthylé ou à l'ADN non méthylé. Les produits PCR sont révélés par électrophorèse, leurs concentrations sont normalisées et ils sont quantifiés.

D'autres méthodes peuvent être utilisées pour évaluer la méthylation de l'ADN, tel que le séquençage d'ADN, technique de transfert selon *Southern*, ...

## CHAPITRE 11

### ÉTUDE SUR UN MODÈLE LEUCÉMIQUE MURIN

L'utilisation du modèle animal permet de comparer des résultats obtenus *in vitro* et *in vivo* et de spéculer sur l'extrapolation des effets observés à l'humain. Et il n'y a rien de plus valorisant pour un scientifique que lorsque ses résultats se répercutent en clinique.

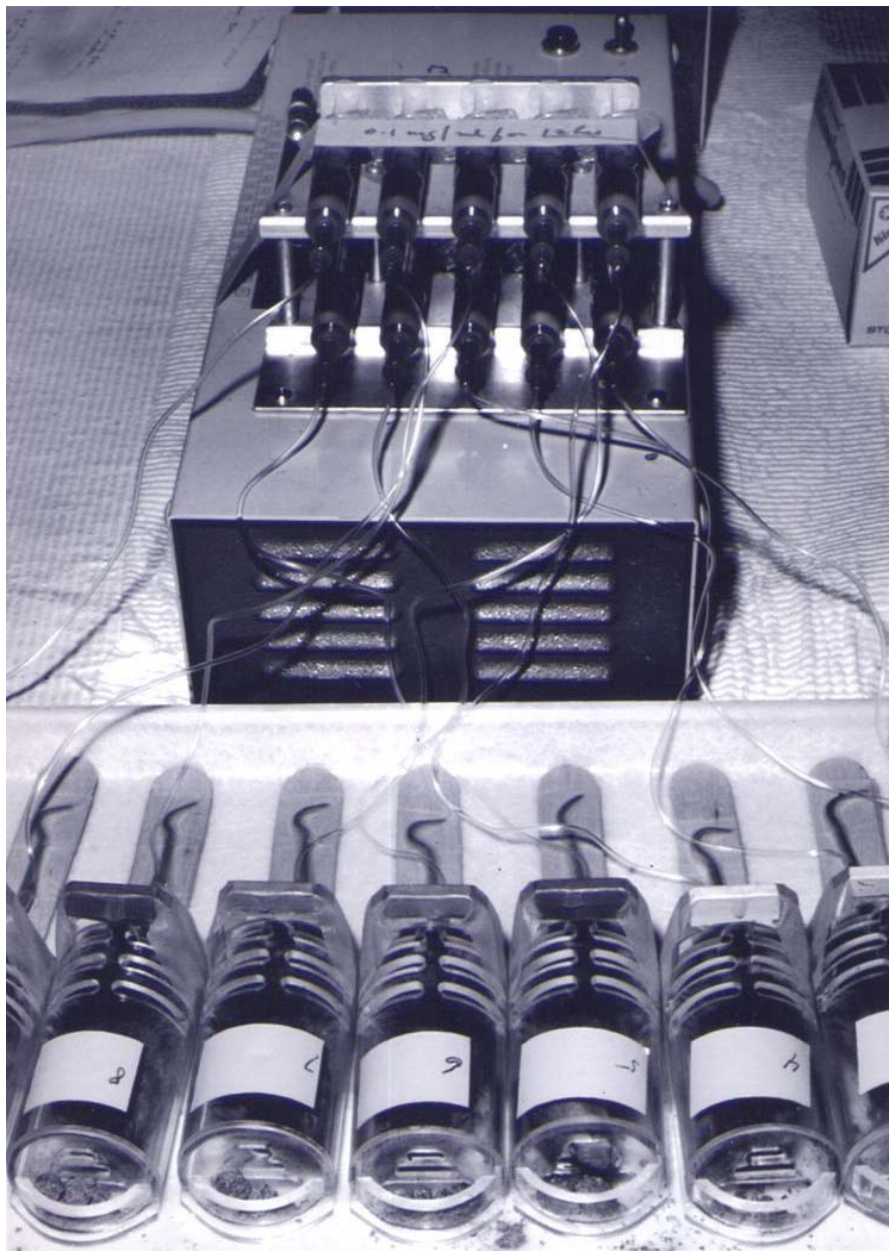
Le modèle leucémique murin de type L1210 a été développé en 1949 (Law et coll., 1949) et a été parmi les premiers modèles à être largement utilisés pour la recherche d'agents antinéoplasiques par le *National Cancer Institute* (États-Unis). 21 molécules ont d'ailleurs été identifiées et approuvées par la *Food and Drug Administration* comme agent thérapeutique contre certaines leucémies et lymphomes humains grâce à ce modèle. Le modèle L1210 classique consiste en l'inoculation intra-péritonéale (i.p.) de cellules L1210 menant à la formation d'une ascite. La souris reçoit ensuite le traitement d'intérêt (i.p.) avec différentes drogues. Ce modèle a l'avantage d'être prévisible, sensible et très rapide ; les cellules L1210 ont un temps de doublement d'environ 12 heures. De plus, cette croissance cellulaire rapide est idéale pour l'étude d'agents agissant en phase S du cycle cellulaire. Le désavantage majeur de ce modèle est l'inoculation i.p. des cellules leucémiques ; l'expérience sur l'ascite ressemblant plus à une expérimentation *in vitro* chez l'animal qu'à une manipulation *in vivo*. De plus, l'emploi de ce modèle n'est pas indiqué dans la recherche d'agents contre les tumeurs solides (Schuh, 2004).

Nous avons choisi d'utiliser ce modèle en faisant l'inoculation intraveineuse (i.v.) des cellules L1210. La distribution cellulaire devient alors similaire à celle observée chez l'humain (Skipper et coll., 1965 ; Momparler & Gonzales, 1978) et permet une meilleure interaction tumeur-hôte, ce qui laisse place à différentes études biologiques. Ce modèle demeure prévisible, sensible et rapide ; en théorie, la présence d'une seule cellule L1210 entraînerait la mort de la souris en 14 jours (Momparler & Gonzales, 1978). Il existe aussi une corrélation entre le nombre de

cellules inoculées et le temps de survie des souris CD2F<sub>1</sub> (Momparler & Gonzales 1978).

D'abord, le maintien d'une source de cellules L1210 se fait par transplantation i.p. de ces cellules chez la souris chaque semaine. Lors de la chimiothérapie, les cellules L1210 recueillies du fluide ascitique sont quantifiées et réimplantées i.v. dans la veine latérale de la queue des souris. Un délai pour permettre la dissémination des cellules L1210 dans la souris est alloué avant le début de la chimiothérapie. Différents protocoles d'administration avec différents composés ont été étudiés. Ces agents ont été administrés seuls ou en combinaison, par voie i.v. en dose unique, multi-doses ou en infusion (figure 11-1).

Une fois le traitement effectué, on mesure le temps de survie des souris. On peut ensuite traduire les résultats obtenus selon le modèle de Skipper-Schabel-Wilcox qui s'exprime en logarithme de cellules leucémiques tuées (*log kill*) (Wilcox, 1966). On peut alors évaluer l'interaction entre les agents utilisés. On considère que le *log kill* correspond à  $y = -\log(F)$  où F représente la fraction de cellules qui survie au traitement (Lloyd, 1975). Par exemple, si la fraction cellulaire qui survie est de 0,1 ; cela correspond à 1,0 log kill, alors qu'un log kill de 10,0 correspond à une fraction cellulaire qui survie de 0,000 000 000 1 (explications supplémentaires et calculs à l'annexe 2). Classiquement, une réduction de 1 log correspond à une rémission partielle et au moins 2 log sont nécessaires pour anticiper une rémission complète (Simpson-Herren, 1975).



**Figure 11-1. Administration en infusion par voie intraveineuse de différents agents aux souris.**

## **CHAPITRE 12**

### **ANALYSE DES DONNÉES - CONSIDÉRATIONS STATISTIQUES ET PRÉSENTATION DES RÉSULTATS**

- Les expériences ont été répétées au moins à trois reprises.
- Les différences obtenues entre chaque groupe de valeurs a été évaluée par une analyse de variance de type ANOVA (GraphPad Prism software, Californie, États-Unis).
- Une valeur de  $P \leq 0.05$  obtenue par la méthode de Tuckey est considérée comme statistiquement significative (GraphPad Prism software).
- La méthode de Valeriote et Lin (Valeriote & Lin, 1975) a été utilisé pour déterminer si les interactions étaient additives, synergiques ou antagonistes. Les formules utilisées sont présentées à l'annexe 3.
- La méthode de Kaplan Meier a été utilisée pour présenter les courbes de survie des souris (GraphPad Prism software). La méthode est présentée à l'annexe 4.

## **QUATRIÈME PARTIE**

### **RÉSULTATS - PRÉSENTATION DES MANUSCRITS**

Les chapitres qui suivent présentent les résultats de mes travaux sous forme d'article. Quatre manuscrits ont été publiés et un est prêt à être soumis ; celui-ci a été placé à l'annexe 7. Les résultats, en plus d'être publiés, ont été présentés lors de différents congrès internationaux et locaux. Les coauteurs et les éditeurs de tous les articles ont donné leur approbation pour que ceux-ci puissent être insérés dans cette thèse ; les attestations sont présentées à l'annexe 5.



## CHAPITRE 13

### ENHANCEMENT OF ANTINEOPLASTIC ACTION OF 5-AZA-2'- DEOXYCYTIDINE BY PHENYLBUTYRATE ON L1210 LEUKEMIC CELLS

#### 13.1 CONTRIBUTION DES AUTEURS

Maryse Lemaire a réalisé les expériences *in vitro* sur les cellules, les expériences de biologie moléculaire, la chimiothérapie *in vivo*, a participé au design de l'étude et a rédigé l'article.

Louise F. Momparler a réalisé la chimiothérapie *in vivo* sur le modèle L1210 en collaboration avec ML.

Nuno Jorge Farinha a participé à la correction de l'article.

Mark L. Bernstein a évalué les résultats et a participé à la rédaction de l'article.

Richard L. Momparler a conçu et coordonné l'étude et a participé à la rédaction de l'article.

L'éditeur (*Leukemia & Lymphoma*) et tous les auteurs sont en accord avec la publication de cet article dans cette thèse ; les formulaires d'approbation sont présentés à l'annexe 5.

## 13.2 RÉSUMÉ FRANÇAIS DE L'ARTICLE

### ***POTENTIALISATION DES L'EFFET ANTINÉOPLASIQUE DE LA 5-AZA-2'- DÉSOXYCYTIDINE PAR LE PHÉNYLBUTYRATE SUR LES CELLULES LEUCÉMIQUES L1210***

Les changements épigénétiques, telle la méthylation aberrante de l'ADN, répriment l'expression des gènes suppresseurs de tumeurs (TSGs), ce qui peut jouer un rôle important dans le développement de la leucémie. L'inhibiteur de la méthylation de l'ADN, la 5-aza-2'-désoxycytidine (5-Aza-CdR), peut réactiver ces gènes réprimés et est donc un agent intéressant à évaluer dans le traitement de la leucémie. Il a été rapporté que l'efficacité de la 5-Aza-CdR à ré-exprimer les TSGs peut être améliorée lorsqu'on y ajoute un inhibiteur des déacétylases des histones (HDACi). Les HDACi permettent à la chromatine compactée d'adopter une structure plus ouverte. Le phénylbutyrate (PB) est un HDACi intéressant qui a montré une activité clinique contre la leucémie. Dans ce rapport, nous avons évalué l'activité antinéoplasique de la 5-Aza-CdR et du PB, administrés seuls et en combinaison, sur les cellules leucémiques lymphoïdes murines L1210 et myéloïdes humaines HL-60. Le traitement *in vitro* de la combinaison de la 5-Aza-CdR et du PB a produit une meilleure inhibition de croissance cellulaire, de formation de clones et de synthèse d'ADN que chacun des agents seuls. La combinaison a aussi permis une réactivation synergique du TSG p15CDN2B dans les cellules L1210. De plus, la potentialisation des effets de la co-administration de la 5-Aza-CdR et du PB a aussi été observée *in vivo* dans un modèle leucémique murin. Toutes ces observations justifient l'évaluation de la co-administration de la 5-Aza-CdR et du PB dans le traitement de patients atteints de leucémie.

### 13.3 PRÉSENTATION DE L'ARTICLE

*ENHANCEMENT OF ANTINEOPLASTIC ACTION OF 5-AZA-2'-  
DEOXYCYTIDINE BY PHENYL BUTYRATE ON L1210 LEUKEMIC CELLS*

**Maryse Lemaire**<sup>a</sup>, Louise F. Momparler<sup>a</sup>, Nuno Jorge Farinha<sup>b</sup>, Mark Bernstein<sup>b</sup> and Richard L. Momparler<sup>a, b</sup>

<sup>a</sup> Département de Pharmacologie, Université de Montréal, Centre de recherche pédiatrique ; <sup>b</sup>Service d'hématologie-oncologie, Hôpital Sainte-Justine, 3175 Côte Sainte-Catherine, Montréal, Québec H3T 1C5, Canada

This work was supported by Grant from the Leukemia & Lymphoma Society (USA).

*Running Title:* 5-AZA-CdR and phenylbutyrate therapy of leukemia

*Keywords:* leukemia, 5-aza-2'-deoxycytidine, phenylbutyrate, DNA methylation, histone acetylation, chemotherapy

*Leukemia & Lymphoma: 45; 1: 147–154 (2004)*

**ABSTRACT**

Epigenetic changes, such as aberrant DNA methylation that silences tumor suppressor genes (TSGs), can play an important role in the development of leukemia. The DNA methylation inhibitor, 5-aza-2'-deoxycytidine (5-AZA-CdR), can reactivate these silent TSGs and is an interesting agent to investigate for therapy of leukemia. It has been reported that the effectiveness of 5-AZA-CdR to reactivate TSG can be enhanced by inhibitors of histone deacetylase (HDIs). HDIs can convert a compact chromatin structure to an open configuration that facilitates gene expression. An interesting HDI is phenylbutyrate (PB), which has shown some clinical activity for the therapy of leukemia. In this report we have investigated the antineoplastic activity of 5-AZA-CdR and PB alone and in combination on murine L1210 lymphoid leukemic cells. The *in vitro* treatment of 5-AZA-CdR and PB in combination produced a greater inhibition of growth, DNA synthesis, and also a greater reduction on colony formation on both L1210 and human HL-60 leukemic cells as compared to either drug alone. The combination also produced a synergistic activation of the TSG, p15CDN2B, in the L1210 cells. In mice with L1210 leukemia the combination showed enhanced antineoplastic activity. We also observed an enhancement of the antineoplastic activity of this combination in mice with L1210 leukemia. These data provide a rationale to investigate 5-AZA-CdR and PB in patients with advanced leukemia.

## INTRODUCTION

Patients with advanced leukemia who relapse after intensive chemotherapy have a poor prognosis [1, 2]. New approaches to therapy should be investigated on these patients. Recent reports have shown that epigenetic changes can play an important role in the development of neoplasia [3, 4]. These epigenetic events can involve aberrant methylation, which silences tumor suppressor genes (TSGs), and changes in chromatin structure that hinder their transcription [4, 5]. In this regard, agents that target these changes, such as inhibitors of DNA methylation and histone deacetylation, may be effective therapeutic drugs against leukemia [6].

Aberrant methylation of a TSG apparently blocks its expression due to the attachment of 5-methylcytosine binding proteins to the promoter region, preventing access to transcription factors [7, 8]. In addition, these binding proteins recruit histone deacetylases, which convert the chromatin structure from an open to a more compact configuration that favors gene silencing [7, 8]. An inhibitor of DNA methylation, such as 5-aza-2'-deoxycytidine (5-AZA-CdR), can reverse this process and reactivate silent TSGs [6]. When this occurs it can lead to terminal differentiation [9, 10] and may be responsible for the antineoplastic action of this cytosine analog [11]. Inhibitors of histone deacetylases (HDIs) also show interesting preclinical antineoplastic activity [12-14]. These inhibitors can reactivate certain genes that are primarily not silenced by promoter methylation [15].

The interaction of these two types of inhibitors was shown by the elegant study of Cameron *et al.* [16] who observed that 5-AZA-CdR in combination with the HDI, trichostatin A (TSA), produced a synergistic activation of the p15CDN2B TSG, in leukemic cells. This report stimulated our interest to investigate the antineoplastic activity of 5-AZA-CdR in combination with a HDI against leukemia. We observed previously an enhancement of the antineoplastic activity of 5-AZACdR on human breast and lung carcinoma cells by its combination with the HDIs: TSA [17], depsipeptide [18, 19] and phenylbutyrate PB [20]. Other investigators have also

reported increased *in vitro* antitumor activity of the combination of 5-AZA-CdR and depsipeptide [21].

For our study on leukemia we chose 5AZA-CdR because it can reactivate many different types of TSGs and is an active antileukemic agent in both animal models [11, 22] and in patients [23-25]. For selection of a HDI we chose PB since it showed promising activity in patients with leukemia [26]. In addition, PB in combination with retinoic acid induced a complete remission in a patient with acute promyelocytic leukemia that was resistant to retinoid therapy [27, 28]. These studies provided us a rationale to investigate if the antileukemic activity of 5-AZA-CdR can be increased by PB. In this report we have observed that the combination of 5-AZA-CdR and PB had an enhanced antineoplastic effect both *in vitro* and *in vivo* on murine L1210 leukemic cells. We also observed that the combination produced a synergistic activation of the p15CDKN2B (p15) gene in the L1210 leukemic cells.

## MATERIALS AND METHODS

**Cell Lines.** The mouse lymphocytic leukemia cell line L1210 was obtained from Dr. T. Khwaja (University of Southern California, LA, USA). These cells were maintained at 37°C with 5% CO<sub>2</sub> in RPMI-1640 medium (Life Technologies, Burlington, Ontario, Canada) with 5% heat-inactivated fetal calf serum (WISENT, St-Bruno, Quebec, Canada) and with 6 mM of 2-mercaptoethanol. The doubling time of the L1210 cells was 10.5 to 12 h. The human myeloid leukemia cell line HL-60 was obtained from American Tissue Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA). HL-60 cells were maintained at 37°C with 5% CO<sub>2</sub> in RPMI-1640 medium with 10% heat-inactivated fetal calf serum. The doubling time of HL-60 cells was approximately 20 h.

**Chemicals.** 5-AZA-CdR and PB were obtained from Pharmachemie (Haarlem, The Netherlands) and Triple Crown America Inc. (Perkasie, PA, USA), respectively. 5-AZA-CdR was dissolved in sterile PBS 1X solution and stored at -70°C to prevent decomposition. (3H-methyl)-thymidine was purchased from ICN Biomedicals (Irvine, CA, USA).

**Inhibition of growth and clonogenic assay.** A 5 ml aliquot of L1210 or HL-60 cells in log phase at a density of  $1 \times 10^4$  cells/ml was placed in 25 cm<sup>2</sup> tissue culture flasks. The indicated concentrations of 5-AZA-CdR and/or PB were added. The flasks were incubated at 37°C and at the indicated times an aliquot was removed for counting with a Model Z Coulter Counter. For the clonogenic assay, the drugs were removed by centrifugation and the cells were suspended in drug-free medium. An aliquot of 100 cells was placed in 2 ml of 0.3% soft agar RPMI 1640 medium containing 11% serum for L1210 cells or 20% serum for HL-60 cells. After the indicated time (7 days for L1210 cells or 15 days for HL-60 cells) of incubation, the number of colonies (> 500 cells) was counted. The cloning efficiency in soft agar of the cells without drug treatment was in the range of 50 - 60% for both cell lines.

**DNA Synthesis Assay.** Leukemic cells ( $5 \times 10^3$  cells/ml) were placed in 5 ml medium for 44 h in presence and absence of drug. At 44 h, a 2 ml aliquot was incubated with 0.5  $\mu$ Ci of (3H-methyl)-thymidine (6.7 Ci/mmol) for an additional 4 h at 37°C in a shaker bath. The cells were placed on a Whatman GF/C glass fiber discs (2.4 cm diameter), washed with cold 0.9% NaCl, 5% cold trichloroacetic acid and ethanol. The filters were dried and the amount of radioactive thymidine incorporated into DNA was determined with a scintillation counter. Under these conditions the cells without drug treatment showed incorporation about  $8,000 \pm 1,180$  (mean  $\pm$  SD) cpm of radioactive thymidine.

**Animals.** Male BALB/c x DBA/2 (hereafter called CD2F<sub>1</sub>) mice 24-28 g were obtained from Taconic Biotechnology (Germantown, NY, USA). Mice were acclimatized to housing conditions at least 2 weeks before experiments. They received food and water *ad libitum*. The animal committee approved the experimental protocol and animals were handled in accordance with the institutional guidelines.

**Transplantation of L1210 Leukemic Cells.** For maintenance of a constant source of L1210 leukemic cells in the laboratory, weekly i.p. injections of  $10^4$  cells in 0.1 ml of RPMI-1640 medium into CD2F<sub>1</sub> mice was performed. Seven days later, the ascitic fluid was obtained from the mice and a cell count of the leukemic cells was performed with a hemocytometer prior to the subsequent transplantation.

**Treatment Plan.** The mice were divided in four groups: control, 5-AZA-CdR, PB and 5-AZA-CdR + PB. The mice were injected i.v. with 0.1 ml ( $5 \times 10^4$ ) L1210 cells [22]. 5-AZA-CdR was prepared in PBS and PB in water. Both drugs were sterilized by 0.2  $\mu$ m filtration. The dose-schedule for 5-AZA-CdR and PB is described in the legend of the Table II. Toxicity was evaluated by body weight loss. The survival time of each group of mice was monitored and the increase in life span (ILS) determined.

**Analysis of Gene Expression by RT-PCR.** In order to study the reactivation of p15CDKN2B gene in L1210 leukemia cells, we treated the cells with 5-AZA-CdR



(0.5 ng/ml) and PB (1 mM), alone or in combination as a simultaneous exposure, for 72 h. Cells were harvested 24 h after removal of the drugs. Total RNA was isolated using Rneasy Mini Kit (Qiagen, Mississauga, Ontario, Canada). For cDNA synthesis, total RNA was reverse-transcribed in a reaction mixture using Super-Script II RNase H Reverse Transcriptase kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). The reaction was performed at 42°C for 50 min followed by 15 min at 70°C to inactivate the enzyme. PCR amplifications were performed using HotStar Taq Polymerase (Qiagen) and specific primers spanning different exons for murine 18S ribosomal RNA and murine p15CDKN2B. The 18S RNA (GenBank accession number X56974) was amplified as an internal control using as sense primer 5'-CCT GGT TGA TCC TGC CAG TA-3' and antisense primer 5'-GAG CGA CCA AAG GAA CCA TA-3'. The length of the PCR product of 18S cDNA was 127 bp. For p15CDKN2B, (GenBank accession number NM\_007670) the primers were sense 5'-CCA CCC TTA CCA GAC CTG TG-3' and antisense 5'-TAG TGG CAG CGT GCA GAT AC-3'. The length of the PCR product of p15CDKN2B was 177 bp. Samples were amplified in a Whatman Biometra T gradient thermocycler (Göttingen, Germany) under the following conditions. For the 18S gene, the PCR conditions were 15 min at 95°C to activate Taq polymerase, denaturation at 94°C for 45 s, annealing at 55°C for 30 s and extension at 72°C for 30 s, for 5 cycles. Then the annealing temperature was lowered at 53°C for 15 - 20 more cycles. For the p15CDKN2B gene, the PCR conditions were 15 min at 95°C to activate Taq polymerase, denaturation at 94°C for 45 s, annealing at 64°C for 45 s and extension at 72°C for 45 s, for 5 cycles. Then the annealing temperature was lowered at 62°C for 35 - 37 more cycles. For each gene, the number of cycles was terminated during the exponential phase of DNA amplification. The PCR products were electrophoresed on 2% agarose gel and detected by ethidium bromide staining. For quantitative detection of gene expression, we used the 18S as the internal standard. The amount of cDNA from the drug-treated samples that would amplify the identical amount of 18S DNA during exponential phase for each sample was determined. The measurement of the concentration and size of amplified DNA was performed on an Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA).

***Statistical Considerations.*** Differences between groups were evaluated by oneway ANOVA test. The value  $P \leq 0.05$  was taken to indicate statistical significance. The data correspond to the mean values  $\pm$  SD for  $n \geq 3$ . The Valeriote and Lin method [29, 30] was used to determine if the interaction observed between drugs in the clonogenic assays was additive, synergistic or antagonistic.

## RESULTS

### *The Combination of 5-AZA-CdR and PB Produced a Greater DNA Synthesis and Growth Inhibition on L1210 Leukemic Cells than either Drug Alone*

In order to evaluate the action of 5-AZA-CdR and PB on inhibition of DNA synthesis, L1210 were exposed to different concentrations of 5-AZA-CdR and/or PB for 48 h. The inhibition on DNA synthesis produced by 5-AZA-CdR or PB alone is shown in Table I. 5-AZA-CdR at a concentration of 1 ng/ml produced 36.6% inhibition whereas at 10 ng/ml and higher produced greater than 80% inhibition of DNA synthesis. For PB the IC<sub>50</sub> for inhibition of DNA synthesis was between 0.5 and 1.0 mM. A significantly greater inhibition of DNA synthesis was observed for the cells treated with the combination of 1 ng/ml of 5-AZA-CdR and 1 mM of PB (81.8%) as compared to each agent alone ( $P < 0.01$ ) (Fig. 1). We also obtained a similar enhancement of 5-AZA-CdR in combination with 0.5 mM of PB (data not shown).

In order to determine the interaction of 5-AZA-CdR and PB on L1210 leukemic cells proliferation, the cells were exposed to a single concentration of 5-AZA-CdR and/or PB (Fig. 2A). The concentrations of each drug alone that gave about 20-40% inhibition of growth were used to evaluate the efficacy of the combination (data not shown). For a 48 h exposure, the growth inhibition produced by 5-AZA-CdR (1 ng/ml) alone was 41.9% whereas PB (1.0 mM) alone produced 32.5% inhibition. The combination of 5-AZA-CdR with PB produced 66.1% in growth inhibition, which is greater than either drug alone ( $P < 0.05$ ) (Fig. 2B). Similar results were obtained with 5-AZA-CdR in combination with 0.5 mM of PB (data not shown).

***The Combination of 5-AZA-CdR and PB Produced a Greater Loss of Clonogenicity of the L1210 and HL-60 Leukemic Cells than either Drug Alone***

The loss of clonogenicity was determined by the reduction in colony formation after a 48 h drug exposure of the L1210. 5-AZA-CdR (1 ng/ml) alone and PB (1 mM) alone produced a 40.5 and 55.5% loss of clonogenicity, respectively. The combination produced 88.8% loss of clonogenicity (Fig. 3A), which is a synergistic interaction as defined by Valeriote and Lin [29, 30]. This difference was significantly greater than either drug alone ( $P < 0.001$ ).

In order to determine if a similar interaction between these epigenetic agents occurs with human leukemic cells, we exposed HL-60 myeloid leukemic cells to these two drugs for 96 h and performed a clonogenic assay. 5-AZA-CdR alone (20 ng/ml) and PB (0.5 mM) produced 42.7 and 25.0% in loss of clonogenicity, respectively for the HL-60 leukemic cells. The combination produced a significantly synergistic loss of clonogenicity (62.3%) that was greater than either drug alone ( $P < 0.001$ ) (Fig. 3B).

***The Combination of 5-AZA-CdR and PB Produced a Synergistic Activation of p15 in L1210 Leukemic Cells as Compared to either Drug Alone***

Since Cameron *et al.* [16] reported that 5-AZA-CdR in combination with the HDI, TSA, produced a synergistic re-activation of the p15 TSG in human leukemic cells, it was of interest to determine if similar results could be obtained with murine leukemic cells. Using RT-PCR, we observed in the L1210 leukemic cells a synergistic reactivation of p15 by 5-AZA-CdR plus PB as compared to either drug alone (Fig. 4). The p15 gene was not expressed in L1210 leukemic cells, but showed marked expression in normal mouse spleen.

***The Combination of 5-AZA-CdR and PB Produced an Enhancement of the Survival Time of CD2F<sub>1</sub> Mice with L1210 Leukemia than either Agent Alone***

In order to have an anatomical distribution of the leukemic cells similar to the human disease, the mice received an i.v. injection of  $5 \times 10^4$  L1210 leukemic cells on day 1. On day 2 the effects of two i.p. injections of 5-AZA-CdR (0.4 mg/kg) [22] and/or of PB (150 mg/kg) on the survival time of CD2F<sub>1</sub> mice with L1210 leukemia were determined (Table II). The ILS was determined for each group. The combination produced a significantly greater ILS (44.9%) as compared to 5-AZA-CdR alone (30.4% ILS) or PB alone (< 1% ILS) ( $P < 0.001$ ). The toxicity produced by the combination was minimal (< 3% loss in body weight).

The fraction of leukemic cells killed by each drug alone or in combination was determined to evaluate the drug interaction. The survival time of mice is directly proportional to the number of L1210 cells injected i.v. [22]. To estimate the fraction of leukemic cells killed by the chemotherapy, we used their growth kinetics and the survival time of the mice. The L1210 doubling time is about 12 h, so it takes 1.6 days for the cell count to increase 10-fold, which corresponds to 1.0 day to recover from 75% or 0.6 log kill. The estimated leukemic cell log kill = (survival time drug treated mice - survival time control mice) x 0.6 log kill / day [22].

With this type of analysis 5-AZA-CdR and PB alone produced an estimated 1.27 and < 0.1 log kill, respectively; whereas the combination produced a 1.86 log kill. According to the analysis of Valeriote and Lin [30], since 1.86 log kill is greater than 1.27 (1.26 + 0.1) log kill, the interaction of the drugs combination was defined as synergistic.

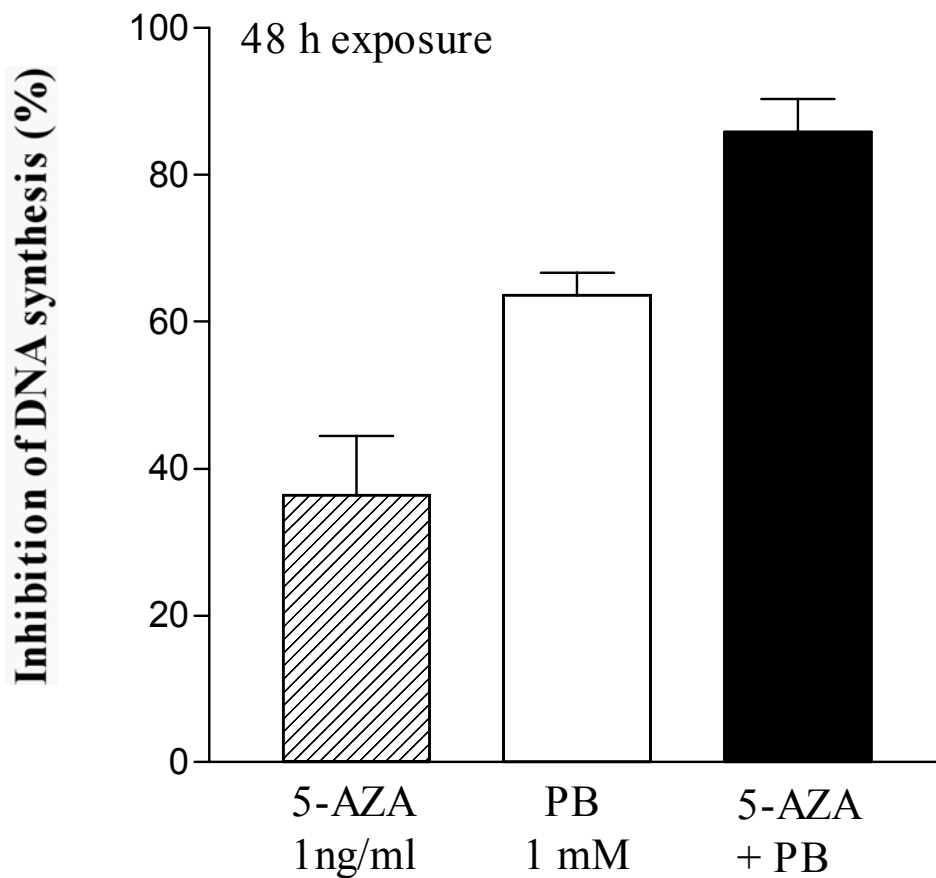
**Table 13-1**

**Inhibition of DNA synthesis by different concentrations of  
5-AZA-CdR or PB on L1210 leukemic cells**

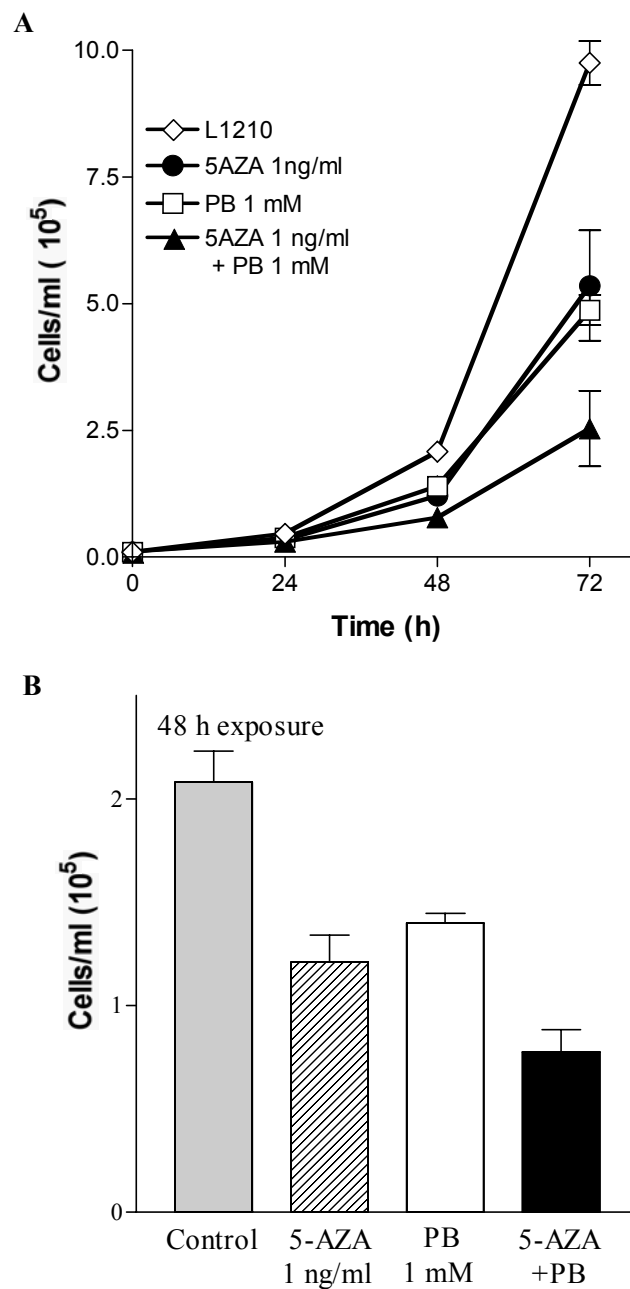
<b>5-AZA-CdR</b>		<b>PB</b>	
Concentration (ng/ml)	Inhibition (%)	Concentration (mM)	Inhibition (%)
1	36.6 ± 7.7*	0.25	23.3 ± 6.6
10	84.0 ± 8.7	0.5	34.6 ± 0.6
100	95.3 ± 2.5	1.0	63.3 ± 3.1
1000	97.4 ± 0.9	2.0	98.0 ± 0.9

The L1210 leukemic cells were exposed to the indicated concentrations of 5-AZA-CdR or PB for 48 h. At 44 h (<sup>3</sup>H-methyl)-thymidine was added to medium for 4 h. and its incorporation into DNA was determined.

\*Mean values ± S.D., n = 3.

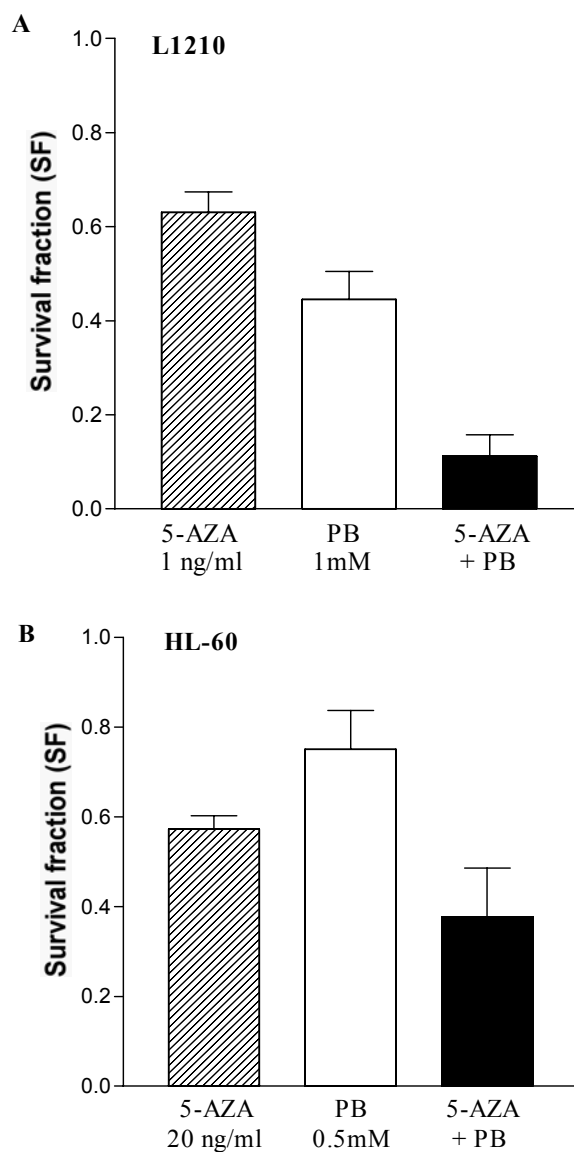


**Figure 13-1. Effect of 5-AZA-CdR and PB alone or in combination on DNA synthesis inhibition in L1210 leukemic cells.** The L1210 leukemic cells were treated with the indicated concentrations of 5-AZA-CdR and/or PB for a 48 h exposure. At 44 h (3H-methyl)-thymidine was added to the medium for 4 h and its incorporation into DNA was determined. The drug combination produced a significantly greater inhibition of DNA synthesis as compared to either drug alone ( $P < 0.01$ ). Data are mean values  $\pm$  SD,  $n=3$ . 5-AZA, 5-AZA-CdR.



**Figure 13-2. Effect of 5-AZA-CdR and/or PB on growth inhibition in L1210 leukemic cells.** In (A) the cells were treated with the indicated concentration of drugs and the number of cells/ml was determined by count every 24 h. The growth inhibition (%) relative to control cells without treatment was evaluated. In (B), it shown the effect of 5-AZA-CdR and PB alone or in combination on growth inhibition in L1210 leukemic cells for 48 h drug exposure. Data shown are mean values  $\pm$  SD,  $n=3$ . 5-AZA-CdR and PB in combination produced a significantly greater growth inhibition than either drug alone ( $P < 0.05$ ). 5-AZA, 5-AZA-CdR.



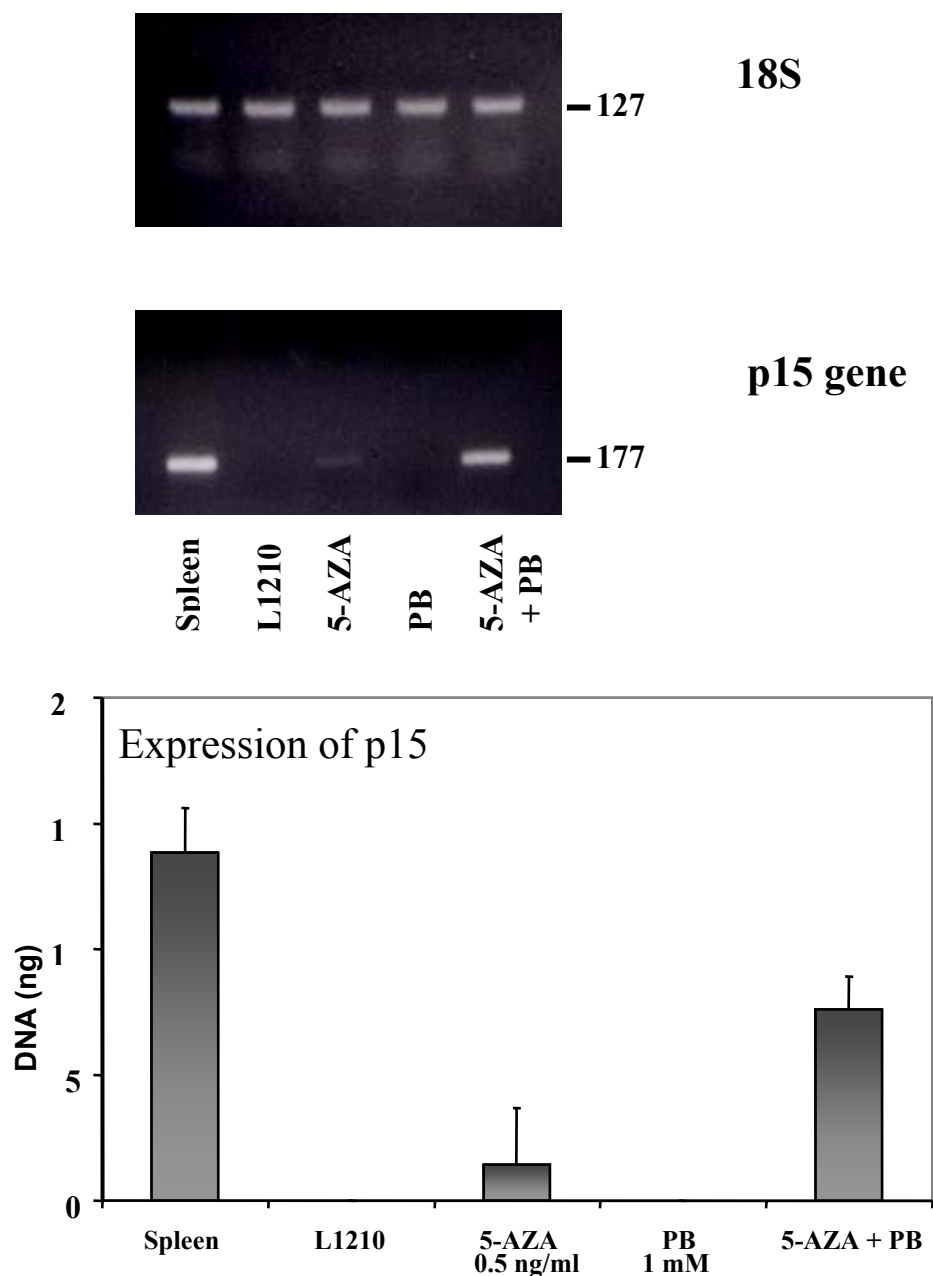


**Figure 13-3. Effect of 5-AZA-CdR and PB alone or in combination on loss of clonogenicity of L1210 or HL-60 leukemic cells.** In (A), the L1210 cells were treated with the indicated concentrations of 5-AZA-CdR and / or PB for 48 h and the survival fraction (SF) was determined by colony assay in soft agar. In (B), the HL-60 cells received 5-AZA-CdR and/or PB for 96 h and the survival fraction (SF) was evaluated by colony assay in soft agar. The loss in clonogenicity [%] relative to control cells without treatment was determined for both experiments, and 5-AZA-CdR plus PB produced a significantly greater loss of clonogenicity as compared to cells treated with either drug alone ( $P < 0.001$ ). Data are mean values  $\pm$  SD,  $n \geq 3$ . 5-AZA, 5-AZA-CdR.

**Table 13-2.****Effect of 5-AZA-CdR and/or PB on survival time of CD2F<sub>1</sub> mice with L1210 leukemia.**

Drug	Number of mice	Total Dose (mg/kg)	Survival time (days)	ILS (%)	Weight loss (%)
Control	8	0	6.9 ± 0.5*	0	0
5-AZA	10	0.8	9.0 ± 0.4	30.4	<2
PB	10	300	6.9 ± 0.1	<1	0
5-AZA + PB	10	0.8 + 300	10.0 ± 0.3	44.9	<3

Mice were injected i.v. with  $5 \times 10^4$  L1210 cells on day 1. On day 2, the mice received i.p. injections of 5-AZA (0.4 mg/kg) and/or PB (150 mg/kg) at 8 h and 12 h at the indicated dosage. Weight loss was determined on day 7. \*Mean values ± S.D., n = 2. ILS, increase in life span ; 5-AZA, 5-AZA-CdR.



**Figure 13-4. Effect of 5-AZA-CdR and PB alone or in combination on the expression of p15 gene in L1210 leukemic cells.** The L1210 cells were treated with the indicated concentrations of 5-AZA-CdR and/or PB for 72 h. Total RNA was isolated at 96 h and 18 S ribosomal RNA gene and p15 gene expression analyzed by RT-PCR. The amount of cDNA amplified during the exponential phase of PCR was analyzed by agar gel electrophoresis and ethidium bromide staining (upper) and by quantification of DNA amplified by Agilent 2100 Bioanalyzer (lower). Statistical analysis of Bioanalyzer results by one-way ANOVA: 5AZA or PB versus 5AZA+PB  $P < 0.001$ ;  $n = 3$ . Normal mouse spleen was used as positive control for p15 expression. L1210, no drug treatment; 5-AZA, 5-AZA-CdR.

## DISCUSSION

Several cancer-related genes have been reported to be silenced by aberrant DNA methylation in leukemia and may play an important role in the pathogenesis of this disease [31]. Cameron *et al.* [16] observed that 5-AZA-CdR, in combination with the HDI TSA, produced a synergistic activation of the expression of p15 TSG in leukemic cells. This work suggested to us that combination of these types of agents may have potential for the therapy of leukemia. In this study, we have investigated the *in vitro* and *in vivo* antineoplastic activity of 5-AZA-CdR and PB, alone and in combination, against murine L1210 leukemic cells. We also have studied the *in vitro* antineoplastic activity of both drugs against human HL-60 leukemic cells. We chose these agents because both have shown promising clinical activity for the therapy of leukemia [23-26, 28].

5-AZA-CdR or PB alone produced a significant inhibition of DNA synthesis in the L1210 leukemic cells (Table I). When these agents were used in combination they produced a greater inhibition of DNA synthesis than either agent alone (Fig. 1). 5-AZA-CdR was a much more potent inhibitor than PB as shown by the DNA synthesis inhibition at a concentration as low as 1 ng/ml for this cytosine analog as compared to a concentration of 0.25 mM (~47 µg/ml) for PB. This difference in activity may be due to the fact that 5-AZA-CdR is a potent inhibitor of DNA methylation whereas PB is a weak inhibitor of histone deacetylation [14, 23-25, 32].

Both 5-AZA-CdR and PB alone inhibited the growth of the L1210 leukemic cells that increased with the duration of treatment (Fig. 2A). At 48 h drug exposure the combination showed a significantly greater growth inhibition than either drug alone (Fig. 2B). At the 72 h, there was even a greater enhancement of growth inhibition produced by the combination as compared to each drug alone.

Using a clonogenic assay, we also observed that the proliferative potential of L1210 cells was significantly decreased when cells were exposed to both drugs as compared to 5-AZA-CdR or PB alone (Fig. 3A). These results on the murine

leukemic cells were also reproduced on the human myeloid leukemic cell line, HL-60 (Fig. 3B). According to the model of Valeriote and Lin [29, 30], 5-AZA-CdR in combination with PB produced a synergistic loss of clonogenicity for both the murine and human leukemic cell lines, since the survival fraction of the combination was less than the product of the survival fraction of each drug alone. The concentrations used in the clonogenic assay were in the range of the estimated plasma levels of both 5-AZA-CdR and PB used in clinical trials in patients with leukemia [14, 25].

Our next objective was to determine if the *in vitro* results obtained with 5-AZA-CdR and PB could also be translated to an *in vivo* model of leukemia. For our *in vivo* studies, we injected L1210 leukemic cells i.v. into mice to produce a histopathology and anatomical distribution of the cells similar to human leukemia [22]. We observed that the combination of these agents produced a synergistic response in the mice with leukemia that was greater than either drug alone (Table II). The dose-schedule used showed minimal host toxicity as evaluated by body weight loss after drug treatment. There was an excellent correlation between the *in vitro* and *in vivo* data on 5-AZA-CdR and PB as shown by the comparison of the loss of clonogenicity (Fig. 3A) and of the ILS produced by the combination of these agents (Table II). The data suggested that both drugs could be administered simultaneously. Pharmacokinetic analysis of the dose-schedule indicated that the estimated plasma levels of both 5-AZA-CdR and PB in the mice were in the range of the plasma level obtained in clinical trials with these drugs [14, 25].

In preliminary clinical studies, PB required a long treatment (up to 21 days) to produce responses in patients with leukemia [26]. Our study suggests that a short treatment with 5-AZA-CdR in combination with PB may produce effective antileukemic therapy in patients. The enhanced interaction between 5-AZA-CdR and PB against leukemic cells may permit the use of many cycles of therapy of short duration without a loss of clinical efficacy and with less host toxicity.

Since a combination of an inhibitor of DNA methylation with an inhibitor of HDI was reported to produce synergistic re-activation of silent TSGs [16, 18], we investigated the effect of 5-AZA-CdR and PB to reactivate the p15, a TSG which is reported to be silenced frequently by DNA methylation in human leukemia [31]. This combination also produced a synergistic re-activation of p15 in L1210 leukemic cells, in confirmation of the results reported for human leukemic cells with 5-AZA-CdR and the HDI, TSA [16].

The mechanism of action responsible for the synergistic activity of 5-AZA-CdR in combination with PB is probably related to their synergistic reactivation of genes silenced by epigenetic events [3-5, 7] and whose function is to suppress leukemogenesis. Additional investigations are needed to confirm this hypothesis. The reactivation of these genes by these epigenetic agents presumably leads to terminal differentiation, senescence or apoptosis of the leukemic cells with an irreversible loss of their proliferative potential [9, 10]. The mechanism for the synergistic antineoplastic activity of a combination of an inhibitor of DNA methylation with an inhibitor of histone deacetylation seems also to be universal, because we and other investigators have also reported enhanced antineoplastic activity of the combination of 5-AZA-CdR and other HDIs on human tumors with different phenotypes [17-21]. Our data suggest that 5-AZA-CdR and PB may be an interesting combination to investigate for the treatment of advanced leukemia.

## REFERENCES

1. Linker, C.A., Levitt, L.J., O'Donnell, M., Forman, S.J. and Ries, C.A. (1991) "Treatment of adult acute lymphoblastic leukemia with intensive cyclical chemotherapy: a follow-up report", *Blood*, 78, 2814 – 2822.
2. Mayer, R.J., Davis, R.B., Schiffer, C.A., Berg, D.T., Powell, B.L., Schulman, P., et al. (1994) "Intensive postremission chemotherapy in adults with acute myeloid leukemia. Cancer and Leukemia Group B", *The New England Journal of Medicine*, 331, 896 – 903.
3. Jones, P.A. and Laird, P.W. (1999) "Cancer epigenetics comes of age", *Nature Genetics*, 21, 163 – 167.
4. Jones, P.A. and Baylin, S. (2002) "The fundamental role of epigenetic events in cancer", *Nature Reviews. Genetics*, 3, 415 – 428.
5. Strahl, B.D. and Allis, C.D. (2000) "The language of covalent histone modifications". *Nature*, 403, 41 – 45.
6. Momparler, R.L. and Bovenzi, V. (2000) "DNA methylation and Cancer", *Journal of Cellular Physiology*, 183, 145 – 154.
7. Jones, P.L., Jan Veenstra, G.C., Wade, P.A., Vermaak, D., Kass, S.U., Landsberger, N., et al. (1998) "Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylases to repress transcription", *Nature Genetics*, 19, 187 – 191.
8. Nan, X., Ng, H.H., Johnson, C.A., Laherty, C.D., Turner, B.M., Eisenman, R.N., et al. (1998) "Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex", *Nature*, 393, 386 – 389.
9. Pinto, A., Attadia, V., Fusco, A., Ferrara, F., Spada, O.A., and Di Fiore, P.P. (1984) "5-Aza-2'-deoxycytidine induces terminal differentiation of leukemic blasts from patients with acute myeloid leukemias", *Blood*, 64, 922 – 929.
10. Momparler, R.L., Dore, B.T. and Momparler, L.F. (1990) "Effect of 5-aza-2'-deoxycytidine and retinoic acid on differentiation and cmyc expression in HL-60 myeloid leukemic cells", *Cancer Letters*, 54, 21 – 28.

11. Wilson, V.L., Jones, P.A. and Momparler, R.L. (1983) "Inhibition of DNA methylation in L1210 leukemic cells by 5-aza-2'-deoxycytidine as a possible mechanism of chemotherapeutic action", *Cancer Research*, 43, 3493 – 3496.
12. Vigushin, D.M. and Coombes, R.C. (2002) "Histone déacétylases inhibitors in cancer treatment", *Anticancer Drugs*, 13, 1 – 13. Review.
13. Marks, P.A., Richon, V.M. and Rifkind, R.A. (2000) "Histone Deacetylase Inhibitors: Inducers of Differentiation or Apoptosis of Transformed Cells", *Journal of the National Cancer Institute*, 92, 1210 – 1216.
14. Gore, S.D. and Carducci, M.A. (2000) "Modifying histones to tame cancer: clinical development of sodium phenylbutyrate and other histone deacetylases inhibitors", *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 9, 2923 – 2934.
15. Suzuki, H., Gabrielson, E., Chen, W., Anbazhagan, R., van Engeland, M., Weijnenberg, M.P., Herman, J.G., et al. (2002) "A genomic screen for genes upregulated by demethylation and histone deacetylase inhibition in human colorectal cancer", *Nature Genetics*, 31, 141 – 149.
16. Cameron, E.E., Bachman, K.E., Myo" ha" nen, B.S., Herman, J.G. and Baylin, S.B. (1999) "Synergy of demethylation and histone deacetylase inhibition in the re-expression of genes silenced in cancer", *Nature Genetics*, 21, 103 – 107.
17. Bovenzi, V. and Momparler, R.L. (2001) "Antineoplastic action of 5-aza-2'-deoxycytidine and histone deacetylase inhibitor and their effect on the expression of retinoic acid receptor beta and estrogen receptor alpha genes in breast carcinoma cells", *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 48, 71 – 76.
18. Primeau, M., Gagnon, J. and Momparler, R.L. (2003) "Synergistic antineoplastic action of DNA methylation inhibitor 5-AZA-2'-deoxycytidine and histone deacetylase inhibitor depsipeptide on human breast carcinoma cells", *International Journal of Cancer*, 103, 177 – 184.
19. Gagnon, J., Shaker, S., Primeau, M., Hurtubise, A. and Momparler, R.L. (2003) "Interaction of 5-aza-2'-deoxycytidine and depsipeptide on antineoplastic activity and activation of sigma 14-3-3, Ecadherin, and Timp3 expression in human breast carcinoma cells". *Anti-cancer Drugs*, 13, 193 – 202.



20. Boivin, A.J., Momparler, L.F., Hurtubise, A. and Momparler, R.L. (2002) “Antineoplastic action of 5-aza-2'-deoxycytidine and phenylbutyrate on human lung carcinoma cells”, *Anticancer Drugs*, 13, 869 – 874.
21. Weiser, T.S., Guo, Z.S., Ohnmacht, G.A., Parkhurst, M.L., Tong-On, P., Marincola, F.M., et al. (2001) “Sequential 5-Aza-2'-deoxycytidine-Depsipeptide FR901228 Treatment Induces Apoptosis Preferentially in Cancer Cells and Facilitates Their Recognition by Cytolytic T Lymphocytes Specific for NY-ESO-1”, *Journal of Immunotherapy*, 24, 151 – 161.
22. Momparler, R.L. and Gonzales, F.A. (1978) “Effect of Intravenous Infusion of 5-Aza-2'-Deoxycytidine on Survival Time of Mice with L1210 Leukemia”, *Cancer Research*, 38, 2673 – 2678.
23. Momparler, R.L., Rivard, G.E. and Gyger, M. (1985) “Clinical trial on 5-aza-2'-deoxycytidine in patients with acute leukemia”, *Pharmacology & Therapeutics*, 30, 277 – 286.
24. Momparler, R.L., Bouchard, J., Onetto, N. and Rivard, G.E. (1984) “5-Aza-2'-deoxycytidine therapy in patients with acute leukemia inhibits DNA methylation”, *Leukemia Research*, 8, 181 – 185.
25. Rivard, G.E., Momparler, R.L., Demers, J., Benoit, P., Raymond, R., Lin, K.T., et al. (1981) “Phase I study on 5-AZA-2'- deoxycytidine in children with acute leukemia”, *Leukemia Research*, 5, 453 – 462.
26. Gore, S.D., Weng, L.J., Figg, W.D., Zhai, S., Donehower, R.C., Dover, G., et al. (2002) “Impact of Prolonged Infusions of the Putative Differentiating Agent Sodium Phenylbutyrate on Myelodysplastic Syndromes and Acute Myeloid Leukemia”, *Clinical Cancer Research*, 8, 963 – 970.
27. He, L.Z., Tolentino, T., Grayson, P., Zhong, S., Warrel, R.P., Rifkind, R.A., et al. (2001) “Histone deacetylase inhibitors induce remission in transgenic models of therapy-resistant acute promyelocytic leukemia”, *The Journal of Clinical Investigation*, 108, 1321– 1330.
28. Warrel, R.P., He, L.Z., Richon, V., Calleja, E. and Pandolfi, P.P. (1998) “Therapeutic Targeting of Transcription in Acute Promyelocytic Leukemia by

- Use of an Inhibitor of Histone Deacetylase”, *Journal of the National Cancer Institute*, 90, 1621 – 1625.
29. Momparler, R.L. (1980) “In vitro systems for the evaluation of combination chemotherapy”, *Pharmacology & Therapeutics*, 8, 21– 25.
  30. Valeriote, F. and Lin, H. (1975) “Synergistic interaction of anticancer drugs: a cellular perspective”, *Cancer Chemotherapy Reports*, 59, 895 – 899.
  31. Toyota, M., Kopecky, K.J., Toyota, M.O., Jair, K.W., Willman, C.L. and Issa, J.P. (1997) “Methylation profiling in acute myeloid leukemia”, *Neoplasia*, 97, 2823 – 2829.
  32. Johnstone, R.W. (2002) “Histone-deacetylase inhibitors: novel drugs for the treatment of cancer”, *Nature Reviews. Drug Discovery*, 1, 287 – 299.

## CHAPITRE 14

### ENHANCEMENT OF ANTINEOPLASTIC ACTION OF 5'-AZA-2'-DEOXYCYTIDINE BY ZEBULARINE ON L1210 LEUKEMIA

#### 14.1 CONTRIBUTION DES AUTEURS

Maryse Lemaire a réalisé les essais clonogéniques, les expériences de biologie moléculaire, la chimiothérapie *in vivo* sur le modèle L1210, a participé au design de l'étude et a rédigé l'article.

Louise F. Momparler a réalisé la chimiothérapie *in vivo* sur le modèle L1210 en collaboration avec ML.

Mark L. Bernstein a évalué les résultats et a participé à la rédaction de l'article.

Victor E. Marquez a permis l'obtention d'un agent chimiothérapeutique utilisé et a participé à la correction de l'article.

Richard L. Momparler a conçu et coordonné l'étude et a participé à la rédaction de l'article.

L'éditeur (*Anti-Cancer Drugs*) et tous les auteurs sont en accord avec la publication de cet article dans cette thèse ; les formulaires d'approbation sont présentés à l'annexe 5.

## 14.2 RÉSUMÉ FRANÇAIS DE L'ARTICLE

### ***POTENTIALISATION DES L'EFFET ANTINÉOPLASIQUE DE LA 5-AZA-2'- DÉSOXYCYTIDINE PAR LE ZEBULARINE SUR LES CELLULES LEUCÉMIQUES L1210***

Les gènes suppresseurs de tumeurs (TSGs) réprimés par la présence de méthylations dans l'ADN, sont des cibles thérapeutiques potentielles pour de nouveaux agents chimiothérapeutiques. Les inhibiteurs de la méthylation de l'ADN, telle la 5-aza-2'-désoxycytidine (5-AZA-CdR, Decitabine), peuvent induire la ré-expression de ces TSGs. La 5-Aza-CdR est cependant rapidement inactivée *in vivo* par la cytidine désaminase (CD), ce qui limite son potentiel d'action anti-leucémique. La co-administration de la 5-Aza-CdR avec un inhibiteur de la CD, tel que le zebularine (Zeb), permettrait de diminuer sa dégradation. De plus, Zeb est aussi un inhibiteur de la méthylation de l'ADN, ce qui lui confère une activité antinéoplasique intrinsèque. La combinaison de la 5-AZA-CdR et du Zeb a produit une meilleure inhibition de croissance cellulaire sur les cellules leucémiques lymphoïdes murines L1210 que chacun des agents seuls. Aussi, la combinaison de ces deux agents a inhibé la formation de clones plus efficacement que la somme de l'action de chaque agent seul, et ce, sur les lignées leucémiques murines L1210 et humaines HL-60. La co-administration a de plus permis une ré-expression synergique du TSG p57KIP2 dans les cellules HL-60. Un essai de "méthylation-specific PCR" a montré que cette ré-activation génique est associée à une diminution significativement plus importante du taux de méthylation qu'avec chaque agent seul. Au surplus, trois différents protocoles d'administration évalués sur le modèle leucémique murine L1210 ont montré que l'activité de cette combinaison engendre une augmentation significative du taux de survie des souris par rapport aux agents seuls. Toutes ces observations justifient l'évaluation de la co-administration de la 5-Aza-CdR et du Zeb dans le traitement de patients atteints de leucémie. Les mécanismes d'action impliqués réfèrent probablement en partie à la capacité du Zeb à inhiber la CD, et aussi à l'inhibition de la méthylation de l'ADN complémentaire induite par les deux agents.

### 14.3 PRÉSENTATION DE L'ARTICLE

#### ***ENHANCEMENT OF ANTINEOPLASTIC ACTION OF 5'-AZA-2'- DEOXYCYTIDINE BY ZEBULARINE ON L1210 LEUKEMIA***

**Maryse Lemaire<sup>a</sup>**, Louise F. Momparler<sup>a</sup>, Mark L. Bernstein<sup>b</sup>, Victor E. Marquez<sup>c</sup>,  
Richard L. Momparler<sup>a, b</sup>

<sup>a</sup>Département de Pharmacologie, Université de Montréal, Centre de recherche pédiatrique; <sup>b</sup>Service d'hématologie-oncologie, Hôpital Sainte-Justine, 3175 Côte Sainte-Catherine, Montréal, Québec, H3T 1C5, Canada;

<sup>c</sup>Laboratory of Medicinal Chemistry, Center for Cancer Research, National Cancer Institute, NIH, Fredrick, MD 21701, USA.

\*This study was supported by grants from National Cancer Institute of Canada and The Leukemia & Lymphoma Society (U.S.A.). M.L. is supported by a studentship from the Fonds de la recherche en santé du Québec.

*Running title: 5-AZA-CdR and Zebularine in therapy of leukemia*

## ABSTRACT

Tumor suppressor genes that have been silenced by aberrant DNA methylation are potential targets for reactivation by novel chemotherapeutic agents. The potent inhibitor of DNA methylation and antileukemic agent, 5-aza-2'-deoxycytidine (5-AZA-CdR, Decitabine), can reactivate silent tumor suppressor genes. One hindrance to the curative potential of 5-AZA-CdR is its rapid *in vivo* inactivation by cytidine deaminase (CD). An approach to overcome this obstacle is to use 5-AZA-CdR in combination with zebularine (Zeb), a potent inhibitor of CD. Zeb also possesses independent antineoplastic activity due to its inhibition of DNA methylation. We tested the capacity of 5-AZA-CdR and Zeb alone and in combination to inhibit growth and colony formation of different leukemic cell lines. 5-AZA-CdR and Zeb in combination produced a greater inhibition of growth against murine L1210 lymphoid leukemic cells, and a greater reduction in colony formation by L1210 and human HL-60 myeloid leukemic cells, than either agent alone. The ability of these agents to reactivate the tumor suppressor gene, p57KIP2, was also tested using RT-PCR. The combination produced a synergistic reactivation of p57KIP2 in HL-60 leukemic cells. A methylation-specific PCR assay showed that this combination also induced a significantly greater demethylation level of the p57KIP2 promoter than either drug alone. The *in vivo* antineoplastic activity of the agents was evaluated in mice with L1210 leukemia. A greater increase in survival time of mice with L1210 leukemia was observed with the combination than with either agent alone using three different dose schedules. The enhanced activity observed with 5-AZA-CdR plus Zeb in both murine and human leukemic cells lines provides a rationale for the clinical investigation of these drugs in patients with advanced leukemia. The probable mechanism of this drug interaction involves inhibition of CD by Zeb and the complementary inhibition of DNA methylation by both agents.

*Keywords:* 5-aza-2'-deoxycytidine, chemotherapy, cytidine deaminase, DNA methylation, leukemia, p57KIP2 expression, zebularine

## INTRODUCTION

Aberrant DNA methylation in the promoter region has been shown to silence the expression of many genes that suppress the development of neoplasia [1]. The genes that are silenced by this epigenetic event are involved in all the major steps of cancer formation [2]. These silent cancer-related genes provide interesting targets for chemotherapeutic intervention by agents that can reverse this epigenetic change [3].

5-Aza-2'-deoxycytidine (5-AZA-CdR, Decitabine), a potent inhibitor of DNA methylation, has been reported to reactivate many of these silent genes in neoplastic cell lines [3]. 5-AZA-CdR is a pro-drug that requires conversion to its active phosphorylated form by deoxycytidine kinase [4, 5] (Fig. 1). Phosphorylated 5-AZA-CdR is rapidly incorporated into DNA where it inhibits DNA methylation [6] after forming a covalent bond with DNA methyltransferase [7]. Cytidine deaminase (CD) is also a key enzyme in the metabolism of 5-AZA-CdR [8] (Fig. 1), since deamination of 5-AZA-CdR results in complete loss of its antineoplastic activity [9].

In preclinical studies, we observed that 5-AZA-CdR is a very potent antileukemic agent in the mouse model [10] and that its antileukemic activity correlated well with the extent of inhibition of DNA methylation [11]. These studies led us to initiate clinical trials in patients with advanced leukemia. We observed that intensive therapy of 5-AZA-CdR of 2–3 days duration could induce complete remissions in some patients with advanced leukemia [12]. However, the duration of remission was short. In one patient that relapsed after 5-AZA-CdR therapy, we detected an increase in CD activity [13], a sign of drug resistance.

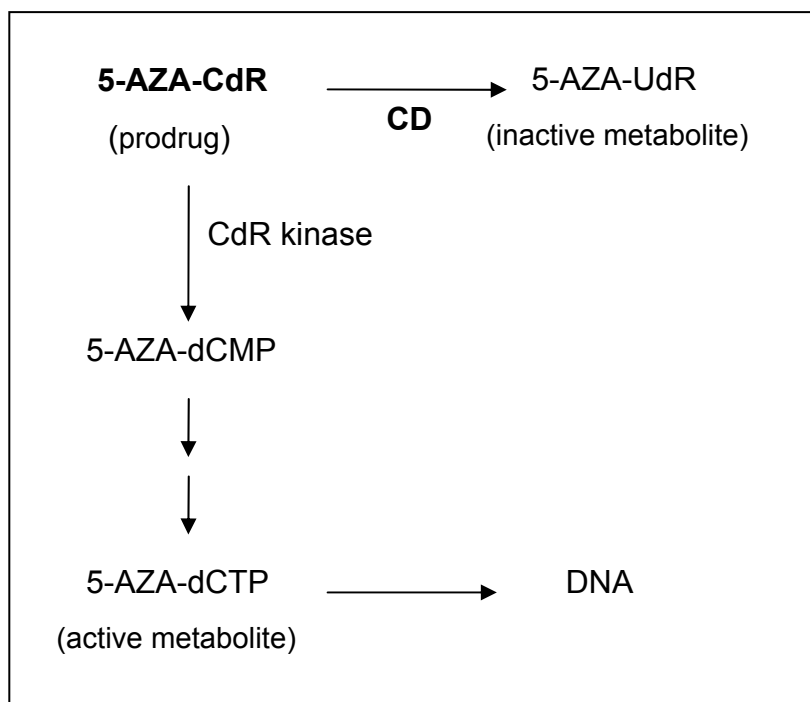
Recently, low-dose therapy for 10 days duration with 5-AZA-CdR was shown to produce good responses in patients with advanced leukemia [14]. This analog also showed effectiveness in patients with the pre-leukemic disease, myelodysplastic syndrome [15]. However, the optimal schedule for 5-AZA-CdR still remains to be determined. One potential obstacle for curative therapy with 5-AZA-CdR therapy is

the presence of very high levels of CD in human liver and spleen [16]. These organs may act as ‘biochemical sanctuaries’ for leukemic cells by reducing the concentration of 5-AZA-CdR to levels below its minimal cytotoxic range due to rapid inactivation by CD [17].

One approach to overcome this problem is to administer an inhibitor of CD along with 5-AZA-CdR. Zebularine (Zeb) is a potent inhibitor of CD [18, 19] capable of blocking the deamination of 5-AZA-CdR [20]. Zeb has been recently shown to have independent antineoplastic activity due to its inhibition of DNA methyltransferase [21–23]. In tumor cells, this CD inhibitor was shown to reactivate the expression of the tumor suppressor gene, p16CDKN2A [22, 23]. Due to its chemical stability, Zeb can be administered orally [24, 25], a major advantage for clinical use. These characteristics of Zeb make it an interesting agent to investigate in combination with 5-AZA-CdR.

In this report, we observed that Zeb produced an enhancement of the *in vitro* and *in vivo* antileukemic activity of 5-AZA-CdR. In addition, we observed that the combination produced an enhanced reactivation of the expression of the tumor suppressor gene p57KIP2 and a significant demethylation of its promoter. This gene, a cyclin-dependent kinase inhibitor, is frequently silenced by aberrant DNA methylation in leukemia [26, 27]. A preliminary report of this work has been published in abstract form [28].





**Figure 14-1. Metabolism of 5-AZA-CdR.** 5-AZA-CdR must be phosphorylated to 5-AZA-dCTP by deoxycytidine (CdR) kinase prior to incorporation into the DNA. The rate-limiting step in these reactions is the formation of 5-AZA-dCMP by CdR kinase. 5-AZA-CdR is deaminated by CD to 5-aza-20-deoxyuridine (5-AZA-UdR), which is completely inactive.

## MATERIALS AND METHODS

**Cell line.** The mouse lymphocytic leukemia cell line L1210 was obtained from Dr T. Khwaja (University of Southern California, Los Angeles). Cells were maintained at 37°C with 5% CO<sub>2</sub> in RPMI 1640 medium (Life Technologies, Burlington, Ontario) with 5% heat-inactivated fetal calf serum (WISENT, St-Bruno, Quebec) and with 6 µM of 2-mercaptoethanol. The doubling time of the L1210 cells was 10–12 h. The human myeloid leukemia cell line HL-60 was obtained from ATCC (Manassas, VA). HL-60 cells were maintained at 37°C with 5% CO<sub>2</sub> in RPMI-1640 medium with 10% heat-inactivated fetal calf serum. The doubling time of HL-60 cells was approximately 20 h.

**Chemicals.** 5-AZA-CdR (FW 228,2) and Zeb (FW 228,2) were obtained from Pharmachemie (Haarlem, Netherlands) and the Laboratory of Medicinal Chemistry at the NCI, respectively. 5-AZA-CdR was dissolved in sterile PBS and stored at –70°C to prevent decomposition. Zeb was dissolved in PBS for *in vitro* assays and in water for the *in vivo* assay.

**Inhibition of growth and clonogenic assay.** A 5-ml aliquot of L1210 or HL-60 cells in log-phase growth at a density of  $1 \times 10^4$  cells/ml was placed in 25-cm<sup>2</sup> tissue culture flasks. The indicated concentrations of 5-AZA-CdR and/or Zeb were added. 5-AZA-CdR was added every 24 h. The flasks were incubated at 37°C and at 48 h an aliquot was removed for counting with a Model Z Coulter Counter. For the clonogenic assay, the drugs were removed by centrifugation and the cells were suspended in drug-free medium. An aliquot of 100 cells was placed in 2 ml of 0.3% soft agar RPMI 1640 medium containing 10% serum for L1210, and 20% serum for HL-60. After 10 days of incubation, the number of colonies (more than 200 cells) was counted. The cloning efficiency in soft agar of the cells without drug treatment was in the range of 50–60%.

**Animals.** BALB/c x DBA/2 (hereafter called CD2F<sub>1</sub>) male mice (24–28 g) were obtained from Taconic Biotechnology (Germantown, NY). Mice were acclimatized to housing conditions for at least 2 weeks before experiments. They received food and water *ad libitum*. The animal committee approved the experimental protocol and animals were handled in accordance with institutional guidelines.

**Transplantation and therapy of L1210 leukemia in mice.** Transplantation of L1210 leukemic cells was performed by weekly i.p. injections of  $1 \times 10^4$  cells in 0.1ml of RPMI 1640 medium into CD2F<sub>1</sub> mice. Seven days later, the ascitic fluid was obtained from the mice and a cell count of the leukemic cells was performed with a hemocytometer prior to the subsequent transplantation. The mice were divided in four groups: control, 5-AZA-CdR, Zeb and 5-AZA-CdR+Zeb. The mice were injected i.v. with 0.1ml of L1210 cells ( $1 \times 10^4$ ) [29]. Both drugs were sterilized by 0.2  $\mu$ m filtration. The dose schedules for 5-AZA-CdR and Zeb is described in the legend of Table 2. For Schedule C, a Harvard infusion pump was used at a flow rate of 0.22 ml/h via a 25-gauge needle into the lateral tail vein. Mice were placed in a restrainer cage during drug treatment with access to food. Toxicity was evaluated by body weight loss as described previously [29]. The survival time of each group of mice was monitored and the increase in life span (ILS) calculated. Leukemic mice that survived more than 55 days after drug treatment were classified as long-term survivors.

**Isolation of RNA and RT-PCR analysis.** In order to study the reactivation of the p57KIP2 gene, HL-60 leukemic cells were treated with 5-AZA-CdR (25 and 50 ng/ml) and Zeb (100 ng/ml), alone or in combination, for 48 h. Cells were harvested 24 h after removal of the drugs. Total RNA was isolated using Rneasy Mini Kit (Qiagen, Mississauga, Ontario, CA). For cDNA synthesis, total RNA was reverse-transcribed in a reaction mixture using Omniscript Reverse Transcriptase kit (Qiagen). The reaction was performed at 37°C for 60 min followed by 5 min at 93°C to inactivate the enzyme. PCR amplifications were performed using HotStar Taq Polymerase (Qiagen) and specific primers spanning different exons for human 18S ribosomal RNA and p57KIP2. The 18S RNA (GenBank accession number X03205)

was amplified as an internal control using as sense primer 5'-TCG ATG GTA GTC GCC GTG CCT A-3' and antisense primer 5'-CTG CTG CCT TCC TTG GAT GTG GTA-3'. The length of the PCR product of 18S cDNA was 110 bp. For p57KIP2 (GenBank accession number NM\_000076), the primers were sense 5'-AGG AGC CTC TCG CTG ACC A-3' and antisense 5'-ATC GCC CGA CGA CTT CTC A-3'. The length of the PCR product of p57KIP2 was 167 bp. Samples were amplified in a Whatman Biometra T gradient thermocycler (Göttingen, Germany) under the following conditions. For 18S and p57KIP2, the PCR conditions were 15 min at 95°C to activate Taq polymerase, denaturation at 94°C for 45 s, annealing at 60°C (18S) or 62°C (p57KIP2) for 30 s and extension at 72°C for 30 s, for 5 cycles. Then the annealing temperature was lowered by 2°C for an additional 10–15 cycles (18S) or for an additional 37–40 cycles (p57KIP2). For each gene, the number of cycles was terminated during the exponential phase of DNA amplification. The PCR products were electrophoresed on 2% agarose gel and detected by ethidium bromide staining. For quantitative detection of gene expression, we used the 18S as the reference standard to normalize the data. The amount of cDNA from the drug-treated samples that would amplify the identical amount of 18S DNA during the exponential phase for each sample was determined. The concentration of the amplified DNA was determined by Agilent 2100 Bioanalyzer (Palo Alto, CA). This instrument uses a very sensitive capillary electrophoresis and fluorescent detection to measure the concentration and size of DNA from a sample size of only 1 µl.

***Isolation of DNA and bisulfite treatment.*** In order to study the methylation status of the promoter of the p57KIP2 gene, HL-60 leukemic cells were treated with 5-AZA-CdR (25 and 50 ng/ml) and Zeb (100 ng/ml), alone or in combination, for 48 h. Cells were harvested 24 h after removal of the drugs. Genomic DNA was isolated using Dneasy Tissue Kit (Qiagen). Genomic DNA was then treated with bisulfite [30]. This bisulfite treatment converts unmethylated cytosine residues to uracil, whereas 5-methylcytosine residues remain unchanged. Briefly, 1.5 µg of DNA was diluted in 20 µl of water and then denatured at 37°C for 30 min in 0.3M NaOH followed by the addition of 278 µl of bisulfite (3.7 M) and 2 µl of 100mM hydroquinone. The tubes

were flushed with nitrogen gas to remove oxygen followed by an incubation period of 15 h at 50°C. Samples were diluted with water and transferred in a Microcon YM-100 filter (Millipore Amicon, Bedford, MA) to collect purified bisulfite-treated DNA.

***Analysis of DNA methylation by the methylation-specific PCR (MSP) assay.*** The MSP assay [31] allows us to distinguished methylated from unmethylated DNA, using specific primers for p57KIP2. PCR amplifications were performed using HotStar Taq Polymerase (Qiagen) and specific primers for unmethylated DNA (MSP-U, 5'-TTT GTT TTG TGG TTG TTA ATT AGT TGT-3' [26] and MSP-A, 5'-AAA-CAC-AAC-ACA-CTT-AAC-CTA-TAA-AAC 3'). The length of the PCR product was 272 bp. For methylated DNA (MSP-M, 5'-CGC-GGT-CGT-TAA-TTA-GTC-GC- 3' [26] and MSP-A), the length of the PCR product was 265 bp. Samples were amplified under the following conditions: 5 min at 95°C to activate Taq polymerase, denaturation at 94°C for 45 s, annealing at 57°C (unmethylated) or 62°C (methylated) for 30 s and extension at 72°C for 30 s, for 5 cycles. Then the annealing temperature was lowered by 2°C for an additional 35 cycles. The number of cycles was terminated during the exponential phase of DNA amplification. The PCR products were electrophoresed on 2% agarose gel and detected by ethidium bromide staining. The concentration of the amplified DNA was determined using an Agilent 2100 Bioanalyzer. For quantitation of the MSP reaction we determined the ratio of methylated / unmethylated DNA from the concentration obtained by Bioanalyzer analysis.

***Statistical considerations.*** In order to evaluate whether the variations between groups were random, one-way ANOVA testing was performed. The p value was evaluated accordingly to Tukey's method. A value  $p < 0.05$  was taken to indicate statistical significance. The data correspond to the mean values  $\pm$  SD for  $n \geq 4$ . Valeriote and Lin's method [32, 33] was used to determine if the interaction observed between drugs in the clonogenic assays was additive, synergistic or antagonistic.

## RESULTS

***Effect of 5-AZA-CdR and Zeb on the growth of L1210 leukemic and HL-60 cells.*** The concentration of 5-AZA-CdR that produced 40% inhibition of growth after a 48-h exposure was in the range of 1 ng/ml for L1210 leukemic cells (Fig. 2A) and 1000 ng/ml for HL-60 leukemic cells (Fig. 2C). Under these conditions Zeb (1000 ng/ml) was a weak inhibitor of growth, producing less than 30% inhibition in both cell lines. The combination of these agents produced a greater inhibition of growth of L1210 cells than either agent alone, which was apparent at longer exposure times. At 48 h (Fig. 2B), 5-AZA-CdR (1 ng/ml) produced 43.7% inhibition and Zeb (100 ng/ml) produced 6.5% inhibition, whereas the combination produced 60% inhibition ( $p < 0.01$ ). The co-incubation of both drugs on HL-60 did not produce significant inhibition of growth than either drug alone ( $p > 0.05$ ).

***Effect of 5-AZA-CdR and Zeb on colony formation of L1210 and HL-60 leukemic cells.*** In order to determine if a similar interaction can be demonstrated in a clonogenic assay, L1210 and HL-60 cells were exposed to a 48-h treatment with different concentrations of 5-AZA-CdR and Zeb (Table 1). The concentrations of 5-AZA-CdR that gave about 40% inhibition of growth (1 ng/ml for L1210 and 10 ng/ml for HL-60) were used to evaluate the efficacy of the combination with 100 ng/ml of Zeb (a concentration that, as a single agent, results in an approximate 10% inhibition of growth in both cell lines). For a 48-h exposure, 5-AZACdR plus Zeb produced a significantly greater loss of clonogenicity (Fig. 3) than either drug alone ( $p < 0.05$  for L1210;  $p < 0.01$  for HL-60).

***Effect of 5-AZA-CdR and Zeb on survival time of mice with L1210 leukemia.*** In order to have an anatomical distribution of the leukemic cells similar to the human disease, the mice received an i.v. injection of  $1 \times 10^4$  L1210 leukemic cells on day 1. The survival time of mice is directly proportional to the number of L1210 cells injected i.v. [29]. Chemotherapy was started on day 2, considered akin to an early leukemia. Three different schedules were evaluated (Table 2). As shown in

Table 2, the mice received an i.p. injections of 5-AZA-CdR (1 mg/kg for Schedule A or 1.25 mg/kg for Schedule B) every 4 h for a total of five injections and/or an i.p. injection of Zeb. In Schedule A, Zeb (20 mg/kg) was administrated at the same time as the fourth injection of 5-AZA-CdR. In Schedule B, the mice received an i.p. injection of Zeb (10 mg/kg) every 4 h for a total of five injections (50 mg/ kg total dose). The effects of these drugs on survival time of CD2F1 mice with L1210 leukemia, the ILS and the number of long-term survivors (more than 55 days) were determined for each group.

For Schedule A, the combination produced a significantly greater ILS (244%) as compared to 5-AZA-CdR alone (156% ILS) or Zeb alone (7% ILS) ( $p < 0.05$ ). One mouse treated with the combination survived more than 55 days. According to the method of Valeriote and Lin [32, 33], the interaction of the drugs combination was defined as synergistic. In Schedule B, the combination produced a greater antileukemic effect with three out of 12 mice surviving more than 55 days, whereas none of those treated with 5-AZA-CdR alone survived more than 29 days.

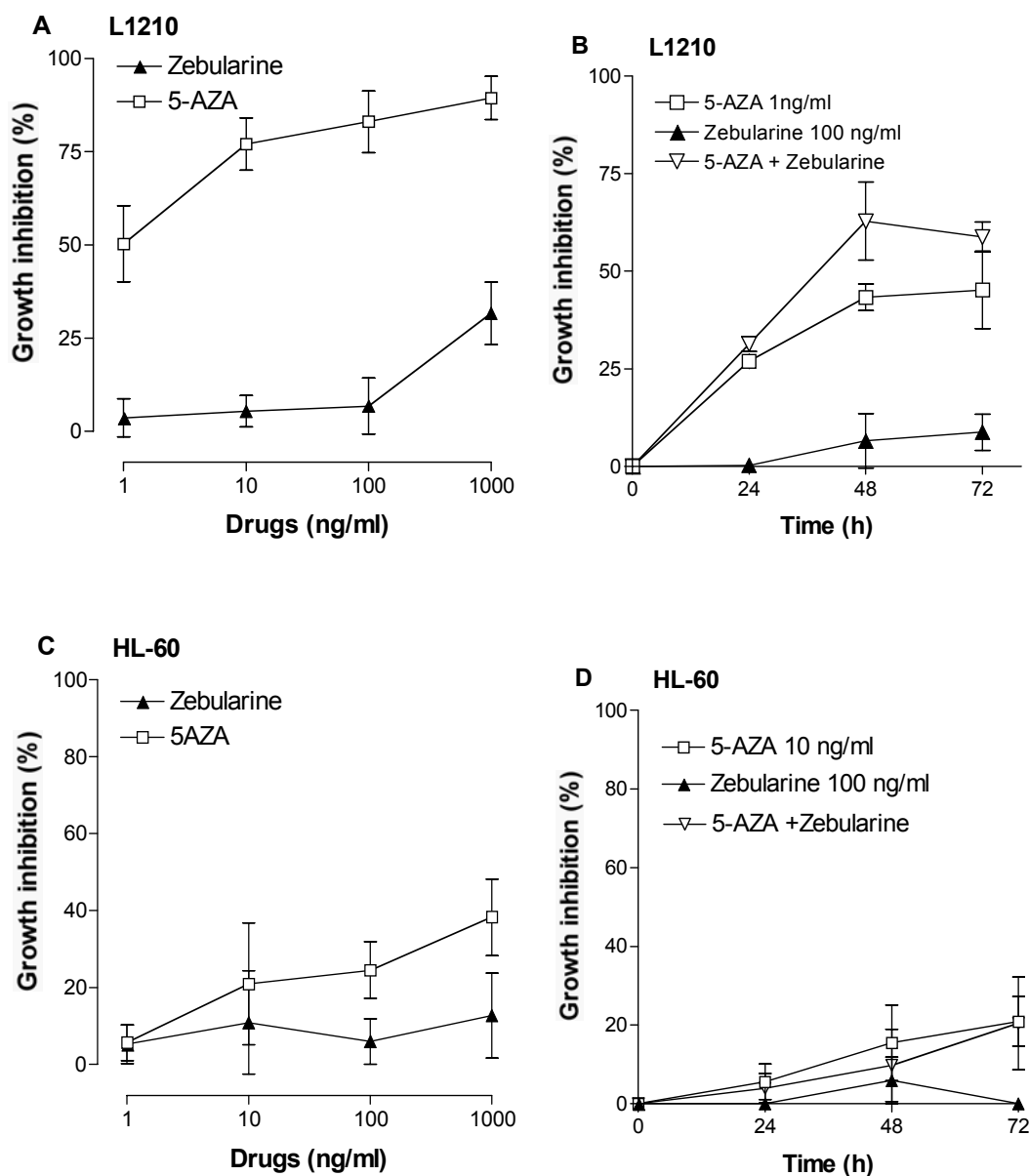
For the Schedule C, the mice received a continuous 15-h i.v. infusion of 5-AZA-CdR (7 mg/kg) and/or Zeb (25 mg/ kg). The combination produced a significantly greater ILS (267%) as compared to 5-AZA-CdR alone (146% ILS) or Zeb alone (1.3% ILS) ( $p < 0.05$ ). According to the method of Valeriote and Lin [32, 33], the interaction of the drugs combination was defined as synergistic. One mouse treated with 5-AZA-CdR alone survived more than 55 days. The toxicity produced by the combination was minimal for all three regimens (less than 3% loss in body weight).

***Effect of 5-AZA-CdR and Zeb on expression of p57KIP2.*** In order to evaluate the potential of the 5-AZA-CdR and Zeb combination in reactivating a gene that is silenced by epigenetic events in HL-60 leukemic cells, we investigated the effect of this combination on the activation of the tumor suppressor gene, p57KIP2, which is reported to be silenced in human leukemia [26, 27]. Using RT-PCR, we

observed a synergistic reactivation of p57KIP2 by 5-AZA-CdR plus Zeb as compared to either drug alone (Fig. 4).

***Effect of 5-AZA-CdR and Zeb on the methylation status of the promoter of p57KIP2.*** In order to study the methylation status of the promoter of the p57KIP2 gene, HL-60 leukemic cells were treated with different concentrations of 5-AZA-CdR (25 and 50 ng/ml) and/or Zeb (100 ng/ml). Using MSP assay, we observed that the combination of 5-AZA-CdR (25 ng/ml) and Zeb produced a greater promoter demethylation than either drugs alone ( $p < 0.05$ ) (Fig. 5). 5-AZA-CdR (25 ng/ml) decreased the methylation level of the promoter of 54% compare to untreated cells. Zeb has no effect on this promoter methylation level, even at concentration up to 1000 ng/ml (data not shown). Values are not significant for 5-AZA-CdR 50 ng/ml, since this concentration demethylates around 80% of the promoter ( $p > 0.05$ ). We were able to demethylated almost completely (more than 95%) the gene promoter with 5-AZA-CdR 1000 ng/ml (data not shown).





**Figure 14-2. Effect of 5-AZA-CdR and/or Zeb on growth of L1210 or HL-60 leukemic cells.** L1210 (A) or HL-60 (C) leukemic cells were treated with the indicated concentration of drugs and the growth inhibition (%) relative to control cells without treatment was evaluated by cell count. Data shown are mean values  $\pm$  SD,  $n \geq 4$ . (B) 5-AZA-CdR and Zeb in combination produced a significantly greater growth inhibition than either drug alone ( $p < 0.01$ ). (D) 5-AZA-CdR and Zeb in combination does not produce a significantly greater growth inhibition than either drug alone ( $p > 0.05$ ).

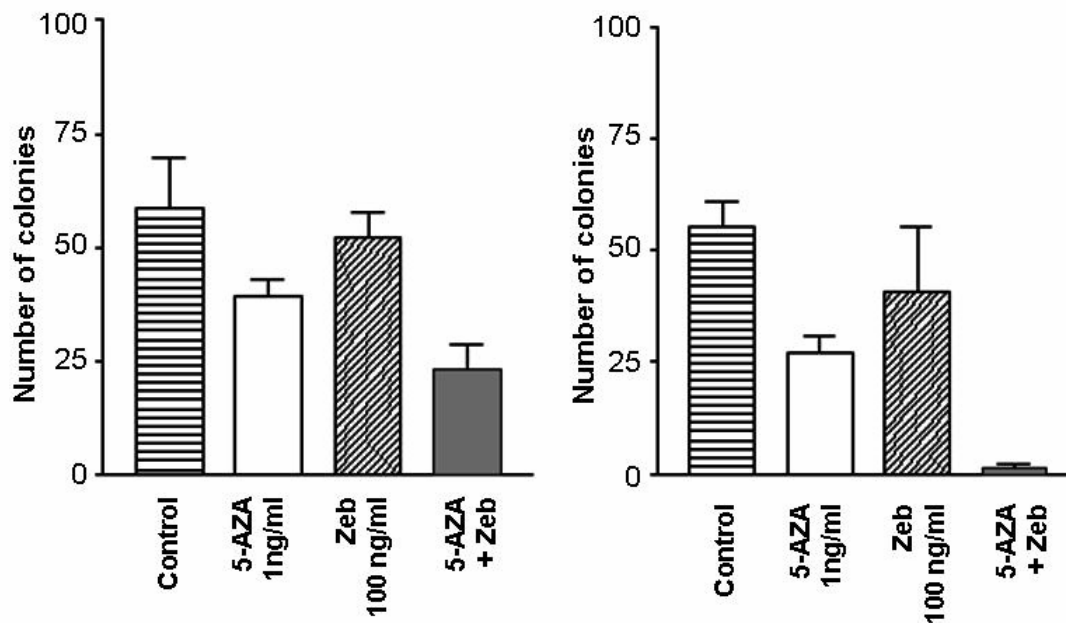
Table 14-1.

Effect of 5-AZA-CdR or Zeb on loss of clonogenicity on L1210 and HL-60 leukemic cells

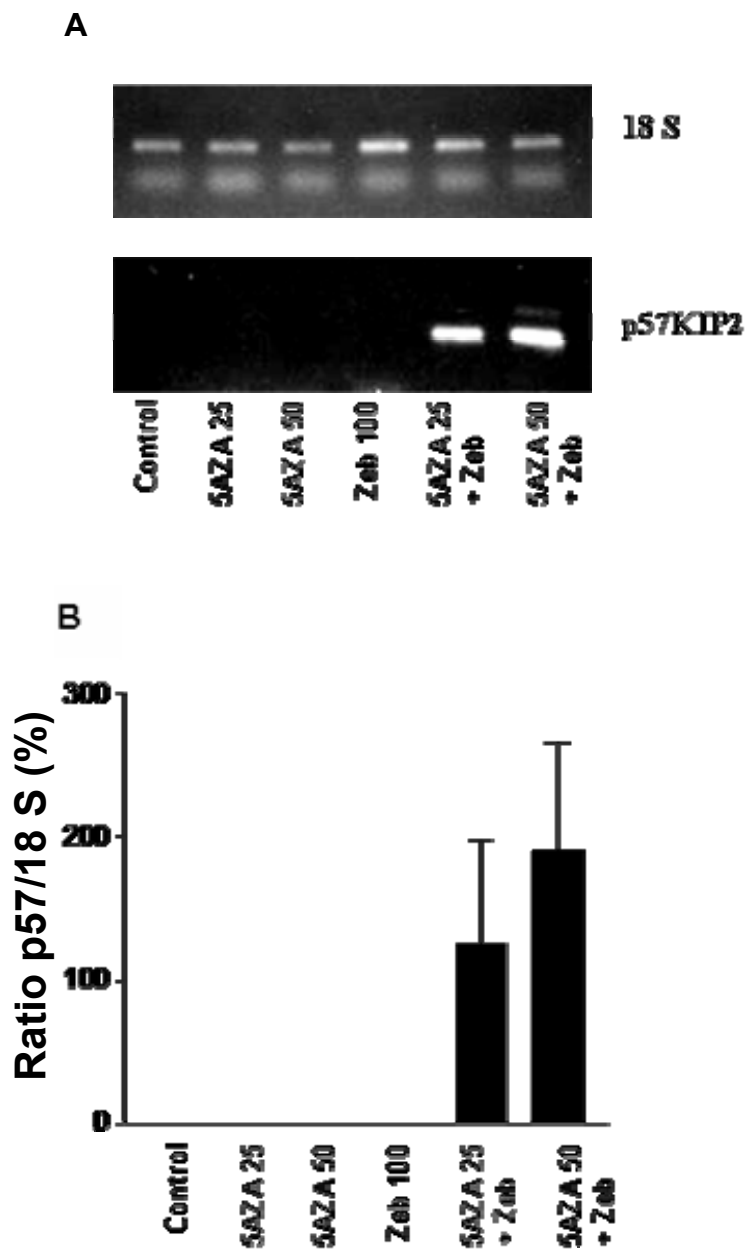
Concentration Drug (ng/ml)	<u>L1210</u>		<u>HL-60</u>	
	Number of colonies	Loss of clonogenicity (%)	Number of colonies	Loss of clonogenicity (%)
<b>5-AZA-CdR</b>				
0	58.6 ± 11.0 <sup>a</sup>	---	55.2 ± 6.1 <sup>a</sup>	---
1	39.5 ± 3.8	32.6	46.0 ± 4.1	16.7
10	0.8 ± 0.8	>98	27.0 ± 3.6	51.1
100	0	100	0.3 ± 0.5	>99
1000	0	100	0	100
<b>Zebularine</b>				
0	58.6 ± 11.0	---	55.2 ± 6.1	---
1	55.3 ± 9.9	5.6	46.8 ± 9.6	15.2
10	45.0 ± 4.5	23.2	38.2 ± 16.3	30.8
100	52.1 ± 5.8	11.0	40.5 ± 14.7	26.6
1000	50.3 ± 5.4	14.2	27.7 ± 12.3	49.8

L1210 and HL-60 leukemic cells were exposed to the indicated concentrations of 5-AZA-CdR or zebularine for 48 h. The number of colonies (greater than 200 cells) was determined on day 10 for L1210 cells and on day 15 for HL-60 cells. Loss of clonogenicity is relative to control cells without treatment.

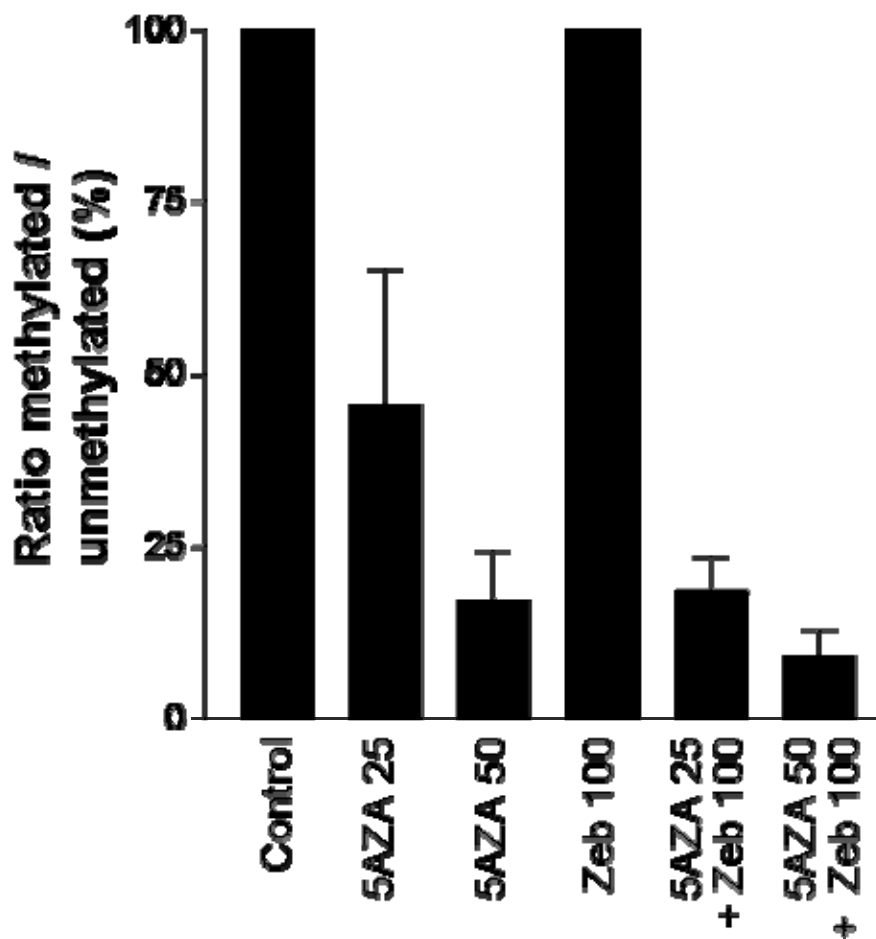
<sup>a</sup> Mean values ± S.D. n ≥ 4.



**Figure 14-3. Effect of 5-AZA-CdR (5-AZA) and/or Zeb on loss of clonogenicity of L1210 and HL-60 leukemic cells.** Cells were treated with the indicated concentration of drugs for 48 h and cell survival determined by colony count. Data shown are mean values $\pm$ SD, nZ4. 5-AZA-CdR and Zeb in combination produced a significantly greater loss in clonogenicity than either drug alone ( $p < 0.05$  for L1210;  $p < 0.01$  for HL-60).



**Figure 14-4.** Effect of 5-AZA-CdR (5-AZA) and Zeb alone or in combination on the expression of the p57KIP2 gene in HL-60 leukemic cells. HL-60 cells were treated with the indicated concentrations of 5-AZA-CdR and/or Zeb for 48 h. Total RNA was isolated at 72 h, 18 S ribosomal RNA gene and p57KIP2 gene expression analyzed by RT-PCR (A). The amount of cDNA amplified during the exponential phase of PCR was analyzed by quantification of amplified DNA (B) by an Agilent 2100 Bioanalyzer ( $p < 0.05$ ). Data are mean values  $\pm$  SD,  $n \geq 4$ . Control = cells with no drug treatment.



**Figure 14-5. Effect of 5-AZA-CdR (5AZA) and Zeb alone or in combination on the methylation status of the promoter of the p57KIP2 gene in HL-60 leukemic cells.** HL-60 cells were treated with the indicated concentrations of 5AZA-CdR and/or Zeb for 48 h. Genomic DNA was isolated at 72 h, treated with bisulfite and a MSP assay was performed. The amount of DNA amplified during the exponential phase of PCR was analyzed by quantification of amplified DNA by an Agilent 2100 Bioanalyzer ( $p < 0.05$ ). Data are mean values  $\pm$ SD,  $n \geq 4$ . Control=cells with no drug treatment.

Table 14-2.

**Effect of different dose schedules of 5-AZA-CdR and/or Zeb on survival time of CD2F1 mice with L1210 leukemia**

<b>Drug</b>	<b>Total dose (mg/kg)</b>	<b>Mean survival time (days)<sup>a</sup></b>	<b>ILS (%)</b>	<b>&gt;55-day survivors</b>	<b>Weight loss (%)</b>
<b>Schedule A</b>					
control	0	7.8± 0.5	0	0/10	---
5-AZA	5	19.9 ± 2.5	156	0/10	< 3
Zeb	20	8.3± 0.6	7	0/7	< 1
5-AZA+ Zeb	5 + 20	26.8 ± 2.1 <sup>b</sup>	244 <sup>b</sup>	1/7	< 3
<b>Schedule B</b>					
control	0	7.7± 0.4	---	0/10	---
5-AZA	6.25	24.6 ± 3.8	219	0/10	< 3
Zeb	50	7.8± 0.4	2	0/11	< 1
5-AZA+ Zeb	6.25 + 50	25.8 ± 3.6 <sup>b</sup>	235 <sup>b</sup>	3/12	< 2
<b>Schedule C</b>					
control	0	7.9± 0.1		0/5	---
5-AZA	7	19.4 ± 4.3	146 <sup>b</sup>	1/5	< 3
Zeb	25	8.0± 0.4	1.3	0/5	< 1
5-AZA+ Zeb	7 + 25	29.0 ± 7.8	267	0/5	< 3

Mice were injected i.v. with 104 L1210 cells on day 1. Chemotherapy was started on day 2. For Schedule A, the mice received i.p. injections of 5-AZA-CdR (1mg/kg) every 4 h for a total of five injections. The last group received an injection of Zeb (20 mg/kg) with the fourth injection of 5-AZA-CdR. For Schedule B, the mice received i.p. injections of 5-AZA-CdR (1.25 mg/kg) and/or of Zeb (10 mg/kg) every 4 h for a total of five injections. For Schedule C, the mice received a 15-h i.v. infusion of 5-AZA-CdR (total dose 7 mg/kg) and/or Zeb (total dose 25 mg/kg). Weight loss was determined every 7 days.

<sup>a</sup>Mean values ± SD; <sup>b</sup>Value does not include > 55-day survivors.

## DISCUSSION

Recent clinical studies of 5-AZA-CdR indicate that this potent inhibitor of DNA methylation has promising activity against hematological malignancies [14, 15]. However, the curative potential of 5-AZA-CdR for the therapy of leukemia may be limited by its rapid *in vivo* inactivation by CD. In this study we have investigated the possibility of enhancing the antileukemic activity of 5-AZA-CdR by using it in combination with Zeb, a potent inhibitor of CD. An additional advantage in using Zeb is that this drug is also an inhibitor of DNA methylation [21–23], which may additionally enhance or complement the antineoplastic action of 5-AZA-CdR.

We investigated the growth inhibitory activity of 5-AZACdR and Zeb alone and in combination on murine L1210 lymphoid leukemic cells (Fig. 2). 5-AZA-CdR was a more potent inhibitor of growth than Zeb (Fig. 2A). The combination of these agents produced greater inhibition than either agent alone (Fig. 2B). In the clonogenic assay, the combination also produced a greater reduction in colony formation by L1210 or HL-60 leukemic cells than either 5-AZA-CdR or Zeb alone (Fig. 3). The enhancement of the antineoplastic activity of 5-AZA-CdR by Zeb was much greater against HL-60 leukemic cells as compared to the L1210 leukemic cells. Perhaps this was due in part to the induction of CD in HL-60 leukemic cells following treatment with 5-AZA-CdR, as we have previously reported [34].

The molecular mechanism responsible for the antineoplastic action of 5-AZA-CdR is probably related to its reactivation of tumor suppressor genes that are silenced by DNA methylation [1–3]. In order to determine if Zeb could influence this event, we investigated its effects, alone and in combination with 5-AZA-CdR, on the activation of p57KIP2 [26, 27] and on its promoter methylation status. p57KIP2 is a negative regulator of cellular proliferation reported to be inactivated frequently by aberrant DNA methylation in leukemia. We observed that 5-AZA-CdR in combination with Zeb produced a synergistic reactivation of p57KIP2 in HL-60 leukemic cells (Fig. 4). This combination also produced a significant greater

demethylation of the p57KIP2 promoter than either drug alone as demonstrated by MSP analysis (Fig. 5). In both these analyses Zeb alone did not produce a significant effect suggesting that its interaction with 5-AZA-CdR was primarily due to its inhibition of CD. However, further experimentation is required to clarify this hypothesis.

In order to facilitate the translation of the *in vitro* data into a clinical trial, it is important to confirm drug interactions in an *in vivo* model as the CD present in host cells can influence the response to chemotherapy. Mice were inoculated i.v. with L1210 leukemic cells and 24 h later injected i.p. (Table 2, Schedule A and B) or i.v. (Table 2, Schedule C) with 5-AZA-CdR, Zeb or with a combination of both these agents. In this model, if only one leukemic cell survives chemotherapy, the mice will die from leukemia. In addition, there is an excellent correlation between the number of surviving leukemic cells and the survival time of the mice [29]. In all regimens, Zeb produced a very weak antileukemic effect as compared to 5-AZA-CdR. However, the combination showed a more potent antileukemic effect than either agent alone for the three different schedules. From a total of 24 mice, four mice treated with the combination survived more than 55 days, which in this model is classified as long-term survivors. The mouse model of leukemia confirms our *in vitro* data, which showed that Zeb enhanced the antineoplastic action of 5-AZA-CdR. The toxicity produced by the single agents or combination was minimal as evaluated by body weight loss (less than 3% change). Our data are in accord with the report that Zeb increased the antineoplastic activity of cytosine arabinoside in mice with L1210 leukemia [25]. Cytosine arabinoside is a cytosine analog whose metabolism is similar to 5-AZA-CdR. These investigators also observed no enhancement of the toxicity by the combination of Zeb with cytosine arabinoside.

In conclusion, our data indicate that Zeb can enhance the antileukemic activity of the deoxycytidine analog, 5-AZA-CdR. This interaction is most likely due to protection against inactivation of 5-AZA-CdR by CD. However, the inhibition of DNA methylation by Zeb may play some role in this process. This hypothesis is supported by our results that demonstrate that the combination of both drugs produces



significantly greater demethylation of the p57KIP2 promoter than either drug alone and that Zeb (100 ng/ml) by itself is unable to achieve (Fig. 5). Cheng et al. also reported that Zeb hinders the remethylation of tumor suppressor genes in tumor cells following treatment with 5-AZA-CdR [23]. At the clinical level, the combination also has the potential to eradicate leukemic cells that show drug resistance to 5-AZA-CdR due to increased CD expression [13]. These points provide a rationale to support clinical trials with 5-AZA-CdR and Zeb in combination in patients with leukemia resistant to conventional chemotherapy.

**REFERENCES**

1. Jones PA, Laird PW. Cancer epigenetics comes of age. *Nature Genetics* 1999; 21: 163-7.
2. Momparler RL. Cancer epigenetics. *Oncogene* 2003; 22: 6479-83.
3. Momparler RL, Bovenzi V. DNA methylation and cancer. *J Cell Physiol* 2000; 183: 145-54.
4. Momparler RL, Derse D. Kinetics of phosphorylation of 5-aza-2'-deoxycytidine by deoxycytidine kinase. *Biochem Pharmacol* 1979; 28:1443-4.
5. Momparler RL. Molecular, cellular and animal pharmacology of 5-aza-2'-deoxycytidine. *Pharmacol Ther.* 1985; 30: 287-99.
6. Bouchard J, Momparler RL, Incorporation of 5-aza-2'-deoxycytidine 5'-triphosphate into DNA interactions with mammalian DNA polymerase and DNA methylase. *Mol Pharmacol* 1983; 24: 109-14.
7. Jüttermann R, Li E, Jaenisch R. Toxicity of 5-aza-2'-deoxycytidine to mammalian cells is mediated primarily by covalent trapping of DNA methyltransferase rather than DNA demethylation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91:11979-801.
8. Chabot GG, Bouchard J, Momparler RL. Kinetics of deamination of 5-aza-2'-deoxycytidine and cytosine arabinoside by human liver cytidine deaminase and its inhibition by 3-deazauridine, thymidine or uracil arabinoside. *Biochem Pharmacol.* 1983; 32: 1327-8.
9. Eliopoulos N, Cournoyer D, Momparler RL. Drug resistance to 5-aza-2'-deoxycytidine, 2'-difluorodeoxycytidine, and cytosine arabinoside conferred by retroviral-mediated transfer of human cytidine deaminase cDNA into murine cells. *Cancer Chemother Pharmacol.*1998; 42: 373-8.
10. Momparler R.L, Momparler LF, Samson J. Comparison of the antileukemic activity of 5-Aza-2'-deoxycytidine, 1- $\beta$ -D-arabinofuranosyl-cytosine and 5-azacytidine against L1210 leukemia. *Leukemia Res* 1984; 8: 1043-9.

11. Wilson VL, Jones PA, Momparler RL. Inhibition of DNA methylation in L1210 leukemic cells by 5-aza-2'-deoxycytidine as a possible mechanism for chemotherapeutic action. *Cancer Res* 1983; 43: 3493-97.
12. Rivard GE, Momparler RL, Demers J, Benoit P, Raymond R, Lin K, *et al.* Phase I study on 5-aza-2'-deoxycytidine in children with acute leukemia. *Leukemia Res* 1981; 5: 453-62.
13. Onetto N, Momparler RL, Momparler LF and Gyger M. In vitro biochemical tests to evaluate the response to therapy of acute leukemia with cytosine arabinoside or 5-AZA-2'-deoxycytidine. *Semin Oncol.* 1987; 14: 231-7.
14. Issa JP, Garcia-Manero G, Giles FJ, Mannari R, Thomas D, Faderl S, *et al.* Phase 1 study of low-dose prolonged exposure schedules of the hypomethylating agent 5-aza-2'-deoxycytidine (decitabine) in hematopoietic malignancies. *Blood* 2004; 103: 1635-40.
15. Daskalakis M, Nguyen TT, Nguyen C, Guldberg P, Kohler G, Wijermans P, *et al.*: Demethylation of a hypermethylated P15/INK4B gene in patients with myelodysplastic syndrome by 5-Aza-2'-deoxycytidine (decitabine) treatment. *Blood* 2002; 100: 2957-64.
16. Ho DH. Distribution of kinase and deaminase of 1-beta-D-arabinofuranosylcytosine in tissues of man and mouse. *Cancer Res.* 1973; 33: 816-20.
17. Momparler RL, Côté, S., Eliopoulos N. Pharmacological Approach for Optimization of the Dose-Schedule of 5-Aza-2'-deoxycytidine (Decitabine) for the Therapy of Leukemia. *Leukemia* 1997; 11: 175-80.
18. Carlow D, Wolfenden R. Substrate connectivity effects in the transition state for cytidine deaminase. *Biochemistry* 1998; 37: 11873-8.
19. Frick L, Yang C, Marquez VE and Wolfenden R. Binding of pyrimidin-2-one ribonucleoside by cytidine deaminase as the transition-state analogue 3,4-dihydrouridine and the contribution of the 4-hydroxyl group to its binding affinity. *Biochemistry* 1989; 28: 9423-30.

20. Laliberté J, Marquez VE and Momparler RL. Potent inhibitors for the deamination of cytosine arabinoside and 5-aza-2'-deoxycytidine by human cytidine deaminase. *Cancer Chemother Pharmacol*. 1992; 30: 7-11.
21. Zhou L, Cheng X, Connolly BA, Dickman MJ, Hurd PJ, Hornby DP. Zebularine: a novel DNA methylation inhibitor that forms a covalent complex with DNA methyltransferases. *J Mol Biol* 2002; 23: 591-9.
22. Cheng JC, Matsen CB, Gonzales FA, Ye W, Greer S, Marquez VE, *et al*. Inhibition of DNA methylation and reactivation of silenced genes by zebularine. *J Natl Cancer Inst* 2003; 95: 399-409.
23. Cheng JC, Weisenberger DJ, Gonzales FA, Gangning L, Xu GL, Hu YG, *et al*. Continuous Zebularine Treatment Effectively Sustains Demethylation in Human Bladder Cancer Cells. *Mol Cell Biol* 2004; 24: 1270-8.
24. Kelley JA, Driscoll JS, McCormack JJ, Roth JS and Marquez VE. Furanose-pyranose isomerization of reduced pyrimidine and cyclic urea ribosides. *J Med Chem* 1986; 29: 2351-8.
25. Driscoll JS, Marquez VE, Plowman J, Liu PS, Kelley JA, Barchi JJ Jr. Antitumor properties of 2(1H)-pyrimidinone riboside (zebularine) and its fluorinated analogues. *Med Chem* 1991; 34: 3280-4.
26. Li Y, Nagai H, Ohno T, Yuge M, Hatano S, Ito E, *et al*. Aberrant DNA methylation of p57(KIP2) gene in the promoter region in lymphoid malignancies of B-cell phenotype. *Blood* 2002; 100: 2572-77.
27. Shen L, Toyota M, Kondo Y, Obata T, Daniel S, Pierce S, *et al*. Aberrant DNA methylation of p57KIP2 identifies a cell-cycle regulatory pathway with prognostic impact in adult acute lymphocytic leukemia. *Blood* 2003; 101: 4131-4136.
28. Lemaire M, Momparler LF, Marquez VE, Bernstein ML, Momparler RL. Enhancement of antineoplastic action of 5-aza-2'-deoxycytidine on L1210 leukemias cells by zebularine, an inhibitor of cytidine deaminase and DNA methyltransferase. *Proc Amer Assoc Cancer Res* 2004; 45: 366

29. Momparler RL, Gonzales FA. Effect of intravenous infusion of 5-aza-2'-deoxycytidine on survival time of mice with L1210 leukemia. *Cancer Res* 1978; 38: 2673-8.
30. Boyd VL, Zon G. Bisulfite conversion of genomic DNA for methylation analysis: protocol simplification with higher recovery applicable to limited samples and increase throughput. *Anal Biochem* 2004; 326:278–280
31. Herman JG, Jen J, Merlo A, Baylin SB. Hypermethylation-associated inactivation indicates a tumor suppressor role for P15 (INK4B). *Cancer Res* 1996; 56:722–727.
32. Valeriote F, Lin H. Synergistic interaction of anticancer agents: a cellular perspective. *Cancer Chemother Rep* 1975; 59:895–900
33. Momparler RL. In vitro systems for evaluation of combination chemotherapy. *Pharmacol Ther* 1980; 8:21–35
34. Momparler RL, Laliberté J. Induction of cytidine deaminase in HL-60 myeloid leukemic cells by 5-aza-20-deoxycytidine. *Leuk Res* 1990;14:751-4.

## CHAPITRE 15

### INHIBITION OF CYTIDINE DEAMINASE BY ZEBULARINE ENHANCES THE ANTINEOPLASTIC ACTION OF 5-AZA-2'-DEOXYCYTIDINE

#### 15.1 CONTRIBUTION DES AUTEURS

Maryse Lemaire a réalisé les essais clonogéniques, les essais enzymatiques, la chimiothérapie *in vivo* sur le modèle L1210, les expériences de pharmacocinétiques, a participé au design de l'étude et a rédigé l'article.

Louise F. Momparler a réalisé la chimiothérapie *in vivo* sur le modèle L1210 en collaboration avec ML.

Noël J-M Raynal a réalisé la chimiothérapie *in vivo* sur le modèle L1210 et a participé à la rédaction de l'article.

Mark L. Bernstein a évalué les résultats et a participé à la rédaction de l'article.

Richard L. Momparler a conçu et coordonné l'étude et a participé à la rédaction de l'article.

L'éditeur (*Cancer Chemotherapy and Pharmacology*) et tous les auteurs sont en accord avec la publication de cet article dans cette thèse ; les formulaires d'approbation sont présentés à l'annexe 5.

## 15.2 RÉSUMÉ FRANÇAIS DE L'ARTICLE

### ***L'INHIBITION DE LA CYTIDINE DÉSAMINASE PAR LE ZEBULARINE POTENTIALISE L'ACTION ANTINÉOPLASIQUE DE LA 5-AZA-2'-DÉSOXYCYTIDINE***

L'enzyme cytidine (CR) désaminase a un rôle clé dans le catabolisme des analogues de la cytosine; leur désamination conduit à la perte de leur activité pharmacologique. Nous avons évalué l'importance du rôle de cette enzyme dans l'efficacité de la combinaison de deux inhibiteurs de la méthylation de l'ADN, soit la 5-aza-2'-désoxycytidine (5-AZA-CdR) et le zebularine. De plus, le zebularine inhibe la CR désaminase; il agit donc en empêchant la dégradation de la 5-Aza-CdR et en complétant son pouvoir d'inhibition de la méthylation de l'ADN. L'objectif de cette étude était de déterminer l'importance relative de ces deux mécanismes dans la potentialisation de l'effet de la 5-Aza-CdR. Nous avons évalué l'activité anti-clonogénique de ces deux agents, seuls et en combinaison, sur des fibroblastes murin (cellules 3T3) et sur les mêmes cellules transfectées avec le gène de la CR désaminase (cellules V5). Les cellules V5 sur-expriment ce gène et on donc un taux très élevé de CR désaminase. Ces dernières sont moins sensibles à l'effet de la 5-Aza-CdR que les cellules 3T3. L'addition du zebularine sensibilise les cellules V5 à l'action de la 5-Aza-CdR, mais pas les cellules 3T3. Des analyses enzymatiques effectuées sur la CR désaminase purifiée indiquent que le zebularine est un inhibiteur compétitif de la désamination de la 5-Aza-CdR. Ces observations *in vitro* corrént avec nos études *in vivo* sur le modèle leucémique murin L1210 qui elles montrent que le zebularine potentialise aussi l'action anti-leucémique de la 5-Aza-CdR. Des analyses pharmacocinétiques chez la souris montrent que le zebularine augmente significativement la concentration plasmatique de la 5-Aza-CdR pendant son infusion. Nos résultats indiquent que le zebularine potentialise l'activité de la 5-Aza-CdR majoritairement en inhibant la CR désaminase. Toutes ces observations justifient l'évaluation de la co-administration de la 5-Aza-CdR et du zebularine dans le traitement des patients atteints de leucémie.

### 15.3 PRÉSENTATION DE L'ARTICLE

***INHIBITION OF CYTIDINE DEAMINASE BY ZEBULARINE ENHANCES  
THE ANTINEOPLASTIC ACTION OF 5-AZA-2'-DEOXYCYTIDINE***

**Maryse Lemaire<sup>a, b</sup>**, Louise F. Momparler<sup>a, b</sup>, Noël J-M Raynal<sup>b</sup>, Mark L. Bernstein<sup>c</sup>  
and Richard L. Momparler<sup>a, b</sup>

<sup>a</sup> Département de pharmacologie, Université de Montréal,

<sup>b</sup> Centre de recherche pédiatrique, Hôpital Sainte-Justine, 3175 Côte Sainte-Catherine,  
Montréal, Québec, H3T 1C5, Canada

<sup>c</sup> Hematology-Oncology, IWK Health center, 5850/5980 University Avenue, Halifax,  
Nova-Scotia, B3K 6R8

This study was supported by grants from the Canadian Cancer Society and the Cancer Research Society. ML is recipient of a studentship from the Fonds de la recherche en santé du Québec.

***Cancer Chemotherapy and Pharmacology, 2008***

DOI 10.1007/s00280-008-0750-6



## ABSTRACT

Cytidine (CR) deaminase is a key enzyme in the catabolism of cytosine nucleoside analogues, since their deamination results in a loss of their pharmacological activity. In this report we have investigated the importance of CR deaminase with respect to the antineoplastic action of inhibitors of DNA methylation, 5-aza-2'-deoxycytidine (5-AZA-CdR) and zebularine. Zebularine has a dual mechanism of action, since it can also inhibit CR deaminase. The objective of our study was to investigate the importance of zebularine as an inhibitor of CR deaminase with respect to the antineoplastic action of 5-AZA-CdR. Using an *in vitro* clonogenic assay, we investigated the antineoplastic action of 5-AZA-CdR and zebularine, alone and in combination on wild type 3T3 murine fibroblasts and corresponding V5 cells transduced with CR deaminase gene to express a very high level of CR deaminase activity. The V5 cells were much less sensitive to 5-AZA-CdR than the wild type 3T3 cells. The addition of zebularine significantly enhanced the antineoplastic action of 5-AZA-CdR on V5 cells, but not 3T3 cells. Enzymatic analysis on CR deaminase purified from the V5 cells showed that zebularine is a competitive inhibitor of the deamination of 5-AZA-CdR. These *in vitro* observations are in accord with our *in vivo* study in mice with L1210 leukemia, which showed that zebularine increased the antileukemic activity of 5-AZA-CdR. Pharmacokinetic analysis also showed that zebularine increased the plasma level of 5-AZA-CdR during an i.v. infusion in mice. Our results indicate that the major mechanism by which zebularine enhances the antineoplastic action of 5-AZA CdR is by inhibition of CR deaminase. These findings provide a rationale to investigate 5-AZA CdR in combination with zebularine in patients with advanced leukemia.

*Keywords :* 5-aza-2'-deoxycytidine, zebularine, cytidine deaminase, leukemia, pharmacokinetics

## INTRODUCTION

Zebularine is a cytidine (CR) analogue reported to inhibit the DNA methyltransferase [1, 2] and consequently re-expressed genes silenced by hypermethylation of their promoter [3, 4]. Preclinical studies have shown that zebularine has both antitumor [3, 4] and antileukemic activity [5, 6]. Zebularine is also a potent competitive inhibitor of the enzyme CR deaminase [7, 8]. CR deaminase is a key enzyme in the catabolism of cytosine nucleoside analogs, such as 5-aza-2'-deoxycytidine (Decitabine, 5-AZA-CdR) [4], since deamination results in a loss of its pharmacologic activity [9]. 5-AZA-CdR, a potent inhibitor of DNA methylation, has been shown to be an effective agent for treatment of the hematological malignancy myelodysplastic syndrome [10, 11]. It is reported that tumor cells and patient cancer cells increase their CR deaminase activity as a resistance mechanism to antineoplastic drugs, such as 5-AZA-CdR [9, 12-14]. It is possible that the use of zebularine in combination with 5-AZA-CdR may be one approach to overcome this problem of drug resistance.

In a previous study, we observed that zebularine increased the curative action of high dose 5-AZA-CdR in mice with L1210 leukemia [15]. This result can be explained either by an additional de-methylation action of zebularine, by preventing 5-AZA-CdR degradation, or by a combination of these two mechanisms. In this report, we investigated the importance of zebularine as an inhibitor of CR deaminase with respect to the antineoplastic action of 5 AZACdR [16] using a cell line transduced with the CR deaminase gene [14]. We observed that zebularine enhanced the antineoplastic action of 5-AZA-CdR on cells containing high levels of CR deaminase.

## MATERIALS AND METHODS

**Cell lines.** The mouse lymphocytic leukemia cell line L1210 was obtained from Dr. T. Khwaja (University of Southern California, Los Angeles). These cells were maintained in RPMI-1640 medium (Canadian Life Technologies, Burlington, Ontario) with 5% heat-inactivated fetal bovine serum (WISENT, St-Bruno, Quebec) and with 6  $\mu$ M of 2-mercaptoethanol. The doubling time of the L1210 cells was 10-12 h. The mouse fibroblast NIH 3T3 was obtained from ATCC (ATCC, USA). 3T3-CD3-V5 cells (V5) transduced with CR deaminase gene was previously constructed in our laboratory [12, 14]. Both cell lines were maintained in Dulbecco's modified essential medium (Canadian Life Technologies) with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (WISENT). The doubling time of the 3T3 and V5 cells was 30-35 h. All cell lines were maintained at 37°C with 5% CO<sub>2</sub>.

**Chemicals.** 5-AZA-CdR (FW 228.2) was obtained from Pharmachemie (Haarlem, Netherlands). Zebularine (FW 228.2) was kindly provided by the Laboratory of Medicinal Chemistry (NCI, NIH, Frederick, MD, USA). Both agents were dissolved in sterile phosphate buffer saline solution (0.2 gm/l of KCl, 0.2 gm/l of KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 8 gm/l of NaCl and 2.16 gm/l of Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>•7H<sub>2</sub>O) for *in vitro* and *in vivo* assays. 5-AZA-CdR was stored at -70°C to prevent its decomposition; whereas zebularine was stored at -20°C. CR and 5-[<sup>3</sup>H]CR were obtained from Boehringer Mannheim (Laval, Canada) and ICN Biomedicals (Irvine, CA, USA), respectively.

**Clonogenic assay.** A 5 ml aliquot of L1210 (10<sup>4</sup> cells) in log growth phase were placed in 25 cm<sup>2</sup> tissue-culture flasks. The indicated concentrations of drugs were added. The flasks were incubated at 37°C and at the indicated times, an aliquot was removed for counting with a Model Z Coulter Counter. An aliquot of 100 cells was placed in 2 ml of 0.3% soft agar RPMI 1640 medium containing 11% serum. For 3T3 or V5 cells, 200 cells were plated in 6-well dishes and incubated for 24 h prior to addition of different concentrations of 5-AZA-CdR and/or zebularine. The drug was removed after the different exposure times and the cells were placed in drug free medium. The number of colonies (>500 cells) was counted after 7 days of incubation

for L1210 cells and after 14 days of incubation for both 3T3 and V5 cells. The cloning efficiency of L1210 cells was in the range of 60-70% whereas it was approximately 50% for 3T3 and V5 cells.

***CR deaminase purification and quantification.*** A partial purification of CR deaminase was performed on 3T3 and on V5 cells as previously described [12, 14]. Briefly,  $6 \times 10^7$  cells were suspended in 5 mM Tris-HCl (pH 7.4), then freeze-thawed 3 times and the buffer concentration adjusted to 100 mM Tris-HCl (pH 7.4). Samples were then centrifuged at 5°C to obtain the cytosolic extract. Streptomycin sulfate (65 mg/ml final concentration) was added followed by incubation for 10 min on ice and centrifugation. Ammonium sulfate, pH 6.8 (70% saturation final concentration) was then added to precipitate the enzyme on ice for 10 min. After centrifugation was performed, the precipitate was suspended in 50 mM Tris-HCl + 20% glycerol and stored at -70°C. A spectrophotometric assay was used for quantification of the CR deaminase activity [17].

***CR deaminase assay.*** CR deaminase activity was determined using radioactive CR. Diluted enzyme from both 3T3 and V5 cells was incubated with 10  $\mu$ M of 5-[3H]CR, 50  $\mu$ Ci/ml (Moraveck Biochemicals inc, CA) with 50 mM Tris-HCl (pH 7.4) for 10 min at 37°C [12-13], with or without zebularine. The reaction was stopped by adding cold HCl 0.001N and the mixture was placed on Whatman P-81 phosphocellulose discs. The amount of radioactive cytosine moiety bound to the disc was determined by scintillation counting. The amount of the enzyme that catalyzed the deamination of 1 nmol of CR per minute was defined as one unit (U) of enzyme activity. The rate of deamination of 5-AZA-CdR was determined by spectrophotometric assay at 245 nm using a Gilford 260 spectrophotometer [17]. The reaction mixture (0.1 ml) contained 20 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (pH 7.5), 100 mM KCl, the indicated concentration of substrate, and about 2 U or 5.8  $\mu$ g purified CR deaminase from V5 cells. The Michaelis-Menten constant ( $K_m$ ) for 5-AZA-CdR and inhibition constant ( $K_i$ ) for zebularine were determined using the method of Lineweaver-Burk with different substrate concentrations and a constant inhibitor concentration [18].

***Chemotherapy of leukemia in mice.*** BALB/c x DBA/2 (hereafter called CD2F<sub>1</sub>) male mice 24-28g were obtained from Taconic Biotechnology (Germantown, NY, USA). Mice were acclimatized to housing conditions for at least 2 weeks before experiments. The mice received food and water ad libitum. The animal committee approved the experimental protocol and the animals were handled in accordance with institutional guidelines. Transplantation of L1210 leukemic cells was performed by weekly i.p. injections of 10<sup>4</sup> cells in 0.1 ml of RPMI-1640 medium into CD2F<sub>1</sub> mice. Seven days later, the ascetic fluid was obtained and a cell count of the leukemic cells was performed with a hemocytometer. For chemotherapy, the mice were injected i.v. into the lateral tail vein with 0.1 ml of L1210 (10<sup>4</sup> cells) on day 1 [15]. 5-AZA-CdR (2 mg/kg) and/or zebularine (20 mg/kg) were administered as a 15 h i.v infusion on day 2 using a Harvard infusion pump and flow rate of 0.22 ml/h via a 25-gauge needle attached to a butterfly tube into the lateral tail vein. Mice were placed in a restrainer cage during drug treatment. The survival time of each group of leukemic mice (11 mice per group) was monitored and the increase in life span (ILS) calculated.

***Pharmacokinetic analysis of 5-AZA-CdR in mice.*** Mice received 5-AZA-CdR and/or zebularine by i.v. infusion for 4 h. Blood samples were obtained by cardiac puncture. A standard clonogenic assay as described above was then performed on L1210 cells with different concentrations of 5-AZA-CdR for a standard curve and with different dilutions of plasma from the drug-treated mice. The plasma concentration of 5-AZA-CdR in presence or absence of zebularine was estimated from the standard curve [19].

***Statistical considerations.*** For statistical analysis of *in vitro* experiments, the one-way ANOVA was performed and the P value was evaluated accordingly to Tukey's method. The Kaplan Meier method was used to analyze the survival curves using the GraphPad Prism software (San Diego, CA, USA). A value P < 0.05 was taken to indicate statistical significance. The data correspond to the mean values ± S.D. for n ≥ 3.

## RESULTS

Analysis of extracts of V5 cells indicated that these transduced cells contained 25-fold greater CR deaminase activity than the wild type 3T3 cells (Table 1), as reported previously [12, 14]. Enzyme kinetic analysis on CR deaminase from V5 cell showed that zebularine was a competitive inhibitor of the deamination of 5-AZA-CdR (Figure 1). The estimated apparent  $K_m$  value for 5-AZA-CdR was 47.7  $\mu\text{M}$ , whereas the estimated inhibitory constant ( $K_i$ ) for zebularine was 0.95  $\mu\text{M}$ .

Clonogenic assay showed that the V5 cells were less sensitive to the antineoplastic action of 5-AZA-CdR as compared to the 3T3 cells (Table 2). The antineoplastic activity of zebularine for both these cell lines was similar, but very weak. When zebularine was used in combination with 5-AZA-CdR, it produced a marked enhancement of the antineoplastic activity of this cytosine nucleoside analog on the V5 cells, but not the 3T3 cells (Figure 2). A similar interaction between these two agents was observed for both the 24 and 48 h exposure times.

Zebularine also enhanced the survival time of mice with L1210 leukemia treated with 5-AZA-CdR (Figure 3). 27% of the mice treated with this drug combination had a survival time longer than the mice treated with only 5-AZA-CdR ( $P < 0.05$ ). Mice treated with zebularine alone had a survival time that was not significantly different from the control mice [15]. In this mouse model, the leukemic cells were injected i.v. to give an anatomical distribution similar to the human disease. The mice received a 15 h i.v. infusion of 5-AZA-CdR (2 mg/kg) and/or zebularine (20 mg/kg). From the published pharmacokinetic data on zebularine [20], we estimated that the steady state plasma level of this agent was in the range of 6  $\mu\text{M}$  (~1,400 ng/ml). In order to determine if zebularine increased the plasma level of 5-AZA-CdR by inhibition of CR deaminase, we determined the steady state plasma level of this cytosine nucleoside analog (Table 3). Co-infusion of zebularine increased the 5-AZA-CdR plasma level by 2-fold.

**Table 15-1****CR deaminase activity in 3T3 and V5 cells<sup>a</sup>**

Cell line	CR deaminase activity (units/mg)
3T3 cells	14.7 ± 6.2b
V5 cells	338 ± 75

<sup>a</sup>CR deaminase activity was obtained by CR deaminase assay using a radioactive substrate.

<sup>b</sup>Mean values ± S.D., n ≥ 4.

**Table 15-2**

**Effect of different concentrations and exposure times of 5-AZA-CdR on loss of clonogenicity of 3T3 and V5 cells**

Drug concentration (ng/ml)	Loss of clonogenicity (%)			
	3T3		V5	
	Exposure time (h)		Exposure time (h)	
	24	48	24	48
<u>5-AZA-CdR</u>				
1	22.6 ± 12.7 <sup>a</sup>	19.0 ± 18.9 <sup>a</sup>	6.1 ± 7.2 <sup>a</sup>	9.4 ± 12.2 <sup>a</sup>
10	28.6 ± 13.3	54.9 ± 20.1	6.8 ± 10.1	7.1 ± 7.5
20	58.6 ± 14.3	85.3 ± 9.4	8.6 ± 9.5	6.9 ± 7.6
100	91.3 ± 4.2	98.0 ± 2.5	23.1 ± 13.8	44.5 ± 25.3
<u>Zebularine</u>				
1	22.0 ± 17.4	14.0 ± 13.2	19.0 ± 18.0	15.2 ± 19.7
10	9.0 ± 13.1	6.0 ± 7.4	3.0 ± 4.7	9.4 ± 10.8
100	9.0 ± 12.7	4.0 ± 4.9	9.0 ± 11.6	9.0 ± 11.3
1000	12.0 ± 11.6	11.0 ± 9.9	11.4 ± 8.9	15.5 ± 13.0

<sup>a</sup>Mean value ± S.D. n ≥ 4

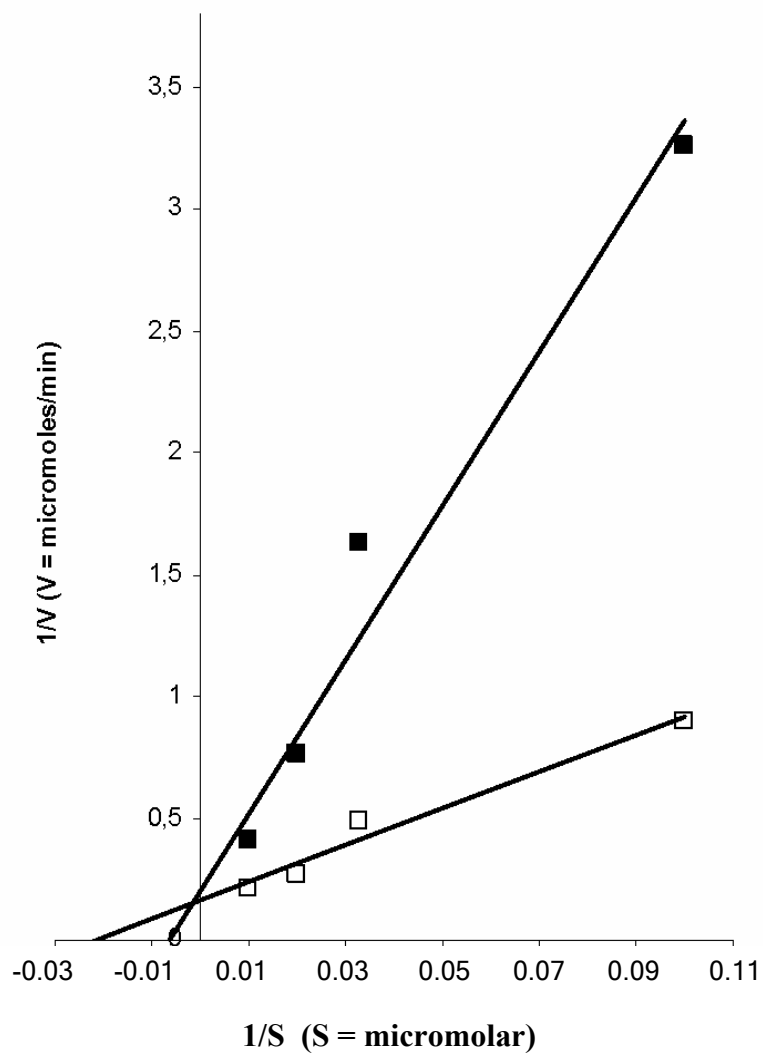


**Table 15-3****Pharmacokinetic analysis of 5-AZA-CdR during i.v. infusion in mice**

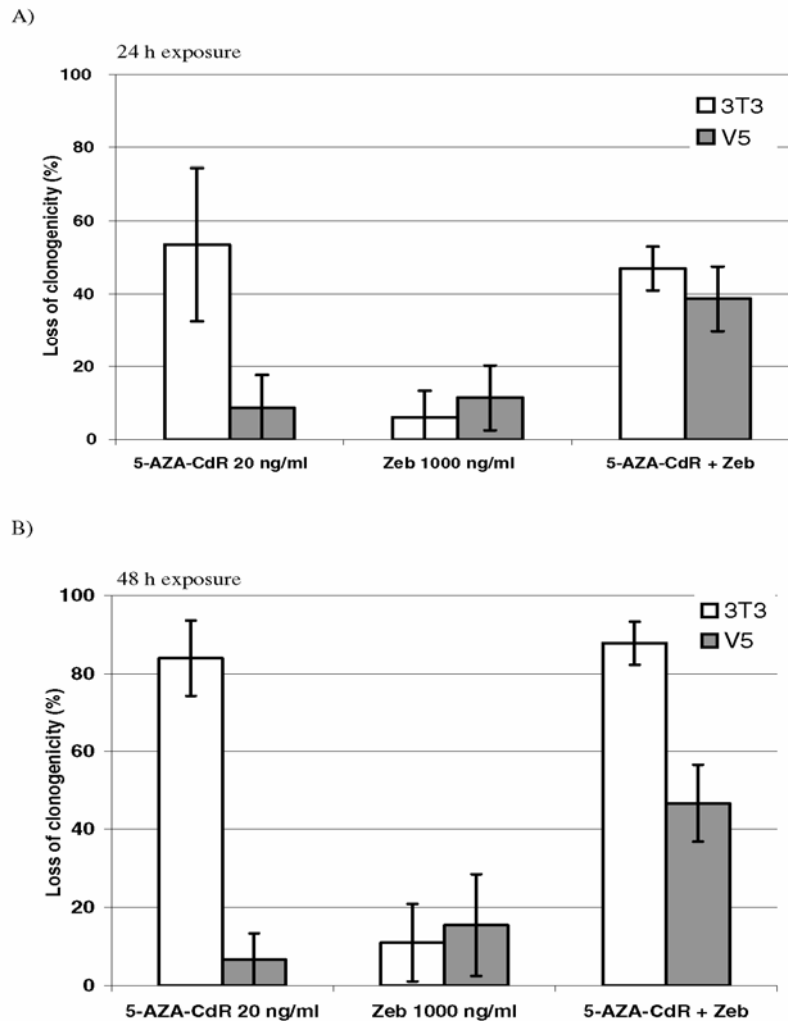
Drug	Rate drug infusion (mg/kg/h)	Plasma level 5-AZA-CdR (ng/ml)
5-AZA-CdR	0.133	71.4 ± 3.3 <sup>a</sup>
Zebularine	1.33	0
5-AZA-CdR + Zebularine	0.133 + 1.33	149.2 ± 34.2

5-AZA-CdR and/or zebularine were administered as a 15 h i.v. infusion at total doses of 2 and 20 mg/kg, respectively. Blood samples were obtained after 4 h i.v. infusion and plasmaconcentration of 5-AZA-CdR was determined by bioassay on L1210 leukemic cells.

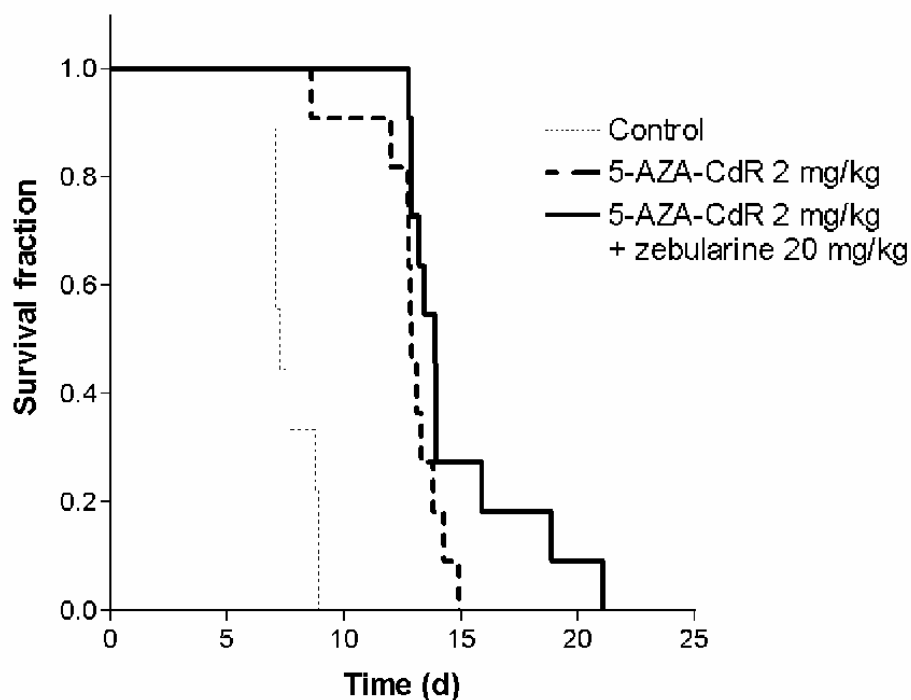
<sup>a</sup>Mean value ± S.D. n = 4



**Figure 15-1. Lineweaver-Burk plot of the effect of zebularine on the deamination of different concentrations of 5-AZA-CdR by CR deaminase. 5-AZA-CdR plus 500 ng/ml of zebularine (black squares); 5-AZA-CdR alone (white squares). S =  $\mu$ M 5-AZA-CdR; Zebularine concentration 2.19  $\mu$ M**



**Figure 15-2. Effect of zebularine on antineoplastic action of 5-AZA-CdR on 3T3 cells and V5 cells transduced with CR deaminase gene.** The cells were exposed to 20 ng/ml 5-AZA-CdR and/or 1,000 ng/ml Zebularine (Zeb) for either 24 h (A) or 48 h (B). Cell survival was determined by clonogenic assay. For V5 cells, the loss of clonogenicity of 5-AZA-CdR plus zebularine was greater than 5-AZA-CdR or zebularine alone ( $P < 0.05$ )



**Figure 15-3. Kaplan-Meier survival curve of mice with L1210 leukemia treated with zebularine and 5AZA-CdR.** The mice received an i.v. injection of  $10^4$  L1210 leukemic cells day 1. On day 2 the mice were administered a 15 h i.v. infusion of 5-AZA-CdR (2 mg/kg) and/or zebularine (20 mg/kg). The control leukemic mice without treatment survived 7.3 days. Mice treated with zebularine alone had a survival time that was not significantly different from the control mice (data not shown) [15]. Twenty seven % of the mice that received 5-AZA-CdR plus zebularine survived longer than those who were treated with 5-AZA-CdR alone ( $P < 0.05$ ).

## DISCUSSION

Zebularine is an interesting antineoplastic agent [1]. Its capacity to inhibit DNA methylation can result in reactivation of silent tumor suppressor genes [2-5]. Zebularine shows inhibitory activity against both tumor and leukemic cells [3-5]. In mouse models, zebularine at high doses shows significant antitumor [3] and antileukemic activity [6]. Zebularine is also a potent inhibitor of CR deaminase [8, 16], which is of great importance since this enzyme inactivates cytosine nucleoside analogs [9, 13]. We reported previously that zebularine enhances the curative activity of the potent inhibitor of DNA methylation 5-AZA-CdR in mice with L1210 leukemia [15]. An important question is whether this enhancement of the epigenetic action of 5-AZA-CdR is due to the additional inhibition of DNA methylation or reduction in its inactivation by zebularine. We showed previously that co-incubation of HL-60 human myeloid leukemic cells with 5-AZA-CdR and zebularine gives a greater re-expression of the tumor suppressor gene p57KIP2 compare to each agent alone, whereas zebularine by itself does not demethylate the gene [15]. Also, zebularine is reported to sustain the demethylation produced by 5-AZA-CdR on human bladder cells [4]. In this report, we focus on the ability of zebularine to inhibit the CR deaminase and to prevent the degradation of 5-AZA-CdR to explain the longer survival time of mice with L1210 leukemia treated with both compounds.

In order to clarify the interaction between 5-AZA-CdR and zebularine, we used a murine fibroblast cell line (V5) that was transduced with the CR deaminase gene and expresses very high levels of CR deaminase activity [12, 14, Table 1]. We observed that the transduced V5 cells showed significant drug resistance to 5-AZA-CdR as compared to the wild type cells (Table 2) and therefore represent a trustable model of resistance to cytosine nucleoside analogues. The addition of zebularine to 5-AZA-CdR enhances its antineoplastic activity against the V5 transduced cells, but not the wild type 3T3 cells (Figure 2). Enzymatic analysis of CR deaminase purified from the V5 cells showed that zebularine was a competitive inhibitor of the deamination of 5-AZA-CdR (Figure 1). In this cellular model, the enhancement of the antineoplastic

activity of 5-AZA-CdR by zebularine was due primarily to its inhibition of CR deaminase. We based this conclusion on the fact that zebularine did not produce a significant enhancement of 5-AZA CdR on the wild type cells.

In order to show that the enhancement of antineoplastic activity of 5-AZA-CdR was due to the inhibition of CR deaminase by zebularine, we administered a 15 h i.v. infusion of low dose 5-AZA-CdR with and without zebularine to mice with L1210 leukemia. The low dose 5-AZA-CdR was used to clarify the *in vivo* role of CR deaminase with respect to the metabolism of this analog. The addition of zebularine to 5-AZA-CdR increased significantly the survival time of the leukemic mice as compared to the mice administered 5-AZA-CdR alone (Figure 3). Pharmacokinetic analysis showed that the addition of zebularine significantly increased the plasma level of 5-AZA-CdR in the mice (Table 3). These observations are supportive to our hypothesis that the enhancement of the antineoplastic action of 5-AZA-CdR by zebularine is due to reduction in the catabolism of this cytosine nucleoside analog. Our results may have clinical application for the therapy of leukemia in patients. Due to the very high levels of CR deaminase in human liver [21], this organ may act as a “biochemical sanctuary” for leukemic stem cells during therapy with 5-AZA-CdR [22]. The use of zebularine in combination with 5-AZA-CdR may be a way to overcome this problem and increase the clinical efficacy of this epigenetic agent in patients with hematological malignancies.

**REFERENCES**

1. Marquez VE, Kelley JA, Agbaria R, Ben-Kasus T, Cheng JC, Yoo CB, Jones PA (2005) Zebularine: a unique molecule for an epigenetically based strategy in cancer chemotherapy. *Ann N Y Acad Sci* 1058: 246-254
2. Zhou L, Cheng X, Connolly BA, Dickman MJ, Hurd PJ, Hornby DP (2002) Zebularine: a novel DNA methylation inhibitor that forms a covalent complex with DNA methyltransferases. *J Mol Biol* 23: 591–599
3. Cheng JC, Matsen CB, Gonzales FA, Ye W, Greer S, Marquez VE, Jones PA, Selker EU (2003) Inhibition of DNA methylation and reactivation of silenced genes by zebularine. *J Natl Cancer Inst* 95: 399–409
4. Cheng JC, Weisenberger DJ, Gonzales FA, Gangning L, Xu GL, Hu YG, Marquez VE, Jones PA (2004) Continuous zebularine treatment effectively sustains demethylation in human bladder cancer cells. *Mol Cell Biol* 24:1270-8
5. Scott SA, Lakshimikuttysamma A, Sheridan DP, Sanche SE, Geyer CR, DeCoteau JF (2007) Zebularine inhibits human acute myeloid leukemia cell growth in vitro in association with p15INK4B demethylation and reexpression. *Exp Hematol* 35: 263-273
6. Herranz M, Martin-Caballero J, Fraga MF, Ruiz-Cabello J, Flores JM, Desco M, Marquez VE, Esteller M (2006) The novel DNA methylation inhibitor zebularine is effective against the development of T-cell lymphoma. *Blood* 107: 1174-1177
7. Carlow D, Wolfenden R (1998) Substrate connectivity effects in the transition state for cytidine deaminase. *Biochemistry* 37: 11873–11878
8. Frick L, Yang C, Marquez VE, Wolfenden R (1989) Binding of pyrimidin-2-one ribonucleoside by cytidine deaminase as the transition-state analogue 3,4-dihydrouridine and the contribution of the 4-hydroxyl group to its binding affinity. *Biochemistry* 28: 9423–9430
9. Momparler RL (2005) Pharmacology of 5-aza-2'-deoxycytidine (decitabine) *Semin Hematol* 42 (suppl 2): S9-S16
10. Issa JP, Garcia-Manero G, Giles FJ, Mannari R, Thomas D, Faderl S, Bayar E, Lyons J, Rosenfeld CS, Cortes J, Kantarjian HM (2004) Phase 1 study of low-

- dose prolonged exposure schedules of the hypomethylating agent 5-aza-2'-deoxycytidine (decitabine) in hematopoietic malignancies. *Blood* 103: 1635-1640
11. Ruter B, Wijermans PW, Lubbert M (2006) Superiority of prolonged low-dose azanucleoside administration? Results of 5-aza-2'-deoxycytidine retreatment in high-risk myelodysplasia patients. *Cancer* 106 : 1744-1750
  12. Momparler RL, Eliopoulos N, Bovenzi V, Letourneau S, Greenbaum M, Cournoyer D (1996) Resistance to cytosine arabinoside by retrovirally mediated gene transfer of human cytidine deaminase into murine fibroblast and hematopoietic cells. *Cancer Gene Ther* 3(5):331-338
  13. Onetto N, Momparler RL, Momparler LF, Gyger M (1987) In vitro biochemical tests to evaluate the response to therapy of acute leukemia with cytosine arabinoside or 5-AZA-2'- deoxycytidine. *Semin Oncol* 14(suppl 1) : 231–237
  14. Eliopoulos N, Cournoyer D, Momparler RL. (1998) Drug resistance to 5-aza-2'-deoxycytidine, 2', 2'-difluorodeoxycytidine, and cytosine arabinoside conferred by retroviralmediated transfer of human cytidine deaminase cDNA into murine cells. *Cancer Chemother Pharmacol* 42: 373-378
  15. Lemaire M, Momparler LF, Bernstein ML, Marquez VE, Momparler RL. (2005) Enhancement of antineoplastic action of 5-aza-2'-deoxycytidine by zebularine on L1210 leukemia. *Anti-Cancer Drugs* 16: 301-308
  16. Laliberté J, Marquez VE, Momparler RL (1992) Potent inhibitors for the deamination of cytosine arabinoside and 5-aza-2'-deoxycytidine by human cytidine deaminase. *Cancer Chemother Pharmacol* 30: 7–11
  17. Chabot G, Bouchard J, Momparler RL (1983) Kinetics of deamination of 5-Aza-2'- deoxycytidine and cytosine arabinoside by human liver cytidine deaminase and its inhibition by 3-deazauridine, thymidine or uracil arabinoside. *Biochem Pharmacol* 32: 1327-1328
  18. Dixon M, Webb EC (1979) *Enzymes*, Academic Press, New York
  19. Momparler RL, Bouffard DY, Momparler LF, Dionne J, Belanger K, Ayoub J (1997) Pilot phase I-II study on 5-aza-2'-deoxycytidine (Decitabine) in patients with metastatic lung cancer. *Anticancer Drugs* 8: 358-368



20. Holleran JL, Parise RA, Joseph E, Eiseman JL, Covey JM, Glaze ER, Lyubimov AV, Chen YF, D'Argenio DZ, Egorin MJ (2005) Plasma pharmacokinetics, oral bioavailability, and interspecies scaling of the DNA methyltransferase inhibitor, zebularine. *Clin Cancer Res* 11: 3862-3868
21. Ho DH (1973) Distribution of kinase and deaminase of 1-beta-D-arabinofuranosylcytosine in tissues of man and mouse. *Cancer Res* 33: 2816-2820
22. Momparler RL, Côté S, Eliopoulos N (1997) Pharmacological approach for optimization of the dose-schedule of 5-aza-2'-deoxycytidine (decitabine) for the therapy of leukemia. *Leukemia* 11: 175-180

## CHAPITRE 16

### IMPORTANCE OF DOSE-SCHEDULE OF 5-AZA-2'-DEOXYCYTIDINE FOR EPIGENETIC THERAPY OF CANCER

#### 16.1 CONTRIBUTION DES AUTEURS

Maryse Lemaire a réalisé les essais clonogéniques, les études de biologies moléculaires, la chimiothérapie *in vivo* sur le modèle L1210, a participé au design de l'étude et a rédigé l'article.

Guy G. Chabot a réalisé les essais clonogéniques et la chimiothérapie *in vivo* sur le modèle tumoral et a participé à la rédaction de l'article.

Noël J-M Raynal a réalisé les expériences de pharmacocinétiques et a participé à la rédaction de l'article.

Louise F. Momparler a réalisé la chimiothérapie *in vivo* sur le modèle L1210 en collaboration avec ML.

Annie Hurtubise a réalisé les essais clonogéniques *in vitro* sur les cellules tumorales.

Mark L. Bernstein a évalué les résultats et a participé à la rédaction de l'article.

Richard L. Momparler a conçu et coordonné l'étude et a participé à la rédaction de l'article.

L'éditeur (*BMC Cancer*) et tous les auteurs sont en accord avec la publication de cet article dans cette thèse ; les formulaires d'approbation sont présentés à l'annexe 5.

## 16.2 RÉSUMÉ FRANÇAIS DE L'ARTICLE

### ***IMPORTANCE DU PROTOCOLE D'ADMISTRATION DE LA 5-AZA-2'-DÉSOXYCYTIDINE DANS LA THÉRAPIE ÉPIGÉNÉTIQUE DU CANCER***

L'inactivation des gènes suppresseurs de tumeurs (TSG) par la méthylation de l'ADN joue un rôle important dans l'oncogenèse. Ce mécanisme épigénétique est réversible, il est donc une cible thérapeutique intéressante des inhibiteurs de la méthylation de l'ADN, telle la 5-aza-2'-désoxycytidine (DAC). Utilisé lors d'essais cliniques, le DAC s'est avérée efficace contre des maladies hématologiques et a montré une certaine activité contre des tumeurs. Cependant, le protocole d'administration optimal de cet agent n'est pas établi; les thérapies expérimentales actuelles n'étant basées que sur des données empiriques.

La perte de clonogénicité dans les cellules leucémiques et tumorales, la ré-expression de différents TSGs (*p57KIP2* dans les cellules leucémiques et *p16CDKN2A* dans les cellules tumorales) et l'inhibition globale de la méthylation de l'ADN dans les cellules leucémiques augmentent toutes avec la dose. L'action antinéoplasique du DAC s'accroît aussi avec la dose dans les différents modèles *in vivo*. La concentration plasmatique du DAC de  $> 200$  ng/ml ( $>1$   $\mu$ M) produit un bon effet antinéoplasique dans les cellules leucémiques et tumorales. *Conclusions:* L'intensification de la dose du DAC augmente significativement son activité antinéoplasique. Nos données indiquent qu'il y a une bonne corrélation entre la concentration de DAC utilisée *in vitro* qui réduit la clonogénicité, réactive les TSGs et inhibe la méthylation de l'ADN avec les résultats obtenus *in vivo*. Ceci suggère que l'activité du DAC est liée à son action épigénétique. Ces observations justifient l'élaboration de protocoles d'administration du DAC qui emploieraient des doses plus intenses dans le but de maximiser le potentiel thérapeutique de cet agent épigénétique chez des patients cancéreux.

### 16.3 PRÉSENTATION DE L'ARTICLE

#### *IMPORTANCE OF DOSE-SCHEDULE OF 5-AZA-2'-DEOXYCYTIDINE FOR EPIGENETIC THERAPY OF CANCER*

**Maryse Lemaire**<sup>1</sup>, Guy G. Chabot<sup>2</sup>, Noël J-M Raynal<sup>1</sup>, Louise F. Momparler<sup>1</sup>, Annie Hurtubise<sup>1</sup>, Mark L. Bernstein<sup>3</sup> and Richard L. Momparler<sup>1</sup>

- 1 Département de pharmacologie, Université de Montréal, Centre de recherche pédiatrique, Service d'Hématologie-Oncologie, Hôpital Sainte-Justine, 3175 Côte Sainte-Catherine, Montréal, Québec H3T 1C5 Canada.
- 2 INSERM U640-CNRS UMR8151, Laboratoire de pharmacologie chimique et génétique, Faculté de Pharmacie, Université Paris V, F75006 Paris, France.
- 3 Hematology-Oncology, IWK Health center, 5850/5980 University Avenue, Halifax, Nova-Scotia, B3K 6R8. Tel: (902) 470-6399 Fax: (902) 470-7216

This study was supported by grants from the Canadian Cancer Society (RLM & MLB #014193) and Cancer Research Society (RLM & MLB). ML is supported by a studentship from the Fonds de la Recherche en Santé du Québec.

**ABSTRACT**

*Background:* The inactivation of tumor suppressor genes (TSGs) by aberrant DNA methylation plays an important role in the development of malignancy. Since this epigenetic change is reversible, it is a potential target for chemotherapeutic intervention using an inhibitor of DNA methylation, such as 5-aza-2'-deoxycytidine (DAC). Although clinical studies show that DAC has activity against hematological malignancies, the optimal dose schedule of this epigenetic agent still needs to be established.

*Methods:* Clonogenic assays were performed on leukemic and tumor cell lines to evaluate the *in vitro* antineoplastic activity of DAC. The reactivation of TSGs and inhibition of DNA methylation by DAC were investigated by reverse transcriptase-PCR and Line-1 assays. The *in vivo* antineoplastic activity of DAC administered as an i.v. infusion was evaluated in mice with murine L1210 leukemia by measurement of survival time, and in mice bearing murine EMT6 mammary tumor by excision of tumor after chemotherapy for an *in vitro* clonogenic assay.

*Results:* Increasing the DAC concentration and duration of exposure produced a greater loss of clonogenicity for both human leukemic and tumor cell lines. The reactivation of the TSGs (*p57KIP2* in HL-60 leukemic cells and *p16CDKN2A* in Calu-6 lung carcinoma cells) and the inhibition of global DNA methylation in HL-60 leukemic cells increased with DAC concentration. In mice with L1210 leukemia and in mice bearing EMT6 tumors, the antineoplastic action of DAC also increased with the dose. The plasma level of DAC that produced a very potent antineoplastic effect in mice with leukemia or solid tumors was > 200 ng/ml (>1  $\mu$ M).

*Conclusions:* We have shown that intensification of the DAC dose markedly increased its antineoplastic activity in mouse models of cancer. Our data also show that there is a good correlation between the concentrations of DAC that reduce *in vitro* clonogenicity, reactivate TSGs and inhibit DNA methylation. These results suggest that the antineoplastic action of DAC is related to its epigenetic action. Our observations provide a strong rationale to perform clinical trials using dose intensification of DAC to maximize the chemotherapeutic potential of this epigenetic agent in patients with cancer.

## BACKGROUND

The inactivation of tumor suppressor genes (TSGs) by epigenetic events, such as aberrant DNA methylation, plays an important role in oncogenesis [1, 2]. Since epigenetic changes are Reversible, they are promising targets for chemotherapy using agents that inhibit DNA methylation [3, 4]. 5-Aza-2'-deoxycytidine (decitabine, dacogen, DAC) is a potent demethylating agent [5] that has been shown to reactivate TSGs [3] silenced by promoter DNA methylation [1, 2]. In preclinical studies DAC was shown to have potent antileukemic activity in the mouse model [6-8]. In addition DAC showed potent antitumor activity against a human tumor xenograft [9]. Its mechanism of action is related to the induction of terminal differentiation, senescence or apoptosis, resulting in an irreversible loss of proliferative potential [10-12].

Clinical trials in patients with hematological malignancies have shown that both low and intermediate doses of DAC can produce responses [13-18]. In patients with solid tumors, low dose DAC produced low response rates [19-21], whereas in a pilot study high doses showed promising activity [22]. Indeed, the dose-schedules of DAC used in the clinical studies were very different, and it appears that the optimal dose still needs to be refined in order to fully exploit its chemotherapeutic potential.

In order to clarify the dose-schedule of DAC as a guide to clinical trials, we have evaluated the antineoplastic activity of DAC both *in vitro* and in animal models. We have observed that DAC reduced the *in vitro* clonogenic potential in a dose-dependent manner of both human and murine leukemia and tumor cell lines. The *in vitro* antineoplastic action of DAC correlated well with its inhibition of DNA methylation and reactivation of TSG in human neoplastic cells. We also observed a correlation between *in vitro* and *in vivo* concentrations needed to produce optimal responses in mice with L1210 leukemia or with EMT6 tumor. These observations may be useful in the design of optimized dose-schedules of DAC for future clinical trials aimed at evaluating its full chemotherapeutic potential in patients with cancer.

## METHODS

**Chemicals.** DAC (molecular weight 228.2) was obtained from A. Piskala, Institut of Organic Chemistry and Biochemistry, Czechoslovak Academy of Science, Prague, Czechoslovakia. DAC was dissolved in sterile phosphate buffer saline pH 6.8 (PBS) solution and stored at 70°C to prevent decomposition.

**Cell culture.** The mouse lymphoid leukemia cell line L1210 was obtained from Dr. T. Khwaja (University of Southern California, Los Angeles). These cells were maintained in RPMI-1640 medium (Canadian Life Technologies, Burlington, Ontario) with 5% heat-inactivated fetal calf serum (WISENT, St-Bruno, Quebec) and with 6  $\mu$ M of 2-mercaptoethanol. The mouse mammary tumor cell line EMT6 was obtained from spontaneous mammary tumor of BALB/c mouse [23]. These cells were maintained in MEM F-14 medium (Canadian Life Technologies) with 10% heat-inactivated fetal calf serum and with 25 units/ml of penicillin, 25  $\mu$ g/ml of streptomycin and 0.1 mg/ml of calcium chloride. The doubling time of both murine cell lines was ~12 h. The human acute promyelocytic leukemic cells HL-60 (ATCC, USA) and the lung carcinoma cells Calu-6 were maintained in RPMI-1640 medium (Canadian Life Technologies) with 10% heat-inactivated foetal calf serum (WISENT). The doubling times of the HL-60 and Calu-6 cells were 16 and 30 h, respectively. All cells lines were maintained at 37°C with 5% CO<sub>2</sub>.

**Clonogenic assays.** A 5 ml aliquot of HL-60 or L1210 ( $10^4$  cells/ml) in log growth phase were placed in 25 cm<sup>2</sup> tissue-culture flasks. The indicated concentrations of DAC were added. The flasks were incubated at 37°C and at the indicated times, an aliquot was removed for counting with a Model Z Coulter Counter. An aliquot of 100 cells was placed in 2 ml of 0.3% soft agar RPMI 1640 medium containing 20% serum for HL-60 (Table 1) or 10% serum plus 6  $\mu$ M 2-mercaptoethanol (Sigma) for L1210 cells (Table 3). For EMT6 tumor, 5 ml (200 cells) were placed in a Petri dish and incubated for 4 h. Different concentrations of DAC were then added for 18 h exposure (Table 3). The drug was removed and the cells were placed in drug free

medium. For Calu-6 lung carcinoma cells, 2 ml (100 cells) were plated in 6-well dishes and incubated for 24 h prior to addition of different concentrations of DAC (Table 2). The drug was removed after the different exposure times and the cells were placed in drug-free medium. The number of colonies (>500 cells) was counted after 7 days of incubation for both L1210 and EMT6 cells (Table 3), and after 14 days of incubation for HL-60 (Table 1) and Calu-6 cells (Table 2). The cloning efficiency of all the cells was in the range of 60-75%.

***Isolation of RNA and RT-PCR.*** In order to study the epigenetic effect of DAC, the reactivation of the tumor suppressor genes p57CDKN1C (p57) (GenBank accession number NM\_000076) [8] on HL-60 cells and p16CDKN2A (p16) (GenBank accession number NM\_058197) [24] on Calu-6 cells was evaluated. HL-60 leukemic cells and Calu-6 lung carcinoma cells were treated with different concentrations of DAC for 48 h (Fig. 1). Total RNA was isolated 24 h after drug removal using Rneasy Mini Kit (Qiagen, Mississauga, Ontario, CA). For cDNA synthesis, RNA was reverse-transcribed as previously described [8]. PCR amplifications were performed using HotStar Taq Polymerase (Qiagen) and specific primers spanning different exons for human 18S ribosomal RNA (18S) (Gen Bank accession number X03205) [8], p57 [8] and p16 [25]. The 18S was amplified as an internal control. Samples were amplified in a Whatman Biometra T gradient thermocycler (Göttingen, Germany) under the following conditions (previously described for 18S and p57 [8]). For p16, 15 min at 95°C to activate Taq polymerase, denaturation at 94°C for 45 s, annealing at 59°C for 30 s and extension at 72°C for 30 s, for 5 cycles. Then, the annealing temperature was lowered by 2°C for an additional 35 cycles. The length of the PCR products were 110, 167 and 117 bp for 18S, p57 and p16 respectively. For each gene, the number of cycles was determined during the exponential phase of DNA amplification. The PCR products were electrophoresed on 2% agarose gel and detected by ethidium bromide staining. For quantitative detection of gene expression, we used the 18S as the reference standard to normalize the data. The concentration of the amplified DNA was determined by Agilent 2100 Bioanalyzer (Palo Alto, CA). This instrument uses a very sensitive capillary electrophoresis and fluorescent



detection to measure the concentration and size of DNA from a sample size of only 1  $\mu$ l (Fig. 1B and C).

***Isolation of DNA and bisulfite treatment.*** In order to study the global methylation status of the genome of the HL-60 leukemic cells, the LINE-1 (GenBank accession number AF148856) assay was used [26]. The specific methylation status of the promoter of the p57 gene (GenBank accession number NC\_000011) has also been studied in these cells. HL-60 cells were treated with different concentrations of DAC (10, 100 and 1000 ng/ml or 0.044, 0.44 and 4.4  $\mu$ M) for 48 h. Genomic DNA was isolated 24 h after drug removal using Dneasy Tissue Kit (Qiagen). Genomic DNA was then treated with bisulfite [8]. This bisulfite treatment converts unmethylated cytosine residues to uracil, whereas 5-methylcytosine residues remain unchanged.

***Quantitation of DNA methylation by LINE assay.*** Analysis of changes in DNA methylation after DAC treatment were evaluated by the method used for the LINE-1 assay [26]. PCR was performed on bisulfite treated DNA using specific primers for either LINE-1 (sense 5'-TTA GGG AGT GTT AGA TAG TGG -3' and antisense 5'-ATA CCC TAC CCC CAA AAA TAA AAC -3' (primer sequences were designed by Allen S. Yang, personal communication). The PCR conditions were the same as RT-PCR for 18S, except the annealing temperature was 53°C and the total number of cycles was 35. The PCR products were then purified using the DNA Clean and Concentrator Kit (Zymo Research, CA, USA) and digested with *Hinf I* enzyme (New England BioLabs, MA, USA) according to manufacturer's protocols. *Hinf I* will only cut the repetitive LINE-1 elements that were originally methylated, leading to a 53 and a 398 bp fragmentation product that can be quantified. The samples were placed on a 2% agarose gel, detected by ethidium bromide staining and their concentrations were evaluated by the Agilent 2100 Bioanalyzer.

***Chemotherapy in mice.*** BALB/c x DBA/2 (hereafter called CD2F<sub>1</sub>) male mice 24-28 g were obtained from Taconic Biotechnology (Germantown, NY, USA). The animal committee approved the experimental protocols and the animals were handled in

accordance with institutional guidelines. Transplantation of L1210 leukemic cells was performed by weekly i.p. injections of  $10^4$  cells in 0.1 ml of RPMI-1640 medium into CD2F<sub>1</sub> mice. Seven days later, the ascitic fluid was obtained and a cell count of the leukemic cells was performed with a hemocytometer. For chemotherapy of leukemia, the mice were injected i.v. with 0.1 ml of L1210 ( $10^4$  cells) [6]. DAC was dissolved in PBS and sterilized by 0.2  $\mu$ m filtration (Fig. 2). For i.v. infusion administration, a Harvard infusion pump was used at a flow rate of 0.22 ml/h via a 25-gauge needle attached to a winged infusion set into the lateral tail vein. Mice were placed in a restrainer cage during drug treatment [8]. The survival time of each group of leukemic mice was monitored and the increase in life span (ILS) calculated (Fig. 2). Mice that survived >60 days after drug treatment were classified as long-term survivors.

***In vitro clonogenic assay of tumors after in vivo chemotherapy [27].*** For the transplantation of EMT6 mammary tumor, the tumor was removed by surgery and cut into small pieces under sterile conditions. A tumor fragment of ~1 mm diameter was injected s.c.. Transplantations were performed every two weeks. CD2F<sub>1</sub> mice with EMT6 tumors received DAC when the tumors reached a weight of ~200 mg ( $14 \pm 2$  days after s.c. injection of EMT6 cells). Mice were administered the i.v. infusion of DAC at a flow rate of 0.25 ml/h at 1.67 mg/kg/h for different infusion times or a single 18 h i.v. infusion at different doses. Tumors were then removed, cut and washed with medium. Cells were trypsinized and filtered (37  $\mu$ m) to remove tumor fragments. The single cell suspension was centrifuged, washed with medium and counted. Cells were then plated in Petri dishes at a density of 500 and 1000 cells/dish and 14 days later, colonies were fixed, stained with Giemsa and counted. The cloning efficiency was ~10%.

***Pharmacokinetic analysis.*** Mice received DAC by i.v. infusion for 4 h to reach a steady state concentration at the indicated rate of infusion corresponding to different doses levels (Table 4). The mice were anesthetized with carbon dioxide. At 1-2 min post-infusion, blood samples were obtained by cardiac puncture using a syringe

flushed with heparin. The blood samples were placed on ice and centrifuged at 10,000 x g for 5 min. The supernatant was obtained and used for bioassay as described previously [22]. The bioassay measures the growth inhibition of L1210 leukemic cells after 48 h incubation. Different dilutions of the plasma were added to the medium and the growth inhibition determined. The plasma concentration of DAC was estimated from the standard curve (not shown) with known concentrations of this analog. The experiment was repeated twice and performed in duplicates.

***Statistical considerations.*** For statistical analysis one-way ANOVA was performed. The p-value was evaluated accordingly to Tukey's method [28]. A value  $p < 0.05$  was taken to indicate statistical significance. The data represented the mean values  $\pm$  S.D. for  $n \geq 3$ .

## RESULTS

Clonogenic assays were performed on human leukemic and tumor cell lines to facilitate the translation of *in vitro* data to the design of a protocol for a clinical trial. Human HL-60 myeloid leukemic cells were exposed to different concentrations of DAC for different exposure times (Table 1). DAC produced a loss of clonogenicity in a time- and a dose-dependent manner. For a 24 h exposure, the concentration that produced 50% loss of clonogenicity (IC<sub>50</sub>) value was between 10 and 20 ng/ml (0.044 and 0.088  $\mu$ M), whereas 200 ng/ml (0.88  $\mu$ M) produced almost 100% in loss of clonogenicity.

Similarly, Calu-6 lung carcinoma cells were exposed to different concentrations of DAC for different exposure times (Table 2). DAC produced a loss of clonogenicity in a dose- and a time-dependent manner. For the 4 and 8 h exposure times, the IC<sub>50</sub> value was in the range of 100 ng/ml (0.44  $\mu$ M). Compared to HL-60 leukemic cells, higher concentrations and longer exposure times were required to achieve a loss of clonogenicity of approximately >90%.

In order to fully understand the antineoplastic activity of DAC, we evaluated its epigenetic action at different concentrations on human leukemic and tumor cell lines. The global DNA methylation status of HL-60 leukemic cells was monitored by tracking the amount of methylated LINE-1 element [26] (Fig. 1A). After a 48 h exposure, 100 ng/ml (0.44  $\mu$ M) of DAC reduced the global methylation status of HL-60 by 40% ( $p < 0.001$ , compared to untreated cells), which seems to be sufficient to inhibit almost 100% of the clonogenic potential (Table 1). Lower concentration of DAC (10 ng/ml; 0.044  $\mu$ M) did not produce a significant loss in global DNA methylation ( $p > 0.05$ , compared to untreated cells) in HL-60 cells. Similar results were obtained from the examination of the tumor suppressor gene p57, reported to be methylated in HL-60 cell lines [8]. HL-60 cells exposed to 100 ng/ml (0.44  $\mu$ M) for 48 h showed re-expression of p57 mRNA (Fig. 1B). These data correlate well with the concentration required to significantly decrease the promoter methylation of p57 as determined by the methylation-specific PCR assay [8] (data not shown). When HL-60 cells are exposed to lower concentrations of DAC (10 ng/ml; 0.044  $\mu$ M), DNA

hypomethylation was not detected, even though that concentration could inhibit approximately 70% of the clonogenicity of these cells (Table 1).

We next investigated the re-expression of p16 mRNA on Calu-6 lung carcinoma cells exposed to different concentrations of DAC (Fig. 1C), because p16 has been reported to be completely repressed by DNA methylation in these cells [24]. The observed re-expression of p16 was found to be time- and dose-dependent, with 100 ng/ml (0.44  $\mu$ M) required to achieve a significant re-expression at 24 h (data not shown) and 48 h (Fig. 1C). These data correlated well with the efficacy in reducing the clonogenic potential of DAC, since both exposure times gave ~80% loss of clonogenicity (Table 2).

The loss of clonogenicity was determined by the reduction in colony formation after an 18 h drug exposure of the L1210 murine lymphoid leukemic cells and of the EMT6 mammary tumor cells to different concentrations of DAC (Table 3). The IC<sub>50</sub> was ~15 ng/ml (0.066  $\mu$ M) for L1210 and ~50 ng/ml (0.22  $\mu$ M) for EMT6, according to calculations. In a previous study on L1210, we also observed that shorter exposure times to DAC were less effective indicating a time-dependence [6, 8]. DAC produced a loss of clonogenicity in a dose-dependent manner in both cell lines, although L1210 leukemic cells are much more sensitive than the EMT6 cells. It is noteworthy that both murine and human leukemic cells were more sensitive to the antineoplastic action of 5-AZA-CdR than the solid tumor cells of either species.

CD2F<sub>1</sub> mice received an i.v. injection of 10<sup>4</sup> L1210 leukemic cells on day 1 and chemotherapy was started on day 2. The short plasma half-life of DAC in mice of 20-30 min [29] supports the use of a continuous i.v. infusion for drug administration. We administered different doses of DAC ranging from 2.5 to 20 mg/kg (Fig. 2). The total dose of 2.5 mg/kg increased the survival time to 13.9  $\pm$  1.3 days, an 85% increase in life span as compared to untreated mice which had a survival time of 7.5  $\pm$  0.5 days. Doubling the dose to 5 mg/kg produced an increase in survival time to 26 days with 30% of the mice surviving more than 60 days, designated as long-term survivors in this model. Increasing the dose of DAC to 10 and 15 mg/kg produced a further increase in survival time and long-term survivors. At a total dose of 20 mg/kg of DAC, 100% of treated mice survived more than 60 days, indicating that they were

all long-term survivors as described in this model (Fig. 2). The toxicity produced by the 20 mg/kg dose of DAC was minimal as indicated by the <3 % loss in body weight (data not presented).

A very sensitive method to evaluate the antitumor activity of DAC is to determine the cloning efficiency of tumor cells *in vitro* after an *in vivo* treatment. This model is more sensitive than measuring tumor volume because it is possible to detect 2 to 4 log cell kill. Mice were injected with EMT6 mammary tumor cells s.c. and the treatment with DAC was started when tumor reached a weight of approximately 200 mg. In the initial experiments, the mice received a constant rate of infusion of DAC (1.67 mg/kg/h) for different infusion times (Fig. 3A). The tumors were removed 48 h after treatment, the cells plated and colonies were counted 14 days later. The loss of clonogenicity of the tumor cells increased with the duration of the DAC infusion. A complete loss of clonogenicity was observed for the 24 h infusion at a total dose of 40 mg/kg of DAC. However, this latter dose-schedule was very toxic to the mice. In the second set of experiments, the mice received a constant 18 h infusion of DAC at different total doses of 7.5, 15, 30 and 60 mg/kg (Fig. 3B). A reduction in the survival fraction of the tumor cells was dependent on the dose of this analogue. DAC at a total dose of 30 mg/kg produced an estimated ~2 log cell kill of the tumor cells (Fig. 3B).

In a standard pharmacokinetic analysis, about 4 plasma half-lives are required for a drug to reach steady state level during a continuous i.v. infusion. The elimination half-life of DAC in plasma of mice was estimated to be 29 min [29]. For DAC it takes about 2 h to reach steady state level. In order to determine plasma level of DAC in our leukemic mouse model that produced 100% long-term survivors, we obtained blood samples after 4 h infusion time and estimated the level of this analogue using a bioassay. When DAC was infused at a rate of 1.11 mg/kg/h, which corresponds to the total dose of 20 mg/kg for 18 h infusion, its estimated plasma level was 610 ng/ml (2.68  $\mu$ M) (Table 4).

**Table 16-1**

**Effect of different concentrations and exposure times of DAC on loss of clonogenicity of human HL-60 myeloid leukemic cells**

DAC Concentration ng/ml ( $\mu$ M)	Loss of clonogenicity (%)			
	Exposure time			
	2h	6h	24h	48h
10 (0.044)	11.8 $\pm$ 9.8 <sup>a</sup>	43.9 $\pm$ 10.2 <sup>a</sup>	44.9 $\pm$ 15.9 <sup>a</sup>	69.0 $\pm$ 19.9 <sup>a</sup>
20 (0.088)	ND	ND	56.1 $\pm$ 19.2	ND
100 (0.44)	43.9 $\pm$ 7.8	74.0 $\pm$ 9.8	83.9 $\pm$ 4.9	99.7 $\pm$ 0.8
200 (0.88)	56.4 $\pm$ 14.8	77.2 $\pm$ 10.7	99.2 $\pm$ 2.1	100
1,000 (4.4)	61.3 $\pm$ 14.7	89.3 $\pm$ 3.8	ND	100

<sup>a</sup>Mean values  $\pm$  S.D.,  $n \geq 4$

**Table 16-2**

**Effect of different concentrations and exposure times of DAC on loss of clonogenicity of human Calu-6 lung carcinoma cells**

DAC Concentration ng/ml ( $\mu$ M)	Loss of clonogenicity (%)			
	4h	Exposure time		48h
		8h	24h	
1 (0.0044)	ND	ND	16.4 $\pm$ 9.1 <sup>a</sup>	10.3 $\pm$ 5.9 <sup>a</sup>
10 (0.044)	25.5 $\pm$ 15.6 <sup>a</sup>	20.1 $\pm$ 15.2 <sup>a</sup>	30.7 $\pm$ 11.4	22.5 $\pm$ 19.4
100 (0.44)	59.8 $\pm$ 20.2	71.1 $\pm$ 9.3	83.9 $\pm$ 14.2	71.6 $\pm$ 11.1
1,000 (4.4)	82.4 $\pm$ 10.2	83.4 $\pm$ 1.1	98.0 $\pm$ 4.2	100

<sup>a</sup>Mean values  $\pm$  S.D., n  $\geq$  3



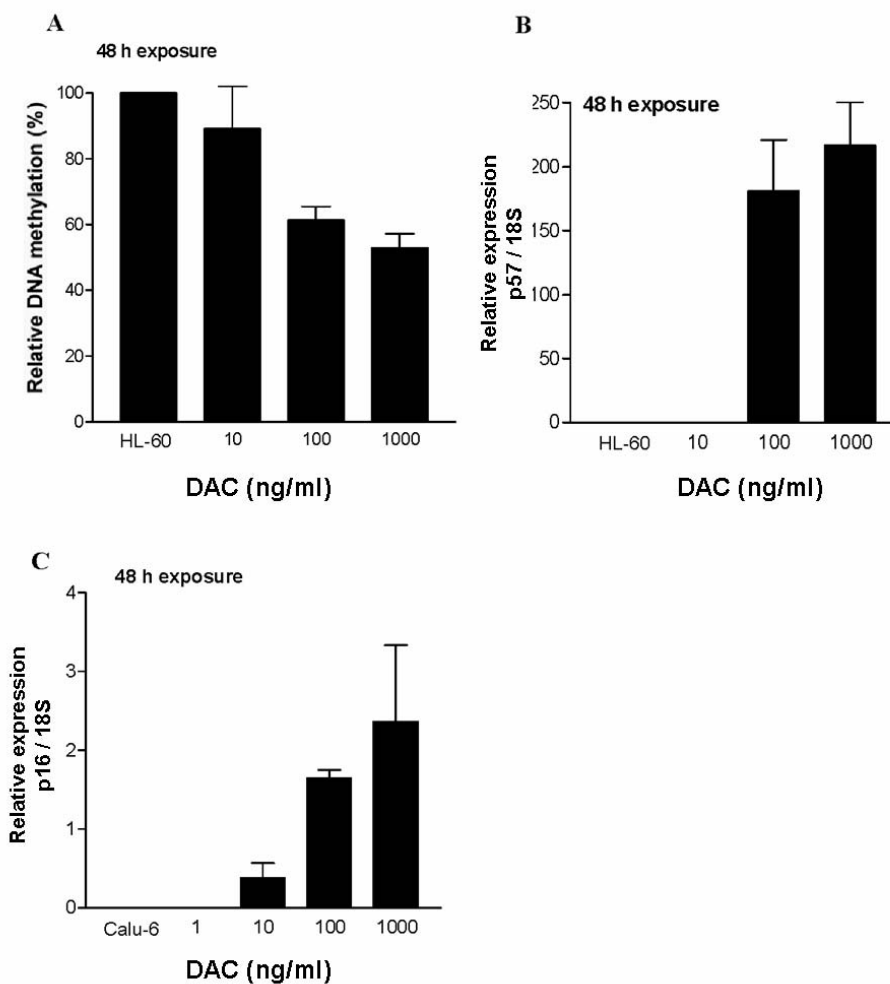
**Table 16-3**

**Effect of different concentrations of DAC on loss of clonogenicity by L1210 murine lymphoblastic leukemia, or by EMT6 murine mammary tumor cells<sup>a</sup>**

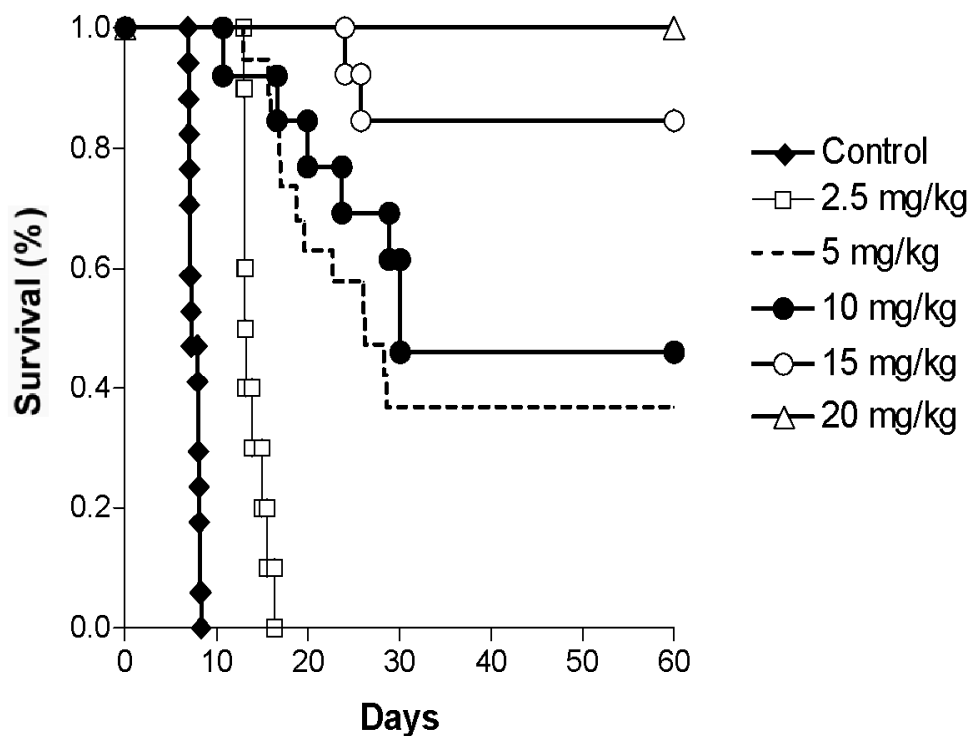
DAC Concentration ng/ml ( $\mu$ M)	L1210 Loss of clonogenicity (%)	EMT6 Loss of clonogenicity (%)
1 (0.0044)	25.3 $\pm$ 12.4 <sup>b</sup>	-
10 (0,044)	41.4 $\pm$ 8.8	12.3 $\pm$ 5.5 <sup>b</sup>
100 (0.44)	98.6 $\pm$ 1.3	69.3 $\pm$ 10.3
1,000 (4.4)	100	75.0 $\pm$ 10.8
10,000 (44)	-	99.2 $\pm$ 0.3

<sup>a</sup>18 h exposure to DAC.

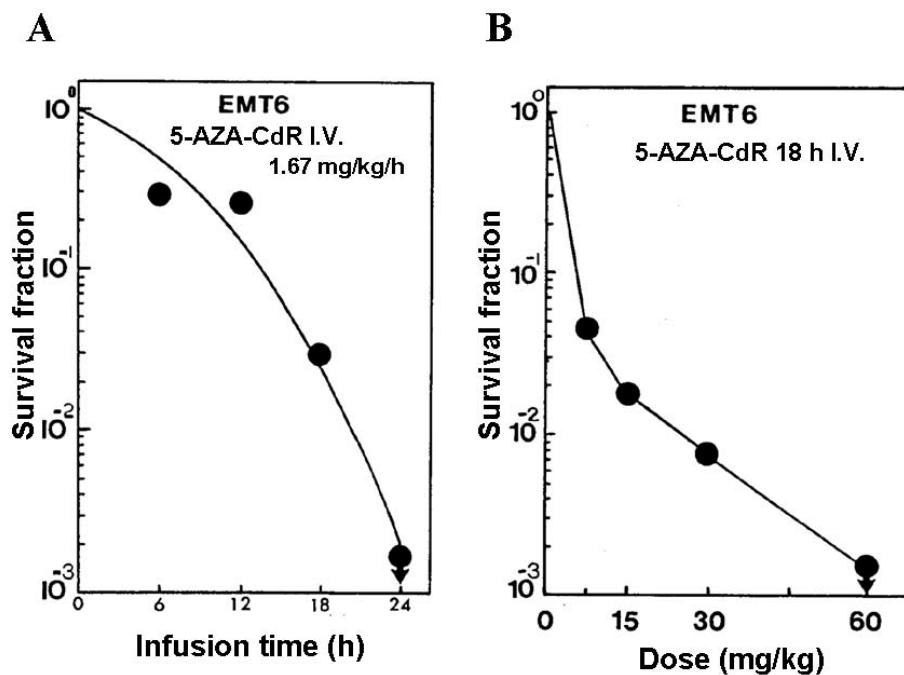
<sup>b</sup>Mean values  $\pm$  S.D., n  $\geq$  3.



**Figure 16-1. Effect of DAC concentration on DNA methylation and reactivation of p57 and p16 tumor suppressor genes;** A) HL-60 cells were treated with the indicated concentrations of DAC for 48 h. Total DNA was isolated at 72 h and the LINE-1 element gene methylation status was analyzed by COBRA assay. B) HL-60 cells were treated with the indicated concentrations of DAC for 48 h and total RNA was isolated at 72 h. Gene expression of 18 S ribosomal RNA gene and p57 were analyzed by RT-PCR. The amount of DNA amplified during the exponential phase of PCR was analyzed by quantification of amplified DNA by an Agilent 2100 Bioanalyzer. The control cells are HL-60 with no drug treatment. Control vs DAC 100 ng/ml or 1,000 ng/ml  $p < 0.001$ . C) Calu-6 cells were treated with the indicated concentrations of DAC for 48 h. Total RNA was isolated at 72 h and 18 S ribosomal RNA gene and p16 gene expression analyzed by RT-PCR. For the quantitative detection of gene expression, we used 18S as the reference to normalize the data. Control = Calu-6 with no drug treatment. Control vs DAC 100 ng/ml  $p < 0.01$ . Data are mean values  $\pm$  S.D.,  $n \geq 3$ .



**Figure 16-2. Effect of DAC on the survival time of mice with L1210 lymphoid leukemia;** CD2F<sub>1</sub> mice received  $1 \times 10^4$  L1210 leukemic cells on day 1. Chemotherapy was started on day 2 with the indicated doses of DAC for 18 h i.v. infusion. The survival time of mouse was monitored. Control: n = 10 ; DAC 2.5 mg/kg : n = 10 ; DAC 5 mg/kg : n = 19 ; DAC 10 mg/kg : n = 13 ; DAC 15 mg/kg : n = 12 ; DAC 20 mg/kg : n = 3.



**Figure 16-3. Effect of DAC therapy on mice on the survival of EMT6 mammary tumor cells;** A) Mice received an i.v. infusion of DAC at 1.67 mg/kg/h for different duration (6, 12, 18 or 24 h) for total doses of 10, 20, 30 or 40 mg/kg, respectively. B) Mice received an 18 h i.v. infusion at different doses of DAC (7.5, 15, 30 or 60 mg/kg). CD2F<sub>1</sub> mice were injected s.c. with EMT6 tumor cells on day 1. DAC treatment as indicated was administered 14 days later. At 48 h post-treatment the tumors were removed and cells were plated in dishes for colony formation analysis. Each data point: n = 2. The cloning efficiency was about 10%.

**Table 16-4****Pharmacokinetics of DAC in mice**

Total dose <sup>a</sup> (mg/kg)	Rate infusion (mg/kg/h)	Plasma level ng/ml ( $\mu$ M)
5	0.278	80 $\pm$ 0.3 <sup>b</sup> (0.35)
10	0.556	190 $\pm$ 0.5 (0.83)
20	1.11	610 $\pm$ 0.9 (2.68)

<sup>a</sup>18 h i.v. infusion of DAC. Blood sample was obtained at 4 h.

<sup>b</sup>Mean values  $\pm$  S.D., n  $\geq$  3.

## DISCUSSION

The silencing of TSGs by aberrant DNA methylation is a frequent event in leukemogenesis and tumorigenesis. Since this epigenetic event is reversible, it provides a very interesting target for cancer therapy with DAC, a potent and specific inhibitor of DNA methylation. Recently, DAC was approved by the FDA for the treatment of the hematological malignancy, myelodysplastic syndrome [13, 15, 17]. However, even though some information is available concerning the dose-scheduling of DAC, the optimal dosing in humans is still not well defined. The purpose of the present preclinical study was therefore to better define the dose-schedule of DAC in order to provide data that may be useful to clinical investigators in their effort to improve the efficacy of DAC therapy in patients with cancer.

In this preclinical study we have investigated the *in vitro* and *in vivo* antineoplastic activity of DAC on leukemic and tumor cells. The objective of our study was to correlate the *in vitro* concentrations of DAC that produced a significant loss of clonogenicity with the doses that produce a potent *in vivo* antineoplastic effect in mouse cancer models. Our data clearly show that the *in vitro* loss of clonogenicity by human and murine leukemic and tumor cells increase with concentration of DAC. For HL-60 leukemic cells and Calu-6 lung carcinoma cells the loss of clonogenicity at the higher concentrations of DAC correlated with its capacity to reactivate TSGs in these cell lines. In addition, the inhibition of DNA methylation by DAC in the HL-60 leukemic cells also correlated with the loss of clonogenicity. This latter result is in accord with our previous study in mice with L1210 leukemia in which the chemotherapeutic action of DAC was correlated with its inhibition of DNA [7]. These observations further support the hypothesis that the antineoplastic action of DAC is related to its epigenetic action.

The antineoplastic action of DAC against both leukemic and tumor cells also increased with the duration of treatment. The longer exposure times allowed a greater fraction of non-S phase cells to progress into S phase, where DAC exerts its antineoplastic action [30]. Due to its S phase specificity, the duration of DAC

treatment is a very important parameter that should be taken into consideration in the design of trials with this epigenetic agent in cancer patients.

In mice with L1210 leukemia, the antineoplastic activity of DAC increased markedly with the dose. The estimated steady-state plasma level of DAC was ~185 ng/ml (~0.8  $\mu$ M) when administered at a total dose of 10 mg/kg as a 15-h i.v. infusion. This treatment produced ~50% long-term survivors. The *in vitro* colony assay on L1210 leukemic cells predicts a >98% loss of clonogenicity with this concentration, indicating a good correlation between the *in vitro* and *in vivo* antileukemic action of DAC. The question arises: Is it possible to translate the observations of DAC in this mouse model of leukemia to the clinical treatment of patients with leukemia? In this regard, it is interesting to note that our data on cytosine arabinoside (cytarabine, ARA-C) in the L1210 leukemia model in mice [31] shows a good correlation with clinical studies on intensive dose ARA-C in patients with acute myeloid leukemia [32].

Although ARA-C and DAC are both deoxycytidine analogues with identical metabolism and S phase specificity, these agents have different mechanisms of action. One major concern for clinical trials using DAC dose-intensification is its hematopoietic toxicity. However, the hematopoietic toxicity seen with post-remission high dose ARA-C in leukemic patients is reversible [31]. Similarly, it should be possible to investigate more intensive dose therapy with DAC in patients with leukemia who have a good performance status, since the pharmacology would predict reversible toxicity with DAC as well [18].

The antineoplastic action of DAC against the EMT6 tumor in mice also increased markedly with dose. In this model, the tumor was excised after DAC treatment, and the cell suspension obtained for the *in vitro* clonogenic assay. We selected this model because it quantifies the survival of tumor stem cells, which should be the key target of chemotherapy [33]. DAC at total dose of 15 mg/kg produced ~2 log reduction in clonogenic survival of EMT6 tumor cells. The

estimated plasma level of DAC during this infusion was 200-400 ng/ml (0.88-1.76  $\mu\text{M}$ ). In patients with solid tumors low dose DAC showed only minimal clinical activity [20- 21]. For example, DAC (60 to 90  $\text{mg}/\text{m}^2$  total dose) administered as a continuous 72 h i.v. infusion gave steady state plasma levels in the range of 10 ng/ml (0.044  $\mu\text{M}$ ) [21]. In our pilot study on patients with advanced lung cancer, we used intensive dose DAC (400 to 660  $\text{mg}/\text{m}^2$  as 8 h i.v. infusion) and observed some very promising responses [22]. The mean steady-state DAC plasma level in our study was estimated to be  $\sim$ 650 ng/ml (2.85  $\mu\text{M}$ ). These preliminary clinical observations indicate that higher plasma levels of DAC are required to obtain significant antitumor activity in patients and are in accord with our preclinical data. In addition, higher plasma levels of DAC also have the potential to overcome the problem of limited penetration of the anticancer drug into the tumor as a possible cause of failure to respond to chemotherapy [34]. The antitumor activity of DAC in patients undoubtedly merits further investigation in order to better refine the dose-scheduling of this epigenetic agent in patients.

## CONCLUSIONS

The *in vitro* assays indicate that the antineoplastic action of DAC on leukemic and tumor cells increase markedly with concentration. The *in vivo* antineoplastic action of DAC against murine leukemia and tumor also increase markedly with the dose. Pharmacokinetic analyses indicate that the plasma concentration of DAC that produce a potent *in vivo* antineoplastic effect is also very effective in reducing the *in vitro* clonogenicity of leukemic and tumor cells. These observations provide a strong rationale for dose intensification in future clinical studies in order to fully develop the chemotherapeutic potential of DAC in patients with cancer [35- 37]. Once a very effective dose schedule for DAC is established, combination studies with other gene reactivating drugs, such as histone deacetylase inhibitors, are warranted [38-41].



**COMPETING INTERESTS**

The authors declare that they have no competing interests.

**AUTHORS' CONTRIBUTIONS**

ML carried out the clonogenic assays, molecular studies, chemotherapy of leukemia in mice and drafted the manuscript.

GGC carried chemotherapy of tumors in mice, clonogenic assays, and drafted the manuscript.

NJ-MR carried out the pharmacokinetic experiments and drafted the manuscript.

LFM carried out the chemotherapy of leukemia in mice. AH performed the clonogenic assays on tumors.

MLB evaluated the data and drafted the manuscript. RLM conceived the study, participated in its design and coordination, and helped to draft the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

**REFERENCES**

1. Jones PA, Laird PW: Cancer epigenetics comes of age. *Nat Genet* 1999,21:163-7.
2. Jones PA, Baylin SB: The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet* 2002, 3:415-428.
3. Momparler RL, Bovenzi V: DNA methylation and cancer. *J Cell Physiol* 2000, 183:145-154.
4. Momparler RL: Epigenetic therapy of cancer with 5-aza-2'-deoxycytidine (decitabine). *Semin Oncol* 2005, 32:443-451.
5. Momparler RL: Pharmacology of 5-Aza-2'-deoxycytidine (decitabine). *Semin Hematol* 2005, 42:S9-16.
6. Momparler RL, Gonzales FA: Effect of intravenous infusion of 5-aza-2'-deoxycytidine on survival time of mice with L1210 leukemia. *Cancer Res* 1978, 38:2673-2678.
7. Wilson VL, Jones PA, Momparler RL: Inhibition of DNA methylation in L1210 leukemic cells by 5-aza-2'-deoxycytidine as a possible mechanism of chemotherapeutic action. *Cancer Res* 1983, 43 :3493-3496.
8. Lemaire M, Momparler LF, Bernstein ML, Marquez VE, Momparler RL: Enhancement of antineoplastic action of 5-aza-2'-deoxycytidine by zebularine on L1210 leukemia. *Anticancer Drugs* 2005, 16:301-308.
9. Braakhuis BJ, van Dongen GA, van Walsum M, Leyva A, Snow GB: Preclinical antitumor activity of 5-aza-2'-deoxycytidine against human and neck cancer xenografts [corrected]. *Invest New Drugs* 1988, 6:299-304.
10. Jones PA, Taylor SM: Cellular differentiation, cytidine analogs and DNA methylation. *Cell* 1980, 20:85-93.
11. Momparler RL, Dore BT, Momparler LF: Effect of 5-aza-2'-deoxycytidine and retinoic acid on differentiation and c-myc expression in HL-60 myeloid leukemic cells. *Cancer Lett* 1990, 54:21-28.
12. Pinto A, Attadia V, Fusco A, Ferrara F, Spada OA, Di Fiore PP: 5-Aza-2'-deoxycytidine induces terminal differentiation of leukemic blasts from patients with acute myeloid leukemias. *Blood* 1984, 64:922-929.

13. Issa JP, Garcia-Manero G, Giles FJ, Mannari R, Thomas D, Faderl S, Bayar E, Lyons J, Rosenfeld CS, Cortes J, Kantarjian HM: Phase 1 study of low-dose prolonged exposure schedules of the hypomethylating agent 5-aza-2'-deoxycytidine in hematopoietic malignancies. *Blood* 2004,103:1635-1640.
14. Kantarjian HM, O'Brien S, Cortes J, Giles FJ, Faderl S, Issa JP, Garcia-Manero G, Rios MB, Shan J, Andreeff M, Keating M, Talpaz M: Results of decitabine therapy in 130 patients with chronic myelogenous leukemia. *Cancer* 2003, 98:522-528.
15. Wijermans P, Lubbert M, Verhoef G, Bosly A, Ravoet C, Andre M, Ferrant A: Lowdose 5-aza-2'-deoxycytidine, a DNA hypomethylating agent, for the treatment of high-risk myelodysplastic syndrome: a multicenter phase II study in elderly patients. *J Clin Oncol* 2000, 18:956-962.
16. Ruter B, Wijermans PW, Lubbert M: Superiority of prolonged low-dose azanucleoside administration? Results of 5-aza-2'-deoxycytidine retreatment in high-risk myelodysplasia patients. *Cancer* 2006, 106:1744-1750.
17. Kantarjian H, Issa JP, Rosenfeld CS, Bennett JM, Albitar M, DiPersio J, Klimek V, Slack J, de Castro C, Ravandi F, Helmer R 3<sup>rd</sup>, Shen L, Nimer SD, Leavitt R, Raza A, Saba H: Decitabine improves patient outcomes in myelodysplastic syndromes: results of a phase III randomized study. *Cancer* 2006, 106:1794-1803.
18. Rivard GE, Momparler RL, Demers J, Benoit P, Raymond R, Lin K, Momparler LF: Phase I study on 5-aza-2'-deoxycytidine in children with acute leukemia. *Leukemia research* 1981, 5:453-462.
19. van Groeningen CJ, Leyva A, O'Brien AM, Gall HE, Pinedo HM: Phase I and pharmacokinetic study of 5-aza-2'-deoxycytidine (NSC 127716) in cancer patients. *Cancer Res* 1986, 46:4831-4836.
20. Samlowski WE, Leachman SA, Wade M, Cassidy P, Porter-Gill P, Busby L, Wheeler R, Boucher K, Fitzpatrick F, Jones DA, Karpf AR: Evaluation of a 7-day continuous intravenous infusion of decitabine: inhibition of promoter-specific and global genomic DNA methylation. *J Clin Oncol* 2005, 23:3897-3905.
21. Schrupp DS, Fischette MR, Nguyen DM, Zhao M, Li X, Kunst TF, Hancox A, Hong JA, Chen GA, Pishchik V, Figg WD, Murgu AJ, Steinberg SM: Phase I

- study of decitabine-mediated gene expression in patients with cancers involving the lungs, esophagus, or pleura. *Clin Cancer Res* 2006, 12 :5777-5785.
22. Momparler RL, Bouffard DY, Momparler LF, Dionne J, Belanger K, Ayoub J: Pilot phase I-II study on 5-aza-2'-deoxycytidine (Decitabine) in patients with metastatic lung cancer. *Anti-Cancer Drugs* 1997, 8:358-368.
  23. Rockwell SC, Kallman RF, Fajardo LF: Characteristics of a serially transplanted mouse mammary tumor and its tissue-culture-adapted derivative. *J Natl Cancer Inst* 1972, 49:735-749.
  24. Otterson GA, Khleif SN, Chen W, Coxon AB, Kaye FJ: CDKN2 gene silencing in lung cancer by DNA hypermethylation and kinetics of p16INK4 protein induction by 5-aza 2' deoxycytidine. *Oncogene* 1995, 11:1211-1216.
  25. Brenner AJ, Stampfer MR, Aldaz CM: Increased p16 expression with first senescence arrest in human mammary epithelial cells and extended growth capacity with p16 inactivation. *Oncogene* 1998, 17:199-205.
  26. Yang AS, Estecio MR, Doshi K, Kondo Y, Tajara EH, Issa JP: A simple method for estimating global DNA methylation using bisulfite PCR of repetitive DNA elements. *Nucleic Acids Res* 2004, 32:e38.
  27. Rockwel SC: Tumor-Cell Survival. In *Tumor Models in Cancer Research* Edited by: BA Teicher. Totowa (NJ): Humana Press; 2002: 617-631.
  28. Hsu JC, Peruggia M: Graphical representation of Tukey's multiple comparison method. *J Computational Graphical Statistics* 1994, 3:143-161.
  29. Chabot GG, Momparler RL: Antileukemic activity of 5-aza-2'-deoxycytidine and cytarabine against intracerebral L1210 murine leukemia. *Cancer Treat Rep* 1984, 68:1483-1487.
  30. Momparler RL, Samson J, Momparler LF, Rivard GE: Cell cycle effects and cellular pharmacology of 5-aza-2'-deoxycytidine. *Cancer Chemother Pharmacol* 1984, 13:191-194.
  31. Momparler RL, Momparler LF, Samson J. Comparison of the antileukemic activity of 5-Aza-2'-deoxycytidine, 1-β-D-arabinofuranosyl-cytosine and 5-azacytidine against L1210 leukemia. *Leukemia Res* 1984, 8:1043-1049.

32. Mayer RJ, Davis RB, Schiffer CA, Berg DT, Powell BL, Schulman P, Omura GA, Moore JO, McIntyre OR, Frei E. Intensive postremission chemotherapy in adults with acute myeloid leukemia. *New Engl J Med* 1994, 331:896-903.
33. Kvinlaug BT, Huntly BJP: Targeting cancer stem cells. *Expert Opin Ther Targets* 2007, 11:915-927.
34. Tannock IF, Lee CM, Tunggall JK, Cowan DSM, Egorin MJ: Limited penetration of anticancer drugs through tissue: A potential cause of resistance of solid tumors to chemotherapy. *Clin Cancer Res* 2002, 8:878-884.
35. Chabot GG Momparler RL: Pharmacokinetics of 5-aza-2'-deoxycytidine in animals and man: relevance to clinical trials. In *5-Aza-2'-deoxycytidine: preclinical and clinical studies* Edited by: Dick de Vos and Richard L Momparler. Haarlem, (Netherlands) : PCH; 1990: 105-115.
36. Momparler RL, Cote S, Eliopoulos N: Pharmacological approach for optimization of the dose schedule of 5-Aza-2'-deoxycytidine (Decitabine) for the therapy of leukemia. *Leukemia* 1997, 11 Suppl 1:1-6.
37. Skipper HE, Schabel FM, Jr., Mellett LB, Montgomery JA, Wilkoff LJ, Lloyd HH, Brockman RW: Implications of biochemical, cytokinetic, pharmacologic, and toxicologic relationships in the design of optimal therapeutic schedules. *Cancer Chemother Rep* 1970, 54:431-450.
38. Primeau M, Gagnon J, Momparler RL: Synergistic antineoplastic action of DNA methylation inhibitor 5-aza-2'-deoxycytidine and histone deacetylase inhibitor depsipeptide on human breast carcinoma cells. *Intl J Cancer* 2003, 103 :177-184.
39. Lemaire M, Momparler LF, Farinha NJ, Bernstein M, Momparler RL: Enhancement of Antineoplastic Action of 5-Aza-2'-deoxycytidine by Phenylbutyrate on L1210 Leukemic Cells. *Leuk & Lymphoma* 2004, 45:147-154.
40. Dokmanovic M, Clarke C, Marks PA: Histone deacetylase inhibitors: Overview and perspectives. *Mol Cancer Res* 2007, 5:981-989.
41. Piekarz RL, Sackett DL, Bates SE: Histone deacetylase inhibitors and demethylating agents: clinical development of histone deacetylase inhibitors for cancer therapy. *Cancer J* 2007, 13:30-39.

**CINQUIÈME PARTIE**  
**DISCUSSION GÉNÉRALE / CONCLUSIONS**

## DISCUSSION

Les recherches effectuées dans le cadre de ce projet de doctorat ont porté sur 1- la potentialisation de l'action de la 5-Aza-CdR en combinant ce composé à différents agents chimiothérapeutiques ayant des mécanismes d'action complémentaires, et 2- la caractérisation du protocole d'administration idéal de la 5-Aza-CdR en monothérapie. Les résultats de ces études ont été l'objet de différentes publications (Lemaire et coll., 2004 ; 2005 ; 2008a et 2008b).

### DISCUSSION SUR LA MÉTHODOLOGIE UTILISÉE

Le traitement de la leucémie vise à éradiquer toutes les cellules atteintes, incluant les cellules souches cancéreuses (CSC) qui sont souvent résistantes à la plupart des traitements (Oakley & Van Zant, 2007). Ces CSC ont un pouvoir clonogénique et peuvent donc théoriquement initier de nouveau la maladie (Clarke & Becker, 2006 ; Oakley & Van Zant, 2007). Nous avons donc voulu évaluer l'activité *in vitro* des différents agents, seuls et en combinaison, sur le potentiel clonogénique de cellules leucémiques qui forment normalement des clones. Suite au traitement, les cellules qui lui ont survécu prolifèrent et forment des clones puis des colonies qui sont visibles à l'œil nu généralement en moins de deux semaines. Cette méthode est plus représentative de la réponse attendue aux agents chimiothérapeutiques *in vivo* que, par exemple, des essais d'inhibition de croissance cellulaire qui ne reflètent que la diminution de la prolifération cellulaire pendant le traitement. De plus, parce qu'elle tient en compte tous les événements cellulaires pouvant survenir, cette méthode est plus efficace *in vivo* pour évaluer l'efficacité d'un agent que si on mesurait certains autres paramètres, comme le volume ou le poids de la tumeur, qui ne nous renseignent pas sur la capacité des SCS à former de nouveau clones (Rockwell, 2002).

Les essais d'inhibition de clonogénicité présentent toutefois certaines limitations. Les conditions de culture font en sorte que les clones ne sont pas dans un milieu représentatif de l'environnement des cellules leucémiques *in vivo* (Minchinton & Tannock, 2006). Malgré tout, cette méthode est celle de choix pour évaluer l'activité d'un agent antinéoplasique (Brown & Attardi, 2005).

Nous avons ensuite évalué *in vivo* les effets des différents agents ayant fait l'objet d'études dans cette thèse, administrés seuls et en combinaison. Nous avons utilisé le modèle murin de leucémie lymphoïde de type L1210 pour évaluer l'effet anti-leucémique des ces agents. Ce modèle a été développé en 1949 (Law et coll., 1949) et a été parmi les premiers modèles à être largement utilisés pour la recherche d'agents antinéoplasiques par le *National Cancer Institute* (États-Unis). Nous avons choisi d'utiliser ce modèle en faisant l'inoculation intraveineuse (i.v.) des cellules L1210 (Chapitre 11). Un délai est ensuite alloué avant le début de la chimiothérapie pour permettre la dissémination des cellules L1210 dans la souris. La distribution cellulaire devient alors semblable à celle observée chez l'humain ; les cellules se propagent via le système circulatoire, formant rapidement des nodules dans le foie, la rate (Skipper et coll., 1965 ; Momparler & Gonzales, 1978) et atteignant même le système nerveux central pour produire des leucémies méningées. Classiquement, les souris présentent alors certains signes cliniques associés à la progression de la leucémie, soit un affaiblissement général, des difficultés à respirer, un hérissément des poils ainsi que l'adoption d'une position recroquevillée. La perte de poids de la souris corrèle typiquement avec la toxicité de l'agent, et non avec la leucémie, bien que des analyses hématologiques soient plus précises pour évaluer cette toxicité (Talmadge et coll., 2007). Bien utilisé, le modèle peut donc servir à prédire et à prévenir la toxicité de l'agent chez l'humain. Au surplus, la distribution anatomique des cellules similaire à celle observée chez l'humain permet une interaction tumeur-hôte plus représentative de la réalité que dans le modèle classique de type L1210, où les cellules sont injectées i.p. ; les expériences sur l'ascite produit ressemblant plus à une expérimentation *in vitro* chez l'animal qu'à une manipulation *in vivo*.



Étant donné le grand potentiel clonogénique des cellules L1210, le modèle utilisé est prévisible, sensible et rapide ; en théorie, la présence d'une seule cellule L1210 entraînerait la mort de la souris en 14 jours (Momparler & Gonzales, 1978), ce qui illustre bien la similarité entre la population cellulaire de type L1210 et les CSC.

Certaines limitations sont tout de même rencontrées avec ce modèle ; d'abord, il ne s'agit que de mâles identiques, appelés clones, issus d'une même lignée. Toutes les variables sexuelles (hormones, proportion du tissu adipeux et de la masse musculaire, ...) qui influencent à la fois la maladie et la réponse au traitement sont mises de côté.

La validité de ce modèle animal réside en son habileté à prédire la réponse clinique. Pour y arriver, les variables doivent cependant représenter le plus fidèlement possible l'être humain. Certaines corrélations établies nous permettent d'ailleurs d'estimer la réponse attendue chez l'humain. Par exemple, Freireich et coll. (1966) ont montré que la dose maximale tolérée (MTD) chez l'humain est le douzième de la dose létale notée chez 10% des souris (LD10). De plus, la MTD/LD10 obtenues chez la souris représente la dose maximale absolue qui sera administrée chez l'humain lors d'essais cliniques avec des agents chimiothérapeutiques (Talmadge et coll., 2007). Aussi, l'extrapolation des résultats chez l'humain doit se faire en tenant compte de la durée du cycle cellulaire. Les cellules L1210 ont un temps de doublement d'environ 12 heures *versus* un temps de doublement des cellules leucémiques de plus de 60 heures chez l'humain (Raza et coll., 1990).

D'autres paramètres, comme la finalité de l'expérience, doivent aussi avoir une signification clinique ; par exemple, le fait de mesurer la capacité d'un agent à ralentir la croissance de la tumeur a peu de répercussion en clinique. L'évaluation du temps de survie est cependant cliniquement plus valable (Hann, 2001).

D'autres modèles ont été développés pour l'évaluation de l'effet anti-leucémique d'agents chimiothérapeutiques, mais ceux-ci sont peu rapides (ex. :

modèle génétiquement modifié (Kuo et coll., 2006)) et ne reflètent pas bien le temps de survie à la leucémie suite au traitement (ex. : modèle immunodéficient transplanté avec des cellules humaines (Shen et coll., 2007)). Il est à noter que l'emploi du modèle leucémique murin L1210 n'est pas indiqué dans l'évaluation de l'effet d'agents contre les tumeurs solides (Schuh, 2004).

La validité du modèle animal dépend d'abord du choix de celui-ci ; notre modèle leucémique murin L1210 est prévisible, sensible et rapide. La croissance cellulaire est idéale pour l'étude d'agents agissant en phase S du cycle cellulaire, comme la 5-Aza-CdR. De plus, la distribution cellulaire est similaire à celle observée chez l'humain. Cependant, le design même du modèle idéal devient alors le point faible de celui-ci ; toutes les variables étant idéales pour l'étude de l'agent chimiothérapeutique, le modèle ne représente plus une population hétérogène où les réponses sont variables. La validité du modèle dépend aussi de l'utilisation qu'on en fait. Tout résultat se doit d'être interprété comme en étant un obtenu chez l'animal, et non chez l'humain. Le modèle murin reste donc une approximation de la réalité.

## DISCUSSION SUR LES RÉSULTATS

### **Les inhibiteurs des déacétylases des histones potentialisent l'effet de la 5-Aza-CdR.**

Les études de Cameron et coll. (1999) ont montré que la combinaison d'agents ciblant à la fois la méthylation de l'ADN et la déacétylation des histones produit une réactivation synergique du gène suppresseur de tumeur p15. Leurs observations permirent de démontrer l'existence d'une complémentarité entre deux mécanismes épigénétiques : la méthylation de l'ADN et la déacétylation des histones des chromosomes. Nous nous sommes donc intéressés à ce phénomène ; nous avons évalué l'effet anti-leucémique *in vitro* et *in vivo* de la 5-Aza-CdR en combinaison avec différents HDACi, soit le PB, le LAQ824 et le SAHA. Ces études ont fait l'objet d'une publication (*Leukemia & Lymphoma*) en 2004 (Lemaire et coll., 2004) et d'un article prêt à être soumis (annexe 7).

Nos résultats démontrent bien que la co-administration de la 5-Aza-CdR avec un HDACi produit une perte de clonogénicité plus importante que chacun des agents seuls, et ce, sur différentes lignées cellulaires leucémique murines et humaines (Lemaire et coll., 2004 ; figure 13-3). D'abord, le PB potentialise d'une façon synergique la perte de clonogénicité induite par la 5-Aza-CdR sur les cellules leucémiques lymphoïdes murines et myéloïdes humaines (Valeriote & Lin, 1975) à des concentrations pouvant être administrées chez des patients atteints de leucémie (Gore & Carducci, 2000; Rivard et coll., 1981). Les études précliniques avec le PB indiquent qu'il doit être administré sur de longue période pour produire une réponse objective chez des sujets leucémique. Étant donné qu'il y a potentialisation de l'activité anti-clonogénique du PB par la 5-Aza-CdR (et *vice versa*), il serait intéressant de vérifier lors d'études cliniques si cette combinaison influence la perte de clonogénicité de façon similaire. La co-administration des HDACi LAQ et SAHA

avec la 5-Aza-CdR produit aussi une inhibition de clonogénicité plus importante que celle induite par chacun des agents.

Par ailleurs, la combinaison de la 5-Aza-CdR et du PB induit une réactivation synergique du TSG p15 dans les cellules lymphoïdes murines (Lemaire et coll., 2004 ; figure 13-4), tout comme ce qu'avait observé Cameron et coll. (1999) lors de leur démonstration de la complémentarité de la méthylation de l'ADN et de la déacétylation des histones. Le gène p15 est fréquemment réprimé dans la leucémie (Wong et coll., 2000 ; Esteller et coll., 2001). La démonstration de sa réactivation par la co-administration de la 5-Aza-CdR et du PB suggère aussi que ces agents pourraient être utilisés dans le traitement de la leucémie.

Nous avons ensuite évalué *in vivo* les effets de la combinaison de la 5-Aza-CdR d'un HDACi. L'utilisation du modèle animal permet de comparer des résultats obtenus *in vitro* et *in vivo* et de spéculer sur l'extrapolation des effets observés à l'humain. Nous avons remarqué une augmentation du temps de survie des souris leucémiques traitées avec la combinaison du PB et de la 5-Aza-CdR, par rapport à celui produit par chacun des agents seuls (Lemaire et coll., 2004 ; table 13-2). Malgré la survie d'une seule journée supplémentaire des souris avec cette combinaison, des analyses plus poussées montrent que la médication a générée 1,86 log kill, ce qui représente une fraction cellulaire de survie d'environ 1.4% seulement, alors que la 5-Aza-CdR et le PB réduisent la fraction cellulaire de survie à 5,4% et de 79,4% respectivement (annexe 2). Notons ici que malgré le faible pourcentage de survie cellulaire suite au traitement avec la combinaison, les cellules restantes ont pu induire la mort des animaux en 10 jours. Au moment de cette mort, les souris ayant reçu les deux agents montraient des signes cliniques normalement observées lors de la progression de la leucémie. Au surplus, des analyses plus poussées nous montrent une augmentation du volume du foie et de la rate, ainsi que la présence de nodules dans ces organes. Ces observations suggèrent que la dissémination cellulaire des cellules leucémiques est responsable de l'apparition des symptômes de la maladie, puis de la mort des sujets. L'augmentation du temps de survie des souris ayant reçu la 5-Aza-

CdR et le PB par rapport à chacun des agents seuls, suggère que la co-administration de ces agents lors d'études cliniques pourrait permettre aux patients d'améliorer leur réponse au traitement, et corrèle avec les résultats obtenus *in vitro*. Par surcroît, étant donné que chacun de ces agents a déjà démontré une activité préclinique intrinsèque contre la leucémie (Rivard et coll., 1981 ; Gore et coll., 2001), la combinaison de ceux-ci semble être une stratégie thérapeutique tout à fait appropriée.

Quelques hypothèses sont proposées pour expliquer le mécanisme de complémentarité observé lors de la co-administration de la 5-Aza-CdR avec un des HDACi :

- 1- D'abord, l'incorporation de la 5-Aza-CdR dans l'ADN permet la séquestration de la DNMT et conduit à une hypométhylation subséquente du génome (Jüttermann et coll., 1994). Cette perte de groupement CH<sub>3</sub> diminue la présence de protéines qui se lieraient normalement aux 5-mC (ex : MECP1 et 2) et des co-répresseurs transcriptionnels qui leur sont généralement associés (ex : Sin3, N-Cor, SMRT). L'accès des facteurs de transcription aux promoteurs de différents gènes, dont les TSGs est alors facilité. L'ajout d'HDACi favoriserait l'action des acétyltransférases des histones (HATs), l'ouverture de la chromatine et du même coup un meilleur accès des facteurs de transcription aux promoteurs des gènes.
- 2- Par ailleurs, de récentes données suggèrent que la chromatine inactive pourrait induire directement l'augmentation de la méthylation de l'ADN (Ben-Porath & Cedar, 2001) en favorisant le recrutement de la DNMT aux promoteurs des gènes. Inversement, la chromatine active mènerait à une déméthylation (Szyf, 2003). Cette observation impliquerait que l'administration d'HDACi pourrait diminuer la méthylation globale de l'ADN et ré-exprimer certains gènes (Johnstone, 2002 ; Wu et coll., 2008), et que l'ajout de la 5-Aza-CdR ne ferait qu'augmenter cet effet.
- 3- L'inhibition des HDACs permet aussi au complexe HDACs-HACs de recruter certains facteurs de transcription et de réguler certains TSGs gène, comme p21, ce qui conduit en une hypophosphorylation de la protéine Rb. Rb ne permet alors pas

la relâche de facteurs de transcription nécessaire au passage des cellules en phase S et favorise donc l'accumulation des cellules en phase G1, diminuant du même coup le nombre de cellule en phase S. Nos résultats (Lemaire et coll., 2004) montrent d'ailleurs que la co-administration du PB et de la 5-Aza-CdR favorise une meilleure inhibition la synthèse de l'ADN de cellules leucémiques.

- 4- De récentes recherches tendent à montrer que l'inhibition de la prolifération cellulaire synergique observée lors de la co-administration d'un HDACi et de la 5-Aza-CdR n'impliquerait peut-être pas une synergie d'action sur des phénomènes épigénétique. En effet, Chai et coll. (2008) ont récemment montré que l'ajout d'HDACi ralentirait le retrait habituellement observé de la base 5-Aza-CdR par le système de réparation de l'ADN, potentialisant du même coup son action anti-leucémique.

On ignore si ces modèles coexistent, mais à la lumière de nos résultats, il semble évident qu'il y a une complémentarité d'effets entre l'inhibiteur de la méthylation de l'ADN 5-Aza-CdR et les différents HDACi. Par ailleurs, depuis la première démonstration par Cameron et coll. (1999), d'autres groupes ont confirmé cette interaction à l'aide d'inhibiteurs de la méthylation de l'ADN et d'HDACi sur différents cancer (Bovenzi & Momparler, 2001 ; Boivin et coll., 2002 ; Gagnon et coll., 2003).

Une seule étude est présentement en cours selon le *US National Institute of Health* avec une combinaison d'un HDACi et de la 5-Aza-CdR. Le coût lié à ses études est élevé, et très peu d'entreprises veulent entreprendre des études cliniques avec deux agents chimiothérapeutiques expérimentaux. L'approbation récente de la 5-Aza-CdR devrait faciliter l'apparition de nouvelles études.

### **Le zebularine potentialise l'effet anti-leucémique de la 5-Aza-CdR.**

Après avoir démontré *in vitro* et *in vivo* que la combinaison de la 5-Aza-CdR avec un HDACi semble être une stratégie thérapeutique intéressante, nous nous sommes intéressés à la possibilité de potentialiser les effets de la 5-Aza-CdR en empêchant sa dégradation. En effet, le catabolisme de la 5-Aza-CdR par l'enzyme cytidine (CR) désaminase résulte en une perte complète de son action anti-leucémique (Bouffard et coll., 1993 ; Chabot et coll., 1983a ; Camiener & Smith, 1965). La CR désaminase est très active dans le foie et la rate, ce qui contribue à l'élimination rapide par désamination des analogues de la désoxycytidine (CdR). D'ailleurs, les cellules néoplasiques qui surexpriment la CR désaminase présentent une résistance à ces analogues (Momparker & Onetto-Pothier, 1989 ; Eliopoulos et coll., 1998). En 1991, Driscoll et coll. montrèrent que la co-administration du zebularine, un inhibiteur de la CR désaminase, avec l'ara-C, un analogue de la CdR, double l'efficacité antinéoplasique de cette dernière *in vivo*. Nous nous sommes donc intéressés à ce phénomène ; nous avons évalué l'effet anti-leucémique *in vitro* et *in vivo* de la 5-Aza-CdR en combinaison avec le zebularine. Ces études font l'objet de deux publications (*Anti-Cancer Drugs* ; Lemaire et coll., 2005 et *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* ; Lemaire et coll., 2008).

D'abord, nos résultats démontrent bien que la co-administration de la 5-Aza-CdR avec le zebularine produit une perte de clonogénicité plus importante que chacun des agents seuls, et ce, sur les lignées cellulaires leucémiques lymphoïdes murines L1210 et myéloïdes humaines HL-60 (Lemaire et coll., 2005 ; figure 14-3). Nous sommes d'ailleurs les premiers à avoir montré cette interaction sur des cellules leucémiques humaines. Ces cellules sont plus sensibles à l'effet de la combinaison des agents que les cellules L1210 ; peut-être est-ce dû à l'augmentation de l'activité de la CR désaminase induite par la 5-Aza-CdR dans cette lignée cellulaire (Momparker & Laliberté, 1990). La potentialisation de l'effet de la 5-Aza-CdR par le zebularine obtenue pourrait cependant découler d'un mécanisme autre que l'inhibition de la CR désaminase. En effet, Driscoll et coll. (1991) ont montré que le

zebularine, lorsqu'administré seul, a un certain potentiel anti-leucémique à forte dose, sans qu'on puisse en expliquer les causes. On connaît effectivement mal le rôle métabolique naturel de la CR désaminase humaine, mais on sait que son activité augmente dans certaines pathologies, comme dans l'arthrite rhumatoïde, ce qui suggère une certaine implication dans les voies des pyrimidines (Pérignon et coll., 1986).

L'explication du mécanisme d'action intrinsèque du zebularine a cependant été caractérisée en 2003 (Cheng et coll., 2003) ; il a la capacité d'inhiber les méthylations de l'ADN, tout comme la 5-Aza-CdR. La démonstration que la co-administration de la 5-Aza-CdR avec le zebularine produit une perte de clonogénicité plus importante que chacun des agents seuls pourrait donc être le résultat de différents mécanismes. D'abord, une partie de la réponse pourrait être attribuable à la diminution de la dégradation de la 5-Aza-CdR qu'induit le zebularine en inhibant la CR désaminase. Au surplus, l'effet anti-leucémique observé pourrait être le résultat de l'inhibition de la méthylation de l'ADN causée par les deux agents.

Nous avons ensuite évalué *in vivo* les effets de la combinaison de la 5-Aza-CdR du zebularine. Ici aussi, l'utilisation du modèle animal permet de comparer des résultats obtenus *in vitro* et *in vivo* et de spéculer sur l'extrapolation de ces observations à l'humain. De plus, les recherches *in vivo* nous permettent aussi d'évaluer l'influence de la présence de CR désaminase dans différentes cellules de l'hôte (foie, rate,...) sur la réponse. Nous avons étudié différents protocoles d'administration et tel qu'anticipé, le zebularine n'a pas augmenter le temps de survie des souris leucémiques aux doses utilisées (Lemaire et coll., 2005 ; Lemaire et coll., 2008a). La co-administration du zebularine avec la 5-Aza-CdR a pourtant potentialisé son anti-leucémique. 4 souris ont même obtenues le statut de " survivante à long-terme", c'est-à-dire qui ne présentent plus de cellules leucémiques suite à la chimiothérapie lorsque traitées avec la combinaison d'agents (Lemaire et coll., 2005 ; table 14-2). Ces résultats tendent à confirmer nos résultats obtenus *in vitro* ainsi que ceux obtenus par Driscoll et coll. (1991) montrèrent que la co-administration du



zebularine avec de l'ara-C, un analogue de la CdR, augmente l'efficacité antinéoplasique de cette dernière dans ce modèle animal.

Nous avons aussi évalué l'effet du zebularine jumelé à une plus petite dose de la 5-Aza-CdR, dans le but de mieux cerner la réponse associée à la combinaison des agents. Ici encore, la co-administration des agents a permis une élévation du temps de survie des souris ; 27% des souris ont vécu plus longtemps que celles traitées uniquement avec la 5-Aza-CdR (Lemaire et coll., 2008a ; figure 15-3). D'ailleurs, la concentration plasmatique du 5-Aza-CdR double dans ce protocole lorsqu'elle est administrée en présence de zebularine (Lemaire et coll., 2008a ; table 15-3). Cette dernière observation nous laisse croire que l'effet ajouté par le zebularine serait dû à sa capacité d'inhiber la CR désaminase et conséquemment de prévenir la dégradation de la 5-Aza-CdR.

De plus, la combinaison de la 5-Aza-CdR et du zebularine induit une déméthylation du promoteur du TSG p57 ainsi que sa réactivation synergique dans les cellules myéloïdes humaines HL-60 (Lemaire et coll., 2005 ; figures 14-4 ; 14-5). La ré-expression du TSG p57 par la combinaison peut avoir une importance clinique, étant donné que la perte d'expression de p57 due à des méthylations dans son promoteur est rapportée dans certaines lignées cellulaires hématopoïétiques (Kikuchi et coll., 2002 ; Shen et coll., 2003) et dans 28 % des LMA hématopoïétiques (Kikuchi et coll., 2002). En plus, comme l'inactivation de ce gène par méthylation corrèle avec un mauvais pronostic (Toyota et coll., 2001), on peut penser qu'il a une importance clinique et que sa ré-expression pourrait être bénéfique pour les patients.

La co-incubation des cellules avec la 5-Aza-CdR et le zebularine induit une ré-expression synergique du gène p57, sans pour autant que le zebularine lui-même ne ré-exprime ce gène (Lemaire et coll., 2005 ; figure 14-4). Cette dernière observation nous laisse croire que l'effet observé est surtout dû à une inhibition de la CR désaminase, permettant ainsi à un plus grand pourcentage de la dose de la 5-Aza-CdR d'être incorporé dans l'ADN.

Nous avons voulu clarifier l'interaction observée entre la 5-Aza-CdR et le zebularine en exploitant un modèle *in vitro* qui surexprime la CR désaminase (Eliopoulos et coll., 1998), soit des fibroblastes murins transfectés avec le gène de la CR désaminase (cellules V5) et présentant une activité enzymatique 20 fois supérieure aux cellules non transfectées (Lemaire et coll., 2008a ; table 15-1). Cette surexpression de l'activité de la CR désaminase confère aux cellules transfectées V5 une résistance à la 5-Aza-CdR ; ce modèle en est donc un représentatif de la résistance aux analogues de la CdR.

Par ailleurs, nous avons montré que le zebularine inhibe compétitivement la désamination de la 5-Aza-CdR ( $K_i$  de 0.95  $\mu\text{M}$ ) et potentialise du même coup l'action de la 5-Aza-CdR seulement sur les cellules transfectées qui surexpriment la CR désaminase. En effet, la combinaison sur les cellules normales n'accroît pas la perte de clonogénicité induite par la 5-Aza-CdR elle-même, indiquant que l'action du zebularine est tributaire de l'activité de la CR désaminase (Lemaire et coll., 2008a ; figure 15-2).

Même si nos résultats semblent montrer que l'effet de la co-administration de la 5-Aza-CdR et du zebularine serait surtout imputable au pouvoir d'inhibition de la CR désaminase par le zebularine, il ne faut pas négliger la capacité qu'a cet agent d'inhiber la méthylation de l'ADN. En effet, Cheng et coll. (2004a) ont montré que la ré-expression du TSG p16 dans des cellules T24 (carcinome de la vessie) est détectable dès la fin d'un traitement (500  $\mu\text{M}$  de zebularine) continu de 48 h et est maximale à 72 h. Comme avec la 5-Aza-CdR, il est possible que le zebularine puisse induire la réactivation de certains gènes rapidement (Samlowski et coll., 2005) ou qu'après de très longue période de traitement (Schump et coll., 2006). Il est donc possible que le zebularine induise une ré-expression du TSG p57 détectable suite à un traitement sur de plus longue période, ou peut-être avec une concentration plus élevée. Effectivement, il est intéressant de noter que nous avons utilisé une dose de zebularine 1000 fois inférieure à ce que Cheng et coll. (2004a) durent employer pour

ré-exprimer le TSG p16, et nous avons pourtant obtenu une ré-expression synergique lorsque nous l'avons combiné à la 5-Aza-CdR (Lemaire et coll., 2005 ; figure 14-4).

Aucune étude clinique n'est présentement en cours pour évaluer l'efficacité du zebularine, car il faudrait environ 1g/kg de masse corporelle pour qu'il puisse inhiber la DNMT lorsqu'administré seul. Les résultats de nos recherches sont d'autant plus intéressants, car nous avons montré qu'à de très faible dose, il est possible de potentialiser les effets du 5-Aza-CdR. Pour obtenir les mêmes résultats qu'avec la combinaison de la 5-Aza-CdR et du zebularine, il faudrait augmenter d'environ 10 fois la dose de la 5-Aza-CdR (Lemaire et coll., 2005 ; table 14-1 ; figure 14-3). Augmenter la dose signifie aussi une intensification des effets secondaires, ce que ne semble pas provoquer l'ajout du zebularine, si on se fie à nos observations chez la souris (moins de 3% de perte de poids) (Lemaire et coll., 2005 ; Lemaire et coll., 2008a). Peut-être serait-il aussi possible d'utiliser le zebularine à la suite d'un traitement à la 5-Aza-CdR, car Cheng et coll. (2004a) ont montré que l'administration continue du zebularine (50  $\mu$ M pendant 30 jours) permettait de maintenir pendant plusieurs semaines l'expression du TSG p16 préalablement induite par un traitement de 24h à la 5-Aza-CdR (1  $\mu$ M). Par ailleurs, nos études sur le modèle transfecté V5 indiquent que d'un point de vue clinique, l'administration du zebularine pourrait permettre aux patients qui présentent une résistance aux analogues de la CdR consécutive à l'augmentation de l'activité de leur CR désaminase de bénéficier eux aussi de ces traitements.

### **Protocole d'administration optimal de la 5-Aza-CdR.**

Bien que des dizaines d'études cliniques évaluant les effets de la 5-Aza-CdR sur des patients leucémiques aient été réalisées depuis le début des années 1980, et malgré que cet agent soit approuvé depuis 2006 dans le traitement des syndromes myélodysplasiques aux États-Unis, son protocole d'administration optimal, en termes de dose et de durée, reste à être déterminé.

Pour déterminer le protocole d'administration optimal de la 5-Aza-CdR, nous avons d'abord traité des cellules leucémiques humaines et murines de différentes façons. La ré-expression génique, ainsi que l'inhibition de croissance cellulaire, de synthèse d'ADN et de la formation de colonies a servi à évaluer l'efficacité de cet agent *in vitro*, alors que le temps de survie des souris leucémiques a permis l'évaluation *in vivo*. Par ailleurs, l'utilisation d'un modèle animal nous a permis de comparer les données obtenues *in vitro* et *in vivo* et d'ainsi pouvoir spéculer sur l'extrapolation des effets observés à l'humain. Les résultats de ces recherches ont fait l'objet d'une publication dans *BioMed Central Cancer* (Lemaire et coll., 2008b).

Rivard et coll. (1981) observèrent certaines réponses avec la 5-Aza-CdR sur de jeunes patients ayant une leucémie résistante aux chimiothérapies conventionnelles. Une dose totale de 2 400 mg/m<sup>2</sup> (sur 38 h) permis de réduire la douleur osseuse perçue par ces enfants et de diminuer la présence de la leucémie méningée, tout en limitant les effets secondaires (nausée, vomissement, diarrhée). Par contre, ce protocole n'a pas permis d'atteindre des rémissions. Ce même groupe modifia l'expérimentation et observa une réponse dans 80% des cas, et même une rémission de 6 mois avec le protocole suivant : 2 010 mg/m<sup>2</sup> (30 mg/m<sup>2</sup>/h en infusion X 60 h + 7 injections de 1 mg/kg aux 10 h), suggérant que de plus longues infusions amènent de meilleurs résultats (Momparler, 1985a). Plusieurs autres protocoles montrent que l'allongement de la durée de l'infusion semble influencer la réponse et que la diminution du dosage réduit aussi le nombre de réponses (Kantarjian et coll., 1997; Aparicio et coll. 2003).

D'autre part, de plus en plus de groupes misent sur l'administration de petites doses de la 5-Aza-CdR (5 - 15 mg/m<sup>2</sup>/j) réparties sur de plus longues périodes dans le temps (10 à 20 jours). Ce protocole d'utilisation permettrait de réduire la toxicité de la 5-Aza-CdR et de modifier l'épigénome de la tumeur tout en ayant un bon pourcentage de réponses objectives. Plusieurs protocoles ont récemment fait l'objet de publications (tableau 5-1).

La 5-AZA-CdR est donc présentement administrée en étude clinique de deux façons, soit (*voir* 5.1.6): 1) à haute dose (environ 1 000 - 2 500 mg/m<sup>2</sup>) sur de courte période (1 - 72 h), ce qui produit une cytotoxicité cellulaire désirée accompagnée d'une myélosuppression parfois sévère, ou 2) à faible dose (~ 150 mg/m<sup>2</sup>) sur de plus longue période (10 - 20 jours), ce qui produit une différenciation cellulaire et une réactivation de gènes suppresseurs de tumeurs (instable et parfois à long terme), tout en produisant peu de toxicité.

Nos résultats démontrent que la 5-Aza-CdR induit une perte de clonogénicité sur les cellules leucémiques murines L1210 et humaines HL-60, et par surcroît, sur des cellules tumorales EMT6. Cette inhibition clonogénique est dépendante de la dose, en termes de concentrations et de durée (Lemaire et coll., 2008b). D'abord, une concentration élevée (1000 ng/ml) à laquelle sont exposées les cellules HL-60 sur une courte période de 2 h produit 60% d'inhibition de clonogénicité, ce qui semble prévisible, étant donné leur cycle cellulaire. Leur temps de doublement étant d'environ 18 h et leur phase S de 9 h (Gilbertz et coll., 1998), il y a donc approximativement 50% des cellules qui sont dans cette phase pendant le traitement à la 5-Aza-CdR, qui peut alors s'incorporer à l'ADN. Une plus longue durée d'infusion (24 h), permettant à toutes les cellules d'être entrées en phase S au moins une fois, voire même deux, produit près de 99 % de perte de clonogénicité (Lemaire et coll., 2008b ; table 16-1). Des résultats similaires sont observés sur les cellules tumorales mammaires EMT6 et leucémiques murines L1210, indiquant que la durée d'administration de la 5-Aza-CdR est, tout comme la dose, tributaire de son action.

De plus, la déméthylation globale de l'ADN et la ré-expression de certains TSGs corrèle bien avec la perte de clonogénicité induite par la 5-Aza-CdR, augmentant avec la dose (Lemaire et coll., 2008b ; figure 16-1).

Nous avons ensuite évalué *in vivo* les effets d'augmentation de la dose de la 5-Aza-CdR. L'utilisation du modèle animal est très importante, puisqu'elle nous permet de comparer des résultats obtenus *in vitro* et *in vivo* et de spéculer sur l'extrapolation des effets observés à l'humain. À la lumière de nos résultats *in vitro*, nous avons choisi d'utiliser différentes concentrations de la 5-Aza-CdR infusées sur 18 h, soit un temps de doublement et demi des cellules L1210. Nous avons remarqué que le temps de survie des souris leucémiques traitées augmente avec la dose administrée (Lemaire et coll., 2008b ; figure 16-2). Nos résultats indiquent que 50% et 100% des souris sont considérées survivantes à long-terme suivant une infusion de 18 h avec des doses de la 5-Aza-CdR de 10 et 20 mg/kg, respectivement (Lemaire et coll., 2008 ; figure 16-3). Des analyses pharmacocinétiques montrent que ces concentrations correspondent à des niveaux plasmatiques à l'équilibre d'environ 190 ng/ml et 610 ng/ml. Nous n'avons pas observé de toxicité à ces doses (< 3% perte de poids). De précédentes études ont montrées qu'une plus courte exposition n'arrive pas à produire une thérapie curative (Momparler & Gonzales, 1978). Les essais clonogéniques sur les cellules L1210 montrent qu'une exposition de 18 h à la 5-Aza-CdR avec des doses de 100 ng/ml ou 1000 ng/ml induisent respectivement une perte de clonogénicité de 90% et de 100%, ce qui corrèle bien avec nos observations *in vivo*. Rappelons que dans ce modèle, la présence théorique d'une seule cellule L1210 entraînerait la mort de la souris en 14 jours (Momparler & Gonzales, 1978), illustrant du même coup l'importance des CSC qui survivent au traitement. Notons que Jones et Baylin (2007) ont observé que la 5-Aza-CdR pourrait effectivement amener les CSC à leur différenciation terminale. Des résultats similaires ont été obtenus avec les cellules EMT6 tumorales mammaires, indiquant que l'utilisation des données *in vitro* pour élaborer un protocole d'administration semble aussi efficace avec des cellules tumorales qu'avec un modèle de leucémie.

La 5-Aza-CdR produit peu de résultats sur les tumeurs lors d'études cliniques, mais, il est intéressant de noter que Momparler et coll. (1997a) ont réussi à observer une réponse intéressante en traitant des patients atteints d'un cancer du poumon avec une dose totale de 660 mg/m<sup>2</sup>, ce qui produit une concentration plasmatique moyenne était alors de ~0,6 µg/ml, dose similaire à laquelle nous avons obtenue la réponse maximale au traitement des souris leucémiques. Cette dose est supérieure à celles utilisées dans les autres études avec différentes tumeurs (Aparicio & Weber, 2002 ; Samlowski et coll., 2005 ; Schrump et coll., 2006). Un patient faisant partie de l'étude était toujours en vie 5 ans après la chimiothérapie (Momparler et coll., 1997a).

Serait-il possible d'extrapoler nos résultats à l'humain ? Il est intéressant de noter que non seulement nous avons obtenu une bonne corrélation entre nos résultats *in vitro* et le modèle murin L1210, mais aussi que les observations de Momparler et coll. (1984a) sur l'ara-C dans le modèle murin L1210 corrélaient avec les résultats obtenus en clinique avec des patients ayant la leucémie (Mayer et coll., 1994). Une extrapolation de nos données nous a alors permis d'élaborer un protocole d'administration clinique plus intensif que ce que suggère la littérature. En effet, des doses équivalentes à 10 fois la concentration requise pour produire une perte de clonogénique de 50% (IC<sub>50</sub> 15 ng/ml) des cellules *in vitro* L1210 ont été nécessaires *in vivo* pour obtenir des souris qui survivent à long-terme. Conséquemment, comme l'IC<sub>50</sub> des cellules HL-60 est de 20 ng/ml lors d'une exposition de 24h (soit près d'un temps et demi de doublement cellulaire), on peut s'attendre à devoir atteindre une concentration plasmatique d'au moins 0.2 µg/ml pour obtenir une réponse anti-leucémique partielle à long terme en clinique. Étant donné que cette concentration produit 99% de perte de clonogénicité, l'intensification de cette dose permettrait peut-être d'éradiquer les CSC et d'obtenir un pourcentage significatif de réponse à long terme. Il est bon de noter que cette intensification de la dose ne correspond pas à de fortes doses, mais bien à des doses plus élevées que ce que privilégient les nouveaux protocoles (faibles doses) qui ciblent l'épigénome (Aparicio et coll., 2003; Issa et coll., 2004; Samlowski et coll., 2005 ; Yang et coll., 2006).

Bien que Rivard et coll. (1981), en administrant 2 010 mg/m<sup>2</sup> en dose totale de la 5-Aza-CdR, aient obtenu une concentration plasmatique d'environ ~1 µg/ml (pendant environ 38h), ils ne réussirent pas à atteindre de rémission. Ils sont cependant parvenus, en diminuant légèrement la concentration (2 010 mg/m<sup>2</sup>) et en augmentant la durée d'infusion à 60h, à observer une réponse dans 80% des cas et même une rémission de 6 mois. Au-delà de la concentration, il est donc important de tenir compte de la pharmacologie de la 5-Aza-CdR, car cet agent doit être incorporé dans l'ADN cellulaire pour être actif. Étant donné que temps de doublement moyen des cellules leucémiques chez l'humain est d'environ 60 (Raza et coll., 1990), nous proposons une durée d'infusion couvrant un cycle cellulaire et demi, soit ~90 h, permettant ainsi à toutes les cellules d'entrer en phase S.

Les groupes de recherches partisans de l'utilisation de faibles doses de la 5-Aza-CdR (concentration plasmatique de < 0.1 µg/ml ; annexe 1) misent sur sa capacité à modifier l'épigénome de la tumeur et d'ainsi induire un bon pourcentage de réponses objectives. Les études ne sont présentement pas très concluantes en ce sens ; bien que la méthylation globale de l'ADN s'abaisse, la déméthylation des TSGs impliqués dans la leucémie ne semblent pas survenir, du moins à court terme (*voir* tableau 5-1) (Aparicio et coll., 2003; Issa et coll., 2004; Samlowski et coll., 2005 ; Yang et coll., 2006 ; Schrupp et coll., 2006). Ces observations impliquent donc la nécessité d'avoir une exposition prolongée des patients aux agents déméthylants. Les études qui privilégient l'utilisation de faibles doses n'évaluent pas tous les mêmes gènes, et encore moins au même moment de la thérapie ; l'évaluation se faisant d'une façon empirique. Il est alors difficile de comparer ces études, d'autant plus qu'elles n'arrivent pas à corrélérer la ré-expression d'un TSG et la réponse obtenue. Si c'est la modification des phénomènes épigénétiques qui sert de finalité à l'expérience, il faudra d'abord déterminer un patron de méthylation caractéristique d'une leucémie, ce qui permettra ensuite de diriger et d'évaluer correctement le traitement. Notons que nos résultats avec des doses plus intenses, ou appelons-les intermédiaires, permettent non seulement d'améliorer le temps de survie des souris, de diminuer le pouvoir clonogénique des cellules (jusqu'à 100%) et de ré-exprimer



différents TSGs impliqués dans la maladie aux doses que nous suggérons, soit l'atteinte d'une concentration plasmatique  $> 0,2 \mu\text{g/ml}$  pendant un temps de doublement cellulaire et demi (Lemaire et coll., 2008b).

L'effet secondaire principal de la 5-Aza-CdR est la myélotoxicité qu'elle induit en favorisant la différenciation des cellules progénitrices de la moelle, provoquant ainsi une diminution de leur prolifération et une myélosuppression dépendante de la dose, ce qui limite évidemment l'utilisation de la 5-Aza-CdR (Momparler et coll., 1997a). La neutropénie est cependant réversible en quelques semaines, car les cellules hématopoïétiques souches (CS), c'est-à-dire les cellules quiescentes qui sont en G0/G1 ne sont pas atteintes par la 5-Aza-CdR (Rivard et coll., 1981; Kantarjian et coll., 1997). Serait-il alors possible d'administrer des doses intermédiaires de 5-Aza-CdR sur une période allant jusqu'à 90 h ? À cet égard, notons que l'ara-C, un analogue de la CdR, administrée à des doses  $> 1 \mu\text{g/ml}$  en infusion continu de 120 h augmente significativement le taux de survie de patients leucémiques et que l'hématotoxicité produite est réversible. Bien que le mécanisme d'action de la 5-Aza-CdR et de l'ara-C soient différents, ils agissent tous les deux en phase S du cycle cellulaire et sont métabolisés de la même façon (Momparler 1984a). Ces observations nous laissent croire que les cellules de la moelle osseuse pourraient se remettre d'une chimiothérapie continue de 90 h avec la 5-Aza-CdR. L'utilisation de cycles de traitement distant d'environ 5 semaines est cependant nécessaire pour permettre le rétablissement de la fonction hématopoïétique. Il est possible que l'usage de facteurs de croissance accélère la production de cellules sanguines (Momparler, 2005b). Par ailleurs, étant donné que la 5-Aza-CdR produit un meilleur effet anti-leucémique que l'ara-C sur les souris leucémiques L1210, on peut s'attendre à ce qu'un traitement à la 5-Aza-CdR de 90 h soit aussi efficace qu'un de 120 h avec l'ara-C.

Nous proposons donc un protocole d'administration qui impliquerait des doses intermédiaires de la 5-Aza-CdR (concentration plasmatique  $> 0,2 \mu\text{g/ml}$  ; idéalement une concentration autour de  $1 \text{ mg/kg/h}$ ) sur une période couvrant au moins un temps et demi de doublement cellulaire, ce qui permettrait d'abord à la 5-

Aza-CdR d'être incorporé sur un brin de l'ADN, puis d'atteindre une certaine cytotoxicité tout minimisant la toxicité. Aussi, ces doses intermédiaires pourraient peut-être modifier l'épigénome des cellules cancéreuses souches, puisqu'elle serait administrée sur de plus longues périodes. L'avantage de ce protocole est qu'il pourrait faciliter la diffusion de l'agent dans les tumeurs solides, ce que ne permet pas l'administration de faibles doses.

La moyenne du taux de survie des patients âgés atteints de leucémie (LMA) est de moins d'un an et on sait que la 5-Aza-CdR est plus efficace chez ces patients que les thérapies habituellement utilisées (Estey, 2007). Ces malades, tout comme ceux présentant un syndrome myélodysplasique, ne sont cependant pas de bons candidats pour recevoir d'importantes doses de la 5-Aza-CdR, étant donné la fragilité de leur fonction hématopoïétique. La co-administration de la 5-Aza-CdR avec divers agents chimiothérapeutiques, tels les HDACi, devient ici très intéressante, car elle permettrait de potentialiser l'activité anti-leucémique de la 5-Aza-CdR sans en intensifier la dose et les effets secondaires.

Lorsque le statut hématopoïétique du patient le permet, la dose optimale de la 5-Aza-CdR pourrait être administrée et potentialiser par un HDACi ou par le zebularine. Ce dernier pourrait aussi être utilisé à faible dose en continu entre les cycles de traitement à la 5-Aza-CdR, étant donné qu'il a la capacité de maintenir la déméthylation de TSGs préalablement ré-exprimer par la 5-Aza-CdR (Cheng et coll., 2004a). Aussi, l'administration du zebularine permettrait aux patients qui présentent une résistance aux analogues de la CdR consécutive à l'augmentation de l'activité de leur CR désaminase de bénéficier eux aussi de ces traitements ; le zebularine étant un inhibiteur de la CR désaminase.

## DISCUSSION GÉNÉRALE

### Hyperméthylation versus hypométhylation ; paradoxe ?

Une fois la cellule dite cancéreuse on observe typiquement une hypométhylation globale du génome et de certains éléments répétitifs et une hyperméthylation régionale des TSGs (Gama-Sosa et coll., 1983 ; Baylin et coll., 1998 ; Gaudet et coll., 2003). L'explication probable de ce phénomène résiderait en la possible affinité qu'auraient les DNMTs pour les palindromes asymétriques retrouvés dans les îlots CpG et méthyleraient alors préférentiellement ces sites. De plus, la surabondance des dommages à l'ADN des cellules cancéreuses crée différentes régions qui pourraient aussi être le siège de méthylation. Ainsi, une augmentation marquée des sites de liaisons aux DNMTs diminuerait conséquemment l'efficacité de l'enzyme, créant une hypométhylation subséquente du génome (Robertson et coll., 1999). Cette dernière hypothèse est controversée. La surexpression d'une ADN déméthylase présente dans les cellules pourrait aussi engendrer une hypométhylation du génome (Bhattacharya et coll., 1999 ; Ramchandani et coll., 1999 ; Cervoni & Szyf 2001). La présence d'une ADN déméthylase (peut-être une *specific-methylated DNA binding protein*, une glycosylase ou même un DNMT (3A)) ferait de la méthylation des cytosines un phénomène biologique réversible, mais l'existence de cet enzyme reste à ce jour contestée (Bhattacharya et coll., 1999 ; Cervoni & Szyf, 2001 ; Kangaspeska et coll., 2008 ; Szyf, 2009). De récentes recherches semblent cependant montrer que la méthylation de l'ADN est effectivement un phénomène dynamique et réversible (Metivier et coll., 2008)

Par ailleurs, étant donné que le patron de méthylation observé dans le cancer implique la présence d'une hypométhylation globale du génome, il a été proposé que l'utilisation d'inhibiteurs ciblant cette hypométhylation globale puisse être une stratégie thérapeutique (Campbell et coll., 2004 ; Szyf, 2009), mais rien n'indique que les molécules proposées ne seront pas elles-mêmes carcinogènes en favorisant la méthylation de l'ADN.

### **La 5-Aza-CdR, un carcinogène ?**

En favorisant la déméthylation de l'ADN, certains auteurs ont suggéré que la 5-Aza-CdR pourrait provoquer un cancer en permettant par exemple la ré-expression d'oncogènes (Feinberg & Vogelstein, 1983 ; Howard et coll., 2007) ou de gènes favorisant le développement de métastases (Pakneshan et coll., 2004) ou encore l'apparition d'instabilité génomique (Chen et coll., 1998). Malgré l'hypométhylation globale qu'elle engendre (Momparler, 2005b) et malgré la démonstration de la mutagénicité de la 5-Aza-CdR chez les procaryotes (Cupples & Miller, 1989) et de sa très faible mutagénicité dans le modèle CHO (*Chinese hamster ovary cells*) (Lin et coll., 2005), mais une seule observation en ce sens a été faite sur des cellules humaines (Ateeq et coll., 2008). Au contraire, des travaux répétés avec la 5-Aza-CdR montrent plutôt que cet agent réduit l'incidence de tumeurs induites par différentes mutations génétiques ou par certains agents carcinogènes (Laird et coll., 1995 ; Belinsky et coll., 2003).

### **L'utilisation des analogues de la CdR dans la prévention des cancers?**

Belinsky et coll. (2003) ont suggéré que d'administrer en prophylaxie un traitement ciblant des phénomènes épigénétiques, pourrait significativement diminuer le taux de morbidité et de mortalité des personnes ayant un risque élevé de développer un cancer du poumon. Ils ont ainsi observé qu'un prétraitement à la 5-Aza-CdR diminuait l'incidence des tumeurs produites par l'exposition à un agent carcinogène. Aussi, Herranz et coll. (2006) ont montré que le zebularine prévient le développement de certains lymphomes induits chez la souris. De plus, Yoo et coll. (2006) ont démontré que le zebularine administré oralement à des souris qui présentent des lésions précancéreuses intestinales limite effectivement le développement du cancer.

Malgré ces constatations, il est difficile de penser qu'un médicament ayant la toxicité de la 5-Aza-CdR puisse être administré en prophylaxie ; des études sur ses effets à long terme doivent d'abord être réalisées et cumulées. Par ailleurs, s'il y a une

chimiothérapie de prévention, cela implique qu'il y ait eu un diagnostic de risque de développement d'un cancer. À ce moment, les grandes questions de la pharmacoépidémiologie entrent alors en jeu ; collections de données, assurabilité, coûts associés, ratio risques / bénéfiques, éthique... Nous n'en sommes cependant pas encore là ; il devra d'abord y avoir développement de méthodes accessibles permettant de détecter les épimutations mises en cause.

### **Les histones participent activement à la régulation de l'expression des gènes**

De plus en plus d'auteurs mettent en évidence le rôle participatif des histones au sein de la machinerie transcriptionnelle. Les histones subissent différentes modification post-transcriptionnelles qui seront "lu" tel un code par des complexes protéiques (Strahl & Allis, 2000). Les différentes modifications agissent alors sur différents processus cellulaires, comme le contrôle de la transcription (Davie & Hendzel, 1994), la mitose ou la prolifération cellulaire (Davie et coll., 1999). Outre les mécanismes d'acétylation et de déacétylation décrits dans cet ouvrage, la méthylation des résidus lysines par des méthyltransférases des histones (HMT) est particulièrement intéressante, car elle semble réguler l'expression de certains gènes et voire même jouer un rôle important dans l'oncogénèse. Typiquement, les méthylations en H3-K9 et H3-K27 corrélaient avec la perte de l'expression génique alors que la méthylation en H3-K4 semble favoriser la transcription génique par un mécanisme encore mal caractérisé qui impliquerait une association à la DNMT (Szyf, 2009). Deux inhibiteurs des HMT, la chaetocin et la *small-molecule inhibitor* de la *G9a HMT*, ont jusqu'à maintenant été identifiés et leurs capacités antinéoplasiques sont présentement à l'étude (Greiner et coll., 2005; Kubicek et coll., 2007); ils pourraient peut-être potentialiser l'action de la 5-Aza-CdR.

À l'opposé, la méthylation en H3-K4 est associée à une activité transcriptionnelle. La déméthylation de ce résidu lysine par des déméthylases des histones favorise donc la répression génique. Quelques composés inhibant la

déméthylase des histones ont d'ailleurs montré une activité anti-néoplasique *in vitro* et aurait une indication en psychiatrie (Huang et coll., 2007; Lee et coll., 2006).

Par ailleurs, l'utilisation de certains HDACi est maintenant considérée dans le traitement de certaines pathologies en santé mentale, comme la schizophrénie, la démence, les manies et les troubles bipolaires (Phiel et coll., 2001; Sharma et coll., 2006; Simonini et coll., 2006; Bowden, 2007). En effet, il semblerait que certains HDACi (tel que l'acide valproïque et le MS-275) puissent ré-exprimer certains gènes impliqués dans ces maladies et que l'acétylation des histones ait un rôle dans l'établissement de la mémoire (Alarcon et coll., 2004). Les mécanismes régissant l'expression des gènes sont multiples et complexes; une meilleure compréhension de ceux-ci pourrait permettre d'élaborer de nouvelles stratégies thérapeutiques.

## CONCLUSIONS

Comprendre les rôles qu'ont les modifications épigénétiques et génétiques, les fonctions immunitaires, les toxines environnementales et le régime de vie des gens dans l'apparition et le développement d'un cancer est impératif. Des recherches poussées sur de larges cohortes d'individus doivent être faites pour bien saisir l'ensemble des variables mises en cause dans le développement des hémopathies malignes. Les découvertes faites en ce sens permettraient peut-être de diminuer leur incidence et d'améliorer leurs traitements. Les phénomènes épigénétiques sont impliqués dans l'apparition, le développement et la progression de la leucémie; il est donc important de mieux les comprendre et de mieux les cibler.

Les recherches effectuées dans le cadre de cette thèse ont montré qu'il est possible d'utiliser les données obtenues *in vitro* avec la 5-Aza-CdR, un inhibiteur de la méthylation de l'ADN, pour élaborer un protocole *in vivo* efficace contre la leucémie. Les résultats de nos travaux indiquent que le protocole d'administration de cet agent en études cliniques chez l'humain devrait être plus intensif que ce que suggère présentement la littérature, en termes de concentrations et de durée d'infusion. Nous suggérons aussi que l'utilisation de ce protocole pourrait modifier l'épigénome des cellules cancéreuses et des cellules cancéreuses souches. L'évaluation de ce protocole en études clinique pourrait permettre l'amélioration du taux de survie des patients leucémiques.

Par ailleurs, nous avons observé qu'il est possible d'exploiter la complémentarité d'action entre la 5-Aza-CdR et différents inhibiteurs des déacétylases des histones, et d'ainsi potentialiser leurs actions anti-leucémiques ; le ou les mécanismes exacts par lesquels s'effectue cette synergie d'action restent cependant à être mieux caractérisés. De plus, nos recherches démontrent que la co-administration du zebularine avec la 5-Aza-CdR permet aussi d'augmenter son activité antinéoplasique. Nos résultats précliniques indiquent que la co-administration d'un HDACi ou du zebularine avec la 5-Aza-CdR a un intéressant potentiel anti-leucémique qui devrait être évalué en clinique contre la leucémie.

## CONTRIBUTION À L'AVANCEMENT DES CONNAISSANCES ET APPLICATIONS FUTURES

Les recherches effectuées dans le cadre de cette thèse ont permis de rappeler l'importance du protocole d'administration de la 5-Aza-CdR. Nous avons montré que l'intensification de ce protocole, en termes de concentrations et de durée, pourrait permettre une meilleure perte de clonogénicité des cellules leucémiques, condition nécessaire à l'éradication des cellules souches cancéreuses responsables de la leucémie. Cette perte de clonogénicité pourrait être due à la modification de l'épigénome des patients ; l'intérêt de la thérapie épigénétique réside d'ailleurs dans l'idée de pouvoir moduler le profil d'expression des gènes des cellules cancéreuses. L'évaluation de ce protocole en clinique pourrait améliorer le taux de survie des patients leucémiques. Au surplus, comme ce protocole emploie des doses supérieures à ce que propose la littérature, cela pourrait faciliter la diffusion de la 5-Aza-CdR dans des tumeurs solides, ce que ne permet pas l'administration de faibles doses.

Nos recherches ont aussi permis de montrer que la co-administration de la 5-Aza-CdR avec les HDACi potentialise leurs actions anti-leucémiques *in vitro* et *in vivo*. L'action antinéoplasique de ces agents pourrait être évaluée en clinique et ainsi permettre l'amélioration du taux de survie des patients cancéreux. Nous avons aussi pu démontrer pour la première fois que l'ajout du zebularine potentialise l'activité antinéoplasique de la 5-Aza-CdR sur des cellules d'une lignée leucémique humaine. Cette observation est importante, car le zebularine, en inhibant l'activité de la cytidine désaminase chez des patients résistants aux analogues de la désoxycytidine, pourrait leur permettre de pouvoir bénéficier de ces thérapies eux aussi. Au surplus, les différentes combinaisons d'agents pourraient être particulièrement utiles dans le traitement de patients leucémiques âgés, dont les fonctions hématopoïétiques supportent mal l'intensification de la dose de la 5-Aza-CdR. Sa co-administration avec les HDACi ou avec le zebularine permettrait de potentialiser son activité anti-leucémique sans en intensifier la dose et les effets secondaires.



Par ailleurs, étant donné qu'on remarque que certains composés pharmaceutiques largement utilisés dans le traitement de diverses pathologies (acide valproïque, procainamide,...) modulent les phénomènes épigénétiques, il serait important à l'avenir d'évaluer les effets sur l'épigénome des nouveaux médicaments mis en marché (Szyf 2009). Cela permettrait un meilleur encadrement de leur utilisation et une meilleure évaluation de leurs effets à long terme.

Les mécanismes régissant l'expression des gènes sont multiples et complexes; une meilleure compréhension de ceux-ci pourrait permettre d'élaborer de nouvelles stratégies thérapeutiques. Comme les mécanismes épigénétiques semblent impliqués dans de nombreuses pathologies (cancers, diabète de type II, asthme, lupus, schizophrénie, démence, autisme, manies, troubles bipolaires, ...) (Szyf, 2009) et dans la résistance médicamenteuse (Gifford et coll. 2004), le développement et l'amélioration d'agents pharmacologiques ciblant les phénomènes épigénétiques pourrait avoir un large impact sur la santé humaine.

## BIBLIOGRAPHIE

- Abele R, Clavel M, Dodion P, Brunsch U, Gundersen S, Smyth J, Renard J, van Glabbeke M, Pinedo HM. The EORTC Early Clinical Trials Cooperative Group experience with 5-aza-2'-deoxycytidine (NSC 127716) in patients with colo-rectal, head and neck, renal carcinomas and malignant melanomas. *European journal of cancer & clinical oncology* 23, 1921-1924 (1987).
- Alarcón JM, Malleret G, Touzani K, Vronskaya S, Ishii S, Kandel ER, Barco A. Chromatin acetylation, memory, and LTP are impaired in CBP+/- mice: a model for the cognitive deficit in Rubinstein-Taybi syndrome and its amelioration. *Neuron* 42, 947-959 (2004).
- Aparicio A, Eads CA, Leong LA, Laird PW, Newman EM, Synold TW, Baker SD, Zhao M, Weber JS. Phase I trial of continuous infusion 5-aza-2'-deoxycytidine. *Cancer chemotherapy and pharmacology* 51, 231-239 (2003).
- Aparicio A, Weber JS. Review of the clinical experience with 5-azacytidine and 5-aza-2'-deoxycytidine in solid tumors. *Current opinion in investigational drugs* 3, 627-633 Review (2002)
- Atadja P, Gao L, Kwon P, Trogani N, Walker H, Hsu M, Yeleswarapu L, Chandramouli N, Perez L, Versace R, Wu A, Sambucetti L, Lassota P, Cohen D, Bair K, Wood A, Remiszewski S. Selective growth inhibition of tumor cells by a novel histone deacetylase inhibitor, NVP-LAQ824. *Cancer Research* 64, 689-695 (2004).
- Ateeq B, Unterberger A, Szyf M, Rabbani SA. Pharmacological inhibition of DNA methylation induces proinvasive and prometastatic genes in vitro and in vivo. *Neoplasia* 10, 266-278 (2008).
- Barchi JJ Jr, Musser S, Marquez VE. The decomposition of 1-(beta-D-ribofuranosyl)-1,2-dihydropyrimidin-2-one (zebularine) in alkali: mechanism and products. *The Journal of organic chemistry* 57:536-41 (1992).
- Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 116, 281-297 Review (2004).
- Baylin SB, Herman JG, Graff JR, Vertino PM, Issa JP. Alterations in DNA methylation: a fundamental aspect of neoplasia. *Advances in cancer research* 72, 141-196 (1998).
- Belinsky SA, Klinge DM, Stidley CA, Issa JP, Herman JG, March TH, Baylin SB. Inhibition of DNA methylation and histone deacetylation prevents murine lung cancer. *Cancer Research* 63, 7089-7093 (2003).
- Bender CM, Gonzalgo ML, Gonzales FA, Nguyen CT, Robertson KD, Jones PA. Roles of cell division and gene transcription in the methylation of CpG islands. *Molecular and cellular biology* 19, 6690-6698 (1999).
- Ben-Kasus T, Ben-Zvi Z, Marquez VE, Kelley JA, Agbaria R. Metabolic activation of zebularine, a novel DNA methylation inhibitor, in human bladder carcinoma cells. *Biochemical pharmacology* 70, 121-133 (2005).
- Ben-Porath I, Cedar H. Epigenetic crosstalk. *Molecular Cell* 8, 933-935 (2001)
- Beumer JH, Joseph E, Egorin MJ, Parker RS, D'argenio DZ, Covey JM, Eiseman JL. A mass balance and disposition study of the DNA methyltransferase inhibitor zebularine (NSC 309132) and three of its metabolites in mice. *Clinical Cancer Research* 12, 5826-5833 (2006).

- Bhattacharya SK, Ramchandani S, Cervoni N, Szyf M. A mammalian protein with specific demethylase activity for mCpG DNA. *Nature* 397, 579-583 (1999).
- Bird AP. CpG-rich islands and the function of DNA methylation. *Nature*. 321, 209-213 (1986).
- Bird AP, Wolffe AP. Methylation-induced repression--belts, braces, and chromatin. *Cell* 99, 451-454. Review (1999).
- Boivin AJ, Momparler LF, Hurtubise A, Momparler RL. Antineoplastic action of 5-aza-2'-deoxycytidine and phenylbutyrate on human lung carcinoma cells. *Anticancer Drugs*. 13, 869-874 (2002).
- Bouchard J, Momparler RL. Incorporation of 5-Aza-2'-deoxycytidine-5'-triphosphate into DNA. Interactions with mammalian DNA polymerase alpha and DNA methylase. *Molecular pharmacology* 24, 109-114 (1983).
- Bouffard DY, Laliberté J, Momparler RL. Kinetic studies on 2',2'-difluorodeoxycytidine (Gemcitabine) with purified human deoxycytidine kinase and cytidine deaminase. *Biochemical Pharmacology* 45, 1857-1861 (1993).
- Bovenzi V, Momparler RL. Antineoplastic action of 5-aza-2'-deoxycytidine and histone deacetylase inhibitor and their effect on the expression of retinoic acid receptor beta and estrogen receptor alpha genes in breast carcinoma cells. *Cancer chemotherapy and pharmacology* 48, 71-76 (2001).
- Bowden CL. Spectrum of effectiveness of valproate in neuropsychiatry. *Expert review of neurotherapeutics* 7, 9-16 (2007).
- Braakhuis BJ, van Dongen GA, van Walsum M, Leyva A, Snow GB. Preclinical antitumor activity of 5-aza-2'-deoxycytidine against human and neck cancer xenografts. *Investigational new drugs* 6, 299-304 (1988).
- Bradley G, Juranka PF, Ling V. Mechanism of multidrug resistance. *Biochimica et biophysica acta* 948, 87-128. Review (1988).
- Brandeis M, Frank D, Keshet I, Siegfried Z, Mendelsohn M, Nemes A, Temper V, Razin A, Cedar H. Sp1 elements protect a CpG island from de novo methylation. *Nature*. 371, 435-438 (1994).
- Brown JM, Attardi LD. The role of apoptosis in cancer development and treatment response *Nature reviews. Cancer* 5, 231-237 (2005).
- Brusilow SW, Danney M, Waber LJ, Batshaw M, Burton B, Levitsky L, Roth K, McKeethren C, Ward J. Treatment of episodic hyperammonemia in children with inborn errors of urea synthesis. *The New England journal of medicine* 310, 1630-1634 (1984).
- Butler LM, Agus DB, Scher HI, Higgins B, Rose A, Cordon-Cardo C, Thaler HT, Rifkind RA, Marks PA, Richon VM. Suberoylanilide hydroxamic acid, an inhibitor of histone deacetylase, suppresses the growth of prostate cancer cells in vitro and in vivo. *Cancer Research* 60, 5165-5170 (2000).
- Camacho LH, Olson J, Tong WP, Young CW, Spriggs DR, Malkin MG. Phase I dose escalation clinical trial of phenylbutyrate sodium administered twice daily to patients with advanced solid tumors. *Investigational new drugs* 25, 131-138 (2007). Epub 2006 Oct.
- Cameron EE, Bachman KE, Myöhänen S, Herman JG, Baylin SB. Synergy of demethylation and histone deacetylase inhibition in the re-expression of genes silenced in cancer. *Nature genetics* 21, 103-107 (1999).

- Camiener GW, Smith CG. Studies of the enzymatic deamination of cytosine arabinoside. I. Enzyme distribution and species specificity. *Biochem Pharmacol.* 1965 Oct;14(10):1405-16
- Camiener GW, Smith CG. Studies of the enzymatic deamination of cytosine arabinoside. I. Enzyme distribution and species specificity. *Biochemical Pharmacology* 14, 1405-1416 (1965).
- Camiener GW. Studies of the enzymatic deamination of ara-cytidine. V. inhibition in vitro and in vivo by tetrahydrouridine and other reduced pyrimidine nucleosides. *Biochemical Pharmacology* 17, 1981-1991 (1968).
- Campbell PM, Bovenzi V, Szyf M. Methylated DNA-binding protein 2 antisense inhibitors suppress tumorigenesis of human cancer cell lines in vitro and in vivo. *Carcinogenesis* 25, 499-507 (2004). Epub 2003 Dec
- Candido EP, Reeves R, Davie JR. Sodium butyrate inhibits histone deacetylation in cultured cells. *Cell* 14, 105-113 (1978).
- Carducci MA, Gilbert J, Bowling MK, Noe D, Eisenberger MA, Sinibaldi V, Zabelina Y, Chen TL, Grochow LB, Donehower RC. A Phase I clinical and pharmacological evaluation of sodium phenylbutyrate on an 120-h infusion schedule. *Clinical cancer research* 7, 3047-3055 (2001).
- Carlow D, Wolfenden R. Substrate connectivity effects in the transition state for cytidine deaminase. *Biochemistry* 37, 11873-11878 (1998).
- Cervoni N, Szyf M. Demethylase activity is directed by histone acetylation. *The Journal of biological chemistry* 276, 40778-40787 (2001). Epub 2001 Aug.
- Chabner BA, Rustum YM, Slocum HK. The role of target determinants in antineoplastic therapy. *Cancer treatment reports* 65, 27-31 (1981).
- Chabot GG, Bouchard J, Momparler RL. Kinetics of deamination of 5-aza-2'-deoxycytidine and cytosine arabinoside by human liver cytidine deaminase and its inhibition by 3-deazauridine, thymidine or uracil arabinoside. *Biochemical pharmacology* 32, 1327-1328. (1983a)
- Chabot GG, Momparler RL. Antileukemic activity of 5-aza-2'-deoxycytidine and cytarabine against intracerebral L1210 murine leukemia. *Cancer treatment reports* 68, 1483-1487 (1984).
- Chabot GG, Rivard GE, Momparler RL. Plasma and cerebrospinal fluid pharmacokinetics of 5-Aza-2'-deoxycytidine in rabbits and dogs. *Cancer Research* 43, 592-597 (1983b).
- Chai G, Li L, Zhou W, Wu L, Zhao Y, Wang D, Lu S, Yu Y, Wang H, McNutt MA, Hu YG, Chen Y, Yang Y, Wu X, Otterson GA, Zhu WG. HDAC inhibitors act with 5-aza-2'-deoxycytidine to inhibit cell proliferation by suppressing removal of incorporated abases in lung cancer cells. *PLoS ONE* 3, e2445 (2008).
- Chen RZ, Pettersson U, Beard C, Jackson-Grusby L, Jaenisch R. DNA hypomethylation leads to elevated mutation rates. *Nature* 395, 89-93 (1998).
- Chen W, Cooper TK, Zahnow CA, Overholtzer M, Zhao Z, Ladanyi M, Karp JE, Gokgoz N, Wunder JS, Andrulis IL, Levine AJ, Mankowski JL, Baylin SB. Epigenetic and genetic loss of Hic1 function accentuates the role of p53 in tumorigenesis. *Cancer Cell* 6, 387-398 (2004).

- Cheng JC, Matsen CB, Gonzales FA, Ye W, Greer S, Marquez VE, Jones PA, Selker EU. Inhibition of DNA methylation and reactivation of silenced genes by zebularine. *Journal of the National Cancer Institute* 95, 399-409 (2003).
- Cheng JC, Weisenberger DJ, Gonzales FA, Liang G, Xu GL, Hu YG, Marquez VE, Jones PA. Continuous zebularine treatment effectively sustains demethylation in human bladder cancer cells. *Molecular and cellular biology* 24, 1270-1278 (2004a).
- Cheng JC, Yoo CB, Weisenberger DJ, Chuang J, Wozniak C, Liang G, Marquez VE, Greer S, Orntoft TF, Thykjaer T, Jones PA. Preferential response of cancer cells to zebularine. *Cancer Cell* 2004 6,151-158 (2004b).
- Chuang JC, Yoo CB, Kwan JM, Li TW, Liang G, Yang AS, Jones PA. Comparison of biological effects of non-nucleoside DNA methylation inhibitors versus 5-aza-2'-deoxycytidine. *Molecular cancer therapeutics* 4, 1515-1520 (2005).
- Chung WY, Yuan L, Feng L, Hensle T, Tycko B. Chromosome 11p15.5 regional imprinting: comparative analysis of KIP2 and H19 in human tissues and Wilms' tumors. *Human molecular genetics* 5, 1101-1108 (1996).
- Clarke MF, Becker MW. Stem cells: the real culprits in cancer? *Scientific American* 295, 52-9 (2006).
- Clavel M, Monfardini S, Fossà S, Smyth J, Renard J, Kaye SB. 5-Aza-2'-deoxycytidine (NSC 127716) in non-seminomatous testicular cancer. Phase II from the EORTC Early Clinical Trials Cooperative Group and Genito-Urinary Group. *Annals of oncology* 3, 399-400 (1992).
- Collins AF, Pearson HA, Giardina P, McDonagh KT, Brusilow SW, Dover GJ. Oral sodium phenylbutyrate therapy in homozygous beta thalassemia: a clinical trial. *Blood* 85, 43-49 (1995).
- Corn PG, Kuerbitz SJ, van Noesel MM, Esteller M, Compitello N, Baylin SB, Herman JG. Transcriptional silencing of the p73 gene in acute lymphoblastic leukemia and Burkitt's lymphoma is associated with 5' CpG island methylation. *Cancer Research* 59, 3352-3356 (1999).
- Cupples CG, Miller JH. A set of lacZ mutations in Escherichia coli that allow rapid detection of each of the six base substitutions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 86, 5345-5349 (1989).
- Czernin B, Imhof A. The sounds of silence--histone deacetylation meets histone methylation. *Genetica* 117, 159-164 (2003).
- Daskalakis M, Nguyen TT, Nguyen C, Guldberg P, Köhler G, Wijermans P, Jones PA, Lübbert M. Demethylation of a hypermethylated P15/INK4B gene in patients with myelodysplastic syndrome by 5-Aza-2'-deoxycytidine (decitabine) treatment *Blood* 100, 2957-2964 (2002).
- Davie JR, Hendzel MJ. Multiple functions of dynamic histone acetylation. *Journal of cellular biochemistry* 55, 98-105 Review (1994).
- Davie JR, Samuel SK, Spencer VA, Holth LT, Chadee DN, Peltier CP, Sun JM, Chen HY, Wright JA. Organization of chromatin in cancer cells: role of signalling pathways. *Biochemistry and cell biology* 77, 265-275 (1999).
- Denissenko MF, Chen JX, Tang MS, Pfeifer GP. Cytosine methylation determines hot spots of DNA damage in the human P53 gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 94, 3893-3898 (1997).

- Di Croce L, Raker VA, Corsaro M, Fazi F, Fanelli M, Faretta M, Fuks F, Lo Coco F, Kouzarides T, Nervi C, Minucci S, Pelicci PG. Methyltransferase recruitment and DNA hypermethylation of target promoters by an oncogenic transcription factor. *Science* 295, 1079-1082 (2002).
- DiGiuseppe JA, Weng LJ, Yu KH, Fu S, Kastan MB, Samid D, Gore SD. Phenylbutyrate-induced G1 arrest and apoptosis in myeloid leukemia cells: structure-function analysis. *Leukemia* 13, 1243-1253 (1999).
- Dixon M, Webb EC. *Enzymes*, Academic Press, New York (1979).
- Dodge JE, Munson C, List AF. KG-1 and KG-1a model the p15 CpG island methylation observed in acute myeloid leukemia patients. *Leukemia Research* 25, 917-925 (2001).
- Doerfler W. The insertion of foreign DNA into mammalian genomes and its consequences: a concept in oncogenesis. *Advances in cancer research* 313-344 Review (1995).
- Driscoll JS, Marquez VE, Plowman J, Liu PS, Kelley JA, Barchi JJ Jr. Antitumor properties of 2(1H)-pyrimidinone riboside (zebularine) and its fluorinated analogues. *Journal of medicinal chemistry* 34, 3280-3284 (1991).
- Drummond DC, Meyer O, Hong K, Kirpotin DB, Papahadjopoulos D. Optimizing liposomes for delivery of chemotherapeutic agents to solid tumors. *Pharmacological reviews* 51, 691-743 (1999).
- Drummond DC, Noble CO, Kirpotin DB, Guo Z, Scott GK, Benz CC. Clinical development of histone deacetylases inhibitors as anticancer agents. *Annual review of pharmacology and toxicology* 45, 495-528 (2005).
- Eads CA, Danenberg KD, Kawakami K, Saltz LB, Danenberg PV, Laird PW. CpG island hypermethylation in human colorectal tumors is not associated with DNA methyltransferase overexpression. *Cancer Research* 59, 2302-6 (1999).
- Eden S, Hashimshony T, Keshet I, Cedar H, Thorne AW. DNA methylation models histone acetylation. *Nature* 394, 842 (1998).
- Ehrlich M. DNA methylation in cancer: too much, but also too little. *Oncogene* 21, 5400-5413 (2002).
- Ehrlich M, Gama-Sosa MA, Huang LH, Midgett RM, Kuo KC, McCune RA, Gehrke C. Amount and distribution of 5-methylcytosine in human DNA from different types of tissues of cells. *Nucleic acids research* 10, 2709-21 (1982).
- Eliopoulos N, Bovenzi V, Le NL, Momparler LF, Greenbaum M, Létourneau S, Cournoyer D, Momparler RL. Retroviral transfer and long-term expression of human cytidine deaminase cDNA in hematopoietic cells following transplantation in mice. *Gene Therapy* 5, 1545-1551 (1998).
- Esteller M, Corn PG, Baylin SB, Herman JG. A gene hypermethylation profile of human cancer. *Cancer Research* 61, 3225-3229 (2001).
- Esteller M. Profiling aberrant DNA methylation in hematologic neoplasms: a view from the tip of the iceberg. *Clinical Immunology* 109, 80-88 Review (2003).
- Estey E. Acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes in older patients. *Journal of Clinical Oncology* 25, 1908-1915 (2007).
- Fearon ER, Feinberg AP, Hamilton SH, Vogelstein B. Loss of genes on the short arm of chromosome 11 in bladder cancer. *Nature* 318, 377-380 (1985).

- Fang MZ, Chen D, Sun Y, Jin Z, Christman JK, Yang CS. Reversal of hypermethylation and reactivation of p16INK4a, RARbeta, and MGMT genes by genistein and other isoflavones from soy. *Clinical Cancer Research* 11, 7033-7041 (2005).
- Feinberg AP, Vogelstein B. Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts. *Nature* 301, 89-92 (1983).
- Finnin MS, Donigian JR, Cohen A, Richon VM, Rifkind RA, Marks PA, Breslow R, Pavletich NP. Structures of a histone deacetylase homologue bound to the TSA and SAHA inhibitors. *Nature* 401, 188-193 (1999).
- Freireich EJ, Gehan EA, Rall DP, Schmidt LH, Skipper HE. Quantitative comparison of toxicity of anticancer agents in mouse, rat, hamster, dog, monkey, and man. *Cancer Chemotherapy Reports* 50, 219-244 (1966).
- Frick L, Yang C, Marquez VE, Wolfenden R. Binding of pyrimidin-2-one ribonucleoside by cytidine deaminase as the transition-state analogue 3,4-dihydrouridine and the contribution of the 4-hydroxyl group to its binding affinity. *Biochemistry* 28, 9423-9430 (1989).
- Funakoshi, R., M. Irie & T. Ukita. 1961. Synthesis of unnatural pyrimidine nucleosides. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* 9: 406-409
- Gagnon J, Shaker S, Primeau M, Hurtubise A, Momparler RL. Interaction of 5-aza-2'-deoxycytidine and depsipeptide on antineoplastic activity and activation of 14-3-3sigma, E-cadherin and tissue inhibitor of metalloproteinase 3 expression in human breast carcinoma cells. *Anticancer Drugs* 14, 193-202 (2003).
- Gama-Sosa MA, Slagel VA, Trewyn RW, Oxenhandler R, Kuo KC, Gehrke CW, Ehrlich M. The 5-methylcytosine content of DNA from human tumors. *Nucleic acids research* 11, 6883-6894 (1983).
- Gardiner-Garden M, Frommer M. CpG islands in vertebrate genomes. *Journal of molecular biology* 196, 261-282 (1987).
- Gaudet F, Hodgson JG, Eden A, Jackson-Grusby L, Dausman J, Gray JW, Leonhardt H, Jaenisch R. Induction of tumors in mice by genomic hypomethylation. *Science* 300, 489-492 (2003).
- Gibbons RJ, McDowell TL, Raman S, O'Rourke DM, Garrick D, Ayyub H, Higgs DR. Mutations in ATRX, encoding a SWI/SNF-like protein, cause diverse changes in the pattern of DNA methylation. *Nature Genetics* 24, 368-71 (2000)
- Gifford G, Paul J, Vasey PA, Kaye SB, Brown R. The acquisition of hMLH1 methylation in plasma DNA after chemotherapy predicts poor survival for ovarian cancer patients. *Clinical Cancer Research* 10, 4420-4426 (2004).
- Gilbert J, Gore SD, Herman JG, Carducci MA. The clinical application of targeting cancer through histone acetylation and hypomethylation. *Clinical Cancer Research* 10, 4589-4596 (2004).
- Gilbert JA, Salavaggione OE, Ji Y, Pelleymounter LL, Eckloff BW, Wieben ED, Ames MM, Weinshilboum RM. Gemcitabine pharmacogenomics: cytidine deaminase and deoxycytidylate deaminase gene resequencing and functional genomics. *Clinical Cancer Research* 12, 1794-1803 (2006).
- Gilbert KP, Van Beuningen D, Rhein AP. Early changes in cell cycle kinetics after ionizing irradiation below 1 GY. *International journal of radiation biology* 73, 187-195 (1998).

- Gillet N, Florins A, Boxus M, Burteau C, Nigro A, Vandermeers F, Balon H, Bouzar AB, Defoiche J, Burny A, Reichert M, Kettmann R, Willems L. Mechanisms of leukemogenesis induced by bovine leukemia virus: prospects for novel anti-retroviral therapies in human. *Retrovirology* 4, 18 (2007).
- Goll MG, Bestor TH. Eukaryotic cytosine methyltransferases. *Annual review of biochemistry* 74, 481-514 (2005).
- Gore SD, Carducci MA. Modifying histones to tame cancer: clinical development of sodium phenylbutyrate and other histone deacetylase inhibitors. *Expert opinion on investigational drugs* 9, 2923-2934 (2000).
- Gore SD, Weng LJ, Figg WD, Zhai S, Donehower RC, Dover G, Grever MR, Griffin C, Grochow LB, Hawkins A, Burks K, Zabelena Y, Miller CB. Impact of prolonged infusions of the putative differentiating agent sodium phenylbutyrate on myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia. *Clinical Cancer Research* 8, 963-970 (2002).
- Gore SD, Weng LJ, Zhai S, Figg WD, Donehower RC, Dover GJ, Grever M, Griffin CA, Grochow LB, Rowinsky EK, Zabalena Y, Hawkins AL, Burks K, Miller CB. Impact of the putative differentiating agent sodium phenylbutyrate on myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia. *Clinical Cancer Research* 7, 2330-2339 (2001).
- Göttlicher M, Minucci S, Zhu P, Krämer OH, Schimpf A, Giavara S, Sleeman JP, Lo Coco F, Nervi C, Pelicci PG, Heinzl T. Valproic acid defines a novel class of HDAC inhibitors inducing differentiation of transformed cells. *The EMBO journal* 20, 6969-6978 (2001).
- Greiner D, Bonaldi T, Eskeland R, Roemer E, Imhof A. Identification of a specific inhibitor of the histone methyltransferase SU(VAR)3-9. *Nature chemical biology* 1, 143-145 (2005).
- Guo Y, Engelhardt M, Wider D, Abdelkarim M, Lübbert M. Effects of 5-aza-2'-deoxycytidine on proliferation, differentiation and p15/INK4b regulation of human hematopoietic progenitor cells. *Leukemia* 20, 115-121 (2006).
- Gutierrez MI, Siraj AK, Bhargava M, Ozbek U, Banavali S, Chaudhary MA, El Solh H, Bhatia K. Concurrent methylation of multiple genes in childhood ALL: Correlation with phenotype and molecular subgroup. *Leukemia* 17, 1845-1850 (2003).
- Han JW, Ahn SH, Park SH, Wang SY, Bae GU, Seo DW, Kwon HK, Hong S, Lee HY, Lee YW, Lee HW. Apicidin, a histone deacetylase inhibitor, inhibits proliferation of tumor cells via induction of p21WAF1/Cip1 and gelsolin. *Cancer Research* 60, 6068-6074 (2000).
- Hann B, Balmain A. Building 'validated' mouse models of human cancer. *Current opinion in cell biology* 13, 778-784 (2001).
- Herman JG, Civin CI, Issa JP, Collector MI, Sharkis SJ, Baylin SB. Distinct patterns of inactivation of p15INK4B and p16INK4A characterize the major types of hematological malignancies. *Cancer Research* 57, 837-841 (1997).
- Herman JG, Jen J, Merlo A, Baylin SB. Hypermethylation-associated inactivation indicates a tumor suppressor role for p15INK4B. *Cancer Research* 56, 722-727 (1996).



- Herranz M, Martín-Caballero J, Fraga MF, Ruiz-Cabello J, Flores JM, Desco M, Marquez V, Esteller M. The novel DNA methylation inhibitor zebularine is effective against the development of murine T-cell lymphoma. *Blood* 107, 1174-1177 (2006). Epub 2005 Oct.
- Heyman M, Rasool O, Borgonovo Brandter L, Liu Y, Grandér D, Söderhäll S, Gustavsson G, Einhorn S. Prognostic importance of p15INK4B and p16INK4 gene inactivation in childhood acute lymphocytic leukemia. *Journal of Clinical Oncology* 14, 1512-1520 (1996).
- Ho DH. Distribution of kinase and deaminase of 1-beta-D-arabinofuranosylcytosine in tissues of man and mouse. *Cancer Research* 33, 2816-2820 (1973).
- Hochedlinger K, Rideout WM, Kyba M, Daley GQ, Blueloch R, Jaenisch R. Nuclear transplantation, embryonic stem cells and the potential for cell therapy. *The Hematology Journal* 5, 114-117 Review (2004).
- Holleran JL, Parise RA, Joseph E, Eiseman JL, Covey JM, Glaze ER, Lyubimov AV, Chen YF, D'Argenio DZ, Egorin MJ. Plasma pharmacokinetics, oral bioavailability, and interspecies scaling of the DNA methyltransferase inhibitor, zebularine. *Clinical Cancer Research* 11, 3862-3868 (2005).
- Howard G, Eiges R, Gaudet F, Jaenisch R, Eden A. Activation and transposition of endogenous retroviral elements in hypomethylation induced tumors in mice. *Oncogene* 27, 404-408 (2008). Epub 2007 Jul
- Huang Y, Greene E, Murray Stewart T, Goodwin AC, Baylin SB, Woster PM, Casero RA Jr. Inhibition of lysine-specific demethylase 1 by polyamine analogues results in reexpression of aberrantly silenced genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 104, 8023-8028 (2007).
- Hunter T, Pines J. Cyclins and cancer. II: Cyclin D and CDK inhibitors come of age. *Cell* 79, 573-582 (1994).
- Iguchi-Arigo SM, Schaffner W. CpG methylation of the cAMP-responsive enhancer/promoter sequence TGACGTC abolishes specific factor binding as well as transcriptional activation. *Genes & development* 3, 612-619 (1989).
- Issa JP, Garcia-Manero G, Giles FJ, Mannari R, Thomas D, Faderl S, Bayar E, Lyons J, Rosenfeld CS, Cortes J, Kantarjian HM. Phase 1 study of low-dose prolonged exposure schedules of the hypomethylating agent 5-aza-2'-deoxycytidine (decitabine) in hematopoietic malignancies. *Blood* 103, 1635-1640 (2004). Epub 2003 Nov.
- Ivanetich KM, Santi DV. 5,6-dihydropyrimidine adducts in the reactions and interactions of pyrimidines with proteins *Progress in nucleic acid research and molecular biology* 42, 127-156 (1992).
- Jabbour E, Issa JP, Garcia-Manero G, Kantarjian H. Evolution of decitabine development: accomplishments, ongoing investigations, and future strategies. *Cancer* 112, 2341-2351 (2008).
- Johnstone RW. Histone-deacetylase inhibitors: novel drugs for the treatment of cancer. *Nature Reviews Drug Discovery* 1, 287-299 (2002).
- Jones LK, Saha V. Chromatin modification, leukaemia and implications for therapy. *British journal of haematology* 118, 714-727 (2002).
- Jones PA, Baylin SB. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nature reviews. Genetics* 3, 415-428 (2002).
- Jones PA, Baylin SB. The epigenomics of cancer. *Cell* 128, 683-692 (2007).

- Jones PA, Gonzalvo ML, Tsutsumi M, Bender CM. DNA methylation in bladder cancer. *European urology* 33, 7-8 (1998).
- Jones PA, Laird PW. Cancer epigenetics comes of age. *Nature Genetics* 21, 163-167 (1999).
- Jones PA, Takai D. The role of DNA methylation in mammalian epigenetics. *Science* 293, 1068-1070 (2001).
- Jones PA, Taylor SM. Cellular differentiation, cytidine analogs and DNA methylation. *Cell* 20, 85-93 (1980).
- Jüttermann R, Li E, Jaenisch R. Toxicity of 5-aza-2'-deoxycytidine to mammalian cells is mediated primarily by covalent trapping of DNA methyltransferase rather than DNA demethylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 91, 11797-11801 (1994).
- Kafri T, Ariel M, Brandeis M, Shemer R, Urven L, McCarrey J, Cedar H, Razin A. Developmental pattern of gene-specific DNA methylation in the mouse embryo and germ line. *Genes & development* 6, 705-714 (1992).
- Kangaspeska S, Stride B, Métivier R, Polycarpou-Schwarz M, Ibberson D, Carmouche RP, Benes V, Gannon F, Reid G. Transient cyclical methylation of promoter DNA. *Nature* 452, 112-115 (2008).
- Kantarjian HM, O'Brien S, Cortes J, Giles FJ, Faderl S, Issa JP, Garcia-Manero G, Rios MB, Shan J, Andreeff M, Keating M, Talpaz M. Results of decitabine (5-aza-2'-deoxycytidine) therapy in 130 patients with chronic myelogenous leukemia. *Cancer* 98, 522-528 (2003).
- Kantarjian HM, O'Brien SM, Keating M, Beran M, Estey E, Giralt S, Kornblau S, Rios MB, de Vos D, Talpaz M. Results of decitabine therapy in the accelerated and blastic phases of chronic myelogenous leukemia. *Leukemia* 11, 1617-1620 (1997).
- Kautiainen TL, Jones PA. DNA methyltransferase levels in tumorigenic and nontumorigenic cells in culture. *The Journal of biological chemistry* 261, 1594-1598 (1986).
- Kazazian HH Jr, Goodier JL. LINE drive retrotransposition and genome instability. *Cell* 110, 277-280. Review (2002).
- Kelly WK, O'Connor OA, Krug LM, Chiao JH, Heaney M, Curley T, MacGregore-Cortelli B, Tong W, Secrist JP, Schwartz L, Richardson S, Chu E, Olgac S, Marks PA, Scher H, Richon VM. Phase I study of an oral histone deacetylase inhibitor, suberoylanilide hydroxamic acid, in patients with advanced cancer. *Journal of Clinical Oncology* 23, 3923-3931 (2005).
- Kelly WK, Richon VM, O'Connor O, Curley T, MacGregor-Curtelli B, Tong W, Klang M, Schwartz L, Richardson S, Rosa E, Drobnjak M, Cordon-Cordo C, Chiao JH, Rifkind R, Marks PA, Scher H. Phase I clinical trial of histone deacetylase inhibitor: suberoylanilide hydroxamic acid administered intravenously. *Clinical Cancer Research* 2003 Sep 1;9(10 Pt 1):3578-88
- Kikuchi T, Toyota M, Itoh F, Suzuki H, Obata T, Yamamoto H, Kakiuchi H, Kusano M, Issa JP, Tokino T, Imai K. Inactivation of p57KIP2 by regional promoter hypermethylation and histone deacetylation in human tumors. *Oncogene* 21, 2741-2749 (2002).

- Kim CH, Marquez VE, Mao DT, Haines DR, McCormack JJ. Synthesis of pyrimidin-2-one nucleosides as acid-stable inhibitors of cytidine deaminase. *Journal of medicinal chemistry* 29, 1374–1380 (1986).
- Klecker RW, Cysyk RL, Collins JM. Zebularine metabolism by aldehyde oxidase in hepatic cytosol from humans, monkeys, dogs, rats, and mice: influence of sex and inhibitors. *Bioorganic & medicinal chemistry* 14, 62-66 (2006). Epub 2005 Sep.
- Klimasauskas S, Kumar S, Roberts RJ, Cheng X. HhaI methyltransferase flips its target base out of the DNA helix. *Cell* 76, 357-369 (1994).
- Knudson AG Jr. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 68, 820-823 (1971).
- Kochanek S, Toth M, Dehmel A, Renz D, Doerfler W. Interindividual concordance of methylation profiles in human genes for tumor necrosis factors alpha and beta. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 87, 8830-8834 (1990).
- Kreis W, Woodcock TM, Gordon CS, Krakoff IH. Tetrahydrouridine: Physiologic disposition and effect upon deamination of cytosine arabinoside in man. *Cancer treatment reports* 61, 1347-1353 (1977).
- Kuang SQ, Tong WG, Yang H, Lin W, Lee MK, Fang ZH, Wei Y, Jelinek J, Issa JP, Garcia-Manero G. Genome-wide identification of aberrantly methylated promoter associated CpG islands in acute lymphocytic leukemia. *Leukemia* 22, 1529-1538 (2008).
- Kubicek S, O'Sullivan RJ, August EM, Hickey ER, Zhang Q, Teodoro ML, Rea S, Mechtler K, Kowalski JA, Homon CA, Kelly TA, Jenuwein T. Reversal of H3K9me2 by a small-molecule inhibitor for the G9a histone méthyltransférase. *Molecular Cell* 25, 473-481 (2007).
- Kuo YH, Landrette SF, Heilman SA, Perrat PN, Garrett L, Liu PP, Le Beau MM, Kogan SC, Castilla LH. Cbf beta-SMMHC induces distinct abnormal myeloid progenitors able to develop acute myeloid leukemia. *Cancer cell* 9, 57-68 (2006).
- Laliberté J, Marquez VE, Momparler RL. Potent inhibitors for the deamination of cytosine arabinoside and 5-aza-2'-deoxycytidine by human cytidine deaminase. *Cancer chemotherapy and pharmacology* 30, 7-11 (1992).
- Law LW, Dunn TB. Observations on the effect of a folic-acid antagonist on transplantable lymphoid leukemias in mice. *Journal of the National Cancer Institute* 10, 179-192 (1949).
- Lee G, Wolff E, Miller JH. Mutagenicity of the cytidine analog zebularine in *Escherichia coli*. *DNA Repair* 3, 155-161 (2004).
- Lee MH, Reynisdóttir I, Massagué J. Cloning of p57KIP2, a cyclin-dependent kinase inhibitor with unique domain structure and tissue distribution. *Genes & development* 9, 639-649 (1995).
- Lei H, Oh SP, Okano M, Jüttermann R, Goss KA, Jaenisch R, Li E. De novo DNA cytosine methyltransferase activities in mouse embryonic stem cells. *Development* 122, 3195-3205 (1996).
- Lee MG, Wynder C, Schmidt DM, McCafferty DG, Shiekhattar R. Histone H3 lysine 4 demethylation is a target of nonselective antidepressive medications. *Chemical & Biology* 13, 563-567 (2006).

- Lemaire M, Momparler LF, Farinha NJ, Bernstein M, Momparler RL. Enhancement of antineoplastic action of 5-aza-2'-deoxycytidine by phenylbutyrate on L1210 leukemic cells. *Leukemia & Lymphoma* 45, 147-154 (2004).
- Lemaire M, Momparler LF, Bernstein ML, Marquez VE, Momparler RL. Enhancement of antineoplastic action of 5-aza-2'-deoxycytidine by zebularine on L1210 leukemia. *Anticancer Drugs* 16, 301-308 (2005).
- Lemaire M, Momparler LF, Raynal NJ, Bernstein ML, Momparler RL. Inhibition of cytidine deaminase by zebularine enhances the antineoplastic action of 5-aza-2'-deoxycytidine. *Cancer chemotherapy and pharmacology* [Epub ahead of print] (2008a).
- Lemaire M, Chabot GG, Raynal NJ, Momparler LF, Hurtubise A, Bernstein ML, Momparler RL. Importance of dose-schedule of 5-aza-2'-deoxycytidine for epigenetic therapy of cancer. *BMC Cancer* 8, 128 (2008b).
- Li Y, Nagai H, Ohno T, Yuge M, Hatano S, Ito E, Mori N, Saito H, Kinoshita T. Aberrant DNA methylation of p57(KIP2) gene in the promoter region in lymphoid malignancies of B-cell phenotype. *Blood* 100, 2572-2577 (2002).
- Yunfu Lin Y, Vincent Dion V, John H. Wilson JH. A novel selectable system for detecting expansion of CAG-CTG repeats in mammalian cells. *Mutation Research* 572, 123-131 (2005).
- Lloyd HH. Estimation of tumor cell kill from Gompertz growth curves. *Cancer chemotherapy reports* 59, 267-277 (1975).
- Maloney KW, McGavran L, Odom LF, Hunger SP. Acquisition of p16(INK4A) and p15(INK4B) gene abnormalities between initial diagnosis and relapse in children with acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 93, 2380-2385 (1999).
- Margueron R, Trojer P, Reinberg D. The key to development: interpreting the histone code? *Current opinion in genetics & development* 15,163-176 (2005).
- Marks PA, Richon VM, Breslow R, Rifkind RA. Histone deacetylase inhibitors as new cancer drugs. *Current opinion in oncology* 13, 477-483 (2001a)
- Marks PA, Richon VM, Rifkind RA. Histone deacetylase inhibitors: inducers of differentiation or apoptosis of transformed cells. *Journal of the National Cancer Institute* 92, 1210-6 (2000).
- Marks P, Rifkind RA, Richon VM, Breslow R, Miller T, Kelly WK. Histone deacetylases and cancer: causes and therapies. *Nature reviews.Cancer* 1, 194-202 (2001b).
- Marquez VE, Eritja R, Kelley JA, Vanbommel D, Christman JK. Potent inhibition of HhaI DNA methylase by the aglycon of 2-(1H)-pyrimidinone riboside (zebularine) at the GCGC recognition domain. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1002, 154-164 (2003).
- Marquez VE, Kelley JA, Agbaria R, Ben-Kasus T, Cheng JC, Yoo CB, Jones PA. Zebularine: a unique molecule for an epigenetically based strategy in cancer chemotherapy. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1058, 246-254 (2005).
- Matsuoka S, Thompson JS, Edwards MC, Bartletta JM, Grundy P, Kalikin LM, Harper JW, Elledge SJ, Feinberg AP. Imprinting of the gene encoding a human cyclin-dependent kinase inhibitor, p57KIP2, on chromosome 11p15.

- Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 93, 3026-3030 (1996).
- Mayer RJ, Davis RB, Schiffer CA, Berg DT, Powell BL, Schulman P, Omura GA, Moore JO, McIntyre OR, Frei E. Intensive postremission chemotherapy in adults with acute myeloid leukemia. *The New England journal of medicine* 331, 896-903 (1994).
- Melki JR, Vincent PC, Brown RD, Clark SJ. Hypermethylation of E-cadherin in leukemia. *Blood* 95, 3208-3213 (2000).
- Métivier R, Gallais R, Tiffoche C, Le Péron C, Jurkowska RZ, Carmouche RP, Ibberson D, Barath P, Demay F, Reid G, Benes V, Jeltsch A, Gannon F, Salbert G. Cyclical DNA methylation of a transcriptionally active promoter. *Nature* 452, 45-50 (2008).
- Minchinton AI, Tannock IF. Drug penetration in solid tumours. *Nature reviews. Cancer* 6, 583-592 (2006).
- Mitsiades CS, Mitsiades NS, McMullan CJ, Poulaki V, Shringarpure R, Hideshima T, Akiyama M, Chauhan D, Munshi N, Gu X, Bailey C, Joseph M, Libermann TA, Richon VM, Marks PA, Anderson KC. Transcriptional signature of histone deacetylase inhibition in multiple myeloma: biological and clinical implications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 101, 540-545 (2004). Epub 2003 Dec.
- Momparler RL. Cancer epigenetics. *Oncogene* 22, 6479-6483 Review (2003).
- Momparler RL. Epigenetic therapy of cancer with 5-aza-2'-deoxycytidine (decitabine). *Seminars in oncology* 32, 443-451 (2005a).
- Momparler RL. Molecular, cellular and animal pharmacology of 5-aza-2'-deoxycytidine. *Pharmacology & therapeutics* 30, 287-299 (1985a).
- Momparler RL. Pharmacology of 5-Aza-2'-deoxycytidine (decitabine). *Seminars in hematology* 42, S9-16 (2005b).
- Momparler RL, Ayoub J. Potential of 5-aza-2'-deoxycytidine (Decitabine) a potent inhibitor of DNA methylation for therapy of advanced non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*. 34 Suppl 4:S111-115 (2001).
- Momparler RL, Bouchard J, Samson J. Induction of differentiation and inhibition of DNA methylation in HL-60 myeloid leukemic cells by 5-AZA-2'-deoxycytidine. *Leukemia Research* 9, 1361-1366 (1985b).
- Momparler RL, Bouffard DY, Momparler LF, Dionne J, Belanger K, Ayoub J. Pilot phase I-II study on 5-aza-2'-deoxycytidine (Decitabine) in patients with metastatic lung cancer. *Anticancer Drugs* 8,358-368 (1997a).
- Momparler RL, Bovenzi V. DNA methylation and cancer. *Journal of cellular physiology* 183, 145-54 Review (2000).
- Momparler RL, Côté S, Eliopoulos N. Pharmacological approach for optimization of the dose schedule of 5-Aza-2'-deoxycytidine (Decitabine) for the therapy of leukemia. *Leukemia* 11, S1-6 Review (1997b).
- Momparler RL, Derse D. Kinetics of phosphorylation of 5-aza-2'-deoxyycytidine by deoxycytidine kinase. *Biochemical pharmacology* 28, 1443-1444 (1979).
- Momparler RL, Doré BT, Momparler LF. Effect of 5-aza-2'-deoxycytidine and retinoic acid on differentiation and c-myc expression in HL-60 myeloid leukemic cells. *Cancer letters* 54, 21-28 (1990).

- Momparler RL, Gonzales FA. Effect of intravenous infusion of 5-aza-2'-deoxycytidine on survival time of mice with L1210 leukemia. *Cancer Research* 38, 2673-2678 (1978).
- Momparler RL, Laliberté J. Induction of cytidine deaminase in HL-60 myeloid leukemic cells by 5-aza-2'-deoxycytidine. *Leukemia Research* 14, 751-754 (1990).
- Momparler RL, Momparler LF, Samson J. Combinational chemotherapy of L1210 and L1210/ARA-C leukemia with 5-AZA-2'-deoxycytidine and beta-2'-deoxythioguanosine. *International Journal of Cancer* 30, 364-364 (1982).
- Momparler RL, Momparler LF, Samson J. Comparison of the antileukemic activity of 5-AZA-2'-deoxycytidine, 1-beta-D-arabinofuranosylcytosine and 5-azacytidine against L1210 leukemia. *Leukemia Research* 8, 1043-1049 (1984a).
- Momparler RL, Onetto-Pothier N. Drug resistance to cytosine arabinoside. in *Resistance to antineoplastic drugs* (ed. Kessel, D.) 354-367 (CRC Press, Boca Raton, Florida, 1989).
- Momparler RL, Rivard GE, Gyger M. Clinical trial on 5-aza-2'-deoxycytidine in patients with acute leukemia. *Pharmacology & therapeutics* 30, 277-286 (1985c).
- Momparler RL, Rossi M, Bouchard J, Vaccaro C, Momparler LF, Bartolucci S. Kinetic interaction of 5-AZA-2'-deoxycytidine-5'-monophosphate and its 5'-triphosphate with deoxycytidylate deaminase. *Molecular pharmacology* 25, 436-440 (1984b).
- Momparler RL, Samson J, Momparler LF, Rivard GE. Cell cycle effects and cellular pharmacology of 5-aza-2'-deoxycytidine. *Cancer chemotherapy and pharmacology* 13, 191-194 (1984c).
- Monneret C. Histone deacetylase inhibitors. *European journal of medicinal chemistry* 40, 1-13 (2005).
- Moradei O, Maroun CR, Paquin I, Vaisburg A. Histone deacetylase inhibitors: latest developments, trends and prospects. *Current medicinal chemistry. Anti-cancer agents* 5, 529-560 (2005).
- Morgan HD, Dean W, Coker HA, Reik W, Petersen-Mahrt SK. Activation-induced cytidine deaminase deaminates 5-methylcytosine in DNA and is expressed in pluripotent tissues: implications for epigenetic reprogramming. *The Journal of biological chemistry* 279, 52353-52360 (2004).
- Morgan MA, Reuter CW. Molecularly targeted therapies in myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemias. *Annals of Hematology* 85, 139-163 (2006).
- Mummaneni P, Walker KA, Bishop PL, Turker MS. Epigenetic gene inactivation induced by a cis-acting methylation center. *The Journal of biological chemistry* 13, 788-792 (1995).
- Mummaneni P, Yates P, Simpson J, Rose J, Turker MS. The primary function of a redundant Sp1 binding site in the mouse aprt gene promoter is to block epigenetic gene inactivation. *Nucleic acids research* 26, 5163-5169 (1998).
- Nakamura M, Saito H, Ebinuma H, Wakabayashi K, Saito Y, Takagi T, Nakamoto N, Ishii H. Reduction of telomerase activity in human liver cancer cells by a

- histone deacetylase inhibitor. *Journal of cellular physiology* 187, 392-401 (2001).
- Nieto M, Samper E, Fraga MF, González de Buitrago G, Esteller M, Serrano M. The absence of p53 is critical for the induction of apoptosis by 5-aza-2'-deoxycytidine. *Oncogene* 23, 735-743 (2004).
- Oakley EJ, Van Zant G. Unraveling the complex regulation of stem cells: implications for aging and cancer. *Leukemia* 21, 612-621 Review (2007).
- Odenike OM, Alkan S, Sher D, Godwin JE, Huo D, Brandt SJ, Green M, Xie J, Zhang Y, Vesole DH, Stiff P, Wright J, Larson RA, Stock W. Histone deacetylase inhibitor romidepsin has differential activity in core binding factor acute myeloid leukemia. *Clinical Cancer Research* 14, 7095-7101 (2008).
- Oki Y, Jelinek J, Shen L, Kantarjian HM, Issa JP. Induction of hypomethylation and molecular response after decitabine therapy in patients with chronic myelomonocytic leukemia. *Blood* 111, 2382-2384 (2008). Epub 2007 Nov.
- Onetto N, Momparler RL, Momparler LF, Gyger M. *In vitro* biochemical tests to evaluate the response to therapy of acute leukemia with cytosine arabinoside or 5-AZA-2'-deoxycytidine. *Seminars in oncology* 14, 237-237 (1987).
- Pakneshan P, Szyf M, Farias-Eisner R, Rabbani SA. Reversal of the hypomethylation status of urokinase (uPA) promoter blocks breast cancer growth and metastasis. *The Journal of Biological Chemistry* 279, 31735-31744 (2004).
- Park CW, Chung JH. Age-dependent changes of p57(Kip2) and p21(Cip1/Waf1) expression in skeletal muscle and lung of mice. *Biochimica et biophysica acta* 1520, 163-168 (2001).
- Pérignon JL, Le Deist F, Arenzana-Seisdedos F, Thuillier L, Fischer A, Cartier P, Griscelli C. Cytidine deaminase deficiency in a child with combined immunodeficiency: more than a coincidence? *Advances in experimental medicine and biology* 195, 129-135 (1986).
- Perrine SP, Faller DV, Swerdlow P, Miller BA, Bank A, Sytkowski AJ, Reczek J, Rudolph AM, Kan YW. Stopping the biologic clock for globin gene switching. *Annals of the New York Academy of Sciences* 612, 134-140 (1990).
- Petti MC, Mandelli F, Zagonel V, De Gregoris C, Merola MC, Latagliata R, Gattei V, Fazi P, Monfardini S, Pinto A. Pilot study of 5-aza-2'-deoxycytidine (Decitabine) in the treatment of poor prognosis acute myelogenous leukemia patients: preliminary results. *Leukemia* 7, 36-41 (1993).
- Phiel CJ, Zhang F, Huang EY, Guenther MG, Lazar MA, Klein PS. Histone deacetylase is a direct target of valproic acid, a potent anticonvulsant, mood stabilizer, and teratogen. *The Journal of Biological Chemistry* 276, 36734-36741 (2001).
- Pili R, Kruszewski MP, Hager BW, Lantz J, Carducci MA. Combination of phenylbutyrate and 13-cis retinoic acid inhibits prostate tumor growth and angiogenesis. *Cancer Research* 61, 1477-85 (2001).
- Pinto A, Attadia V, Fusco A, Ferrara F, Spada OA, Di Fiore PP. 5-Aza-2'-deoxycytidine induces terminal differentiation of leukemic blasts from patients with acute myeloid leukemias. *Blood* 64, 922-929 (1984).
- Pliml J, Sorm F. Synthesis of a 2'-deoxy-D-ribofuranosyl 5-azacytosine. *Collection of Czechoslovak chemical communications* 29, 2576 (1964).

- Quesnel B, Guillermin G, Vereecque R, Wattel E, Preudhomme C, Bauters F, Vanrumbeke M, Fenaux P. Methylation of the p15(INK4b) gene in myelodysplastic syndromes is frequent and acquired during disease progression. *Blood* 91, 2985-2990 (1998).
- Ramchandani S, Bhattacharya SK, Cervoni N, Szyf M. DNA methylation is a reversible biological signal. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 96, 6107-6112 (1999).
- Ramchandani S, MacLeod AR, Pinard M, von Hofe E, Szyf M. Inhibition of tumorigenesis by a cytosine-DNA, methyltransferase, antisense oligodeoxynucleotide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 94, 684 (1997)
- Ravandi F, Kantarjian H, Cohen A, Davis M, O'Brien S, Anderlini P, Andersson B, Claxton D, Donato M, Gajewski J, Khouri I, Korbling M, Ueno N, deVos D, Champlin R, Giralt S. Decitabine with allogeneic peripheral blood stem cell transplantation in the therapy of leukemia relapse following a prior transplant: results of a phase I study. *Bone Marrow Transplant* 27, 1221-1225 (2001).
- Raza A, Preisler HD, Day R, Yasin Z, White M, Lykins J, Kukla C, Barcos M, Bennett J, Browman G, et al. Direct relationship between remission duration in acute myeloid leukemia and cell cycle kinetics: a leukemia intergroup study. *Blood* 76, 2191-2197 (1990).
- Razin A, Cedar H. Distribution of 5-methylcytosine in chromatin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 74, 2725-2728 (1977).
- Razin A, Riggs AD. DNA methylation and gene function. *Science* 210, 604-610 Review (1980).
- Remiszewski SW. The discovery of NVP-LAQ824: from concept to clinic. *Current medicinal chemistry* 10, 2393-2402 (2003).
- Richel DJ, Colly LP, Kluin-Nelemans JC, Willemze R. The antileukaemic activity of 5-Aza-2 deoxycytidine (Aza-dC) in patients with relapsed and resistant leukaemia. *British journal of cancer* 64, 144-148 (1991).
- Richon VM, Emiliani S, Verdin E, Webb Y, Breslow R, Rifkind RA, Marks PA. A class of hybrid polar inducers of transformed cell differentiation inhibits histone deacetylases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 95, 3003-3007 (1998).
- Richon VM, Sandhoff TW, Rifkind RA, Marks PA. Histone deacetylase inhibitor selectively induces p21WAF1 expression and gene-associated histone acetylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 97, 10014-10019 (2000).
- Riggs AD, Pfeifer GP. X-chromosome inactivation and cell memory. *Trends in genetics* 8, 169-174 (1992).
- Rivard GE, Momparler RL, Demers J, Benoit P, Raymond R, Lin K, Momparler LF. Phase I study on 5-aza-2'-deoxycytidine in children with acute leukemia. *Leukemia Research* 5, 453-462 (1981).
- Robert MF, Morin S, Beaulieu N, Gauthier F, Chute IC, Barsalou A, MacLeod AR. DNMT1 is required to maintain CpG methylation and aberrant gene silencing in human cancer cells. *Nature Genetics* 33, 61-65 (2003). Epub 2002 Dec.
- Roberts CW, Orkin SH. The SWI/SNF complex--chromatin and cancer. *Nature reviews. Cancer* 4, 133-142 (2004).



- Robertson KD, Uzvolgyi E, Liang G, Talmadge C, Sumegi J, Gonzales FA, Jones PA. The human DNA methyltransferases (DNMTs) 1, 3a and 3b: coordinate mRNA expression in normal tissues and overexpression in tumors. *Nucleic acids research* 27, 2291-2298 (1999).
- Robertson KD. The role of DNA methylation in modulating Epstein-Barr virus gene expression. *Current topics in microbiology and immunology* 249, 21-34 (2000).
- Rockwell SC. Tumor-Cell Survival. In *Tumor Models in Cancer Research* Edited by: BA Teicher. Totowa (NJ): Humana Press, 617-631 (2002).
- Rosato RR, Almenara JA, Grant S. The histone deacetylase inhibitor MS-275 promotes differentiation or apoptosis in human leukemia cells through a process regulated by generation of reactive oxygen species and induction of p21CIP1/WAF1 1. *Cancer Research* 63, 3637-3645 (2003).
- Ruefli AA, Ausserlechner MJ, Bernhard D, Sutton VR, Tainton KM, Kofler R, Smyth MJ, Johnstone RW. The histone deacetylase inhibitor and chemotherapeutic agent suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) induces a cell-death pathway characterized by cleavage of Bid and production of reactive oxygen species. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 98, 10833-10838 (2001). Epub 2001 Sep.
- Ruefli AA, Bernhard D, Tainton KM, Kofler R, Smyth MJ, Johnstone RW. Suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) overcomes multidrug resistance and induces cell death in P-glycoprotein-expressing cells. *International Journal of Cancer* 99, 292-298 (2002).
- Rustum YM, Takita H, Gomez G. The design of cancer chemotherapy: metabolic modulation and cellular de novo versus salvage metabolism. *Antibiotics and chemotherapy* 28, 86-93. Review (1980).
- Saito A, Yamashita T, Mariko Y, Nosaka Y, Tsuchiya K, Ando T, Suzuki T, Tsuruo T, Nakanishi O. A synthetic inhibitor of histone deacetylase, MS-27-275, with marked in vivo antitumor activity against human tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 96, 4592-4597 (1999).
- Sakashita K, Koike K, Kinoshita T, Shiohara M, Kamijo T, Taniguchi S, Kubota T. Dynamic DNA methylation change in the CpG island region of p15 during human myeloid development. *The Journal of clinical investigation* 1195-1204 (2001).
- Samlowski WE, Leachman SA, Wade M, Cassidy P, Porter-Gill P, Busby L, Wheeler R, Boucher K, Fitzpatrick F, Jones DA, Karpf AR: Evaluation of a 7-day continuous intravenous infusion of decitabine: inhibition of promoter-specific and global genomic DNA methylation. *Journal of Clinical Oncology* 23, 3897-3905 (2005)
- Schröder JK, Kirch C, Flasshove M, Kalweit H, Seidelmann M, Hilger R, Seeber S, Schütte J. Constitutive overexpression of the cytidine deaminase gene confers resistance to cytosine arabinoside in vitro. *Leukemia* 10, 1919-1924 (1996).
- Schrump DS, Fischette MR, Nguyen DM, Zhao M, Li X, Kunst TF, Hancox A, Hong JA, Chen GA, Pishchik V, Figg WD, Murgu AJ, Steinberg SM. Phase I study of decitabine-mediated gene expression in patients with cancers involving the lungs, esophagus, or pleura. *Clinical Cancer Research* 12, 5777-5785 (2006).

- Schuh JC. Trials, tribulations, and trends in tumor modeling in mice. *Toxicologic pathology* 32, 53-66 (2004).
- Scott SA, Lakshimikuttysamma A, Sheridan DP, Sanche SE, Geyer CR, DeCoteau JF. Zebularine inhibits human acute myeloid leukemia cell growth in vitro in association with p15INK4B demethylation and reexpression. *Experimental hematology* 35, 263-273 (2007).
- Shao RG, Shimizu T, Pommier Y. 7-Hydroxystaurosporine (UCN-01) induces apoptosis in human colon carcinoma and leukemia cells independently of p53. *Experimental cell research* 234, 388-397 (1997).
- Shao Y, Gao Z, Marks PA, Jiang X. Apoptotic and autophagic cell death induced by histone deacetylase inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 101, 18030-18035 (2004).
- Sharma RP, Rosen C, Kartan S, Guidotti A, Costa E, Grayson DR, Chase K. Valproic acid and chromatin remodeling in schizophrenia and bipolar disorder: preliminary results from a clinical population. *Schizophrenia Research* 88, 227-231 (2006).
- Shen J, Tai YC, Zhou J, Stephen Wong, CH, Cheang PT, Fred Wong WS, Xie Z, Khan M, Han JH, Chen CS. Synergistic antileukemia effect of genistein and chemotherapy in mouse xenograft model and potential mechanism through MAPK signaling. *Experimental hematology* 35, 75-83 (2007).
- Shen L, Toyota M, Kondo Y, Obata T, Daniel S, Pierce S, Imai K, Kantarjian HM, Issa JP, Garcia-Manero G. Aberrant DNA methylation of p57KIP2 identifies a cell-cycle regulatory pathway with prognostic impact in adult acute lymphocytic leukemia. *Blood* 101, 4131-4136 (2003).
- Sherr CJ. The Pezcoller lecture: cancer cell cycles revisited. *Cancer Research* 60, 3689-3695 Review (2000).
- Shpilberg O, Haddad N, Sofer O, Raanani P, Berkowicz M, Chetrit A, Carter A, Ramot B, Tatarski I, Ben-Bassat I. Postremission therapy with two different dose regimens of cytarabine in adults with acute myelogenous leukemia. *Leukemia Research* 19, 893-897 (1995).
- Simonini MV, Camargo LM, Dong E, Maloku E, Veldic M, Costa E, Guidotti A. The benzamide MS-275 is a potent, long-lasting brain region-selective inhibitor of histone deacetylases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 103, 1587-1592 (2006).
- Simpson-Herren L. Kinetics and tumor models. *Cancer chemotherapy reports* 5, 83-88 (1975).
- Skipper HE, Schabel FM Jr, Wilcox WS, Laster WR Jr, Trader MW, Thompson SA. Experimental evaluation of potential anticancer agents. 28. Effects of therapy on viability and rate of proliferation of leukemic cells in various anatomic sites. *Cancer Chemotherapy Reports* 47, 41-64 (1965).
- Skipper HE, Schabel FM Jr, Wilcox WS. Experimental evaluation of potential anticancer agents. 21. Scheduling of arabinosylcytosine to take advantage of its S-phase specificity against leukemia cells. *Cancer Chemotherapy Reports* 51, 125-165 (1967).
- Sorm F, Veselý J. Effect of 5-aza-2'-deoxycytidine against leukemic and hemopoietic tissues in AKR mice. *Neoplasma* 15, 339-343 (1968).

- Strahl BD, Allis CD. The language of covalent histone modifications. *Nature* 403, 41-45 (2000).
- Strait KA, Dabbas B, Hammond EH, Warnick CT, Istrup SJ, Ford CD. Cell cycle blockade and differentiation of ovarian cancer cells by the histone deacetylase inhibitor trichostatin A are associated with changes in p21, Rb, and Id proteins. *Molecular cancer therapeutics* 13, 1181-1190 (2002).
- Stresemann C, Brueckner B, Musch T, Stopper H, Lyko F. Functional diversity of DNA methyltransferase inhibitors in human cancer cell lines. *Cancer Research* 66, 2794-2800 (2006).
- Suter CM, Martin DI, Ward RL. Germline epimutation of MLH1 in individuals with multiple cancers. *Nature Genetics* 36, 497-501 (2004).
- Suzuki H, Gabrielson E, Chen W, Anbazhagan R, van Engeland M, Weijnenberg MP, Herman JG, Baylin SB. A genomic screen for genes upregulated by demethylation and histone deacetylase inhibition in human colorectal cancer. *Nature genetics* 31, 141-149 (2002).
- Szyf M. DNA methylation and cancer therapy. *Drug resistance updates* 6, 341-353 (2003).
- Szyf M. Epigenetics, DNA Methylation, and Chromatin Modifying Drugs. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* (2009) 2008 Oct Epub ahead of print
- Talmadge JE, Singh RK, Fidler IJ, Raz A. Murine Models to Evaluate Novel and Conventional Therapeutic Strategies for Cancer *American Journal of Pathology* 170, 793-804 (2007).
- Tannock IF, Lee CM, Tunggal JK, Cowan DSM, Egorin MJ. Limited penetration of anticancer drugs through tissue: A potential cause of resistance of solid tumors to chemotherapy. *Clinical Cancer Research* 8, 878-884 (2002).
- Teofili L, Martini M, Luongo M, Diverio D, Capelli G, Breccia M, Lo Coco F, Leone G, Larocca LM. Hypermethylation of CpG islands in the promoter region of p15(INK4b) in acute promyelocytic leukemia represses p15(INK4b) expression and correlates with poor prognosis. *Leukemia* 17, 919-924 (2003).
- Thibault A, Figg WD, Bergan RC, Lush RM, Myers CE, Tompkins A, Reed E, Samid D. A phase II study of 5-aza-2'deoxyctidine (decitabine) in hormone independent metastatic (D2) prostate cancer. *Tumori* 84, 87-79 (1998).
- Thorne AW, Kmiecik D, Mitchelson K, Sautiere P, Crane-Robinson C. Patterns of histone acetylation. *European journal of biochemistry* 13, 701-713 (1990).
- Toyota M, Ahuja N, Ohe-Toyota M, Herman JG, Baylin SB, Issa JP. CpG island methylator phenotype in colorectal cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 96, 8681-8686 (1999).
- Toyota M, Issa JP. CpG island methylator phenotypes in aging and cancer. *Seminars in cancer biology* 9, 349-357 Review (1999).
- Toyota M, Kopecky KJ, Toyota MO, Jair KW, Willman CL, Issa JP. Methylation profiling in acute myeloid leukemia. *Blood* 97, 2823-2829 (2001).
- Turker, MS. Gene silencing in mammalian cells and the spread of DNA methylation. *Oncogene* 21, 5388-5393 (2002).
- Turker MS, Bestor TH Formation of methylation patterns in the mammalian genome. *Mutation research* 386, 119-130 (1997).

- Valeriote F, Lin H. Synergistic interaction of anticancer agents: a cellular perspective. *Cancer Chemotherapy Reports* 59, 895–900 (1975).
- van Groeningen CJ, Leyva A, O'Brien AM, Gall HE, Pinedo HM. Phase I and pharmacokinetic study of 5-aza-2'-deoxycytidine (NSC 127716) in cancer patients. *Cancer Res.* 1986 Sep;46(9):4831-6.
- Veigl ML, Kasturi L, Olechnowicz J, Ma AH, Lutterbaugh JD, Periyasamy S, Li GM, Drummond J, Modrich PL, Sedwick WD, Markowitz SD. Biallelic inactivation of hMLH1 by epigenetic gene silencing, a novel mechanism causing human MSI cancers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 95, 8698-8702 (1998).
- Velicescu M, Weisenberger DJ, Gonzales FA, Tsai YC, Nguyen CT, Jones PA. Cell division is required for de novo methylation of CpG islands in bladder cancer cells. *Cancer Research* 62, 2378-2384 (2002).
- Vesely J, Cihák A, Sorm F. Characteristics of mouse leukemic cells resistant to 5-azacytidine and 5-aza-2'-deoxycytidine. *Cancer Research* 28, 1995-2000 (1968).
- Vrana JA, Decker RH, Johnson CR, Wang Z, Jarvis WD, Richon VM, Ehinger M, Fisher PB, Grant S. Induction of apoptosis in U937 human leukemia cells by suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) proceeds through pathways that are regulated by Bcl-2/Bcl-XL, c-Jun, and p21CIP1, but independent of p53. *Oncogene* 18, 7016-7025 (1999).
- Warrell RP Jr, He LZ, Richon V, Calleja E, Pandolfi PP. Therapeutic targeting of transcription in acute promyelocytic leukemia by use of an inhibitor of histone deacetylase. *Journal of the National Cancer Institute* 90, 1621-1625 (1998).
- Weisberg E, Catley L, Kujawa J, Atadja P, Remiszewski S, Fuerst P, Cavazza C, Anderson K, Griffin JD. Histone deacetylase inhibitor NVP-LAQ824 has significant activity against myeloid leukemia cells in vitro and in vivo. *Leukemia* 18, 1951-1963 (2004).
- Wijermans PW, Krulder JW, Huijgens PC, Neve P. Continuous infusion of low-dose 5-Aza-2'-deoxycytidine in elderly patients with high-risk myelodysplastic syndrome. *Leukemia* 11, 1-5 (1997).
- Wilcox WS. The last surviving cancer cell: the chances of killing it. *Cancer Chemotherapy Reports* 50, 541-542 (1966).
- Wiley JS, Jones SP, Sawyer WH, Paterson AR. Cytosine arabinoside influx and nucleoside transport sites in acute leukemia. *The Journal of clinical investigation* 69, 479-489 (1982).
- Wilson VL, Jones PA, Momparler RL. Inhibition of DNA methylation in L1210 leukemic cells by 5-aza-2'-deoxycytidine as a possible mechanism of chemotherapeutic action. *Cancer Research* 43, 3493-3496 (1983).
- Wolffe AP, Hayes JJ. Chromatin disruption and modification. *Nucleic Acids Research* 27, 711-720 Review (1999).
- Wong IH, Ng MH, Huang DP, Lee JC. Aberrant p15 promoter methylation in adult and childhood acute leukemias of nearly all morphologic subtypes: potential prognostic implications. *Blood* 95, 1942-1949 (2000).
- Wu JC, Santi DV. On the mechanism and inhibition of DNA cytosine methyltransferases. *Progress in clinical and biological research* 198, 119-129 (1985).

- Wu LP, Wu LP, Wang X, Li L, Zhao Y, Lu S, Yu Y, Zhou W, Liu X, Yang J, Zheng Z, Zhang H, Feng J, Yang Y, Wang H, Zhu WG. Histone deacetylase inhibitor depsipeptide activates silenced genes through decreasing both CpG and H3K9 methylation on the promoter. *Molecular and cellular biology* 28, 3219-3235 (2008).
- Xiang S, Short SA, Wolfenden R, Carter CW Jr. Cytidine deaminase complexed to 3-deazacytidine: a "valence buffer" in zinc enzyme catalysis. *Biochemistry* 35, 1335-1341 (1996).
- Xie S, Wang Z, Okano M, Nogami M, Li Y, He WW, Okumura K, Li E. Cloning, expression and chromosome locations of the human DNMT3 gene family. *Gene* 236, 87-95 (1999).
- Yang AS, Doshi KD, Choi SW, Mason JB, Mannari RK, Gharybian V, Luna R, Rashid A, Shen L, Estecio MR, Kantarjian HM, Garcia-Manero G, Issa JP. DNA methylation changes after 5-aza-2'-deoxycytidine therapy in patients with leukemia. *Cancer Research* 66, 5495-5503 (2006).
- Yang AS, Estécio MR, Doshi K, Kondo Y, Tajara EH, Issa JP. A simple method for estimating global DNA methylation using bisulfite PCR of repetitive DNA elements. *Nucleic Acids Research* 32, e38 (2004).
- Yang X, Ferguson AT, Nass SJ, Phillips DL, Butash KA, Wang SM, Herman JG, Davidson NE. Transcriptional activation of estrogen receptor alpha in human breast cancer cells by histone deacetylase inhibition. *Cancer Research* 60, 6890-6894 (2000).
- Yoo CB, Chuang JC, Byun HM, Egger G, Yang AS, Dubeau L, Long T, Laird PW, Marquez VE and Jones PA Long-term Epigenetic Therapy with Oral Zebularine Has Minimal Side Effects and Prevents Intestinal Tumors in Mice *Cancer prevention research* 1,4 (2008).
- Yoo CB, Jones PA. Epigenetic therapy of cancer: past, present and future. *Nature reviews. Drug discovery* 5, 37-50 Review (2006).
- Yu X, Guo ZS, Marcu MG, Neckers L, Nguyen DM, Chen GA, Schrupp DS. Modulation of p53, ErbB1, ErbB2, and Raf-1 expression in lung cancer cells by depsipeptide FR901228. *Journal of the National Cancer Institute* 94, 504-513 (2002).
- Zagonel V, Lo Re G, Marotta G, Babare R, Sardeo G, Gattei V, De Angelis V, Monfardini S, Pinto A. 5-Aza-2'-deoxycytidine (Decitabine) induces trilineage response in unfavourable myelodysplastic syndromes. *Leukemia* 7, 30-35 (1993).
- Zhang P, Liégeois NJ, Wong C, Finegold M, Hou H, Thompson JC, Silverman A, Harper JW, DePinho RA, Elledge SJ. Altered cell differentiation and proliferation in mice lacking p57KIP2 indicates a role in Beckwith-Wiedemann syndrome. *Nature* 387, 151-158 (1997).
- Zhou L, Cheng X, Connolly BA, Dickman MJ, Hurd PJ, Hornby DP. Zebularine: a novel DNA methylation inhibitor that forms a covalent complex with DNA methyltransferases. *Journal of molecular biology* 321, 591-599 (2002).

**ANNEXES**

## ANNEXE 1

**Calculs pharmacocinétiques de la 5-Aza-CdR**La demi-vie apparente d'élimination

$$t_{1/2} = \frac{0,693}{k_e} \quad \text{où } k_e = \text{constante d'élimination}$$

$t_{1/2}$  de la 5-Aza-CdR est d'environ 15 minutes (0,25 h) (Momparler, 2005b) donc,

$$k_e = \frac{0,693}{0,25 \text{ h}}, \quad k_e = 2,8 / \text{h}$$

Concentration plasmatique à l'équilibre (C<sub>ss</sub>)

Le débit de perfusion  $k_0$  (mg/kg/h) et la *clairance* totale du médicament régissent la concentration plasmatique à l'équilibre (C<sub>ss</sub>) de l'agent. La C<sub>ss</sub> est atteinte et constante lorsque la vitesse d'élimination, qui s'accroît avec les concentrations, compense l'apport continu de l'agent en perfusion. Alors,

$$C_{ss} = \frac{k_0}{k_e \times V_d} \quad \text{où } V_d = \text{volume de distribution}$$

$V_d$  est de ~0,9 L/ kg chez la souris (Chabot et coll., 1983b)

C<sub>ss</sub> est donc égale à :

$$C_{ss} = \frac{k_0(\text{mg/kg/h})}{\frac{2,8}{\text{h}} \times \frac{0,9 \text{ L}}{\text{kg}}} \quad \text{où } C_{ss} (\text{mg/L})$$

## ANNEXE 2

### Modèle de Skipper-Schabel-Wilcox, le *Log kill*; explications et calculs

On peut mesurer l'efficacité d'une chimiothérapie et l'interaction entre les agents administrés en comparant le taux de survies des souris traitées au groupe contrôle. On peut ensuite traduire les résultats obtenus selon le modèle de Skipper-Schabel-Wilcox qui s'exprime en logarithme de cellules leucémiques tuées (*log kill*) (Wilcox, 1966). On considère que le *log kill* correspond à  $y = -\log(F)$  où  $F$  représente la fraction de cellules qui survie au traitement (Lloyd, 1975). Par exemple, si la fraction cellulaire qui survie est de 0,1 ; cela correspond à 1,0 *log kill*, alors qu'un *log kill* de 10,0 correspond à une fraction cellulaire qui survie de 0,000 000 000 1. Classiquement, une réduction de 1 *log* correspond à une rémission partielle et au moins 2 *log* sont nécessaires pour anticiper une rémission complète (Simpson-Herren, 1975).

Concrètement, on utilise la cinétique cellulaire pour évaluer ce *log kill*. Étant donnée que les cellules L1210 doublent environ aux 12 heures, cela prends 1.6 jours pour augmenter le compte cellulaire de dix fois :

$$\text{Temps de doublement} = \frac{\text{temps écoulé (h)} \times 0.3}{\log \text{ du nombre de cellules au temps } x - \log \text{ du nombre de cellules au début}}$$

Conséquemment, il y a en une journée 0.6 *log* de cellules produites ; donc par chaque jour de vie supplémentaire, il y a 0.6 *log* de cellules tuées. On peut alors évaluer la fraction cellulaire tuée en présence du traitement (Momparker & Gonzales, 1978) :

$$\text{Fraction de cellules tuées (log kill)} = (\text{temps de survie}_{\text{souris traitée}} - \text{temps de survie}_{\text{souris contrôle}}) \times 0.6 \text{ log kill} / j$$

Ainsi, on peut comparer la fraction de cellules tuées par chaque agent seul ou en combinaison selon la méthode de Valeriote and Lin (1975).



### ANNEXE 3

#### La méthode de Valeriote et Lin

La méthode de Valeriote et Lin (Valeriote & Lin, 1975) nous permet d'évaluer la nature des interactions observées entre différents agents chimiothérapeutiques en additionnant leurs effets thérapeutiques. Les interactions peuvent être additives, synergiques ou antagonistes. Bien que d'autres méthodes soient utilisées pour évaluer ces interactions, la méthode de Valeriote et Lin est celle de choix pour analyser l'efficacité des traitements sur le potentiel clonogénique des cellules cancéreuses.

On mesure la fraction de cellules qui survivent aux traitements (SF) en comparant les cellules traitées aux cellules non traitées.

Pour déterminer la nature de l'interaction, il suffit de comparer les SF :

Par exemple, si pour la combinaison de l'agent A et B on obtient :

$SF_{A+B} < SF_A + SF_B$  l'interaction est synergique

$SF_{A+B} = SF_A + SF_B$  l'interaction est additive

$SF_{A+B} > SF_A + SF_B$  l'interaction est antagoniste

## ANNEXE 4

### **La méthode de Kaplan Meier**

La méthode de Kaplan Meier a été utilisée pour présenter les courbes de survie des souris (GraphPad Prism software). Cette méthode permet de présenter des courbes de survie des sujets traités qui sont soit décédés, qui ont soit survécu pendant un temps donné, qui n'ont toujours pas obtenus de réponses objectives ou qui au contraire sont encore en vie au moment de l'analyse. Toutes les données sont alors prises en compte, et elles permettent d'estimer la probabilité qu'a un sujet de répondre au traitement dans un temps donné. On peut alors comparer différentes courbes. Cette méthode est généralement celle de choix pour présenter des données précliniques.

L'analyse de la courbe peut se faire de différentes façons ;

- Nous avons évalué la valeur de P à l'aide d'un test d'ANOVA suivi d'un test de Tukey et (GraphPad Prism software).
- La méthode de Valeriotte et Lin (Valeriotte & Lin, 1975) a été utilisé pour déterminer la nature des interactions.

**ANNEXE 5**

**Les permissions des coauteurs et des éditeurs pour chacun des articles présentés dans cette thèse sont disponibles dans la version papier au Département de Pharmacologie de l'Université de Montréal**

## ANNEXE 6

**ACTIVATION OF EXPRESSION OF p15, p73 AND E-CADHERIN IN LEUKEMIC CELLS BY DIFFERENT CONCENTRATIONS OF 5'-AZA-2'-DEOXYCYTIDINE (DECITABINE)**

Nuno Jorge Farinha<sup>1, 2</sup>, Sepideh Shaker<sup>3</sup>, **Maryse Lemaire**<sup>3</sup>, Louise Momparler<sup>3</sup>, Mark Bernstein<sup>1</sup> and Richard L. Momparler<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Service d'hématologie-oncologie, Hôpital Sainte-Justine, Montréal, Québec H3T 1C5, Canada;

<sup>2</sup>Division Pediatric Hematology and Oncology, Hospital de S. Joio, A1 Hernani Monteiro, 4200-319 Porto, Portugal;

<sup>3</sup>Département de pharmacologie, Université de Montréal and Centre de recherche, Hôpital Sainte-Justine, Montréal, Québec H3T 1C5, Canada

*Running title:* Activation of p15 in Leukemic Cells by 5-aza-2'-Deoxycytidine

*Key words:* 5-aza-2'-deoxycytidine, leukemia, methylation, p15CDKN2B, E-cadherin, p73

***Anticancer Research: 24: 75-78 (2004)***

**Étant donnée la mince participation de Maryse Lemaire à cette publication (validations de données et mise en place de la méthodologie), et pour éviter d'alourdir cet ouvrage, cet article n'a pas été ajouté à la thèse.**

## ANNEXE 7

## RÉSUMÉ FRANÇAIS DE L'ARTICLE

**POTENTIALISATION DE L'ACTION ANTINÉOPLASIQUE DE LA 5-AZA-2'-DÉSOXYCYTIDINE PAR DIFFÉRENTS INHIBITEURS DES DÉACÉTYLASES DES HISTONES DANS LE TRAITEMENT DE LA LEUCÉMIE.**

Les changements épigénétiques, tels la méthylation de l'ADN et la déacétylation des histones, jouent un rôle important dans la leucémogénèse. La 5-aza-2'-désoxycytidine (5-Aza-CdR, Decitabine, Dacogen) est un inhibiteur de la méthylation de l'ADN qui possède une activité anti-leucémique *in vitro* et *in vivo*. Il a récemment été approuvé dans le traitement du syndrome myélodysplasique. Le NVP-LAQ824 (LAQ) et l'acide suberoylohydroxamique (SAHA) sont des inhibiteurs des déacétylases des histones qui ont montré une activité antinéoplasique intéressante en permettant la ré-expression de gènes suppresseurs de tumeurs réprimés, conduisant ainsi à l'arrêt de la croissance cellulaire. La 5-Aza-CdR, le LAQ et le SAHA ont aussi montrés une activité anti-leucémique lors d'essais cliniques. Récemment, l'existence d'une complémentarité entre la méthylation de l'ADN et la déacétylation des histones a été caractérisée. L'inhibition de ces mécanismes permettrait la ré-expression synergique de TSGs dont l'expression est compromise par la mise en place des phénomènes épigénétiques. Cette synergie pourrait être exploitée et employée dans l'élaboration d'une chimiothérapie contre la leucémie. L'objectif de notre étude était de comparer sur des cellules leucémiques humaines deux combinaisons d'agents expérimentaux ayant des mécanismes d'action épigénétiques complémentaires; soit la 5-Aza-CdR + le LAQ et la 5-Aza-CdR + le SAHA. Les combinaisons simultanées de la 5-Aza-CdR et du LAQ ou du SAHA produisent un effet antinéoplasique supérieur à celui produit par chacun des agents seuls alors que l'administration séquentielle de ces agents sur les cellules HL-60 produit une perte de clonogénicité légèrement plus grande que celle observée avec les combinaisons simultanée.

**PRÉSENTATION DE L'ARTICLE*****ENHANCEMENT OF ANTINEOPLASTIC ACTION OF 5-AZA-2'-  
DEOXYCYTIDINE BY DIFFERENT HISTONE DEACETYLASE INHIBITORS  
IN THE TREATMENT OF LEUKEMIA***

Maryse Lemaire<sup>1</sup> and Richard L. Momparler<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Département de pharmacologie, Université de Montréal, Centre de recherche pédiatrique, <sup>2</sup>Service d'hématologie-oncologie, Hôpital Sainte-Justine, 3175 Côte Sainte-Catherine, Montréal, Québec, H3T 1C5, Canada

Sponsorship: This study was supported by grants from the Canadian Cancer Society (RLM #014193) and Cancer Research Society.

*Running title:* Dose-response to 5-AZA-CdR chemotherapy

Cet article est prêt à être soumis à l'éditeur d'un journal scientifique.

**ABSTRACT**

Epigenetic changes, such as DNA methylation and histone deacetylation, play an important role in leukemogenesis. 5-aza-2'-deoxycytidine (5-Aza-CdR, Decitabine, Dacogen) is an inhibitor of DNA methylation who showed interesting antileukemic effect *in vitro* and *in vivo*. Moreover, 5-Aza-CdR has been reported to activate repressed tumor suppressor genes (TSGs) that produce cell cycle arrest. NVP-LAQ824 (LAQ) and suberoylohydroxamic acid (SAHA) are novel inhibitors of histone deacetylase (HDACi) that also showed some promising antineoplastic activity. Clinical investigations have been initiated with all of those drugs, and 5-Aza-CdR and SAHA have been approved by the FDA for the treatment of different pathologies. Evidences of a "cross-talk" between DNA methylation and histone deacetylation have been reported. Inhibition of those mechanisms can result in a synergistic activation of silent TSGs and be an effective epigenetic therapy for leukemia. The objective of our study was to compare the combination of 5-Aza-CdR with different HDACi (LAQ or SAHA) on human leukemic cells. The combination of 5-Aza-CdR and LAQ or SAHA produced a greater loss of clonogenicity on HL-60 leukemic cells than either agent alone. No signs of antagonism between 5-Aza-CdR and LAQ or SAHA were observed when they were administered simultaneously, whereas as sequential exposure of those drugs gave a slightly better response for the combination of 5-Aza-CdR and LAQ.

Key words: leukemia, 5-aza-2'-deoxycytidine, NVP-LAQ824, suberoylohydroxamic acid (SAHA), epigenetic chemotherapy

## INTRODUCTION

Patients with advanced leukemia who relapse after intensive chemotherapy have a poor prognosis (1, 2). Innovative chemotherapy should be investigated on these patients. Recent reports have shown that inactivation of tumor suppressor genes (TSGs) by epigenetic events, such as aberrant DNA methylation and histone deacetylation, play an important role in oncogenesis (3-8). Aberrant methylation of a TSG apparently blocks its expression by preventing access to transcription machinery to promoter region and by recruiting histone deacetylases that lead to unfavorable configuration of chromatin for transcription (9). Since epigenetic changes are reversible, they are interesting targets for chemotherapeutic agents (6).

5-aza-2'-deoxycytidine (5-Aza-CdR, Decitabine, Dacogen) is a potent demethylating agent that has been shown to reactivate *in vitro* many different types of TSGs previously silenced by DNA methylation (6, 10-12). 5-Aza-CdR was also shown to be a potent antileukemic agent and antitumor agent in animal models (13-15) and in patients (16-19). The mechanism of the antineoplastic action of this analogue is related to its reprogramming of the neoplastic cells down the pathway leading to terminal differentiation or senescence and resulting in an irreversible loss of proliferative potential (20-22).

Inhibitors of histone deacetylases (HDACi) also show interesting preclinical antineoplastic activity (23-25). These inhibitors can even reactivate genes that are primarily not silenced (25, 26). NVP-LAQ824 (LAQ) is a potent HDACi (27-29) that has been shown to increase the survival time of mice from a leukemic model (30). Some phase I clinical trials have been started with this agent (29, 31). LAQ can inhibit leukemic and tumor cellular growth, lead the cells to undergo apoptosis or induce cell cycle arrest in G2/M phase (28, 29, 32).

The suberoylohydroxamic acid (SAHA, Zolinza, vorinostat) is also a potent HDACi (29, 33) which has been the first agent approved as an HDACi by the FDA



(USA) in 2006. It is used in the treatment of patients with cutaneous T-cell lymphoma, a type of skin cancer. SAHA is also tested in several type of cancer, including leukemia (24, 29, 31, 34). SAHA can inhibit cellular growth (35), induce differentiation and lead the cells to undergo apoptosis (29, 36). This HDACi induce cell cycle arrest in G1 phase (37), probably by re-expressing CDK1A gene, which is involved in cell cycle regulation (26). This agent showed interesting chemoprevention activity by suppressing the development of tumors in animal models (38). Moreover, SAHA is reported to overcome MDR resistance by inducing cell death in P-glycoprotein-expressing cultured cells (39).

The interaction between inhibitors of methylation and histone deacetylases was shown by Cameron *et al.* (40) who observed that 5-Aza-CdR in combination with the HDACi trichostatin A (TSA) produced a synergistic activation of the p15 tumor suppressor gene in leukemic cells. Since TSA is in the same chemical structural family as LAQ and SAHA (hydroxamic acids), this reports stimulated our interest to investigate the antineoplastic activity of 5-Aza-CdR in combination with those HDACi against leukemic cells. In addition, we previously observed an enhancement of the antineoplastic activity of 5-AZA-CdR on tumor cell lines and leukemia cell by other HDACi (15, 41, 42). Since both LAQ and SAHA are reported to inhibit the histone déacétylases enzymes in a more powerfull manner than other HDACi previously evaluated, it gives us a rationale to test those combinations (37).

In this report we have observed that 5-Aza-CdR, LAQ and SAHA have a potent antineoplastic effect in a dose-dependent manner on the myeloid leukemic cell line HL-60. The combinations of 5-Aza-CdR and LAQ or SAHA have also enhanced the loss of clonogenicity compare with each drug alone.

Some authors have reported some antagonism with the simultaneous schedule of administration of 5-Aza-CdR and LAQ (43). In order to exploit the full chemotherapeutic potential of both combinations, we tested different schedules of administration. Even if the sequential exposure of 5-Aza-CdR and LAQ did produce a

slightly better loss of clonogenic potential in HL-60 cells, we did not observe any significant lost in the antiproliferative action of the combination of 5-Aza-CdR and LAQ or neither 5-Aza-CdR and SAHA on the leukemic cell line by using them simultaneously.

## METHODS

**Cell lines.** The human acute myeloid HL-60 cell line was obtained from American Tissue Culture Collection (ATCC, Manassas, VA). These cells were maintained at 37°C with 5% CO<sub>2</sub> in RPMI-1640 medium (Life Technologies, Burlington, Ontario) with 5% heat-inactivated fetal calf serum (WISENT, St-Bruno, Quebec). The doubling time of the HL-60 was ~ 16 h.

**Chemicals.** 5-Aza-CdR was obtained from Pharmachemie (Haarlem, Netherlands) and it was dissolved in sterile PBS 1X solution and stored at -70°C to prevent decomposition. LAQ was kindly provided by Dr Peter Atadja from Novartis Institutes for Biomedical Research (New Jersey, USA) and dissolved in DMSO.

**Clonogenic assay.** A 5 ml aliquot of HL-60 (10<sup>4</sup> cells/ml) in log growth phase was placed in 25 cm<sup>2</sup> tissue-culture flasks. The indicated concentrations of 5-Aza-CdR and/or LAQ and/or SAHA were added for 48 h. Because of its rapid degradation, 5-Aza-CdR was added every 24 h. For the sequential exposure, 5-Aza-CdR was administered first for 48h and then LAQ or SAHA were added for another 24 h. The flasks were incubated at 37°C and at 48 h an aliquot was removed for counting with a Model Z Coulter Counter. 100 cells were placed in 2 ml of 0.3% soft agar RPMI 1640 medium containing 20% serum. The number of colonies (>500 cells) was counted after 14 days of incubation. The cloning efficiency of HL-60 cells was in the range of 60%.

**Isolation of RNA and RT-PCR analysis.** In order to evaluate if cells undergo in apoptosis, we evaluate the degradation of the small human RNA hY1 (44). HL-60 leukemic cells were treated with 5-AZA-CdR (10 ng/ml), LAQ (10 ng/ml) and SAHA (100 ng/ml), alone or in combination, for 48 h. Because 5-AZA-CdR is rapidly degraded, it was added to cells every 24 h. Cells were harvested 24 h after removal of the drugs. Total RNA was isolated using Rneasy Mini Kit (Qiagen, Mississauga,

Ontario, CA). For cDNA synthesis, total RNA was reverse transcribed in a reaction mixture using Omniscript Reverse Transcriptase kit (Qiagen). The reaction was performed at 37°C for 60 min followed by 5 min at 93°C to inactivate the enzyme. PCR amplifications were performed using HotStar Taq Polymerase (Qiagen) and specific primers spanning different exons for human 18S ribosomal RNA and small RNA hY1. The 18S RNA (GenBank accession number X03205) was amplified as an internal control using as sense primer 5'-TCG ATG GTA GTC GCC GTG CCT A-3' and antisense primer 5'-CTG CTG CCT TCC TTG GAT GTG GTA-3'. The length of the PCR product of 18S cDNA was 110 bp. For small RNA Y1 (GenBank accession number NM\_005381). Samples were amplified in a Whatman Biometra T gradient thermocycler (Gottingen, Germany) under the following conditions. For 18S and small RNA hY1, the PCR conditions were 15 min at 95°C to activate Taq polymerase, denaturation at 94°C for 45 s, annealing at 60°C (18S) or 58°C (Y1) for 30 s and extension at 72°C for 30 s, for 5 cycles. Then the annealing temperature was lowered by 2°C for an additional 10–15 cycles (18S) or for an additional 25 cycles (Y1). For each gene, the number of cycles was terminated during the exponential phase of DNA amplification. The PCR products were electrophoresed on 2% agarose gel and detected by ethidium bromide staining. For quantitative detection of gene expression, we used the 18S as the reference standard to normalize the data. The amount of cDNA from the drug-treated samples that would amplify the identical amount of 18S DNA during the exponential phase for each sample was determined. The concentration of the amplified DNA was determined by Agilent 2100 Bioanalyzer (Palo Alto, CA, USA). This instrument uses a very sensitive capillary electrophoresis and fluorescent detection to measure the concentration and size of DNA from a sample size of only 1 ml.

***Isolation of DNA and bisulfite treatment.*** In order to study the global methylation status of the genome of the HL-60 leukemic cells, the LINE-1 (GenBank accession number AF148856) assay was used (45) HL-60 cells were treated with different agents: 5-Aza-CdR (10 ng/ml), LAQ (10 ng/ml) or SAHA (100 ng/ml) for 48 h. Genomic DNA was isolated 24 h after drug removal using Dneasy Tissue Kit

(Qiagen). Genomic DNA was then treated with bisulfite (46). This bisulfite treatment converts unmethylated cytosine residues to uracil, whereas 5-methylcytosine residues remain unchanged.

***Quantitation of DNA methylation by LINE assay.*** Analyses of changes in DNA methylation after treatment were evaluated by the method used for the LINE-1 assay (45). PCR was performed on bisulfite treated DNA using specific primers for either LINE-1 (sense 5'-TTA GGG AGT GTT AGA TAG TGG -3' and antisense 5'-ATA CCC TAC CCC CAA AAA TAA AAC -3' (primer sequences were designed by Allen S. Yang, personal communication). The PCR conditions were the same as RT-PCR for 18S, except the annealing temperature was 53°C and the total number of cycles was 35. The PCR products were then purified using the DNA Clean and Concentrator Kit (Zymo Research, CA, USA) and digested with *Hinf I* enzyme (New England BioLabs, MA, USA) according to manufacturer's protocols. *Hinf I* will only cut the repetitive LINE-1 elements that were originally methylated, leading to a 53 and a 398 bp fragmentation product that can be quantified. The samples were placed on a 2% agarose gel, detected by ethidium bromide staining and their concentrations were evaluated by the Agilent 2100 Bioanalyzer.

***Statistical considerations.*** Differences between groups were evaluated by one-way ANOVA test. The value  $p < 0.05$  was taken to indicate statistical significance. The data correspond to the mean values  $\pm$  SD for  $n \geq 3$ . The Valeriote and Lin method (47, 48) was used to determine if the interaction observed between drugs in the clonogenic assays was additive, synergistic or antagonistic.

## RESULTS

### *Effect of 5-Aza-CdR, LAQ and SAHA on colony formation of HL-60 leukemic cells.*

HL-60 cells were exposed to different concentrations of 5-Aza-CdR, LAQ or SAHA. All three drugs decreased the proliferative potential of HL-60 cells in a dose-dependent manner (Table 1). For a 48 h exposure, 5-Aza-CdR (10 ng/ml) simultaneously co-administered with LAQ (10 ng/ml) (Figure 1A) or SAHA (100 ng/ml) (Figure 1B) produced a significantly greater loss of clonogenicity than either drug alone ( $p < 0.01$ ).

Since some authors reported that it is possible to block the action of 5-Aza-CdR with HDACi (43), we assess the capacity of LAQ or SAHA to inhibit the antineoplastic action of 5-Aza-CdR on leukemic cells. As shown in figure 2, LAQ (10ng/ml) or SAHA (100 ng/ml) did not prevent the action of concentration of 5-Aza-CdR (100 ng/ml) that gave  $> 97\%$  in loss of clonogenicity by itself ( $p > 0.05$ ). However, even if no antagonism as been noted, the sequential administration of 5-Aza-CdR and LAQ gave a greater loss of clonogenicity ( $>97\%$ ,  $p < 0.01$ ) than the simultaneous one (82%). The sequential administration of 5-Aza-CdR and SAHA gave similar results to those obtained with the simultaneous exposure (data not shown).

### *Effect of 5-AZA-CdR, LAQ and SAHA on gene expression.*

LAQ (10 ng/ml) does not promote the global demethylation effect of 5-Aza-CdR (10 ng/ml) on HL-60, as measured by tracking the amount of LINE-1 element (45) on the HL-60 genome (Figure 3), even at concentrations that gave a better loss of clonogenicity than each drug alone. Also, the combination of 5-Aza-CdR and LAQ does not promote the reexpression of p57KIP2 tumor suppressor gene reported to be silenced by epigenetic events in leukemia (data not shown) (46). Since LAQ is reported to induce apoptosis (28), we suggest that the significant greater loss of clonogenicity observed when it is co-administered with 5-AZA-CdR may be

attributable to apoptosis. Apoptosis can be demonstrated by tracking the degradation of human cytoplasmic small RNA hY1 (44). Using RT-PCR, we observed a quantitative degradation of the cytoplasmic small RNA hY1 and even its reduction by 90% when HL-60 cells are exposed to both drugs (Figure 4). However, the combination does not give significant result compare to each drug alone ( $p > 0.05$ ). Similar non-significant results on cytoplasmic small RNA hY1 were obtained with co-exposure of 5-AZA-CdR and SAHA (data not shown).

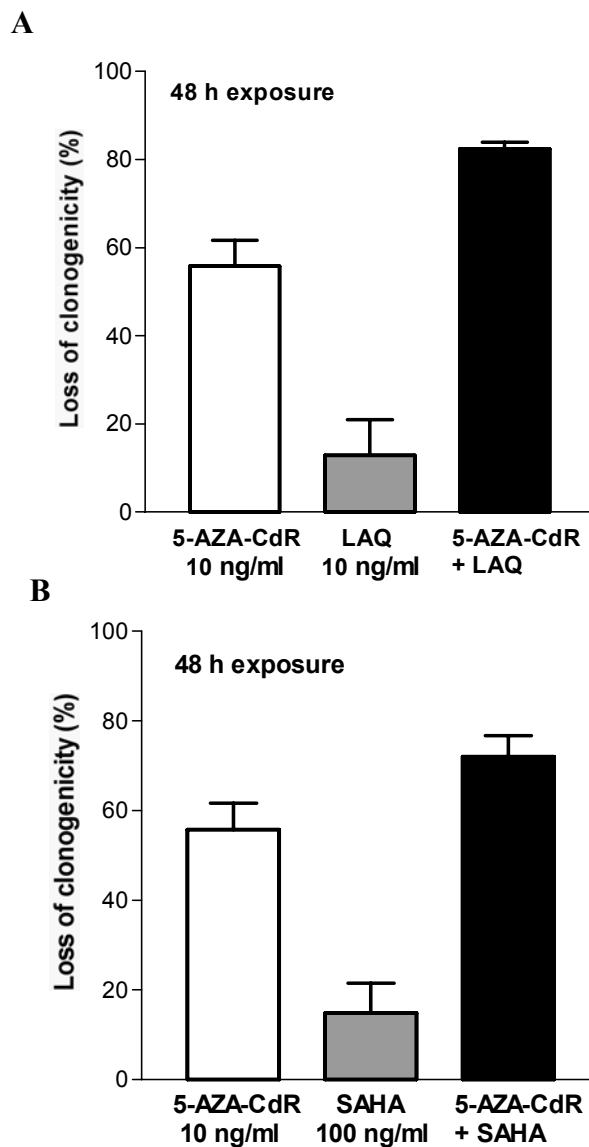
**Table 17-1****Effect of 5-AZA-CdR, LAQ or SAHA on loss of clonogenicity on HL-60 leukemic cells**

<b>Drug concentration (ng/ml)</b>	<b>No. of colonies</b>	<b>Loss of clonogenicity (%)</b>
<b>5-AZA-CdR</b>		
0	65.6 ± 8.7*	-
1	46.0 ± 4.1	29.9
10	27.0 ± 3.6	58.8
100	2.6 ± 5.0	>97
1000	0	100
<b>LAQ</b>		
0	65.6 ± 8.7*	-
10	57.1 ± 5.3	13.2
25	2.1 ± 1.7	96.8
50	0 ± 1.0	>98
<b>SAHA</b>		
0	65.6 ± 8.7*	-
100	54.1 ± 7.1	17.5
500	18.8 ± 2.9	71.3
1000	1.3 ± 1.0	>98

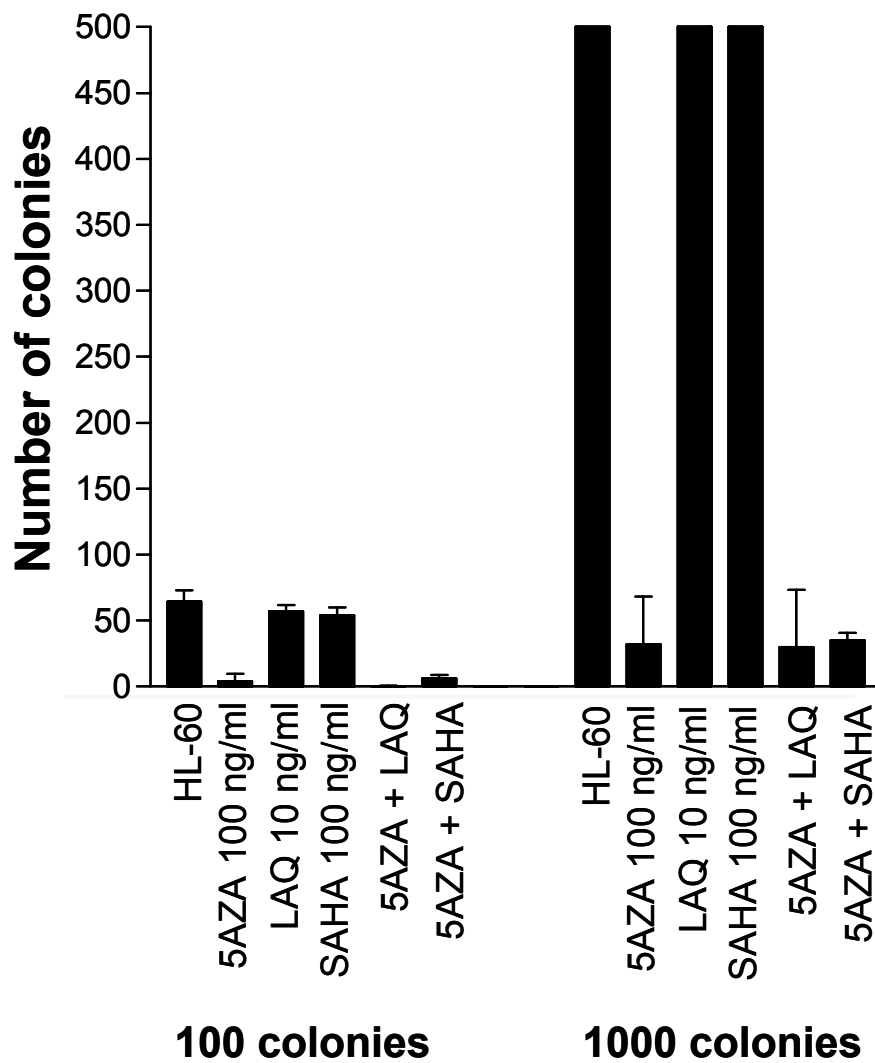
HL-60 leukemic cells were exposed to the indicated concentrations of 5-Aza-CdR, LAQ or SAHA for 48 h. The number of colonies was determined on day 14. Loss of clonogenicity is relative to control cells without treatment.

\*Mean values ± SD, n ≥ 4.

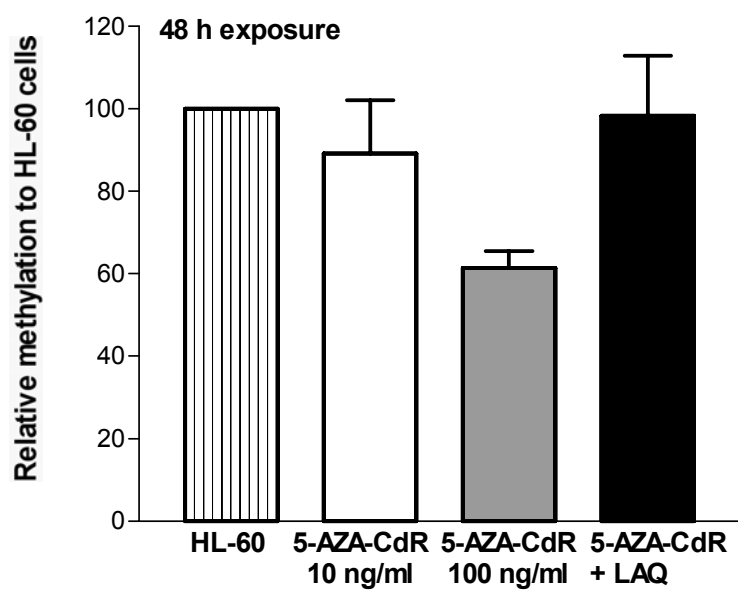




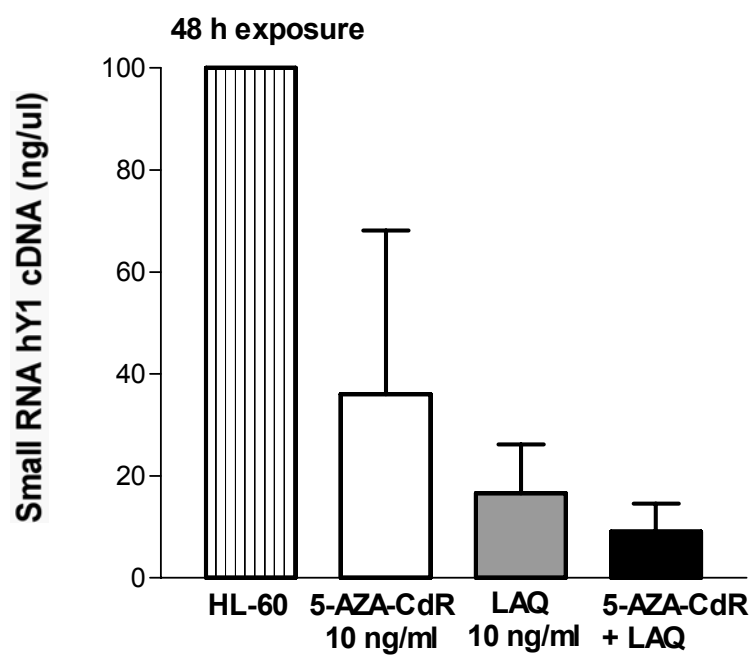
**Figure 17-1.** Effect on loss of clonogenicity of a simultaneous exposure of HL-60 cells to 5-AZA-CdR and LAQ (A) or SAHA (B). The cells were exposed for 48 h to the indicated concentrations of drugs and the loss of proliferation potential was determined by colony assay. Data shown are mean values  $\pm$  SD,  $n \geq 4$ . 5-Aza-CdR and LAQ (A) or 5-Aza-CdR and SAHA (B) in combination produced a significantly greater loss in clonogenicity than either drug alone ( $p < 0.01$ ).



**Figure 17-2. Effect of LAQ and SAHA on loss of clonogenicity on HL-60 cells exposed to a higher concentration of 5-Aza-CdR.**  
5-AZA; 5-Aza-CdR



**Figure 17-3. Effect of 5-AZA-CdR and LAQ on global methylation of the LINE element on HL-60 cells. Combination: 5-Aza-CdR 10 ng/ml + LAQ 10 ng/ml**



**Figure 17-4. Expression of the small RNA hY1 gene in presence of 5-Aza-CdR and LAQ.**

## DISCUSSION

LAQ and SAHA did not promote the demethylating effect of 5-Aza-CdR on global DNA at a dosage that however induces a greater loss of clonogenicity than either agent administered alone. Since HDACi are reported to re-express genes that are involved in cell cycle regulation, we assessed their capacity to promote the reactivation by 5-Aza-CdR of the TSG p57, which is reported to be silenced by epigenetic events in HL-60 cells (46). Neither LAQ nor SAHA were able to re-express the gene or to potentialize the demethylation action of 5-Aza-CdR on p57.

Is it possible that observed greater loss of clonogenicity with the combinations is attributable to apoptosis, as reported by some authors (32)? Apoptosis can be demonstrated by tracking the degradation of human cytoplasmic small RNA hY1 (44), which we evaluated with both combinations. Using RT-PCR, we observed a slightly non significant higher degradation of the cytoplasmic small RNA hY1 when HL-60 cells are exposed to both drugs compare to each drug alone (26). We know that HDACi can activate apoptosis by inducing caspases, which can also lead to autophagic cell death (49). If it is the case, the measurement of cytoplasmic small RNA hY1 does not evaluate this mechanism.

Since the clonogenic inhibition produced by the combinations of 5-Aza-CdR and LAQ or 5-Aza-CdR and SAHA referred to a more additive than a synergistic interaction (47, 48), it is possible that the observed greater loss in clonogenicity produced by the combinations is just the result of two distinct mechanisms, one produce by 5-Aza-CdR and the other one by the HDACi. We expected that those drugs will produce a synergistic antileukemic activity, since others reported this kind of interaction with HDACi and 5-Aza-CdR (40). Our non synergistic interactions seems to show that the antineoplastic effet observed with a combination of DNA methylation inhibitor and an histone methylation inhibitor can involved other mechanisms than those targetted by these drugs. Similar considerations should be taken even when synergistic interaction is been noted, since recent research had

shows that those interactions maybe related to the capacity of an HDACi (TSA) to suppress the normal removal of the 5-Aza-CdR incorporated into DNA by the cell repair system, and therefore promote its action (50). We know that either 5-Aza-CdR, LAQ and SAHA can induce cellular diffrenciation and that they produce objective response in vivo, so their combined administration could be promising against some cancer. Additionnal studies must be performed on those combinations to try to understand their mechanism of antileukemic action, prior to assess their evaluation in clinical trials.

## REFERENCES

1. Linker CA, Levitt LJ, O'Donnell M, Forman SJ, Ries CA. (1991) Treatment of adult acute lymphoblastic leukemia with intensive cyclical chemotherapy: a follow-up report. *Blood*, 78, 2814-2822.
2. Mayer, RJ, Davis RB, Schiffer CA, Berg DT, Powell BL, Schulman P, Omura GA, Moore JO, McIntyre OR, Frei 3<sup>rd</sup>E. (1994) Intensive postremission chemotherapy in adults with acute myeloid leukemia. *Cancer and Leukemia Group B. The New England journal of medicine*, 331, 896-903.
3. Wolfe AP. (1996) Histone deacetylase: a regulator of transcription. *Science* 272:371-372
4. Archer SY, Hoddin RA. (1999) Histone acetylation and cancer. *Curr Opin Genet Dev* 9:171-174
5. Jones PA, Laird PW (1999). Cancer epigenetics comes of age. *Nat Genet* 21(2):163-7. Review.
6. Momparler RL, Bovenzi V. DNA methylation and cancer. *J Cell Physiol* 2000;183(2):145-54. Review.
7. Strahl BD, Allis CD. (2000) The language of covalent histone modifications. *Nature*, 403, 41-45
8. Jones PA, Baylin S (2002). The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet* 2002;3(6):415-28.
9. Jones PL, Jan Veenstra GC, Wade PA, Vermaak D, Kass SU, Landsberger N, Strouboulis J, Wolffe AP. (1998) Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylases to repress transcription. *Nature genetics*, 19, 187-191
10. Wilson VL, Jones PA, Momparler RL (1983). Inhibition of DNA methylation in L1210 leukemic cells by 5-aza-2'-deoxycytidine as a possible mechanism of chemotherapeutic action. *Cancer Res* 43(8):3493-6.
11. Daskalakis M, Nguyen TT, Nguyen C, et al. (2002) Demethylation of a hypermethylated P15/INK4B gene in patients with myelodysplastic syndrome by 5-Aza-2'-deoxycytidine (decitabine) treatment. *Blood* 100(8):2957-64.
12. Momparler RL (2005). Epigenetic therapy of cancer with 5-aza-2'-deoxycytidine (decitabine). *Semin Oncol* 32(5):443-51. Review.
13. Momparler RL, Gonzales FA (1978). Effect of intravenous infusion of 5-aza-2'-deoxycytidine on survival time of mice with L1210 leukemia. *Cancer Res* 38(9):2673-8.
14. Braakhuis BJ, van Dongen GA, van Walsum M, Leyva A, Snow GB (1988). Preclinical antitumor activity of 5-aza-2'-deoxycytidine against human head and neck cancer xenografts. *Invest New Drugs* 6(4):299-304.
15. Lemaire M, Momparler LF, Farinha NJ, Bernstein ML, Momparler RL (2004). Enhancement of antineoplastic action of 5-Aza-2'-deoxycytidine by phenylbutyrate on L1210 leukemic cells. *Leuk Lymphoma* 45(1) :147-54.
16. Rivard GE, Momparler RL, Demers J, et al (1981). Phase I study on 5-AZA-2'-deoxycytidine in children with acute leukemia. *Leuk Res* 5(6):453-62.
17. Momparler RL, Ayoub J (2001). Potential of 5-aza-2'-deoxycytidine (decitabine) a potent inhibitor of DNA methylation for therapy of advanced non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 34(Suppl 4):S111-5.

18. Issa JP, Garcia-Manero G, Giles FJ, et al (2004). Phase 1 study of low-dose prolonged exposure schedules of the hypomethylating agent 5-aza-2'-deoxycytidine (decitabine) in hematopoietic malignancies. *Blood* 103(5):1635-40.
19. Kantajian HM, O'Brien S, Cortes J, et al (2003). Results of decitabine (5-aza-2'-deoxycytidine) therapy in 130 patients with chronic myelogenous leukemia. *Cancer* 98(3):522-8.
20. Jones PA, Taylor SM (1980). Cellular differentiation, cytidine analogs and DNA methylation. *Cell* 20(1):85-93.
21. Pinto A, Attadia V, Fusco A, Ferrara F, Spada OA, Di Fiore PP (1984). 5-Aza-2'-deoxycytidine induces terminal differentiation of leukemic blasts from patients with acute myeloid leukemias. *Blood* 64(4):922-9.
22. Momparler RL, Dore BT, Momparler LF (1990). Effect of 5-aza-2'-deoxycytidine and retinoic acid on differentiation and c-myc expression in HL-60 myeloid leukemic cells. *Cancer Lett* 54(1-2):21-8.
23. Gore SD, Carducci MA. (2000) Modifying histones to tame cancer: clinical development of sodium phenylbutyrate and other histone deacetylases inhibitors. *Expert opinion on investigational drugs*, 9, 2923-2934
24. Marks PA, Richon VM, Rifkind RA. (2000) Histone Deacetylase Inhibitors: Inducers of Differentiation or Apoptosis of Transformed Cells, *Journal of the National Cancer Institute*, 92, 1210-1216
25. Suzuki H, Gabrielson E, Chen W, Anbazhagan R, van Engeland M, Weijnenberg MP, Herman JG, Baylin SB. (2002) A genomic screen for genes upregulated by demethylation and histone deacetylase inhibition in human colorectal cancer. *Nature genetics*, 31, 141-149
26. Johnstone RW (2002). Histone-deacetylase inhibitors: novel drugs for the treatment of cancer. *Nature Reviews Drug Discovery* 1, 287-299.
27. Remiszewski SW (2003). The discovery of NVP-LAQ824: from concept to clinic. *Curr Med Chem*. 10(22):2393-402
28. Atadja P, Gao L, Kwon P, Trogani N, Walker H, Hsu M, Yeleswarapu L, Chandramouli N, Perez L, Versace R, Wu A, Sambucetti L, Lassota P, Cohen D, Bair K, Wood A, Remiszewski S (2004). Selective growth inhibition of tumor cells by a novel histone deacetylase inhibitor, NVP-LAQ824. *Cancer Res* 64:689– 695
29. Moradei O, Maroun CR, Paquin I, Vaisburg A (2005). Histone deacetylases inhibitors: latest developments, trends and prospects. *Curr Med Chem – Anti-Cancer Agents*, 2005;5:529-60
30. Weisberg E, Catley L, Kujawa J, Atadja P, Remiszewski S, Fuerst P, et al (2004). Histone deacetylases inhibitor NVP-LAQ824 has significant activity against myeloid leukemia cells in vitro and in vivo. *Leukemia* 18: 1951-63
31. Monneret C (2005). Histone deacetylases inhibitors. *Eur J Med Chem* 40:1-13
32. Atadja P, Hsu M, Kwon P, Trogani N, Bhalla K, Remiszewski S (2004) Molecular and cellular basis for the anti-proliferative effects of the HDAC inhibitor LAQ824. *Novartis Found Symp* 259:249-66
33. Richon VM, Emiliani S, Verdin E, Webb Y, Breslow R, Rifkind RA et al (1998). A class of hybrid polar inducers of transformed cell differentiation inhibits histone deacetylases. *Proc Natl Acad Sci USA* 95 -3003



34. Kelly WK et al (2003). Phase 1 clinical trial of histone deacetylases inhibitor: suberoylanilide hydroxamic acid administered intravenously. *Clin Cancer Res* 9:3578-88
35. Butler LM, Agus DB, Scher HI, Higgins B, Rose A, et al (2000). Suberoylanilide hydroxamic acid, an inhibitor of histone deacetylase, suppresses the growth of prostate cancer cells in vitro and in vivo *Cancer Res* 30 5165
36. Vrana JA, Decker RH, Johnson CR, Wang Z, Jarvis WD Richon VM et al (1999). Induction of apoptosis in U937 human leukemia cells by suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) proceeds through pathways that are regulated by Bcl-2/Bcl-XL, c-Jun, and p21CIP1, but independent of p53. *Oncogene*. 25;18(50):7016-25
37. Richon VM, Webb Y, Merger R, Sheppard T et al (1996). Second generation hybrid polar compounds are potent inducers of transformed cell differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:5705-8
38. Cohen LA, Amin S, Marks PA, Rifkind RA, Desai D, Richon VM (1999). Chemoprevention of carcinogen-induced mammary tumorigenesis by the hybrid polar cytodifferentiation agent, suberanilohydroxamic acid (SAHA). *Anticancer Res*. 19(6B):4999-5005.
39. Ruefli AA, Bernhard D, Tainton KM, Kofler R, Smyth MJ, Johnstone RW. Suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) overcomes multidrug resistance and induces cell death in P-glycoprotein-expressing cells. *International Journal of Cancer* 99, 292-298 (2002).
40. Cameron, E. E., Bachman, K. E., Myöhänen, B. S., Herman, J. G., Baylin, S. B. (1999) Synergy of demethylation and histone deacetylase inhibition in the re-expression of genes silenced in cancer. *Nature genetics*, 21, 103-107
41. Boivin, A. J., Momparler, L. F., Hurtubise, A., Momparler, R. L. (2002) Antineoplastic action of 5-aza-2'-deoxycytidine and phenylbutyrate on human lung carcinoma cells. *Anticancer Drugs*, 13, 869-874
42. Primeau, M., Gagnon, J., Momparler, R. L. (2003) Synergistic antineoplastic action of DNA methylation inhibitor 5-AZA-2'-deoxycytidine and histone deacetylase inhibitor depsipeptide on human breast carcinoma cells. *International journal of cancer*, 103, 177-184
43. Hurtubise A, Momparler RL (2006). Effect of histone deacetylase inhibitor LAQ824 on antineoplastic action of 5-Aza-2'-deoxycytidine (decitabine) on human breast carcinoma cells. *Cancer Chemother Pharmacol*. Nov;58(5):618-25
44. Asselbergs FA, Widmer R (2003). Rapid detection of apoptosis through real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction measurement of the small cytoplasmic RNA Y1. *Anal Biochem*. Jul 15;318(2):221-9.
45. Yang AS, Estecio MR, Doshi K, Kondo Y, Tajara EH, Issa JP (2004): A simple method for estimating global DNA methylation using bisulfite PCR of repetitive DNA elements. *Nucleic Acids Res* 32:e38.
46. Lemaire M, Momparler LF, Bernstein ML, Marquez VE, Momparler RL (2005) Enhancement of antineoplastic action of 5-aza-2'-deoxycytidine by zebularine on L1210 leukemia. *Anticancer Drugs* 16:301-308.
47. Valeriote, F., Lin, H. (1975) Synergistic interaction of anticancer drugs: a cellular perspective. *Cancer chemotherapy reports*, 59, 895-899

48. Momparler, R. L. (1980) *In vitro* systems for the evaluation of combination chemotherapy. *Pharmacology & therapeutics*, 8, 21-25
49. Shao Y, Gao Z, Marks PA, Jiang X (2004). Apoptotic and autophagic cell death induced by histone deacetylase inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 101, 18030-18035
50. Chai Chai G, Li L, Zhou W, Wu L, Zhao Y, Wang D, Lu S, Yu Y, Wang H, McNutt MA, Hu YG, Chen Y, Yang Y, Wu X, Otterson GA, Zhu WG (2008). HDAC inhibitors act with 5-aza-2'-deoxycytidine to inhibit cell proliferation by suppressing removal of incorporated abases in lung cancer cells. *PLoS ONE* 3, e2445

**ANNEXE 8****CURRICULUM VITAE**

**Nom :** Maryse Lemaire  
**Adresse** 293 24<sup>e</sup> avenue  
 Île Perrot, (Qc)  
 J7V 4N1  
**Tél :** (514) 425-6792  
**Langues :** Français, Anglais

**FORMATION ACADÉMIQUE**

Ph.D. en pharmacologie. Université de Montréal  
 Sept 2002 - Avril 2009

et

M.Sc. en pharmacologie. Université de Montréal  
 Sept 2001 - passage au doctorat

Le tout sous la direction de : Richard L. Momparler, Ph.D.  
 Hôpital Sainte-Justine, Centre de Recherche  
 pédiatrique  
 3175 ch. Côte Sainte-Catherine  
 Montréal, (Qc)  
 H3T 1C5  
 Tél : (514) 354-4931 poste 6140

B.Sc. en Biologie Médicale. Université du Québec à Trois-Rivières  
 Sept 1998 - Août 2001

**Cours suivis aux études supérieures****Doctorat :**

- Progrès en pharmacologie moléculaire - PHL 6085 A-2003  
 - Cancérologie - PCB 6085 A-2002

**Maîtrise :**

- Métabolisme des médicaments - PHL 6081 H-2002  
 - Séminaire de pharmacologie - PHL 6051 A-2001 - H-2002  
 - Pharmacodynamie - PHL 6011 A-2001  
 - Pharmacodynamie des médicaments - PHL 3100 A-2001

**Autres Cours**

- Formation en expérimentation animale -PLU 6044  
(théorie et expérimentation) fin en 2006
- Matières radioactives, sources non scellées (Radioprotection Inc) 2002 et 2004
- Statistiques en biologie (cours offert par le Centre de Recherche  
Pédiatrique de l'hôpital Sainte-Justine) 2004

**BOURSES OBTENUES**

- Bourse de fin d'études doctorales de la Faculté des  
Études Supérieures (FES) de l'Université de  
Montréal 2008-2009 Juin 2008 - Novembre 2008
- Bourse du Centre de Recherche de l'Hôpital  
Sainte-Justine Avril 2008 - Novembre 2008  
Novembre 2003 - Mars 2004
- Fondation J.A. DeSève Novembre 2006
- Fonds de la recherche en santé du Québec (FRSQ) Avril 2004 - Mars 2008
- Bourses de la Faculté des Études Supérieures (FES)  
de l'Université de Montréal du Département de  
Pharmacologie de l'Université de Montréal 2001, 2002, 2003, 2007

**PRIX ET DISTINCTIONS**

- 2004, Montréal.  
Prix pour présentation par affiche lors de la *Journée de la recherche Gabriel L.  
Plaa*, Département de Pharmacologie, Faculté de Médecine, Université de Montréal
- 2003, Paris.  
Finaliste à l'*International Congress of Anti-Cancer Treatment (ICACT)*

**RECHERCHE SCIENTIFIQUE - QUALIFICATIONS**

- Manipulation animale
- Culture cellulaire  
(inhibition de la synthèse de l'ADN, essais clonogéniques, essais de mobilité, ...)
- Expériences de biologie moléculaire  
(PCR, RT-PCR, *Real-Time* PCR, RT-PCR compétitif, *semi-nested* PCR, MSP, ...)
- Essais de pharmacocinétique
- Essais enzymatiques
- Électrophorèses, Chromatographies
- Manipulation d'agents radioactifs
- Spectrophotométrie (FACS)
- ...

### **EXPÉRIENCES DE TRAVAIL**

- Enseignement à des élèves du secondaire dans le cadre du projet *seur*  
(Programme de sensibilisation aux Études Universitaires et à la Recherche)  
2002 - 2006
- Enseignement à des élèves du secondaire dans le cadre du projet *ADRIQ*  
(Association de la Recherche Industrielle du Québec)  
2006 – 2008

### **PUBLICATIONS SCIENTIFIQUES**

- **Lemaire M**, Chabot GG, Raynal JM, Momparler LF, Hurtubise A, Bernstein ML and Momparler RL. Importance of dose-schedule of 5-aza-2'-deoxycytidine for epigenetic therapy of cancer. *BMC Cancer*. 2008; 8: 128
- **Lemaire M**, Momparler LF, Raynal NJ, Bernstein ML, Momparler RL. Inhibition of cytidine deaminase by zebularine enhances the antineoplastic action of 5-aza-2'-deoxycytidine. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2008 Apr 9; [Epub ahead of print]
- **Lemaire M**, Momparler LF, Bernstein ML, Marquez VE, Momparler RL. Enhancement of antineoplastic action of 5-aza-2'-deoxycytidine by zebularine on L1210 leukemia. *Anticancer Drugs*. 2005 Mar;16(3):301-8.
- **Lemaire M**, Momparler LF, Farinha NJ, Bernstein M, Momparler RL. Enhancement of antineoplastic action of 5-aza-2'-deoxycytidine by phenylbutyrate on L1210 leukemic cells. *Leuk Lymphoma*. 2004 Jan;45(1):147-54.
- Farinha NJ, Shaker S, **Lemaire M**, Momparler L, Bernstein M, Momparler RL. Activation of expression of p15, p73 and E-cadherin in leukemic cells by different concentrations of 5-aza-2'-deoxycytidine (Decitabine). *Anticancer Res*. 2004 Jan Feb;24(1):75-8.

### **COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES**

#### **Internationales, présentatrice principale :**

- 2009, Burlington (Vermont, USA)  
New England Pharmacologists annual meeting  
**Lemaire M**, Momparler LF, Raynal NJM, Marquez VE, Bernstein ML and Momparler RL. Zebularine enhances the antineoplastic action of 5-aza-2'-deoxycytidine.
- 2006, Washington D.C. (USA)  
American Association for Cancer Research (AACR)  
**Lemaire M**, Chabot GG, Momparler LF, Bernstein ML and Momparler RL. Dose-response to 5-aza-2'-deoxycytidine in mice with L1210 leukemia and EMT6 mammary tumor.

- 2004, Orlando (USA)  
American Association for Cancer Research (AACR)  
**Lemaire M**, Momparler LF, Marquez VE, Bernstein ML and Momparler RL.  
Enhancement of antineoplastic action of 5-aza-2'-deoxycytidine on L1210 cells by zebularine, an inhibitor of cytidine deaminase and DNA methyltransferase.
- 2003, Paris (France)  
14th International Congress of Anti-Cancer Treatment (ICACT)  
**Lemaire M**, Momparler LF and Momparler RL. Enhancement of antineoplastic activity of 5-aza-2'-deoxycytidine (Decitabine) by phenylbutyrate on L1210 leukemia.  
**Sélectionnée dans les 25 finalistes**

**Internationales, présentation de mes résultats par un autre présentateur :**

- 2007, Madrid (Espagne)  
Momparler RL, **Lemaire M**, Chabot GG, Raynal N, Bernstein ML, Momparler LF and Hurtubise A. Optimization of chemotherapy of cancer with 5-aza-2'-deoxycytidine (decitabine, dacogen).  
Présentateur : Richard L. Momparler
- 2006, Versailles (France)  
11<sup>th</sup> International Conference on Differentiation Therapy and Innovative Therapeutics in Oncology  
Momparler RL, **Lemaire M**, Chabot GG. Future Potential of epigenetic therapy of cancer.  
Présentateur : Richard L. Momparler
- 2004, Paris (France)  
15th International Congress of Anti-Cancer Treatment (ICACT)  
Momparler RL, **Lemaire M**, Shaker S and Momparler LF. Potential of epigenetic therapy of leukemia using 5-aza-2'-deoxycytidine (Decitabine, Dacogen) in combination with histones deacetylase inhibitors.  
Présentateur : Richard L. Momparler
- 2002, Philadelphie (USA)  
Annual Meeting of the American Society of Hematology  
Farinha NJ, Shaker S, **Lemaire M**, Momparler LF, Bernstein ML and Momparler RL. Re-expression of p15, p73 and E-Cadherin in leukemic cells after treatment with different concentrations of 5-aza-2'-deoxycytidine, an inhibitor of DNA methylation.  
Présentateur : Nuno J. Farinha

- 2002, San Francisco (USA)  
American Association for Cancer Research (AACR),  
Primeau M, Gagnon J, Shaker S, Boivin AJ, Hurtubise A, **Lemaire M**, Momparler LF and Momparler RL. Enhancement of antineoplastic action of 5-aza-2'-deoxycytidine (Decitabine) by histone deacetylase inhibitors against tumors and leukemia.  
Présentatrice : Mélanie Primeau

**Locales, présentatrice principale :**

- 2006, Montréal  
XXI<sup>e</sup> Congrès annuel de la recherche des étudiants gradués et post-gradués de l'Hôpital Sainte-Justine  
**Lemaire M**, Chabot GG, Momparler LF, Bernstein ML et Momparler RL.  
Optimisation de l'effet chimiothérapeutique de la 5-aza-2'-désoxycytidine chez la souris.
- 2006, Montréal  
Journée de la recherche Gabriel L. Plaa; Département de pharmacologie de l'Université de Montréal  
**Lemaire M**, Chabot GG, Momparler LF, Bernstein ML et Momparler RL.  
Optimisation de l'effet chimiothérapeutique de la 5-aza-2'-désoxycytidine chez la souris.
- 2006, Montréal  
4<sup>th</sup> MCETC annual meeting, Jewish General Hospital (McGill University)  
**Lemaire M**, Chabot GG, Momparler LF, Bernstein ML and Momparler RL. Dose-response to 5-aza-2'-deoxycytidine in mice with L1210 leukemia and EMT6 mammary tumor.
- 2005, Montréal  
3<sup>rd</sup> MCETC VRQ annual meeting, Jewish General Hospital (McGill University)  
**Lemaire M**, Momparler LF, Marquez VE, Bernstein ML and Momparler RL.  
Augmentation de l'effet antinéoplasique de la 5-aza-2'-désoxycytidine par le zebularine, un inhibiteur de la cytidine désaminase et de l'ADN méthyltransférase.
- 2005, Montréal  
XX<sup>e</sup> Congrès annuel de la recherche des étudiants gradués et post-gradués de l'Hôpital Sainte-Justine  
**Lemaire M**, Momparler LF, Marquez VE, Bernstein ML and Momparler RL.  
Augmentation de l'effet antinéoplasique de la 5-aza-2'-désoxycytidine par le zebularine, un inhibiteur de la cytidine désaminase et de l'ADN méthyltransférase.

- 2004, Montréal  
Journée de la recherche Gabriel L. Plaa; Département de pharmacologie de l'Université de Montréal  
**Lemaire M** et Momparler RL. Augmentation de l'effet antinéoplasique de la 5-aza-2'-désoxycytidine par le zebularine, un inhibiteur de la cytidine désaminase et de l'ADN méthyltransférase.  
**Réциpiendaire d'une bourse de 500\$**
  
- 2003, Montréal  
XVIII<sup>e</sup> Congrès annuel de la recherche des étudiants gradués et post-gradués de l'Hôpital Sainte-Justine  
**Lemaire M** et Momparler RL. Action antileucémique des inhibiteurs de la méthylation de l'ADN et de la déacétylation des histones.
  
- 2003, Montréal  
Journée de la recherche Gabriel L. Plaa, Département de pharmacologie de l'Université de Montréal.  
**Lemaire M** et Momparler RL. Action antileucémique des inhibiteurs de la méthylation de l'ADN et de la déacétylation des histones.
  
- 2003, Montréal  
Congrès de la Faculté de Médecine de l'Université de Montréal  
**Lemaire M** et Momparler RL. Action antileucémique des inhibiteurs de la méthylation de l'ADN et de la déacétylation des histones.
  
- 2002, Montréal  
XVII<sup>e</sup> Congrès annuel de la recherche des étudiants gradués et post-gradués de l'Hôpital Sainte-Justine  
**Lemaire M** et Momparler RL. Action antileucémique des inhibiteurs de la méthylation de l'ADN et de la déacétylation des histones.
  
- 2002, Montréal  
Journée de la recherche Gabriel L. Plaa, Département de pharmacologie, Université de Montréal  
**Lemaire M** et Momparler RL. Action antileucémique des inhibiteurs de la méthylation de l'ADN et de la déacétylation des histones.
  
- 2002, Montréal  
Congrès de la Faculté de Médecine de l'Université de Montréal  
**Lemaire M\***, Hurtubise A\*, Momparler RL. Action antinéoplasique de la 5-aza-2'-désoxycytidine en combinaison avec le taxotere ou le phénylbutyrate.  
\*les deux auteurs ont contribué également à ces travaux
  
- 2001, Trois-Rivières  
**Lemaire M** et Momparler RL. Action antileucémique des inhibiteurs de la méthylation de l'ADN et de la déacétylation des histones.  
Université du Québec à Trois-Rivières