

Université de Montréal

**Caractérisation des activités épigénétiques et anticancéreuses de la
proscillaridine A dans les cancers pédiatriques**

Par Elodie Da Costa

Département de pharmacologie et de physiologie, Faculté de médecine
Centre de recherche du CHU Sainte-Justine

Thèse présentée à la faculté des études supérieures et post doctorales en
vue de l'obtention du grade de doctorat en pharmacologie

Novembre 2019

© Elodie Da Costa, 2019

Université de Montréal

Cette thèse intitulée

**Caractérisation des activités épigénétiques et anticancéreuses de la
proscillaridine A dans les cancers pédiatriques**

présentée par

Elodie M. Da Costa

a été évaluée par un jury composé des membres suivants:

Sylvain Meloche

Président-rapporteur

Noël J-M. Raynal

Directeur de thèse

Maja Krajinovic

Membre du jury

Jean-Philippe Lambert

Examineur externe

*« La science a-t-elle promis le bonheur? Je ne le crois pas. Elle a
promis la vérité, et la question est de savoir si l'on fera jamais du
bonheur avec de la vérité. »*

Emile Zola

Résumé

Les glycosides cardiotoniques sont des inhibiteurs des pompes sodium / potassium utilisés pour le traitement des insuffisances cardiaques, qui détiennent également des activités anticancéreuses et épigénétiques récemment caractérisées. Toutefois, dans l'objectif de repositionner ces médicaments comme traitement anticancéreux, les mécanismes sous-jacents aux activités anticancéreuses et épigénétiques des glycosides cardiotoniques restent à être déterminés. Dans nos travaux, nous révélons que la proscillaridine A est le glycoside cardiotonique qui détient des activités anticancéreuses et épigénétiques les plus puissantes dans des lignées de cancer du côlon, de leucémies et de sarcomes pédiatriques. De plus, nous avons identifié que l'activité anticancéreuse de la proscillaridine A corrèle positivement avec le niveau d'expression protéique du proto-oncogène MYC dans un panel de 14 lignées cellulaires cancéreuses. Dans les lignées cellulaires exprimant un haut niveau de MYC telles que les lignées leucémiques, la proscillaridine A agit comme un inhibiteur de MYC et module sa stabilité protéique ainsi que la régulation transcriptionnelle et translationnelle de ces cibles. Cette inhibition est induite par la baisse significative de l'expression des enzymes épigénétiques les lysines acétyltransférases (KATs), qui contrôlent l'ajout des résidus d'acétyl-coenzyme A sur les histones et sur d'autres protéines dont MYC. La baisse d'expression des KATs résultent à une baisse de l'acétylation des résidus de l'histone 3 et à une reprogrammation de l'acétylome des cellules cancéreuses surexprimant MYC. Ces changements au niveau de la chromatine induisent une reprogrammation transcriptionnelle et phénotypique des cellules surexprimant MYC, qui se traduit par une perte de la transcription des programmes oncogéniques et l'induction des programmes associés à la différenciation cellulaire. Pour finir, nous avons évalué le potentiel synergique anticancéreux et épigénétique de la proscillaridine A avec le médicament épigénétique la décitabine dans des lignées cancéreuses exprimant des niveaux différentiels de MYC. Dans une lignée résistante à la proscillaridine A et exprimant de faible niveau de MYC (lignée de cancer de côlon), la décitabine et la proscillaridine A démontrent des activités épigénétiques synergiques tandis que dans une lignée sensible à la proscillaridine A et surexprimant MYC (lignée de sarcome pédiatrique), la décitabine et la proscillaridine A démontrent des activités antiprolifératives synergiques. Dans ces travaux, nous avons donc démontré le potentiel de repositionner la proscillaridine A dans les cancers surexprimant MYC. Également, nous démontrons le potentiel synergique anticancéreux et épigénétique de la proscillaridine A avec la décitabine et nous suggérons d'étudier cette combinaison de médicaments dans les cancers plus résistants à la proscillaridine A.

Mots clefs: Glycoside cardiotonique, proscillaridine A, repositionnement de médicaments, traitements anticancéreux, proto-oncogène MYC, lysine acétyltransférases (KATs), acétylation des histones, acétylome, combinaison de médicaments, décitabine.

Abstract

Cardiac glycosides are sodium / potassium pumps' inhibitors used for the treatment of heart failure, and whose anticancer and epigenetic activities have been recently characterized. However, in order to repurpose cardiac glycosides as anticancer drugs, mechanistic studies are required to identify the anticancer and epigenetic mechanism of actions. In our experiments, proscillaridin A exhibited the most powerful anticancer and epigenetic activities in colon cancer, leukemia and sarcoma cell lines. Moreover, we demonstrated that in a panel of 14 cancer cell lines, proscillaridin A anticancer activities positively correlated with MYC proto-oncogene expression level. In high MYC expressing cell lines such as leukemia, proscillaridin A inhibited MYC expression through protein destabilization and through transcriptomic and translational regulation of MYC targets. These inhibitions are induced by the loss of lysine acetyltransferase (KAT) expressions, which are epigenetic enzymes controlling the addition of acetyl-coenzyme A on histones and other proteins such as MYC. KAT inhibition is responsible for global loss of histone 3 acetylation and acetylome reprogramming in high MYC expressing cancer cells. These chromatin changes induced transcriptomic and phenotypic reprogramming, defined by a loss of the transcription of oncogenic programs and the induction of cell differentiation. To finish, we evaluated the anticancer and epigenetic synergistic potential of proscillaridin A in combination with the epigenetic drug the decitabine in cancer cell lines expressing different MYC levels. In a cancer cell line resistant to proscillaridin A treatments and expressing low MYC level (colon cancer cell line), the combination of decitabine and proscillaridin A demonstrated synergistic epigenetic activity although in a cell line sensitive to proscillaridin A treatments and expressing high MYC level (sarcoma cell line), the combination of decitabine and proscillaridin A exhibited synergistic anti-proliferative activity. To conclude, we highlighted the potential of repurposing proscillaridin A as anticancer treatment in high MYC expressing cells. Furthermore, we demonstrated the anticancer and epigenetic synergistic potential of proscillaridin A in combination with decitabine and we propose to study the drug combination in cancers that are resistant to proscillaridin A treatment.

Key words: Cardiac glycosides, proscillaridin A, drug repurposing, anticancer treatments, MYC proto-oncogene, lysine acetyltransferases (KATs), histone acetylation, acetylome, drug combinations, decitabine.

Résumé de vulgarisation

Les cancers pédiatriques représentent la première cause de mortalité par maladie chez les enfants, malgré un taux de survie atteignant de nos jours les 84%. Toutefois, ces traitements sont extrêmement toxiques puisque 2/3 des enfants traités souffrent de nombreux effets secondaires comme des déficiences neurocognitives, des maladies métaboliques et l'apparition de tumeurs secondaires. Ces effets secondaires sont dus à un défaut de spécificité des médicaments qui ciblent aussi bien les cellules saines que les cellules cancéreuses. Afin de développer de nouvelles approches thérapeutiques plus efficaces et moins toxiques, mon projet vise à tester l'efficacité anti-leucémique parmi des médicaments déjà approuvés pour le traitement de différentes maladies. Cette stratégie est appelée le repositionnement de médicaments. Mon objectif est de découvrir le potentiel de certains médicaments déjà approuvés pour améliorer le traitement des cancers pédiatriques qui seront mieux tolérés que la chimiothérapie et la radiothérapie classiques. Particulièrement, je m'intéresse à des médicaments dont les effets permettent de rétablir le bon fonctionnement des gènes pour reprogrammer et convertir des cellules malignes en cellules saines. Cette approche thérapeutique est connue sous le nom de thérapie épigénétique. Les résultats de mes travaux serviront de base au déclenchement de nouveaux essais cliniques qui seront réalisés au CHU Sainte-Justine. Nos résultats ont démontré jusqu'à présent que la proscillaridine A, un médicament utilisé pour traiter les insuffisances cardiaques, possède une grande efficacité anticancéreuse et épigénétique contre les cancers exprimants fortement MYC, une protéine pro-cancérogène, et cela à des doses sécuritaires pour les cellules saines. La proscillaridine A induit l'inhibition de gènes pro-cancérogènes, qui poussent les cellules cancéreuses à se multiplier, ainsi que l'activation de gènes suppresseurs de tumeurs, qui rétablissent un profil non pathologique aux cellules cancéreuses. Nous étudions également la possibilité de traiter les cancers plus résistants à la proscillaridine A avec une combinaison de médicaments utilisant la proscillaridine A et un autre médicament approuvé contre le cancer, la décitabine, afin d'attaquer les cellules cancéreuses sous plusieurs angles. Des études plus poussées sont en cours pour valider notre nouvelle stratégie thérapeutique avant la transition vers la clinique.

Table des matières

Liste des figures	15
Liste des tableaux.....	19
Liste des abréviations.....	20
Remerciements.....	24
I/ Introduction	29
1. Les cancers pédiatriques.....	29
1.1. Généralités	29
1.1.1. Le cancer	29
1.1.1.1. Définition.....	29
1.1.1.2. Origines	30
1.1.1.3. Cellules souches cancéreuses et hiérarchie.....	33
1.1.1.4. Prévalence	33
1.1.1.5. Traitements	34
1.1.2. Les cancers pédiatriques.....	35
1.2. Les leucémies pédiatriques	35
1.2.1. Généralités.....	35
1.2.1.1. Définition.....	35
1.2.1.2. Prévalence	37
1.2.2. Leucémies lymphoblastiques pédiatriques	37
1.2.2.1. Généralités.....	37
1.2.2.2. Facteurs de risques et classification	38
1.2.2.3. Traitements	38
1.2.3. Leucémies myéloïdes pédiatriques	39
1.2.3.1. Définition.....	39
1.2.3.2. Facteurs de risques et classification	40
1.2.3.3. Traitements	40
1.3. Les sarcomes pédiatriques	42
1.3.1. Généralités.....	42
1.3.1.1. Définition.....	42
1.3.1.2. Prévalence	42

1.3.2. Les rhabdomyosarcomes	42
1.3.2.1. Généralités.....	42
1.3.2.2. Facteurs de risque et classifications	43
1.3.2.3. Caractéristiques moléculaires	44
1.3.2.3.1 Les rhabdomyosarcomes embryonnaires	44
1.3.2.3.2 Les rhabdomyosarcomes alvéolaires.....	44
1.3.2.4. Traitements.....	45
1.3.3. Les ostéosarcomes.....	46
1.3.3.1. Généralités.....	46
1.3.3.2. Facteurs de risque et classifications	46
1.3.3.3. Caractéristiques moléculaires	47
1.3.3.4. Traitements	47
1.4. Le proto-oncogène MYC	48
1.4.1. Généralités.....	48
1.4.1.1. La famille de MYC	48
1.4.1.2. Régulateur de la transcription	50
1.4.1.2.1. La famille MYC	50
1.4.1.2.2. La protéine MYC	52
1.4.1.3. Régulation de MYC: ARN messenger et protéines	52
1.4.1.3.1. Régulation de l'ARN messenger de MYC et de sa transcription	52
1.4.1.3.2. Régulation de la protéine MYC	52
1.4.2. MYC dans les cancers.....	55
1.4.2.1. Dérégulation de la famille MYC dans les cancers	55
1.4.2.2. La famille MYC dans les leucémies pédiatriques.....	56
1.4.2.2.1 Rôle de de la famille MYC dans l'hématopoïèse.....	56
1.4.2.2.1 Dérégulation de MYC dans les leucémies pédiatriques.....	56
1.4.2.3. MYC dans les sarcomes pédiatriques.....	57
1.4.2.3.1 Rôle de MYC dans les précurseurs myogéniques et les tissus	
mous différenciés	57
1.4.2.3.2 Dérégulation de MYC dans les RMS.....	57
1.4.2.3.3 Rôle de MYC dans les cellules mésenchymateuses, les	
ostéoblastes et les ostéoclastes	58
1.4.2.3.4 Dérégulation de MYC dans les OS.....	58

1.4.2.4. Les thérapies anti-MYC	58
2. L'épigénétique.....	62
2.1. Généralités	62
2.1.1. Définition	62
2.1.2. L'enroulement de l'ADN: la chromatine	62
2.2. Les mécanismes épigénétiques.....	63
2.2.1. Généralités	63
2.2.2. La méthylation de l'ADN	64
2.2.2.1. La méthylation des cytosines de l'ADN.....	64
2.2.2.2. Les ADN méthyltransférases	65
2.2.2.3. Les enzymes responsables de la déméthylation de l'ADN.....	65
2.2.2.4. Influence du métabolisme	66
2.2.2.5. Rôle de la méthylation de l'ADN.....	67
2.2.3. Les modifications post-traductionnelles des histones	68
2.2.3.1 Généralités.....	68
2.2.3.2 L'acétylation des histones	68
2.2.3.2.1 L'acylation	68
2.2.3.2.2 Généralités sur l'acétylation des histones.....	69
2.2.3.2.3 Les lysines acetyltransférases.....	71
2.2.3.2.4 Les lysines désacétylases	74
2.2.3.3 La méthylation des histones.....	75
2.2.3.3.1 Généralités	75
2.2.3.3.2 Les protéines méthyltransférases	76
2.2.3.3.3. Les histones déméthylases	77
2.3. Les altérations de l'épigénome dans les cancers pédiatriques	79
2.3.1. Altérations de l'épigénome dans les cancers	79
2.3.1.1 Généralités.....	79
2.3.1.2 La méthylation de l'ADN dans les cancers.....	79
2.3.1.3 Les MPTs des histones dans les cancers.....	81
2.3.1.3.1 L'acétylation des histones dans les cancers.....	81
2.3.1.3.2 La méthylation des histones dans les cancers	82
2.3.1.3.3 Les variants d'histones et les oncohistones	83

2.3.2. Altérations de l'épigénome dans les leucémies pédiatriques.....	84
2.3.2.1 Altérations de la méthylation de l'ADN dans les leucémies pédiatriques.....	84
2.3.2.2 Altérations des régulateurs des MPTs des histones dans les leucémies pédiatriques.....	85
2.3.3. Altérations de l'épigénome dans les rhabdomyosarcomes pédiatriques	86
2.3.3.1 Altérations de la méthylation de l'ADN dans les rhabdomyosarcomes pédiatriques.....	86
2.3.3.2 Altérations des régulateurs des MPTs des histones dans les rhabdomyosarcomes pédiatriques.....	86
2.3.4. Altérations de l'épigénome dans les ostéosarcomes pédiatriques	87
2.3.4.1 Altérations de la méthylation de l'ADN dans les ostéosarcomes pédiatriques.....	87
2.3.4.2 Altérations des régulateurs des MPTs des histones dans les ostéosarcomes pédiatriques	88
2.4. Les thérapies épigénétiques	88
2.4.1. Généralités.....	88
2.4.2. Les inhibiteurs de la méthylation de l'ADN.....	89
2.4.3. Les médicaments qui ciblent l'acétylation des histones	90
2.4.3.1 Inhibiteurs des lysines désacétylases (KDACi).....	90
2.4.3.2 Inhibiteurs des lysines acétyltransférases (KATi).....	91
2.4.3.2.1. Généralitéss.....	91
2.4.3.2.2. Les produits naturels et leurs dérivés.....	91
2.4.3.2.3. Les produits synthétiques	92
2.4.3.2.4. Les inhibiteurs bi-substrats.....	92
2.4.3.3 Inhibiteurs des protéines qui se lient aux histones acétylées	93
2.4.4. Les combinaisons des médicaments épigénétiques.....	94
2.4.4.1. Généralités.....	94
2.4.4.2. Les combinaisons des médicaments épigénétiques entre eux.....	94
2.4.4.3. Les combinaisons de médicaments épigénétiques avec d'autres médicaments	95
3. Les glycosides cardiotoniques	97
3.1. Généralités	97
3.1.1. Définition.....	97

3.1.2. Mécanisme d'action.....	98
3.1.2.1 Description de la contraction cardiaque.....	98
3.1.2.2 Mécanisme d'action des glycosides cardiotoniques	99
3.1.2.3 Les pompes Na ⁺ / K ⁺ ATPases.....	100
3.1.2.4 Toxicité des GCs.....	101
3.1.3. Utilisation clinique des GCs.....	101
3.1.3.1 La digoxine	101
3.1.3.2 La proscillaridine A	102
3.1.3.3 La digitoxine	103
3.2. Activités anticancéreuses	104
3.2.1. Découvertes.....	104
3.2.2. Mécanismes d'action anticancéreux	104
3.2.2.1 Régulation des processus inflammatoires.....	105
3.2.2.2 Induction des programmes de mort cellulaire	105
3.2.2.3 Inhibition de la prolifération et de l'angiogenèse des cellules cancéreuses	106
3.2.3. Utilisation des GCs en combinaison dans les cancers.....	106
3.2.4. Repositionnement des GCs comme thérapies anticancéreuses (essais cliniques).....	107
3.3. Activités épigénétiques	109
3.3.1. Découverte.....	109
3.3.2. Mécanisme d'action.....	110
II/ Hypothèses et objectifs.....	111
1. Identification des lignées cancéreuses les plus sensibles à un traitement de proscillaridine A et caractérisation des mécanismes anticancéreux et épigénétiques.	111
2. Études du potentiel combinatoire de la proscillaridine A avec la décitabine: identification du potentiel synergique des activités anticancéreuses et épigénétiques de ces deux médicaments.	112
III/ Résultats.....	113
1. Première publication.....	113
1.1. Introduction et mise en contexte du premier article	113
1.2. Premier article	113
2. Deuxième publication.....	114

2.1. Introduction et mise en contexte du deuxième article	114
3. Troisième publication.....	116
3.1. Introduction et mise en contexte du troisième article.....	116
3.2. Troisième publication	116
IV/ Discussion	117
1. Proscillaridine A: un médicament anti-MYC dans les cancers surexprimant MYC ...	117
2. Mécanisme d'action de l'inhibition de MYC induite par la proscillaridine A: une inhibition simultanée des KATs	121
3. Régulation calcique de l'oncogène MYC et des KATs dans les LLAs.....	124
4. Effet de la proscillaridine A dans les sarcomes pédiatriques.....	127
5. Effet de la proscillaridine A dans les cancers solides ne surexprimant pas l'oncogène MYC.....	129
6. La combinaison de proscillaridine A et de décitabine induit des activités épigénétiques synergiques dans les cancers du côlon.....	131
7. La combinaison de proscillaridine A et de décitabine induit des activités anticancéreuses synergiques dans les RMS-e.....	132
8. Étude du mécanisme d'action de la combinaison séquentielle de décitabine et de proscillaridine A dans les RMS-e.....	133
V/ Perspectives et directions futures.....	136
VI/ Conclusion	138
VII/ Références bibliographiques	139
Annexes	162
1. Annexe 1: Revue de littérature « DNA methylation-targeted drugs ».....	162
2. Annexe 2: La digitoxine tend à exercer une plus forte activité anticancéreuse dans les cancers exprimants un haut niveau de MYC.	163
3. Annexe 3: La dégradation de MYC et des KATs est indépendante de la machinerie protéasomique.	164
4. Annexe 4: La proscillaridine A induit une augmentation de l'acétylation de protéines impliquées dans la voie de signalisation JAK-STAT et la synthèse d'ATP. ...	165
5. Annexe 5: Régulation calcique du niveau d'expression protéique de l'oncogène MYC et de certaines KATs dans les LLAs.....	166
6. Annexe 6: Activités anticancéreuses de la proscillaridine A dans les ostéosarcomes pédiatriques.	168
7. Annexe 7: Modification de l'expression de certains oncogènes et des KATs en réponse à une monothérapie de décitabine, à une monothérapie de proscillaridine A et	

à une combinaison de décitabine et de proscillaridine A dans les rhabdomyosarcomes embryonnaires.....170

Liste des figures

Figure 1: Les caractéristiques du cancer d'après les Drs. Hanahan et Weinberg.....	32
Figure 2: Mise à jour des caractéristiques du cancer d'après les Drs. Hanahan et Weinberg.....	32
Figure 3: Schéma représentant l'accumulation de blastes dans les leucémies.....	36
Figure 4: Classification des cellules hématopoïétiques pouvant donner naissance à des leucémies.....	36
Les sous-types de leucémies sont également divisés en 2 catégories en fonction de la vitesse de progression de la maladie. On parle de leucémies aiguës ou de leucémies chroniques. Les leucémies aiguës se développent très rapidement et peuvent être fatales en quelques mois si elles ne sont pas traitées tandis que les leucémies chroniques progressent lentement et sont moins agressives que les leucémies aiguës...	
	37
Figure 5: Structure générale des protéines de la famille de MYC.	49
Figure 7: Schéma représentant les protéines appartenant à l'intéactome de MYC, les possibles hétérodimérisations associées et leurs effets sur la transcription des gènes....	51
Figure 8: Régulation de la transcription des gènes par l'intéactome de MYC. La régulation positive ou négative des différents hétérodimères sur les différents processus biologiques est indiquée par les couleurs suivantes: bleu cyan pour l'hétérodimère MYC / MAX; jaune pour les hétérodimères MGA /MAX, MNT / MAX et MNT / MLX; rose pour l'hétérodimère MLXP1 / MLX. Figure adaptée de Carroll et al. (43).....	51
Figure 9: Schéma représentant les différentes étapes de la dégradation protéique par l'UPS. Les ubiquitines sont d'abord activées par l'enzyme E1 puis conjuguées avec l'enzyme E2. L'ubiquitine ligase E3 se lie sur la protéine cible, qui dans cette représentation est MYC. La ligation de la molécule d'ubiquitine activée sur MYC est	

alors réalisée. MYC subit des réaction d'ubiquitination en série puis sera dégradée par le protéasome 26S.....53

Figure 10: Schéma représentant les voies de signalisation impliquées dans la dégradation de MYC par SCFFBW7. MYC est d'abord phosphorylée sur la sérine 62. Cette phosphorylation peut être catalysée par différentes enzymes appartenant soit à la voie de signalisation ERK, soit par CDK2. Par la suite, MYC est phosphorylée sur la thréonine 58 par GSK-3 β . Cela entraîne une déphosphorylation de la sérine 62 par PP2A-B56 α en partenariat avec PIN1. FBW7 se lie alors sur MYC et l'ubiquitination de MYC est réalisée par le complexe SRC. MYC subira des ubiquitinations en série avant d'être dégradée par le protéasome 26S.....54

Figure 11: Schéma représentant les différentes classes d'inhibiteurs pharmacologiques de MYC et leurs cibles. (A) Inhibiteurs de la transcription de MYC: JQ1 inhibe la liaison de BRD4, THZ1 inhibe le recrutement de P-TFEb et PC585 inhibe l'activation de l'ARN polymérase II (ARN POL II). (B) Inhibiteurs de la traduction de MYC qui empêchent la formation du complexe CAP: BEZ235 inhibe les activités catalytiques de PI3K et MTOR, la rapamycine inhibe MTOR et MK206 inhibe l'activité catalytique d'AKT. (C) Inhibiteurs post-traductionnels de MYC: P22077 inhibe l'ubiquitinase USP7, MLN8237 inhibe la kinase aurora (AURKA) et BI6727 / BI2536 sérine / thréonine kinase 1 (PLK1). (D) Inhibiteur de liaison de MYC sur les régions amplificatrices de l'ADN: Omomyc. (E) Les inhibiteurs créent une létalité synthétique lorsque MYC est surexprimé: le Purvalanol A qui inhibe CDK1, LY2606368 qui inhibe CHK1 et CB839 qui inhibe la glutaminase (GLS).60

Figure 12: Schéma représentant la formation de 5-mC effectuée via les ADN méthyltransférases.64

Figure 13: Schéma représentant les réactions d'oxydation en série catalysées par les enzymes TET.....66

Figure 14: Schéma représentant l'action des TDGs dans le processus de déméthylation des 5-mC.66

Figure 15: Schéma représentant le métabolisme de la méthionine impliqué dans la formation du SAM. Les substrats du cycle du carbone provenant de la diète sont écrits en bleu.	67
Figure 16: Schéma représentant l'influence de la méthylation de l'ADN sur la transcription des gènes.	67
Figure 17: Schéma représentant la formation de lysine acétylée par le transfert d'acétyl-CoA ainsi que la réaction inverse.	69
Figure 18: Schéma représentant l'influence de l'acétylation des lysines sur la transcription des gènes.	70
Figure 19: Schéma représentant la liaison des protéines contenant des BRDs (en bleu) sur les histones acétylées. Dans l'exemple représenté ici, la liaison de ces protéines induit le recrutement de facteur de transcription (en gris) et de la machinerie transcriptionnel (en orange) pour activer la transcription des gènes.	70
Figure 20: Schéma représentant l'acétylation des protéines catalysées par les HDACs de classe I, II et IV.	74
Figure 21: Schéma représentant l'acétylation des protéines catalysées par la famille des sirtuines.	74
Au total, on dénombre chez l'humain 18 KDACs qui sont divisées en 4 familles (ou classes) selon leurs homologies structurales, fonctionnelles et leur localisation cellulaire (158):.....	75
Figure 22: Schéma représentant les structures chimiques d'une lysine sans modification post-traductionnelle et des lysines mono-, di-, et triméthylées.	76
Figure 23: Schéma représentant les structures chimiques d'une arginine sans modification postraductionnelle et des arginines mono-, et diméthylées de manière symétrique et asymétrique.	76
Figure 24: Schéma représentant la déméthylation d'une lysine monométhylée en lysine non-méthylée par l'amine oxydase LSD1 suivie d'une réaction d'hydrolyse.....	78

Figure 25: Schéma représentant la déméthylation d'une lysine triméthylée en lysine diméthylée par les enzymes appartenants à la famille Jumonji.	78
Figure 26: Schéma représentant l'ADN hypométhylé dans les cellules cancéreuses....	79
Figure 27: Schéma représentant l'ADN hyperméthylé sur les îlots CpGs des régions promotrices hyperméthylées dans les cancers.	80
Figure 28: Schéma représentant les mutations ponctuelles de la méthylation de l'ADN mesurées dans les cancers.	80
Figure 29: Structure chimique des GCs.	97
Figure 30: Structures chimiques des cardénolides (A) et des bufadénolides (B).	97
Figure 31: Schéma décrivant les mécanismes cellulaires impliqués dans la contraction cardiaque.	99
Figure 32: Schéma représentant le mécanisme d'action des GCs.	100
Figure 33: Structure chimique de la digoxine.	102
Figure 34: Structure chimique de la proscillardine A.	103
Figure 35: Structure chimique de la digitoxine.	104
Figure 36: Schéma représentant la construction génétique du promoteur CMV suivi du gène GFP en absence (A) ou en présence (B) d'une thérapie épigénétique dans les cellules de cancers du colon et leurs conséquence sur les cellules.	109

Liste des tableaux

Tableau 1: Liste des différents substrats sur les histones des principales KATs de type A. Références du tableau: 1: (131-133); 2: (116, 134, 135); 3: (136); 4: (137); 5: (138); 6: (129, 139, 140), 7: (141), 8: (142), 9: (143, 144), 10: (145), 11: (146).....	73
Tableau 2: Listes des médicaments épigénétiques approuvés par la FDA des États-Unis avec leurs cibles et leurs indications.....	89
Tableau 3: Listes des KDACi approuvés par la FDA des États-Unis avec leurs classes et leurs cibles.....	90
Tableau 4: Liste des essais cliniques terminés et complétés étudiant les GCs seuls ou en combinaison comme traitement anticancéreux (source clinicaltrials.gov).	108
Tableau 5: Liste des essais cliniques en recrutement et en cours étudiant les GCs seuls ou en combinaison comme traitement anticancéreux (source clinicaltrials.gov).	109

Liste des abréviations

5-caC: 5-carboxylcytosine

5-fC: 5-formylcytosine

5-hmC: 5-hydroxyméthylcytosine

5-mC: 5-méthylcytosine

7BS: seven- β -strand

α -KG: alpha cétooglutarate

Acétyl-CoA: acétyl-coenzyme A

ADN: Acide désoxyribonucléique

ARN: Acide ribonucléique

BET: *Bromodomain and Extra-Terminal Domain*

BETi: inhibiteurs de BET

BRD: bromodomaine

bHLH-LZ: structure hélice-boucle-hélice et glissière à leucine

Ca²⁺: calcium

CAMK: Ca²⁺ calmoduline kinase

CDK: kinase cycline-dépendante

CDK2: kinase 2 dépendante du cycle cellulaire

CpG: Cytosine précédent une guanine

CIMP: *CpG island methylator phenotype*

CpT: cytosine précédée d'une thymine

CSC: cellule souche cancéreuse

CSH: cellule souche hématopoïétique

DNMT1: ADN méthyltransférase 1

DNMT3: ADN méthyltransférase 3

DOT1L: *DOT1-like*

ERK: voie de signalisation des kinases régulatrices des signaux extracellulaires

EWS: sarcome d'Ewing

FDA: *Food and Drug Administration*

GC: glycoside cardiotonique

GNAT: N-acétyltransférases reliées à GCN5
GSK-3 β : glycogène synthétase kinase
H1: Histone 1
H2A: Histone 2A H2B: Histone 2B
H3: Histone 3
H3K4me3: triméthylation de la lysine 4 sur l'histone 3
H3K27me3: triméthylation de la lysine 27 sur l'histone 3
H4: Histone 4
HDAC: histone désacétylase
HMT: histone lysine méthyltransférase
IDH1/2: isocytates déshydrogénases 1 et 2
JQ1: thieno-triazolo-1,4-diazepine
K⁺: potassium
KAT: lysine acétyltransférase
KAT2A: GCN5
KAT2B: PCAF
KAT3A: Creb Binding Protein ou CBP
KAT3B: P300
KAT5: TIP60
KAT6A: MOZ
KAT6B: MORF
KAT7: HBO1
KAT8: MOF ou MYST1
KAT9: ELP3
KAT10: HPA3
KATi: inhibiteur des lysines acétyltransférases
KDAC: lysine désacétylase
KDACi: inhibiteur des lysines désacétylases
KDM1: LSD1
KMD6A: UTX
KMT2A: lysine méthyltransférase 2A ou MLL

KMT6A: EZH2
LLA: leucémie lymphoblastique aiguë
LLC: leucémies lymphoblastiques chroniquesLMA: leucémie myéloïde aiguë
LMC: leucémie myéloïde chronique
MPT: modification post-traductionnelle
MXD: famille des protéines de dimérisation de MAX
Na⁺: sodium
Na⁺ / K⁺ ATPase: pompe sodium / potassium adénosine triphosphatase
NAD: nicotinamide adénine dinucléotide
NK: *natural killer*
NLS: séquence de localisation nucléaire
OS: ostéosarcomes
PMT: protéine méthyltransférase
PP2A: protéine phosphatase 2A
PPAR: récepteur activé par les proliférateurs du peroxisome
PRC2: complexe répressif Polycomb 2
PRMT: arginine méthyltransférase
PSN: polymorphismes mononucléotidiques
Rb: rétinoblastome
REB: réparation par excision de bases
RMS: rhabdomyosarcome
RMS-a: rhabdomyosarcome alvéolaire
RMS-e: rhabdomyosarcome embryonnaire
SCF^{FBW7}: complexe protéique SCF-FBW7
Snf2 Related CREBBP Activator Protein: SRCAP
TAD: domaine d'activation de la transcription
TDG: thymine ADN glycosylases
TET: Ten-Eleven Translocation
TpG: thymine précédée d'une guanine
T-regs: lymphocytes T régulateurs
UPS: complexe ubiquitine-protéasome

WT: *wild type*

Remerciements

Les rencontres, le temps, les contextes et un brin de chance constituent à mon avis les quatre paramètres déterminants qui façonnent nos vies et les directions que l'on décide de prendre ou non. Dans le cadre de ma thèse, qui a débuté en maîtrise il y a de cela plus de 4 ans, de nombreuses personnes ont contribué à mon apprentissage scientifique et à la bonne réalisation des projets qui la constitue. Je tiens donc à les remercier et à présenter ma gratitude, car sans eux rien de cela n'aurait été possible.

Je tiens tout d'abord à remercier le **Dr. Raynal** de m'avoir ouvert la porte de son laboratoire. Le Dr. Raynal m'a toujours poussé à aller au delà de mes ambitions, au delà de mes aptitudes, au delà de ce que je pensais être possible. Il m'a également donné sa confiance et beaucoup de liberté scientifique quand il a jugé que je détenais les connaissances ou que j'étais capable de trouver les ressources nécessaires pour répondre à mes hypothèses, tout en restant disponible si j'avais besoin de discuter avec lui de mes avancées et de mes questionnements. J'ai énormément appris à vos côtés et je vous remercie sincèrement de m'avoir soutenu dans les moments difficiles de mon doctorat.

Également, j'adresse ma sincère gratitude à la **Fondation Cole**, au **Fond de recherche du Québec - Santé (FRQS)**, au **Groupe de recherche universitaire du médicament (GRUM)**, à **IRICoR**, aux **Instituts de recherche en santé du Canada**, au **département de pharmacologie et de physiologie** de la Faculté de Médecine de l'Université de Montréal et à la **Faculté des études supérieures et postdoctorales (FESP)** de l'Université de Montréal pour les différentes bourses d'études qui m'ont été attribuées. J'ai eu la chance de poursuivre mes études sereinement et de pouvoir compléter ma formation doctorale en participant à des congrès internationaux avant-gardistes dans mon domaine d'étude, des écoles d'été internationales et une formation entrepreneuriale.

Je tiens à exprimer ma sincère reconnaissance aux **Dr. Meloche, Dre. Krajinovic, Dr. Lambert** et **Dr. Hickson** d'avoir accepté d'évaluer mon travail doctoral et de consacrer de leurs temps pour l'enrichir.

Mes chers collègues du laboratoire, amis, je souhaite vous remercier du plus profond de mon coeur pour votre soutien quotidien. J'ai débuté ma maîtrise avec Mr. **Gregory Armaos** sur ce projet de recherche, qui fut un compère de taille, avec qui j'ai appris un bon nombre des techniques expérimentales nécessaires pour réaliser mon projet de recherche et le tout dans la bonne humeur, malgré la présence exaspérante de Gaspard. Merci pour ce beau début. Je remercie **Simon Jacques-Ricard** pour sa gentillesse et son aide à mes débuts. C'est avec beaucoup d'affection que je remercie **Gabrielle McInnes**, que j'ai eu la chance de former et de la voir évoluer en une scientifique perfectionniste et rigoureuse. Je ne te serai jamais assez reconnaissante pour l'aide et le soutien que tu m'as apporté dans l'un des moments les plus difficiles de ma vie. Sans hésitation, tu as pris le relais de mes expériences quand ma santé ne me permettait plus de pouvoir venir au laboratoire. Ton aide a été inestimable, merci.

Je tiens à exprimer ma profonde reconnaissance et gratitude à l'ensemble des collaborateurs qui ont cru en notre projet et qui nous ont offert la possibilité d'utiliser des techniques expérimentales sophistiquées pour pouvoir répondre à nos hypothèses de recherches. Je nomme le **Dr. Sinnett**, le **Dr. Beauséjour**, le **Dr. McGraw**, le **Dr. Downey**, le **Dr. Eppert**, la **Dre. Hoang**, le **Dr. Krogan** ainsi que l'ensemble de leurs équipes respectives.

Je remercie également l'ensembles des membres du personnel du **Centre de recherche du CHU Sainte-Justine** ainsi que du **département de pharmacologie et de physiologie** de l'Université de Montréal pour leurs aides au bon déroulement de mes travaux doctoraux.

C'est avec beaucoup d'émotions que je remercie ma famille, mes grands-parents **Maryse** et **Yves**, ma mère **Sandrine** et ma soeur **Marine**. Vous m'avez toujours soutenu et encouragé à poursuivre ma voie, à m'épanouir et à grandir en faisant mes propres choix, même si cela signifiait de le faire à 5632km de vous. Vous m'avez offert la liberté d'être moi-même, vous n'avez jamais eu d'exigence à mon égard et vous n'avez seulement souhaité que mon bonheur. Malgré les nombreux combats que nous avons affronté, nous avons toujours été unis et nous avons toujours essayé de trouver les solutions les plus justes, dans la bienveillance et dans l'amour. J'ai eu la chance d'évoluer dans une famille sans jugement et qui accepte le fait que nous essayons de faire au mieux, à la mesure de nos capacités. Vous m'avez inspiré à constamment essayer d'être la meilleure version de soi-même et à aider nos autrui. À vos côtés, j'ai également appris que rien est acquis, et que le travail et la bienveillance sont les clefs de l'équilibre personnel, même si selon le contexte, l'injustice peut nous en faire douter. Je suis fière d'être votre petite-fille, fille et soeur et extrêmement reconnaissante pour l'amour et le soutien que vous me donnez. J'essaierai toujours d'être à votre hauteur. Merci pour tout.

J'aimerai également remercier mes amis les plus proches, **Amandine**, **Anna**, **Pierre**, **Chloé** et **Angélique**, pour votre soutien inconditionnel. J'ai de la chance de vous avoir dans ma vie et sans votre aide, la réalisation de cette thèse aurait été très pénible. Je remercie également mes belles rencontres de Montréal, **Olivia**, **Adelyne**, **Cynthia**, **Émilie** et **Virginie**, pour votre soutien quotidien et les beaux moments partagés qui ont permis d'égayer les longs hivers québécois.

Pour finir, je tiens à remercier mon amour, **Timothé**, qui a partagé tous les hauts et les bas, les défis, les réussites, les doutes et les déceptions qui se sont entremêlés durant mon doctorat. Tu as été à mes côtés à chaque instant et tu n'as jamais cessé de croire en moi. Tu m'as donné de la force, du courage, du soutien et du réconfort. Tu m'as rappelé d'être fière de ce que je produisais, d'être fière de réaliser un doctorat et qu'en dehors du monde académique, ce n'est pas si commun. Également, tu as toujours été persuadé que j'étais capable de plus, et tu m'as toujours

poussé dans mes retranchements, poussé à être la meilleure version de moi-même. Avant de t'avoir dans ma vie, j'avais décidé de dédier l'intégralité de mon énergie pour améliorer d'une manière ou d'une autre, la qualité de vie des personnes atteintes de cancers, quitte à ce que cela porte préjudice à ma propre santé. Toutefois, tu m'as fait réaliser que si je veux être à la hauteur de cet objectif, je dois avant tout prendre soin de moi et ne pas ignorer les signaux que le corps nous envoie. De manière encore plus importante, je me dois d'être en bonne santé pour toi et pour que l'on puisse vivre les nombreuses aventures que la vie nous réserve. Les mots ne sont pas suffisants pour exprimer la reconnaissance et l'amour que je porte à ton égard. Merci de faire parti de ma vie.

Je dédie cette thèse à mes grands parents Maryse et Yves Zamagni, à ma mère Sandrine Zamagni et à ma soeur Marine Da Costa.

Pour la force, le courage et la détermination que vous m'avez appris, et pour l'inspiration que vous m'apportez tous les jours.

Peu importe les combats de la vie, nous avons la chance de pouvoir les combattre ensemble et peut-être l'opportunité de rendre les prochains moins difficiles pour soi et pour les autres.

I/ Introduction

1. Les cancers pédiatriques

1.1. Généralités

1.1.1. Le cancer

1.1.1.1. *Définition*

Le corps humain est composé d'environ 1000 milliards (10^{15}) de cellules qui ont des origines et des destinées cellulaires variées (1). Le renouvellement cellulaire est un mécanisme utilisé à différentes fréquences en réponse à un évènement exogène, tel qu'une blessure par exemple (1). Les cellules détiennent donc la capacité de se diviser et de se différencier pour assurer ce renouvellement cellulaire. Toutefois, l'homéostasie entre la création de nouvelles cellules et la mort cellulaire est primordiale pour assurer un bon fonctionnement général. Lorsque cette homéostasie est corrompue et que certaines cellules ne répondent plus aux signaux contrôlant la prolifération, la survie, la mort et la différenciation cellulaires, on observe une accumulation et une prolifération anarchiques et incontrôlées de ces cellules (1). On parle alors de cancer. Le cancer est donc une pathologie caractérisée par une aberration de la prolifération cellulaire, une augmentation de la survie cellulaire et une inhibition de la mort et de la différenciation cellulaire dans un tissu (1). Cela entraîne de nombreux dommages cellulaires et active les processus inflammatoires dans le tissu affecté (1-3). Le cancer peut se développer à partir de n'importe quel type cellulaire et on dénombre plus d'une centaine de types cancers dont les caractéristiques sont différentes (4). Une des notions clefs dans la pathologie du cancer est la distinction entre les tumeurs dites malignes et les tumeurs dites bénignes (4). Une tumeur correspond à une accumulation anormale de cellules qui peuvent être soit malignes ou bénignes (4). Les tumeurs bénignes, telles que les grains de beauté par exemple, correspondent à une accumulation locale de cellules (4). Ces tumeurs sont confinées dans leur site de formation d'origine et ne détiennent pas la capacité à envahir des régions situées en dehors de ce site (4). À l'inverse, les tumeurs malignes détiennent la capacité à envahir des tissus sains à proximité du site d'origine de formation et de se propager au delà de ce site via la circulation sanguine (4).

Les tumeurs bénignes et malignes sont catégorisées en fonction du type cellulaire dont elles proviennent (4). Deux principales catégories de cancers se différencient. En premier lieu, les cancers hématologiques, qui se forment à partir des cellules du tissu sanguin telles que les cellules immunitaires, par exemple (4). Les deux grands sous-types de cancers hématologiques sont les leucémies, originaires des cellules sanguines ou de la moelle osseuse, et les lymphomes, originaires du système lymphatique. En second lieu, les cancers dits solides, qui se forment à partir des cellules de n'importe quel tissu autre que le tissu sanguin (4). Les deux grands sous-types de cancers solides sont les carcinomes, originaires des cellules épithéliales, et les sarcomes, originaires des tissus conjonctifs. Les tumeurs sont ensuite classées en fonction de leur tissu d'origine (tel que le cancer du sein par exemple), et du sous-type de cellules impliquées (tel que les fibroblastes par exemple) (4).

1.1.1.2. Origines

Plusieurs événements sont nécessaires pour qu'une cellule initie des programmes cellulaires associés à la transformation tumorale (5). Tout d'abord, la plupart des cellules cancéreuses initiatrices subissent plusieurs mutations génomiques qui vont permettre de déréguler des voies cellulaires pour avantager la prolifération (5). Ces mutations génomiques sont provoquées par des lésions de l'acide désoxyribonucléique (ADN) et peuvent être dues à de nombreux facteurs dont les principaux sont l'influence de l'environnement, certains produits chimiques, des mutations spontanées ou encore des erreurs lors de la réplication de l'ADN (5). La division cellulaire est donc un processus risqué, où les erreurs lors de la réplication de l'ADN sont courantes et conduisent à des aberrations génomiques si elles ne sont pas corrigées correctement. Les trois mutations clefs qui induisent la transformation tumorale affectent les gènes suppresseurs de tumeur (1), les proto-oncogènes (oncogènes) (2) et les gènes associés à la régulation des télomères (3):

1. Les gènes suppresseurs de tumeurs sont des gènes principalement impliqués dans les mécanismes de contrôle de la division cellulaire, de l'apoptose, de la réparation de l'ADN, du contrôle de l'expression des gènes (gènes impliqués dans les mécanismes épigénétiques) et des programmes de mort cellulaire. Les gènes suppresseurs de tumeurs sont majoritairement réprimés dans les cancers. Par exemple, le gène p53 est un gène suppresseur de tumeur dérégulé dans plus de la moitié des cancers (5).

2. Les proto-oncogènes sont des gènes impliqués dans la régulation génomique des cellules et dont les protéines codées par ces proto-oncogènes régulent les voies de signalisations associées à la prolifération (4). Des exemples de proto-oncogènes sont *RAS*,

SRC ou *MYC* (*C-MYC*). Dans les cancers, les proto-oncogènes sont anormalement exprimés ou mutés et on les définit alors comme des oncogènes (4).

3. Les télomères sont des séquences répétées d'ADN situées à l'extrémité des chromosomes (6). Les télomères empêchent la reconnaissance de ces extrémités par les mécanismes de réparation de l'ADN et compensent les pertes des séquences nucléotidiques associées à la réplication semi-conservative de l'ADN (6). Ces mécanismes de réparation sont effectués via l'action de la télomérase, une enzyme qui catalyse l'addition des séquences répétées des télomères (6). La majorité des cellules humaines n'exprime pas assez de télomérase pour compenser la perte des séquences télomériques associées à la division cellulaire (6). Les cellules cancéreuses sont caractérisées pour exprimer de hauts niveaux de télomérase et acquièrent donc la capacité de renouveler leurs télomères indéfiniment afin d'augmenter leur survie cellulaire (6).

Les cellules doivent acquérir plusieurs événements mutationnels afin de développer un phénotype cancéreux. Plus les cellules entrent en division cellulaire, plus le risque d'acquérir des erreurs génomiques est important (5). Le cancer est donc une pathologie corrélée positivement avec le vieillissement et celui-ci régule cette pathologie via plusieurs mécanismes autres que l'instabilité génique et la régulation des télomères tels que l'autophagie, la sénescence et le métabolisme (7). De nombreux facteurs environnementaux jouent un rôle clef dans l'accélération du vieillissement cellulaire et le développement de cancers tels que les rayons ultraviolets du soleil, les carcinogènes et la diète (5).

Un autre facteur clef dans le développement de 15 à 20% des cancers est l'infection virale par des virus oncogéniques (8). Il existe de nombreuses variétés de virus oncogéniques qui agissent par des mécanismes différents dans le processus de carcinogenèse. Toutefois, de manière générale, les virus oncogéniques infectent leurs cellules hôtes (8). De plus, les cancers dérivés des virus se développent souvent des années après l'infection primaire dû au fait que les virus seuls ne sont pas suffisants pour développer un cancer (8). D'autres cofacteurs sont nécessaires comme les différents éléments cités préalablement ou encore l'inaction du système immunitaire.

Le cancer est donc une pathologie complexe, pouvant avoir différentes et multiples origines. Beaucoup d'efforts de la part de la communauté scientifique ont permis d'identifier les caractéristiques et les acteurs clefs du processus de carcinogenèse. Dans les années 2000, les Drs. Hanahan et Weinberg ont proposé 6 caractéristiques que les cancers acquièrent pendant leur développement: le potentiel réplicatif illimité, une angiogenèse importante, l'évasion de l'apoptose, l'auto-suffisance des signaux impliqués dans la croissance cellulaire, l'insensibilité aux signaux contre la croissance cellulaire et l'invasion tissulaires et la formation de métastases (Figure 1) (9). Au cours des décennies qui ont suivi et grâce au progrès de la

recherche, ce modèle a évolué et 10 caractéristiques sont décrites soit 4 nouvelles (en gras): la prolifération cellulaire autonome, l'évasion contre la croissance cellulaire, **le détournement du système immunitaire**, **l'inflammation**, l'immortalité réplivative, l'angiogénèse importante, l'invasion et la formation de métastases, **l'instabilité du génomes et les mutations**, la résistance à la mort cellulaire et **la dérégulation du métabolisme** (Figure 2) (10, 11).

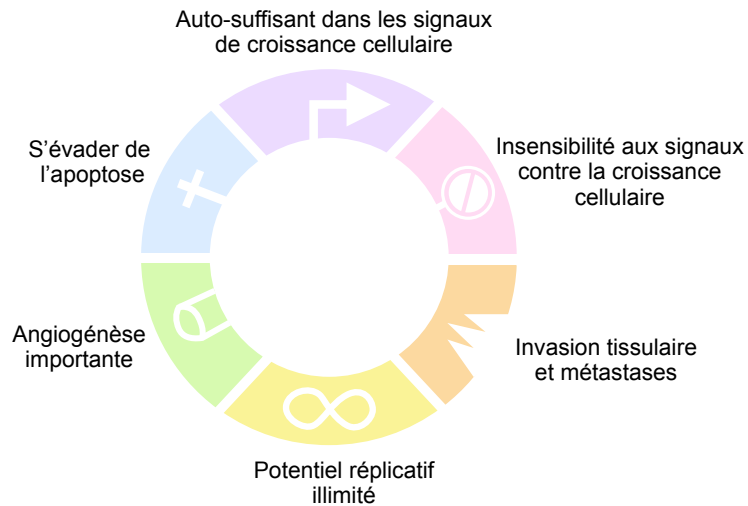


Figure 1: Les caractéristiques du cancer d'après les Drs. Hanahan et Weinberg.

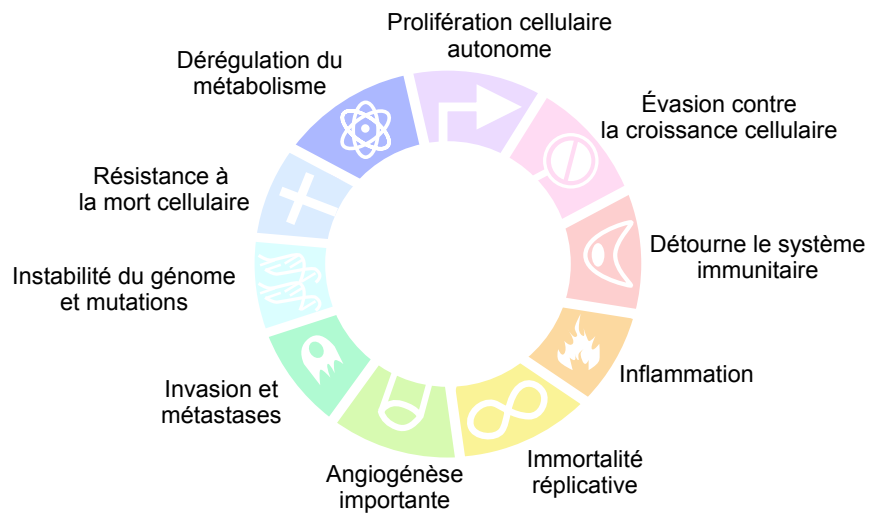


Figure 2: Mise à jour des caractéristiques du cancer d'après les Drs. Hanahan et Weinberg.

1.1.1.3. Cellules souches cancéreuses et hiérarchie

De nombreuses études suggèrent que les cellules cancéreuses initiatrices partagent à la fois des propriétés de cellules souches et de cellules cancéreuses: on les appelle les cellules souches cancéreuses (CSCs) (12). Les cellules souches sont des cellules qui ont la capacité de s'auto-renouveler et de se différencier en différents sous-types cellulaires spécialisés selon différents signaux environnementaux (12). Les cellules souches jouent un rôle crucial dans la réparation tissulaire en réponse à un dommage (12). De la même manière que les cellules souches, les CSCs s'auto-renouvellent et forment des cellules filles qui peuvent se différencier en plusieurs types de progéniture et créer alors une nouvelle génération de cellules cancéreuses (12). Au cours des divisions cellulaires, les nouvelles générations de cellules vont acquérir de nouvelles altérations génomiques et se différencient donc des cellules cancéreuses initiatrices (12). En étudiant le génome des différentes cellules formant une tumeur, on peut établir une hiérarchie des cellules cancéreuses allant des cellules initiatrices aux différentes générations.

L'existence des CSCs a été démontrée pour la première fois en transplantant des cellules humaines de leucémies dans des souris immunodéprimées (12, 13). Les cellules initiatrices de la leucémie chez les souris partageaient des marqueurs de surface communs avec les cellules souches hématopoïétiques (13). Les CSCs ont pu être identifiées par la suite dans différents types de cancers grâce à leurs marqueurs phénotypiques ainsi que leurs transcrits génomiques (12). Deux théories principales sur l'origine des CSCs résultent donc: la première est que les CSCs sont le fruit d'une cellule souche ayant subi des altérations génomiques; la deuxième est que les CSCs proviennent de cellules cancéreuses ayant acquis des propriétés de cellules souches (14). Toutefois, l'importance de nombreux autres facteurs dans l'origine et la régulation des CSCs, tels que le microenvironnement cellulaire par exemple, suggèrent que la création des CSCs est multifactorielle (14).

Aujourd'hui, les CSCs représentent un challenge thérapeutique dans le traitement du cancer car elles sont résistantes aux thérapies actuelles et sont la cause de nombreuses rechutes (14). De nombreux efforts sont faits pour mieux comprendre cette population cellulaire et le micro-environnement associé afin de trouver de nouvelles stratégies thérapeutiques pour cibler les CSCs.

1.1.1.4. Prévalence

D'après le rapport statistique de 2019 sur l'incidence du cancer au Canada fourni par le gouvernement du Canada et la société canadienne du cancer, le cancer est la principale

cause de décès au Canada (15). En 2019 au Canada, 220400 nouveaux cancers diagnostiqués ont été recensés, et dans 63% des cas, une survie supérieure à 5 ans est anticipée.

Malgré le fait que le taux d'incidence de tous les cancers confondus soit à la baisse chez les hommes et n'augmente plus chez les femmes, il est estimé qu'un canadien sur deux recevra un diagnostic de cancer au cours de sa vie, principalement dû au vieillissement de la population. Au Canada, les cancers les plus fréquemment diagnostiqués sont le cancer du poumon, le cancer colorectal, le cancer du sein et le cancer de la prostate.

1.1.1.5. Traitements

Le cancer est une pathologie complexe, qui détient différents sous-types, origines et localisations et qui évolue de manière différentielle selon les individus. Toutefois, pendant de nombreuses décennies, 3 principales stratégies thérapeutiques étaient utilisées seules ou en combinaison pour traiter les cancers (16). La première est la chirurgie, qui consiste à réséquer la tumeur primaire et les ganglions lymphatiques associés. Elle est souvent utilisée en première ligne de traitement quand la tumeur est accessible (16). La deuxième est la radiothérapie, qui consiste à tuer les cellules cancéreuses par des rayons X à haute énergie (17). Cette stratégie est efficace et permet d'atteindre des tumeurs difficilement accessibles par chirurgie (17). Toutefois, des cellules non cancéreuses sont également tuées par le biais de ces traitements, créant de la toxicité et des effets secondaires graves pour les patients (17). De nombreuses recherches ont été effectuées pour améliorer ces technologies afin de cibler les cellules cancéreuses de manière spécifique. La troisième est constituée par les chimiothérapies traditionnelles, qui consistent à prendre un médicament par voie orale ou intraveineuse, qui va tuer les cellules qui se divisent rapidement (18). Il existe différents types de chimiothérapies qui se distinguent par deux mécanismes principaux: les chimiothérapies dépendantes du cycle cellulaire (les antimétabolites, les alcaloïdes et la bléomycine par exemple) ou les chimiothérapies indépendantes du cycle cellulaire (les agents alkylants et certains antibiotiques par exemple). L'utilisation des chimiothérapies traditionnelles s'avèrent efficaces pour traiter différents cancers en réduisant la taille de la tumeur primaire pour faciliter une chirurgie, ou alors en permettant le traitement de tumeurs secondaires propagées dans plusieurs parties du corps. Cependant, les chimiothérapies manquent de spécificité pour les cellules cancéreuses et beaucoup de toxicité et d'effets secondaires graves sont développés à la suite de ces traitements (19).

De ce fait, il est estimé que les 2/3 des patients ayant subi des thérapies anticancéreuses présentent des effets secondaires graves à long terme tels que des troubles métaboliques, des troubles neurologiques et parfois des tumeurs secondaires (19). Les

patients en rechute développent des cancers plus agressifs, souvent résistants à la première ligne de traitement qu'ils ont reçu. De nombreux efforts ont donc été réalisés par la communauté scientifique pour trouver des traitements anticancéreux plus ciblés et efficaces. Au cours des dernières décennies, de multiples nouvelles stratégies sont apparues telles que l'utilisation d'anticorps monoclonaux anti-tumoraux (le bévacizumab ou avastin par exemple), des petites molécules ciblées contre une voie cellulaire pro-tumorale comme l'imatinib par exemple, des thérapies épigénétiques comme la décitabine par exemple (plus de détails en partie 2), ou encore plus récemment, la thérapie cellulaire avec l'utilisation des cellules CAR-T. Ces nouvelles stratégies sont utilisées seules ou en combinaison avec les traitements anticancéreux traditionnels. Cependant, malgré l'amélioration des traitements anticancéreux se traduisant par une amélioration de la survie des patients atteints de cancers, de nombreuses rechutes et de nombreux effets secondaires graves sont toujours observés et le cancer reste la première cause de décès par maladie au Canada.

1.1.2. Les cancers pédiatriques

Les cancers pédiatriques sont des pathologies rares qui toutefois, demeurent la principale cause de décès infantile par maladie au Canada d'après la Société canadienne du cancer (20). Les cancers pédiatriques se différencient des cancers de l'adulte de par leur localisation, leur agressivité et leur origine (21). Les cancers les plus fréquents chez les enfants sont les cancers hématopoïétiques, les cancers du système nerveux et les sarcomes (21). De plus, le nombre global de mutations dans les cancers pédiatriques est plus faible en comparaison aux cancers de l'adulte, et les mutations présentes dans les cancers pédiatriques sont rarement trouvées dans les cancers de l'adulte (21). Les altérations de l'épigénome (qui seront détaillées dans la partie 2) sont caractérisées pour être plus nombreuses dans les cancers pédiatriques (21). De nombreuses théories suggèrent que les cancers pédiatriques sont dus à la dérégulation de cellules souches pendant le développement embryonnaire (21).

1.2. Les leucémies pédiatriques

1.2.1. Généralités

1.2.1.1. Définition

Les leucémies sont définies par la prolifération clonale de cellules hématopoïétiques non différenciées appelées blastes dans la moelle osseuse. Par conséquent, le nombre de

cellules sanguines diminue et le nombre de cellules non différenciées et non fonctionnelles augmente. Chez les patients atteints de leucémie, cela se mesure par de l'anémie, une baisse du nombre de cellules immunitaires et une altération de la coagulation sanguine (Figure 3).

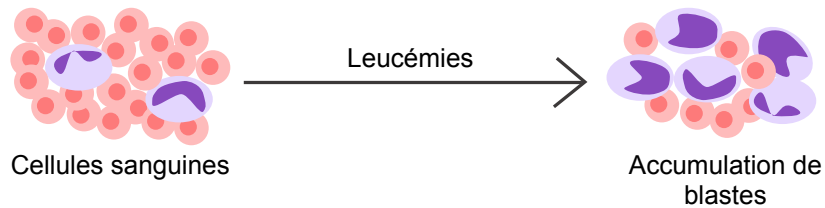


Figure 3: Schéma représentant l'accumulation de blastes dans les leucémies.

Il existe de nombreux sous-types leucémiques qui dépendent de l'origine du clone. Les deux principaux sous-types de leucémies proviennent de deux progéniteurs. Le premier est constitué par la lignée myéloïde qui donne naissance aux globules rouges, aux plaquettes et aux granulocytes. Les leucémies provenant de cette lignée sont appelées les leucémies myéloïdes. Le deuxième sous-type est constitué par la lignée lymphoïde, qui donne naissance aux lymphocytes B et T et aux cellules *natural killers* (NKs). Les leucémies provenant de cette lignée sont appelées les leucémies lymphoïdes. La classification des cellules hématopoïétiques selon leur origine est représentée dans la Figure 4.

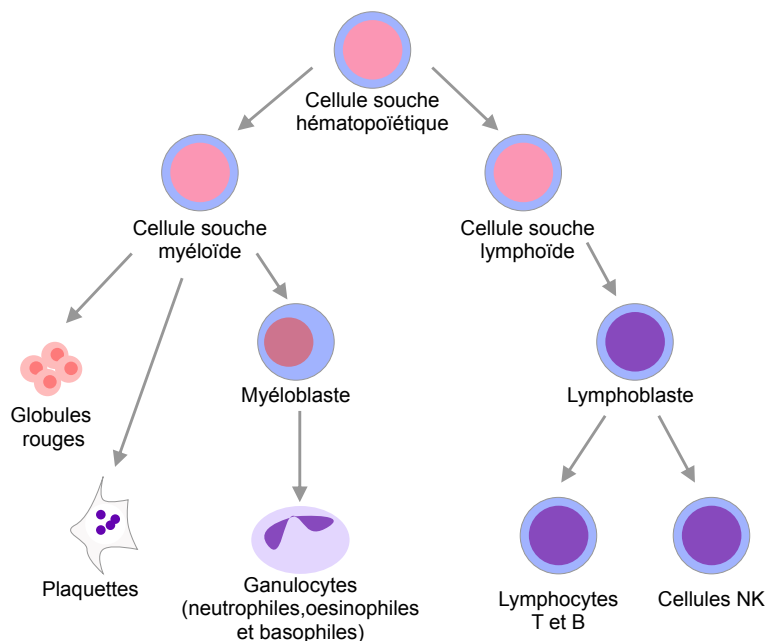


Figure 4: Classification des cellules hématopoïétiques pouvant donner naissance à des leucémies.

Les sous-types de leucémies sont également divisés en 2 catégories en fonction de la vitesse de progression de la maladie. On parle de leucémies aiguës ou de leucémies chroniques. Les leucémies aiguës se développent très rapidement et peuvent être fatales en quelques mois si elles ne sont pas traitées tandis que les leucémies chroniques progressent lentement et sont moins agressives que les leucémies aiguës.

Les leucémies se divisent donc en 4 catégories qui sont 1. les leucémies lymphoblastiques aiguës (LLAs), 2. les leucémies lymphoblastiques chroniques (LLCs), 3. les leucémies myéloïdes aiguës (LMAs) et 4. les leucémies myéloïdes chroniques (LMCs). Également, il existe certaines leucémies provenant de précurseurs non différenciés ou souches qui présentent à la fois des facteurs phénotypiques provenant des lignées myéloïdes et des lignées lymphoïdes.

1.2.1.2. Prévalence

D'après les statistiques de la société canadienne du cancer, les leucémies sont les cancers les plus diagnostiqués chez les enfants de 0 à 14 ans et ils représentent environ 35% des cancers pédiatriques au Canada (20). Les leucémies sont la 2^{ème} principale cause de décès infantiles par cancers au Canada (environ 21%).

Parmi les leucémies, les LLAs sont les plus diagnostiquées chez les enfants de 0 à 14 ans au Canada (22). Ils représentent environ 78% des cas de leucémies et sont responsables de la moitié des décès suite à une leucémie.

1.2.2. Leucémies lymphoblastiques pédiatriques

1.2.2.1. Généralités

Les leucémies lymphoblastiques pédiatriques sont très majoritairement des LLAs. Les LLCs sont extrêmement rares chez les enfants. De ce fait la partie 1.2.2 décrira exclusivement les LLAs.

Les LLAs prennent majoritairement naissance dans les précurseurs lymphoblastiques des cellules B ou des cellules T. Dans 80% des cas, les patients atteints de LLA développent l'immunophénotype B, souvent associé avec un meilleur pronostic (23). Les leucémies de type T représentent 15% des LLAs. Elles sont majoritairement plus agressives que les types B et sont donc associées à un plus faible taux de rémission (23). Le dernier sous-type de LLAs est représenté par les leucémies provenant de précurseurs souches exprimant les deux immunophénotypes (23).

1.2.2.2. Facteurs de risques et classification

Lors du diagnostic, les patients sont stratifiés en fonction de plusieurs paramètres permettant d'établir le type de traitement le plus favorable en fonction des différents cas. Par exemple, les enfants âgés de 1 à 10 ans ont des leucémies moins agressives que les enfants âgés de 0 à 1 an et que les enfants âgés de plus de 10 ans: l'âge constitue donc un critère important (23). Également, le nombre total de globules blancs constitue aussi un facteur de risque: un nombre supérieur à 50,000/l de globules blancs indique une leucémie plus agressive (23). Au total, il existe 3 groupes de risques de patients atteints de LLAs:

- Risque standard : les patients de 1 à 10 ans qui ont un nombre de globules blancs inférieur à 50,000/l.
- Haut risque : les patients de plus de 10 ans et / ou qui ont un nombre de globules blancs supérieur à 50,000/l.
- Très haut risque : les patients âgés de 0 à 1 ans, les patients qui détiennent une cytogénétique non favorable et les patients qui ont une faible réponse au traitement où l'on observe l'apparition de maladie résiduelle 4 semaines après la première ligne de traitement.

Également, il existe d'autres facteurs de risque que ceux précédemment décrits tels que l'infiltration des cellules leucémiques dans le système nerveux central et dans les testicules ainsi que l'immunophénotype (lymphocytes B ou T) (23).

1.2.2.3. Traitements

Il existe plusieurs types de traitements en fonction de l'origine de la leucémie et de la classification lors du diagnostic. Le traitement des patients de LLAs se fait en 3 phases (23). La première phase est l'induction de la rémission. Cette phase consiste à éliminer les cellules leucémiques dans le sang et la moelle osseuse via l'utilisation d'agents chimiothérapeutiques tels que la vincristine, les corticostéroïdes, l'asparaginase et des anthracyclines (utilisés seuls ou en combinaison selon les protocoles et les types de LLAs). Elle dure environ 4 à 6 semaines et 95% des patients la complètent. Les patients qui n'entrent pas en rémission à la suite de cette première ligne de traitement vont recevoir une greffe allogénique de moelle osseuse contenant des cellules souches hématopoïétiques. La deuxième phase de traitement est la consolidation, qui consiste à intensifier la thérapie pour éliminer les cellules leucémiques résiduelles qui pourraient induire des rechutes. Cette étape comprend l'administration de combinaisons de plusieurs agents chimiothérapeutiques, différents de ceux utilisés pendant la phase d'induction de la rémission, pendant 6 à 9 mois. La durée et l'intensité du traitement dépendent de la réponse des patients aux thérapies et des facteurs de risques associés. La

troisième phase est la maintenance. Cette phase consiste à diminuer les doses de chimiothérapies (antimétabolites en combinaison avec le methotrexate et la mercaptopurine) pour éliminer les dernières cellules leucémiques résiduelles qui pourraient induire des rechutes. Cette étape dure généralement 2 ans mais peut être prolongée en fonction des réponses des patients.

De plus, les patients démontrant une infiltration des cellules leucémiques dans le système nerveux central vont subir des traitements supplémentaires pour éviter des rechutes localisées dans le système nerveux central (23). Ces traitements consistent principalement à administrer des agents chimiothérapeutiques par voie intrathécale ou par voie systémique (en utilisant des agents capables de traverser la barrière hémato-encéphalique) pendant la phase d'induction de la rémission et également, selon les protocoles, pendant la phase de maintenance (23). Des radiations crâniennes peuvent aussi être administrées, mais la toxicité associée à cette procédure la limite aujourd'hui aux patients en rechute qui présentent une infiltration de cellules leucémiques dans le système nerveux central (23). Les patients qui présentent une rechute ont des maladies généralement plus agressives et résistantes aux thérapies (18). D'autres cycles de chimiothérapies seront donnés avec ou sans transplantation de cellules souches hématopoïétiques en fonction des cas (23).

De nombreuses nouvelles thérapies plus spécifiques et moins toxiques pour le traitement des LLAs existent aujourd'hui ou sont en cours d'essais cliniques. Particulièrement, les thérapies cellulaires CAR-T, récemment approuvées par Santé Canada pour le traitement de certains lymphomes démontrent des résultats prometteurs pour le traitement des LLAs en rechute et / ou réfractaires (24). Cette thérapie consiste à modifier les cellules T des patients pour qu'elles expriment le récepteur CAR-T qui permet de reconnaître des antigènes spécifiques aux cellules de LLAs (24).

1.2.3. Leucémies myéloïdes pédiatriques

1.2.3.1. Définition

Les leucémies myéloïdes représentent 20% des leucémies de l'enfant et les leucémies aiguës représentent 18% des leucémies chez les enfants de moins de 15 ans (25, 26). Les LMCs forment donc un groupe plus rare de leucémies pédiatriques et ce sous-type de leucémies est traité de la même manière que les LMCs de l'adulte (26). Cette partie sera donc consacrée aux LMAs de l'enfant.

Les LMAs de l'enfant sont des maladies dites *de novo*, c'est à dire sans cause particulière identifiée (25). Certaines maladies génétiques sont connues pour augmenter le risque de développer des LMAs tels que le syndrome de Bloom, le syndrome de Down et l'anémie de Fanconi (25). Les LMAs de l'enfant apparaissent également à la suite de traitements toxiques donnés pour un autre type de cancer (25). Les LMAs peuvent apparaître dans différentes lignées cellulaires myéloïdes à différents stade de différenciation (25).

1.2.3.2. Facteurs de risques et classification

La LMA est une maladie hétérogène et la classification clinique dépend de plusieurs caractéristiques phénotypiques, moléculaires et génétiques (25). La classification des différents sous-types de LMAs suit la classification de l'Organisation mondiale de la santé qui distingue 7 catégories incluant les LMAs et les néoplasmes associés (25):

- Les LMAs avec des aberrations génomiques récurrentes tels que certaines translocation chromosomiques ou certaines mutations génétiques;
- Les LMAs induites par des changements myélodysplasiques;
- Les LMAs induites par des thérapies;
- Les LMAs sans origine spécifiée telles que les leucémies monocytiques aiguës ou les leucémies érythroïdes aiguës;
- Les sarcomes myéloïdes;
- Les aberrations myéloïdes liées au syndrome de Down dont les leucémies myéloïdes;
- Les néoplasmes des cellules dendritiques plasmacytoïdes.

De la même manière que les LLAs, l'âge du patient, le nombre de globules blancs et le sous-type de LMAs vont influencer le choix des traitements et les pronostics de survie. Toutefois, contrairement aux LLAs, il n'existe pas de stratification spécifique de la maladie (25). Le choix des traitements dépend principalement de l'origine et du sous-type de la maladie, de l'infiltration de la maladie à l'extérieur des compartiments sanguins et de la moelle osseuse, et si la maladie est primaire, en rémission ou récurrente (25).

1.2.3.3. Traitements

Le traitement des LMAs est principalement constitué de deux phases (26, 27). La première phase est l'induction de la rémission, qui comme pour le traitement des LLAs, consiste à éliminer les cellules leucémiques dans le sang et la moelle osseuse via l'utilisation

d'agents chimiothérapeutiques tels que la cytarabine et des anthracyclines. La combinaison des traitements chimiothérapeutiques avec la greffe allogénique de cellules souches hématopoïétiques permet d'améliorer les réponses aux traitements, la survie des patients et diminue les chances de rechutes. La rémission est atteinte chez 85% des patients. La deuxième phase est la consolidation, qui telle que pour le traitement des LLAs, consiste à intensifier la thérapie pour éliminer les cellules leucémiques résiduelles qui pourraient induire des rechutes. Cette étape consiste à administrer des combinaisons de plusieurs agents chimiothérapeutiques à haute dose, parfois, selon les cas, en combinaison avec la greffe allogénique de cellules souches hématopoïétiques.

Comme pour les patients atteints de LLAs, certains patients vont développer une infiltration de cellules leucémiques dans le système nerveux central et vont recevoir des traitements chimiothérapeutiques par voie intrathécale ou par voie systémique pendant la phase d'induction de la rémission (27).

L'augmentation des doses de chimiothérapies a permis d'augmenter la survie des patients atteints de LMAs. Toutefois une haute toxicité est associée à ces traitements et environ 5 à 13% des patients décèdent durant les cycles de traitements principalement dû à une infection bactérienne ou fongique (28). La complétion des traitements chimiothérapeutiques avec des antibiotiques a permis de diminuer le taux de décès en réponse aux traitements (28). Toutefois, 3 à 19% des patients sont réfractaires aux traitement et environ 35% des patients non-réfractaires rechutent avec un taux de survie estimé à 25% (28). Il n'existe pas de thérapie standard pour les patients en rechute. Toutefois, dans la majorité des cas, ils reçoivent une seconde ligne de traitements chimiothérapeutiques en combinaison avec la greffe allogénique de cellules souches hématopoïétiques (28).

De nos jours, il existe des thérapies plus spécifiques approuvées pour le traitement des LMAs réfractaires et certains essais cliniques sont en cours pour tester de nouvelles stratégies plus ciblées et moins toxiques pour le traitement des LMAs. Par exemple, un anticorps monoclonal, le gemtuzumab ozogamicin, est approuvé pour les adultes de plus de 60 ans atteints de LMAs et pour les patients âgées de plus de 2 ans réfractaires aux thérapies ou en rechute (29). Le gemtuzumab ozogamicin est un anticorps dirigé contre l'antigène de surface CD33, exprimé par les blastes myéloïdes, et conjugué avec l'antibiotique calicheamicine qui cause des doubles cassures de l'ADN aux cellules qui l'incorporent (29). L'immunothérapie est l'une des stratégies thérapeutiques ciblées les plus prometteuses pour le traitement des LMAs pédiatriques et différentes immunothérapies sont en cours d'essais cliniques (30).

1.3. Les sarcomes pédiatriques

1.3.1. Généralités

1.3.1.1. Définition

Les sarcomes sont un groupe de néoplasmes mésenchymateux hétérogènes qui peuvent être divisés en deux catégories principales: les sarcomes des tissus mous et les sarcomes des os (31). Les sarcomes des tissus mous sont divisés en deux sous-types composés des rhabdomyosarcomes (RMS) et des non-RMS, et les deux principaux sarcomes des os pédiatriques sont les ostéosarcomes (OS) et les sarcomes d'Ewing (EWS) (31). Dû à la grande diversité des origines de ces néoplasmes, il existe plus d'une centaine de sous-types de sarcomes différenciés en clinique an fonction de leur localisation primaire, leur cytogénicité et des résultats obtenus lors d'analyses histologiques et moléculaires. Les différents sous-types de sarcomes sont traités de manière différentielle en clinique (32).

1.3.1.2. Prévalence

Les sarcomes représentent 20% des cancers solides pédiatriques (33). D'après les données de la société Canadienne du cancer, entre 2009 et 2013, le nombre d'enfants âgés de 0 à 14 ans diagnostiqués avec des sarcomes des tissus mous est de 295 et le nombre d'enfants âgés de 0 à 14 ans diagnostiqués avec des sarcomes des os est de 225 (22). Parmi ces patients, 43 enfants atteints des sarcomes des tissus mous et 36 enfants atteints des sarcomes des os vont succomber à leurs maladies.

1.3.2. Les rhabdomyosarcomes

1.3.2.1. Généralités

Les RMS sont des néoplasmes malins composés de myoblastes squelettiques immatures. Les analyses histologiques et moléculaires permettent de distinguer 3 sous-catégories de RMS (31, 34). La première catégorie est constituée par les RMS embryonnaires (RMS-e). Ils occurrent principalement au niveau de la tête, du cou et le long du tractus génito-urinaire. Ils sont génétiquement hétérogènes et présentent de nombreuses altérations au

niveau des voies de signalisation oncogéniques. La deuxième catégorie est composée par les RMS alvéolaires (RMS-a). Ils ocurrent principalement dans les extrémités, le tronc, le périnée et les sites péri-anaux. Les RMS-a sont caractérisés pour avoir des translocations chromosomiques et ils se distinguent donc en deux groupes: les RMS-a à fusions positives et les RMS-a à fusions négatives. Les fusions chromosomiques impliquent majoritairement le gène *FOXO1* avec les gènes *PAX3* ou *PAX7*. La troisième catégorie est constituée par les RMS anaplastiques ou pléomorphiques. Ce sont des RMS non différenciés et difficilement diagnostiqués dû à leur manque de caractéristiques phénotypiques. Les RMS anaplastiques sont très peu courants chez les enfants.

Le RMS est le sarcome des tissus mous le plus courant chez les enfants et les adolescents et il représente 3.5% des cancers chez les enfants âgés de 0 à 14 ans et 2% des cancers chez les adolescents (15 à 19 ans) (34). Le taux de survie sur 5 ans est estimé à 65% chez les enfants et à 51% chez les adolescents (34). L'incidence des RMS varie selon leurs sous-types: les RMS-e sont plus courants chez les jeunes enfants que chez les adolescents et ils sont globalement plus courants chez les garçons alors que l'incidence des RMS-a est plus élevée chez les enfants âgés de plus de 10 ans et la distribution est constante selon les genres (34). Les RMS-e représentent le sous-type de RMS le plus fréquent chez les enfants comptabilisant entre 60 et 70% des cas et les RMS-a ocurrent chez 20% des enfants (35).

1.3.2.2. Facteurs de risque et classifications

Les RMS sont des cancers dits sporadiques, sans facteurs de risques particuliers à l'exception de certaines prédispositions génétiques, telles que le syndrome de Costello (mutation de l'oncogène *HRAS*), le syndrome de Li-Fraumeni (mutation du gène suppresseur de tumeur *TP53*) et d'autres (36). De plus, un poids élevé lors de la naissance ainsi qu'une grande taille lors de la gestation sont associés avec une augmentation de l'incidence des RMS-e (36). Par ailleurs, certaines caractéristiques des patients et de leurs tumeurs lors du diagnostic sont associées avec des facteurs de risques. Par exemple, les patients âgés entre 1 et 9 ans ont de meilleur pronostic de survie que les patients âgés de 0 à 1 an ou de plus de 9 ans (34). Également, une taille du RMS inférieure à 5 cm ainsi que certaines localisations sont associées à des meilleurs pronostics de survie tels que les régions péri-testiculaires par exemple (34). En outre, la présence de métastases est associées avec un mauvais pronostic de survie (34). De plus, les RMS-a sont associés avec un moins bon pronostic de survie que les RMS-e (34).

En fonction de leurs caractéristiques, les RMS sont classés selon leurs risques (34):

- Faible: lorsque c'est un RMS-e situé dans un site favorable qui ne présente pas de métastase ou lorsque le RMS-e est situé dans un site non favorable mais que sa taille est inférieure à 5 cm et que le patient ne présente ni de métastases ni une implication des ganglions lymphatiques à proximité du RMS-e.
- Intermédiaire: lorsque c'est un RMS-e situé dans un site non favorable, sans métastases, avec ou sans implication des ganglions lymphatiques situés à proximité du RMS-e et dont la tumeur primaire n'a pas été totalement réséquée lors de la chirurgie ou bien lorsque c'est un RMS-a sans métastase associée.
- Élevé: lorsque c'est un RMS avec des métastases associées.

1.3.2.3. Caractéristiques moléculaires

1.3.2.3.1 Les rhabdomyosarcomes embryonnaires

Les RMS-e sont caractérisés par un nombre plus élevé de mutations chromosomiques et un plus grand nombre de variants de copie par rapport aux autres sous-types, et le nombre de mutations détectées au diagnostic corrèle de manière positive avec l'âge du patient (36). La majorité des RMS-e présentent une perte d'hétérozygotie au niveau de la région chromosomique 11p15 ainsi que des gains au niveau du chromosome 8 (36). Les mutations mesurées chez les patients atteints de RMS-e impliquent dans 1/3 des cas les gènes associés aux voies de signalisation de l'oncogène RAS (36). Chez certains patients de moins de 10 ans, un sous-type de RMS-e présentant de l'anaplasie est retrouvé. Ce sous-type est associée avec le syndrome de Li-Fraumeni et la mutation du gène suppresseur de tumeur *TP53* (36).

1.3.2.3.2 Les rhabdomyosarcomes alvéolaires

Les RMS-a se différencient principalement des RMS-e par la présence de fusion chromosomique impliquant principalement le gène *FOXO1* avec les gènes *PAX3* (59% des cas) ou *PAX7* (19% des cas) (36). Globalement, les RMS-a présentent moins de mutations que les RMS-e et les mutations retrouvées sont souvent associées à des gains de fonction de l'expression et de l'activité de certains gènes (36). Certains RMS-a (20%) ne présentent pas de translocations chromosomiques et leurs caractéristiques moléculaires se rapprochent très fortement des RMS-e (37).

1.3.2.4. Traitements

Des traitements multimodaux sont utilisés pour les RMS pédiatriques qui consistent à associer la prise de traitements chimiothérapeutiques avec la chirurgie et / ou la radiothérapie selon les cas (34, 38). Lorsque c'est possible, la chirurgie est la première étape de traitement contre les RMS (34). Cela implique la résection totale de la tumeur en incluant des marges de quelques centimètres autour de la tumeur. Toutefois, si la taille de la tumeur est trop grande, ou bien que le site est difficilement accessible ou dangereux pour le patient, seulement une biopsie de la tumeur sera prélevée et la chimiothérapie puis la radiothérapie seront envisagées pour réduire la tumeur et y accéder plus facilement (34, 38). L'intensité et la durée des traitements chimiothérapeutiques dépendent des groupes dans lesquels sont classifiés les patients (34, 38). Les patients à faible risque reçoivent 3 médicaments chimiothérapeutiques à faible dose (vincristine, dactinomycine et cyclophosphamide); les patients à risque intermédiaire reçoivent le même cocktail chimiothérapeutique avec des concentrations plus élevées; les patients à haut risque reçoivent 3 agents chimiothérapeutiques supplémentaires en plus des précédents cités à faible dose (34).

Les patients diagnostiqués avec des RMS localisés ou bien des RMS-e métastatiques guérissent de leur maladie respectivement dans 70% et 50% des cas (34, 38). Les patients sont suivis pendant 5 ans pour vérifier l'apparition d'une nouvelle tumeur ainsi que les effets secondaires à long terme des thérapies qui seront spécifiques en fonction des différents types de tumeurs (34). Les rechutes des patients sont principalement associées à la résection non complète des RMS primaires après la première chirurgie ainsi que chez les patients présentant des métastases au diagnostic (36).

D'autres approches thérapeutiques sont testées pour améliorer le traitement des patients atteints de RMS. Par exemple, certains groupes ont administré de hautes doses de chimiothérapie en combinaison avec des transplantations autologues et allogéniques de cellules souches chez des patients nouvellement diagnostiqués ou en rechute (36). Toutefois, les patients ayant reçu cette stratégie thérapeutique sont encore peu nombreux et aucune amélioration significative n'a été démontrée (36). Également, une étude pilote combinant les traitements chimiothérapeutiques avec l'immunothérapie présentent des résultats encourageants sur l'amélioration des taux de survie de patients atteints de RMS-a (36). De nombreux essais cliniques sont en cours pour améliorer le traitement des RMS.

1.3.3. Les ostéosarcomes

1.3.3.1. Généralités

Les ostéosarcomes (OS) sont des tumeurs malignes qui dérivent de cellules mésenchymateuses et qui déposent une matrice d'ostéoïdes immature sur des tissus conjonctifs (31). D'après les informations disponibles sur le site de la Société canadienne contre le cancer, 255 patients âgés de 0 à 14 ans ont été diagnostiqués avec un sarcome de l'os (OS et sarcome d'Ewing) entre 2009 et 2013 et 36 enfants sont décédés de leur maladie (<https://www.cancer.ca/en/cancer-information/cancer-type/bone-childhood/statistics/?region=on>). L'OS représente le sarcome de l'os le plus commun chez les enfants et les adolescents de moins de 20 ans (34). Toutefois, l'OS apparaît rarement avant l'âge de 5 ans et le premier pic d'apparition de l'OS s'observe chez les adolescents d'une moyenne d'âge de 15 ans. L'OS survient pendant la croissance osseuse des enfants et des adolescents et dans 75% des cas, les OS se développent dans les petites extrémités des os longs tels que le fémur et le tibia (39).

1.3.3.2. Facteurs de risque et classifications

L'incidence des OS est plus élevée chez les hommes que chez les femmes et chez les afro-américains (34, 39). Aucune anomalie chromosomique et génétique spécifique a été identifiée dans l'établissement de cette pathologie (34). Cependant, les patients présentant certains syndromes génétiques tels que le syndrome de Bloom, le syndrome de Rothmund-Thomson, présentent davantage de risque de développer des OS (34). Certaines caractéristiques des tumeurs des patients lors du diagnostic sont associées avec des facteurs de risques. Par exemple, les OS situés au niveau de la colonne vertébrale et du pelvis sont associés avec un mauvais pronostic tandis que les OS situés dans les extrémités et au niveau de la tête et du cou sont associés avec des meilleurs pronostics (34). Également, une taille supérieure à 8 cm ainsi que la présence de métastases sont associées avec un mauvais pronostic (34). De plus, une résection incomplète de la tumeur augmente le taux de rechute des patients (34). Également, pour les tumeurs inopérables, le degré de nécrose présent dans la tumeur en réponse à une chimiothérapie néo-adjuvante influe sur le risque de rechute après 2 ans: les patients qui présentent 90% de nécrose ont un meilleur pronostic de survie que les patients ayant un taux de nécrose inférieur à 90% (34).

La classification des OS se détermine en premier lieu selon la présence ou non de métastases: on parle d'OS local et d'OS métastatique (31). Les OS locaux sont divisés en deux

groupes: les OS résécables de manière chirurgicale et les OS non résécables (39). La deuxième classification des OS est appelée le système d'Enneking est elle dépend de 3 paramètres (39). Le premier est le grade qui est déterminé par des analyses histologiques de la tumeur (39). Le grade permet d'évaluer le potentiel de l'OS à se propager en fonction du phénotype des cellules (39). Les OS détiennent soit un faible grade (grade 1) et donc un faible potentiel invasif, soit un haut grade (grade 2) et donc, un fort potentiel invasif (39). Le deuxième paramètre est l'extension de la tumeur. Les OS peuvent être soit localisés dans l'os, et donc intra-compartmentales (T1), soit localisés dans l'os et ses alentours, et donc inter-compartmentales (T2) (39). Le troisième paramètre est l'absence (M0) ou la présence de métastases (M1) (39).

De manière globale, il existe 3 stades d'OS définit en stade I, II ou III (39). Le stade I correspond aux OS de faibles grades locaux. Ce stade est divisé en deux sous-groupes: le stade IA pour les T1 et le stade IB pour les T2. Le stade II correspond aux OS de haut grades locaux. Le stade II est aussi divisé en deux sous-groupes: le stade IIA pour les T1 et le stade IIB pour les T2. Le stade III, qui correspond aux OS métastatiques.

1.3.3.3. Caractéristiques moléculaires

La plupart des OS sont originaires de mutations sporadiques qui toutefois, impliquent l'inhibition de l'activité de suppresseurs de tumeurs tels que p53 dans environ 25% des cas, ou encore la protéine du rétinoblastome RB dans plus de 60% des cas (39). De plus, les OS présentent une dérégulation des voies de signalisation impliquées dans la promotion de la prolifération et des métastases au niveau de l'os, telle que la voie du facteur de croissance transformant TGF- β , mais aussi de manière générale dans les cancers telle que la voie de la kinase phosphoinositide 3 PI3K/AKT/mTOR et de la protéine kinase *mitogen-activated* MAPK/ERK (39). Dans les OS métastatiques, la promotion de la voie de signalisation de Wnt/ β -catenin et de la tyrosine kinase SRC est caractérisée pour induire la migration des cellules dans la circulation sanguine (39).

1.3.3.4. Traitements

Le traitement des patients atteints de OS suit généralement le cycle de traitement suivant: 2 cycles de chimiothérapies néo-adjuvantes (10 semaines), chirurgie de l'OS et des métastases selon les cas, puis 4 cycles de chimiothérapies post-chirurgicales (18 semaines) (31). Les chimiothérapies standards néo-adjuvantes et adjuvantes utilisées pour le traitement des OS sont des cycles de doxorubicine combinée avec le cisplatine suivis de hautes doses de méthotrexate (31). La chirurgie est une étape clef pour le traitement des OS car la résection

complète de la tumeur est déterminante pour la rémission des patients. Lors de la chirurgie, des marges de plusieurs centimètres autour de l'OS seront enlevées et des analyses biologiques de ces marges permettront de révéler si l'OS s'est propagé ou non (31). Il est donc parfois nécessaire d'avoir recours à des amputations. Pour les OS métastatiques, la résection des métastases et des marges autour des métastases est également cruciale (31). La radiothérapie est utilisée lorsque la tumeur ou une partie de la tumeur n'est pas atteignable par chirurgie (31).

De nos jours, le taux de survie à 5 ans des patients atteints d'OS de faible grade est de 83-95% et de 60-78% pour les patients atteints d'OS de haut grade (39). Les patients diagnostiqués avec des métastases ont un taux de survie à 5 ans de 20-30% et les patients en rechute présentent également un faible taux de survie de 20% (39).

Plusieurs nouvelles thérapies sont en cours d'investigation pour le traitement des OS. Par exemple, des thérapies ciblées inhibitrices des voies de signalisation impliquées dans la prolifération (everolimus, inhibiteur de mTOR) ou encore dans l'angiogénèse (le pazopanib et le sorafenib, inhibiteurs des récepteurs du *Vascular Endothelial Growth Factor* et de *Platelets-Derived Growth Factor*), démontrent des effets prometteurs chez des patients réfractaires aux thérapies actuelles (39). Une autre classe de médicaments utilisée pour le traitement de pathologies osseuses comme l'ostéoporose est également investiguée pour le traitement des OS. Particulièrement, les biphosphonates sont aujourd'hui étudiés en combinaison avec les chimiothérapies pour leurs propriétés inhibitrices de la prolifération cellulaire et de l'angiogénèse, et activatrices de l'apoptose (39).

1.4. Le proto-oncogène MYC

1.4.1. Généralités

1.4.1.1. La famille de MYC

La famille protéique MYC est composée de trois membres qui se différencient selon la localisation de leur expression (40). Le premier membre de cette famille est C-MYC, ou MYC, qui est exprimé de manière ubiquitaire (40). N-MYC forme le deuxième membre et il est exprimé principalement dans les tissus d'origines neurales (40). Le dernier membre est constitué par L-MYC qui est exprimé principalement dans les tissus épithéliaux (40).

Les différents membres de cette famille protéique sont composés de 4 domaines principaux: un domaine d'activation de la transcription (TAD), une portion centrale, une

séquence canonique de localisation nucléaire (N) et un domaine de liaison à l'ADN (Figure 5) (41):



Figure 5: Structure générale des protéines de la famille de MYC.

Lorsqu'il est activé, le TAD est un domaine suffisant pour recruter les partenaires protéiques de l'ARN polymérase II afin d'induire la transcription (41). Afin d'être activé, la dimérisation avec un autre partenaire protéique contenant un domaine de liaison de l'ADN est nécessaire. Les membres de la famille de MYC ne sont pas capables de s'homodimériser; ils s'hétérodimérisent donc avec un autre partenaire protéique: MAX (41). L'hétérodimérisation de MYC avec MAX est possible grâce à la présence de leurs domaines de liaison à l'ADN composés d'une structure hélice-boucle-hélice et glissière à leucine (bHLH-LZ) (42). Cette structure bHLH-LZ reconnaît une séquence consensus de l'ADN « CACGTG » appelée région amplificatrice (soit *Enhancer box* ou *E box* en anglais) (42). MYC et MAX se lient donc sur des régions amplificatrices via leurs domaines bHLH-LZ. Ils s'enroulent et forment une structure en forme de « ciseau » afin de recruter la machinerie transcriptionnelle sur les gènes cibles des protéines de la famille MYC (Figure 6) (41).

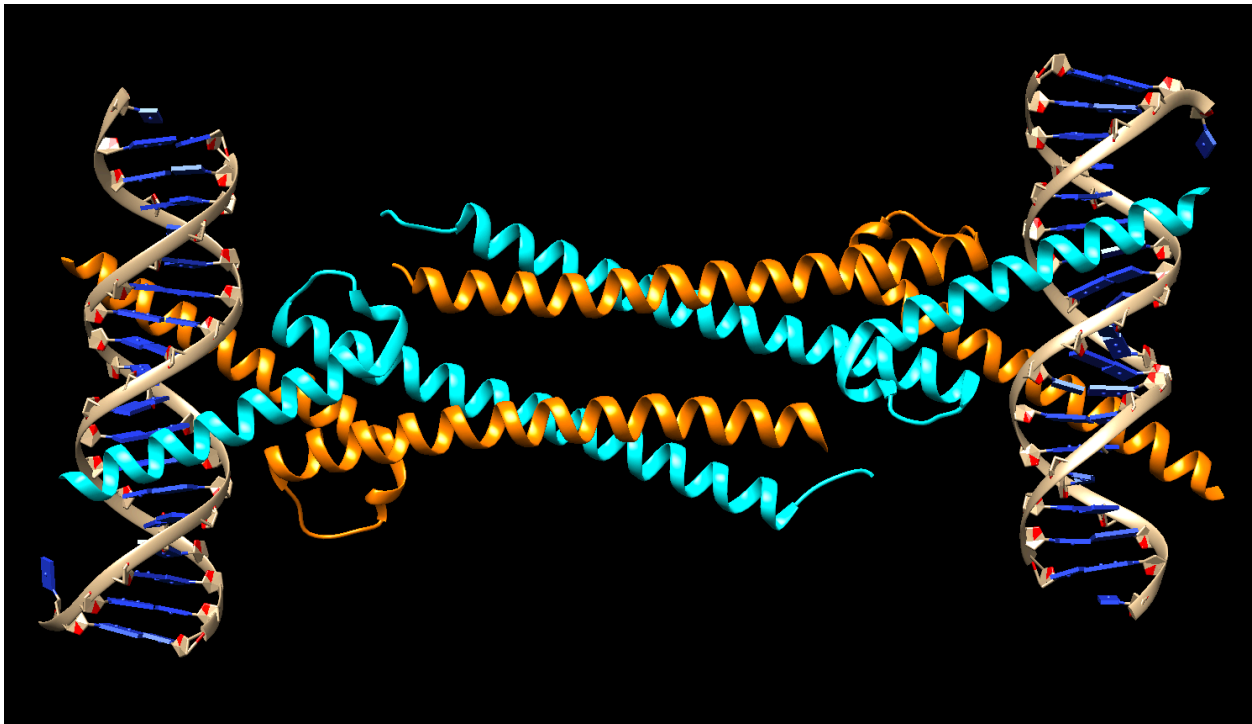


Figure 6: Structure cristallographique de l'hétérodimère MYC / MAX qui se lie sur les régions amplificatrices de l'ADN disponible sur le logiciel Chimera (Numéro de la banque protéique PDB de MYC/MAX: 1NKP; MYC: orange; MAX: bleu cyan).

La liaison de l'hétérodimère MYC / MAX sur les régions amplificatrices dépend également de l'état de la chromatine: si la chromatine est décondensée (précision dans la partie 2.), la liaison de l'hétérodimère MYC / MAX est facilitée (43). Lorsque MYC / MAX est lié sur l'ADN, plusieurs facteurs sont recrutés pour permettre la transcription des gènes tels que le complexe NuA4 qui contient des modulateurs de la chromatine (tels que des lysine acétyltransférases qui seront décrites dans la partie 2) et des régulateurs positifs de la transcription (tels que le facteur de transcription positif d'élongation nommé pTEFb) (43). Certaines protéines peuvent également se fixer directement sur l'hétérodimère MYC / MAX et influencer son activité transcriptionnelle.

1.4.1.2. Régulateur de la transcription

1.4.1.2.1. La famille MYC

Le rôle majeur de la famille protéique MYC est de réguler la transcription génomique; cette famille contrôle 15% de la transcription du génome (40). Les protéines MYC régulent spécifiquement la transcription des gènes détenant des régions amplificatrices sur leurs promoteurs: ces gènes sont dénommés les gènes cibles de MYC (41). Selon le contexte, les protéines MYC sont également capables de s'accumuler aux niveaux des promoteurs de ces gènes cibles déjà actifs pour agir comme amplificateurs de la transcription de manière indépendante à sa liaison sur les régions amplificatrices (41, 43).

Les protéines MYC sont décrites comme des facteurs de transcription « *masters* » et les gènes cibles de MYC forment un réseau signalétique impliqué dans différents processus biologiques: on parle de l'interactome de MYC (43). Cet interactome est contrôlé par plusieurs composants appartenant à la famille des protéines bHLH-LZ et qui se distinguent en 3 modules (Figure 7) (43). Le premier module est constitué par les protéines MYC, capables de s'hétérodimériser avec MAX et d'agir positivement sur la transcription des gènes cibles de MYC (Figure 7) (43). Le deuxième module est composé des protéines appartenant à la famille des protéines de dimérisation de MAX (MXD) ainsi que les protéines MNT (Max Network Transcriptional Repressor) et MGA (Max gene-associated protein), capables de s'hétérodimériser avec MAX et / ou MLX (*Max-like protein*) et d'inhiber la transcription des gènes cibles de MYC (Figure 7) (43). Le troisième est composé des protéines MLXIP (MLX-

interactin protein) et MLXIPL (*MLX-interactin protein like*), capables de s'hétérodimériser avec MLX et d'agir positivement sur la transcription des gènes cibles de MYC (Figure 7) (43).

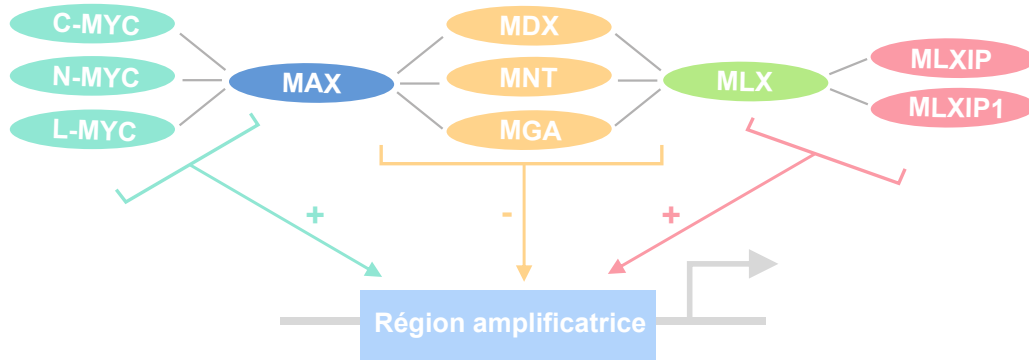


Figure 7: Schéma représentant les protéines appartenant à l'interactome de MYC, les possibles hétérodimérisations associées et leurs effets sur la transcription des gènes.

L'interactome de MYC agit principalement dans les processus biologiques contrôlant la croissance et la prolifération cellulaire, la différenciation cellulaire, l'apoptose et le métabolisme cellulaire (Figure 8) (43). L'hétérodimère MYC / MAX contrôle positivement la croissance et la prolifération cellulaire, l'apoptose et le métabolisme cellulaire et inhibe la différenciation cellulaire (Figure 8) (43). Les hétérodimères impliquant MAX et ses partenaires protéiques différents de MYC ainsi que les hétérodimères impliquant MLX régulent l'interactome de MYC de manière inverse que l'hétérodimère MYC /MAX, à l'exception de MLX / MLXIP qui régule de manière positive le métabolisme (Figure 8) (43).

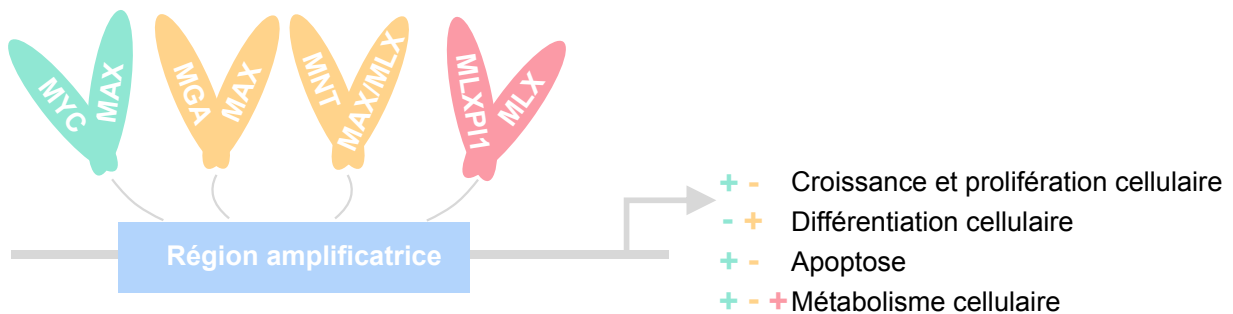


Figure 8: Régulation de la transcription des gènes par l'interactome de MYC. La régulation positive ou négative des différents hétérodimères sur les différents processus biologiques est indiquée par les couleurs suivantes: bleu cyan pour l'hétérodimère MYC / MAX;

jaune pour les hétérodimères MGA /MAX, MNT / MAX et MNT / MLX; rose pour l'hétérodimère MLXP1 / MLX. Figure adaptée de Carroll et al. (43)

1.4.1.2.2. La protéine MYC

De manière plus spécifique, la protéine MYC (ou C-MYC) régule la transcription de gènes impliqués dans de nombreux processus biologiques incluant la synthèse protéique, le cycle cellulaire, le métabolisme, l'adhésion cellulaire, le cytosquelette, l'apoptose, l'angiogénèse, la transcription, la traduction, la réparation de l'ADN et certains micro-ARN (41, 44). Ces familles de gènes sont décrites dans différentes banques de données telles que la banque de données de signature moléculaire du Broad Institute (<http://software.broadinstitute.org/gsea/msigdb/index.jsp>).

1.4.1.3. Régulation de MYC: ARN messenger et protéines

1.4.1.3.1. Régulation de l'ARN messenger de MYC et de sa transcription

L'ARN messenger de MYC est régulé par l'action de certains micro-ARNs dont par exemple miR-34 et miR-145, deux inhibiteurs de l'expression de MYC (45, 46). La transcription de MYC est également régulée par de nombreux facteurs de transcription dont certains sont impliqués dans la voie cellulaire de WNT, tel que TCF, identifié pour déréguler l'expression de MYC (40). De plus, certains motifs répétitifs de l'ADN caractérisés pour adopter des structures non canoniques de l'ADN régulent la transcription de MYC (exemple: les ADN-Z, les quadruples-G et les bulles simples brins) (40).

1.4.1.3.2. Régulation de la protéine MYC

Le niveau d'expression de la protéine MYC dans les cellules est en parti contrôlé par la dégradation de cette protéine. Le mécanisme majeur de dégradation de MYC implique le complexe ubiquitine-protéasome (UPS) dépendant de l'ATP (47). La dégradation par l'UPS se résume par deux étapes cruciales. La première est la liaison covalente de molécules ubiquitine sur la protéine cible. La deuxième est la dégradation de la protéine poly-ubiquitinée par le protéasome 26S. Plus précisément, la liaison covalente des molécules d'ubiquitine sur la protéine cible se fait en trois étapes et implique différentes enzymes. Tout d'abord, l'ubiquitine est adénylée par une enzyme E1 ce qui est responsable de l'activation de l'ubiquitine. Ensuite, l'ubiquitine activée est transférée sur une enzyme de conjugaison de l'ubiquitine appelée E2.

Puis, avec la collaboration d'une ubiquitine ligase appelée E3 qui est liée sur la protéine cible, l'enzyme E2 transfère l'ubiquitine activée sur un résidu de lysine présent sur la protéine cible. Des réactions successives d'ubiquitination vont engendrer une poly-ubiquitination de la même lysine sur la protéine cible. Cette protéine poly-ubiquitinée sera alors reconnue par le protéasome 26S et dégradée. Un schéma récapitulatif de la dégradation par l'UPS est décrit en figure 9.

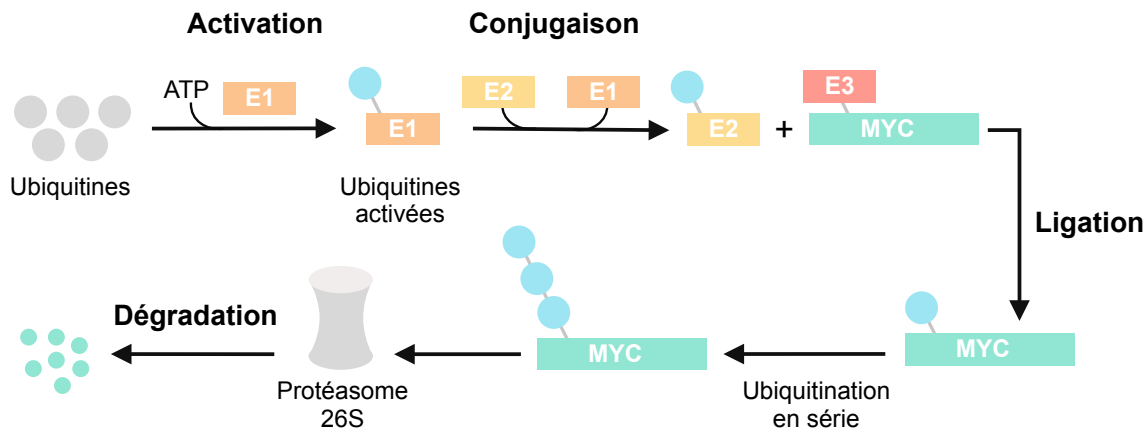


Figure 9: Schéma représentant les différentes étapes de la dégradation protéique par l'UPS. Les ubiquitines sont d'abord activées par l'enzyme E1 puis conjuguées avec l'enzyme E2. L'ubiquitine ligase E3 se lie sur la protéine cible, qui dans cette représentation est MYC. La ligation de la molécule d'ubiquitine activée sur MYC est alors réalisée. MYC subit des réaction d'ubiquitination en série puis sera dégradée par le protéasome 26S.

Plusieurs ubiquitines ligases E3 sont impliquées dans la dégradation de MYC. L'une des plus étudiées est FBW7 qui permet l'ubiquitination de de MYC avec le complexe SCF (SCF^{FBW7}) (48, 49). La régulation de MYC par FBW7 dépend du statut de phosphorylation de la thréonine 58 et de la sérine 62 localisées dans le TAD de MYC (48, 49). Plus précisément, la phosphorylation de la sérine 62 peut être catalysée par la voie cellulaire des kinases régulatrices des signaux extracellulaires (ERK) et la kinase 2 dépendante du cycle cellulaire (CDK2) (50-52). La phosphorylation de la sérine 62 de MYC permet l'amorçage de la phosphorylation de la thréonine 48 catalysée par la glycogène synthétase kinase GSK-3 β (50, 51). La présence de phosphorylation sur ses deux résidus de MYC entraîne une déphosphorylation de la sérine 62 par la protéine phosphatase 2A (PP2A) B56 α et via l'intermédiaire de l'isomérase PIN1 (51, 53). La protéine MYC uniquement phosphorylée sur la thréonine 58 va être reconnue par FBW7. Le complexe SCF^{FBW7} transfère alors des molécules

d'ubiquitines activées sur MYC (48). La dégradation de MYC par SCF^{FBW7} est décrite dans la figure 10.

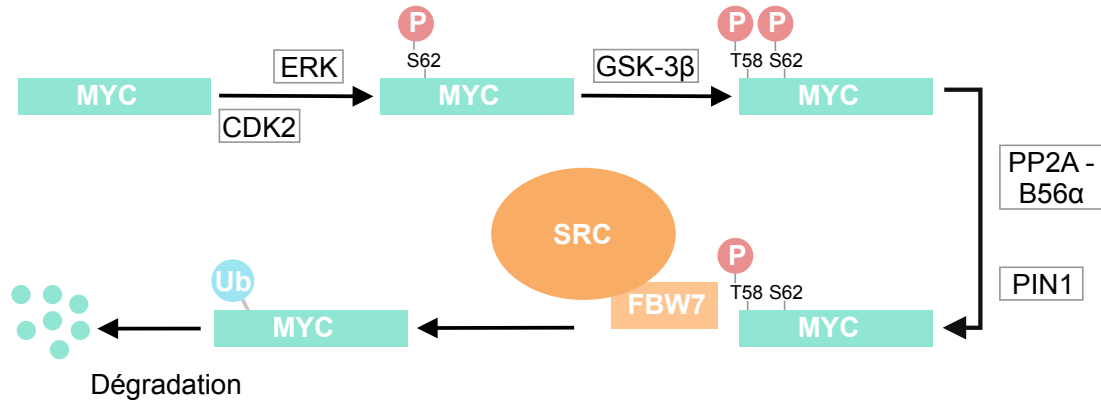


Figure 10: Schéma représentant les voies de signalisation impliquées dans la dégradation de MYC par SCF^{FBW7}. MYC est d'abord phosphorylée sur la sérine 62. Cette phosphorylation peut être catalysée par différentes enzymes appartenant soit à la voie de signalisation ERK, soit par CDK2. Par la suite, MYC est phosphorylée sur la thréonine 58 par GSK-3 β . Cela entraîne une déphosphorylation de la sérine 62 par PP2A-B56 α en partenariat avec PIN1. FBW7 se lie alors sur MYC et l'ubiquitination de MYC est réalisée par le complexe SRC. MYC subira des ubiquitinations en série avant d'être dégradée par le protéasome 26S.

De plus, il existe d'autres régulations de la protéine MYC que celle impliquant l'UPS. Par exemple, MYC est régulée par des protéases à cystéine dépendantes du calcium appelées calpaïnes (54). Ces protéases clive la partie carboxyle de MYC contenant le domaine de liaison à l'ADN ce qui induit la perte d'activité transcriptionnelle de MYC (54). MYC n'est donc pas totalement dégradée mais partiellement clivée. De plus, une récente étude démontre une nouvelle voie de dégradation de la protéine MYC indépendante de la phosphorylation de la thréonine 58 et de l'ubiquitination de MYC (55). Cette dégradation s'effectue dans le noyau cellulaire via la protéine régulatrice polyamide antizyme 2 (55). Également, la protéine MYC peut subir d'autres modifications post-traductionnelles qui influencent sa stabilité. Par exemple, l'acétylation de MYC sur certaines lysines crée une compétition avec les lysines ubiquitinées et augmente la stabilité de cette protéine (40, 56).

La demi-vie de la protéine MYC varie selon le type cellulaire et le contexte. Ainsi, dans des fibroblastes humains non transformés et quiescents, la demi-vie de MYC est estimée à 10 minutes tandis que dans un contexte de croissance cellulaire, la demi-vie de MYC est estimée

à 30 minutes (57, 58). De plus, il a été démontré que l'activation de la voie cellulaire RAS induit une augmentation de la demi-vie de MYC jusqu'à 45 minutes dans des fibroblastes quiescents et jusqu'à 90 minutes dans des fibroblastes en croissance (50, 58). Ce contrôle positif exercé par RAS sur la stabilité protéique de MYC est régulé par des effecteurs de RAS qui contrôlent la phosphorylation de MYC (50). Également, dans divers contextes pathologiques comme par exemple dans certaines lignées cellulaires leucémiques, une altération du système de dégradation effectuée par le protéasome induit une augmentation de la demi-vie de MYC jusqu'à 70 minutes (59).

1.4.2. MYC dans les cancers

1.4.2.1. Dérégulation de la famille MYC dans les cancers

La famille protéique de MYC est dérégulée dans plus de 50% des cancers, résultant en une augmentation aberrante de l'activité de ces proto-oncogènes. Ces dérégulations sont associées avec un mauvais pronostic (41). Différents mécanismes sont impliqués dans la dérégulation de la famille MYC. Tout d'abord des translocations chromosomiques au niveau du chromosome 8 peuvent être observés et induire une surexpression de ce proto-oncogène (60). Également, la séquence codante de MYC peut contenir des mutations qui résultent à une expression plus stable du proto-oncogène et de ce fait, à sa surexpression (61). De plus, des polymorphismes mononucléotidiques (PSN) au niveau de la région du gène de MYC 8q24 peuvent être identifiés dans les cancers (61, 62). Dans 88% des cas, les PSN associés aux maladies sont localisés dans des régions non-codantes de l'ADN (62, 63). Une des fonctions de ces régions non-codantes de l'ADN est la régulation en *cis* de la transcription des gènes avoisinants (62, 63). Les régions amplificatrices décrites dans la partie 1.4.1 appartiennent à la famille des éléments régulateurs en *cis* (62). Ils forment ainsi des sites de liaison qui regroupent plusieurs facteurs de transcription afin de réguler la transcription sur de large région génomique (62). Dans les cancers, différentes régions amplificatrices sont dérégulées et induisent une surexpression de MYC (62). Par exemple, dans certaines LLAs de type T, une duplication de 8q24 entraîne une amplification du nombre de copie d'une région amplificatrice où le gène NOTCH1 se lie, ce qui conduit à une surpression de MYC (64). En outre, certaines régions amplificatrices mais aussi promotrices sont hyperacétylées dans les cancers ce qui permet selon les cas d'activer ou d'augmenter la transcription induite par MYC (60). Dernièrement, dans les cancers, différentes kinases peuvent être mutées et différentes voies de signalisation dérégulées dont par exemple les voies de WNT, MAPK et PI3K/AKT, et cela induit une augmentation soit de la stabilité de MYC, soit de son activité (60).

1.4.2.2. La famille MYC dans les leucémies pédiatriques

1.4.2.2.1 Rôle de de la famille MYC dans l'hématopoïèse

Les transcrits des membres de la famille de MYC sont exprimés dans différentes lignées hématopoïétiques (61):

- MYC et N-MYC sont exprimés dans les cellules souches hématopoïétiques (CSH) ainsi que dans certains progéniteurs;
- L-MYC est faiblement exprimé dans les progéniteurs lymphoïdes communs, les macrophages et les mégacaryocytes.

Il est à noter que l'expression de N-MYC et de L-MYC est impossible sans l'expression de MYC dans les cellules hématopoïétiques (61).

Au niveau protéique, seulement MYC est mesurée dans les progéniteurs myéloérythroïdes, les CSHs et les progéniteurs multipotents. Un de ses rôles clefs dans l'hématopoïèse est l'inhibition de la différenciation hématopoïétique (61). Toutefois, ce rôle ne s'applique pas à tous les types cellulaires hématopoïétiques. Par exemple, la différenciation des mégacaryocytes est indépendante de la régulation de MYC tandis que dans les CSHs, MYC est impliqué dans la balance entre le renouvellement des CSHs et la différenciation (61). De plus, MYC et N-MYC jouent un rôle déterminant dans la différenciation lymphocytaire et l'expression de MYC dans les lymphocytes B et T matures corrèle avec leurs états d'activation (61). MYC est donc également caractérisée pour induire la prolifération lymphocytaire (61).

1.4.2.2.1 Dérégulation de MYC dans les leucémies pédiatriques

L'activité et l'expression de MYC sont dérégulées dans 80% des leucémies. Dans les leucémies pédiatriques, 2% à 5% des LLAs et certaines LMAs présentent des translocations chromosomiques au niveau du chromosome 8 impliquant une dérégulation de MYC (61). Également, les LMAs présentent des amplifications du nombre de copies du gène de MYC (61). En outre, certaines translocations chromosomiques n'impliquant pas MYC sont caractérisées pour induire son expression, telles que les translocations impliquant RUNX1 avec ETO et PML avec RAR α par exemple (61). De plus, une augmentation de la stabilité de MYC a été mesurée chez des patients atteints de LLAs et cela via une augmentation de l'acétylation de MYC (60, 61). Chez les patients atteints de LLAs de type T, le récepteur cellulaire NOTCH1 impliqué dans le développement des lymphocytes T est muté dans plus de 50% des cas (61). NOTCH1 est impliqué dans la régulation de la transcription de MYC et dans les cas de LLAs-T, la transformation oncogénique des lymphocytes T mutés pour NOTCH1 se ferait via une

augmentation de la transcription de MYC et de ses gènes cibles (61). Également, tel que discuté précédemment dans la partie 1.4.2.1., l'augmentation du nombre de copie de certaines régions amplificatrices permettant la liaison de NOTCH1 et de différents facteurs de transcription au niveau des promoteurs de MYC et de ces gènes cibles, induit une surexpression de la voie de MYC dans certains cas de LLAs-T (64).

1.4.2.3. MYC dans les sarcomes pédiatriques

1.4.2.3.1 Rôle de MYC dans les précurseurs myogéniques et les tissus mous différenciés

Les précurseurs myogéniques se différencient en myotubes sous l'influence de signaux cellulaires précis (65). Afin d'induire cette différenciation cellulaire, l'expression de MYC est inhibée et à l'inverse, la surexpression de MYC empêche ce processus et induit la prolifération des myoblastes (65). D'après les informations disponibles sur le site *The Human Protein Atlas*, MYC est fortement exprimé dans certains tissus myogéniques tels que les tissus utérins et les testicules (<https://www.proteinatlas.org/ENSG00000136997-MYC/tissue>). Dans les tubules séminifères, les cellules de Sertoli régulent la spermatogenèse et prolifèrent via la libération de l'hormone folliculostimulante qui induit la transcription de MYC (66).

1.4.2.3.2 Dérégulation de MYC dans les RMS

MYC et MYC-N sont fréquemment surexprimés dans les RMS, et particulièrement MYC-N qui est régulé positivement par des facteurs de transcription impliqués dans la translocation PAX3-FOXO1 dans les RMS-a (67). Dans les RMS-e, MYC induit la transformation oncogénique en collaborant avec un facteur de transcription appartenant à la famille des gènes T-box, TBX2, qui agit comme inhibiteur de la myogenèse (67). De nombreuses voies de signalisation sont caractérisées pour augmenter l'activité de MYC dans les RMS. En particulier, la signalisation de la voie RAS/MEK/ERK est augmentée dans les RMS-e entraînant une accumulation de MYC (68). Dans les RMS-e, MYC induit une inhibition des voies de différenciation myogénique, il régule de manière positive les processus de transformation oncogénique et joue un rôle dans la résistance aux traitements radiothérapeutiques (68). Récemment, une étude a démontré le rôle de STAUFEN1, une protéine qui se lie aux ARNs, dans la régulation traductionnelle de MYC qui est augmentée dans les RMS embryonnaires (68).

1.4.2.3.3 Rôle de MYC dans les cellules mésenchymateuses, les ostéoblastes et les ostéoclastes

À l'inverse de la majorité des lignées cellulaires, MYC régule positivement les processus de différenciation des cellules mésenchymateuses en ostéoblastes et en ostéoclastes (69, 70). Le processus de différenciation ostéoclastique dépend de l'induction de l'expression de MYC par la liaison du ligand du récepteur activateur du facteur nucléaire κ B nommé RANKL (69). Également, la différenciation ostéoblastique induite par une augmentation de la concentration de vitamine D, implique la régulation positive de MYC dans l'ostéogénèse (70).

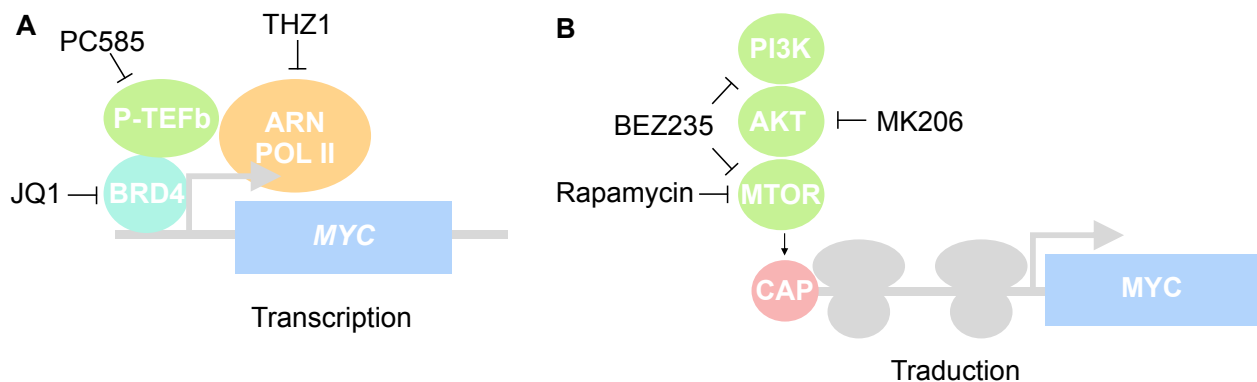
1.4.2.3.4 Dérégulation de MYC dans les OS

La dérégulation de MYC dans les OS est impliquée dans le développement de cette maladie, le développement de métastases et la résistance aux thérapies (71). L'expression de MYC dans les OS est associée avec un plus mauvais pronostic de survie et un taux de rechute plus élevé (71). Dans les OS, l'expression de MYC est augmentée via différentes voies de signalisation telles que la voie de la nucléoside diphosphate kinase B ou certains micro-ARNs (72, 73). Le micro-ARN 14q32 est un régulateur négatif de la transcription de MYC et ce micro-ARN est inhibé dans certains OS ce qui permet une augmentation de l'expression et de l'activité de MYC (72).

1.4.2.4. Les thérapies anti-MYC

Considérant l'implication clef de la famille protéique MYC dans les processus de la carcinogénèse, MYC et ses variants représentent des cibles de choix pour le développement de stratégies anticancéreuses. Cependant, ces protéines sont dites « *undruggable* » en anglais, c'est à dire qu'elles ne peuvent pas être ciblées pharmacologiquement de manière directe dû à l'absence de site catalytique dans leurs structures (74). Différentes stratégies thérapeutiques indirectes ont donc été développées pour stopper les signaux pro-oncogéniques régulés par MYC et elles sont récapitulés dans la Figure 11 (41, 75, 76). Tout d'abord, des inhibiteurs transcriptionnels de MYC ont été développés tels que les inhibiteurs des bromodomains (JQ1 par exemple) et les inhibiteurs de la kinase cycline-dépendante (CDK) 7 (THZ1 par exemple) et de CDK9 (PC85 par exemple). JQ1 inhibe la liaison entre les bromodomains et les groupement acétyles ce qui conduit à réduire le recrutement du facteur de transcription P-TEFb qui phosphoryle l'ARN polymérase II située notamment au niveau du promoteur de MYC (41, 76). THZ1 inhibe CDK7, une sous-unité catalytique de l'ARN polymérase II et PC85 inhibe

CDK9, une sous-unité catalytique de P-TEFb (41). Également, l'inhibition traductionnelle de MYC est possible par l'utilisation de certains composés dont la rapamycine, BEZ35 et MK206. Ces trois inhibiteurs ciblent la voie de signalisation PI3K/AKT/MTOR impliquée dans la formation de la coiffe (complexe CAP) au niveau de l'ARN messager MYC (41). De plus, il existe des inhibiteurs post-traductionnels de MYC dont des inhibiteurs d'enzymes responsables de la désubiquitination de MYC (P22077 par exemple) et des inhibiteurs de protéines qui forment des complexes avec MYC-N pour empêcher sa dégradation (MLN8237 par exemple) ou pour augmenter sa transcription (BI6727 et BI2536 par exemple) (41). L'inhibition de MYC peut également être réalisée en empêchant l'hétérodimérisation de MYC avec MAX en utilisant le dominant négatif 10058-F4 Omomyc ou l'inhibiteur du domaine bHLH-ZIP de MYC le 10074-G5 (41, 75). Finalement, une des stratégies inhibitrices de MYC consiste à créer des interactions synthétiques létales dans les cancers surexprimant MYC (41). Le concept d'interactions synthétiques létales a été établie à partir du concept de létalité synthétiques entre deux gènes (77). Deux gènes sont définis comme létaux synthétiques si la mutation de l'un des deux gènes est compatible avec la viabilité cellulaire mais que les mutations des deux gènes entraînent la mort cellulaire (41). Dans les cancers surexprimants MYC, les cellules cancéreuses sont plus sensibles aux signaux apoptotiques par exemple (41). De ce fait, l'utilisation d'inhibiteurs du CDK1 (Purvalanol A), de la kinase *checkpoint* 1 CHK1 (LY2606368) et de la glutaminase (CB839) induisent des interactions synthétiques létales dans ces cancers (41).



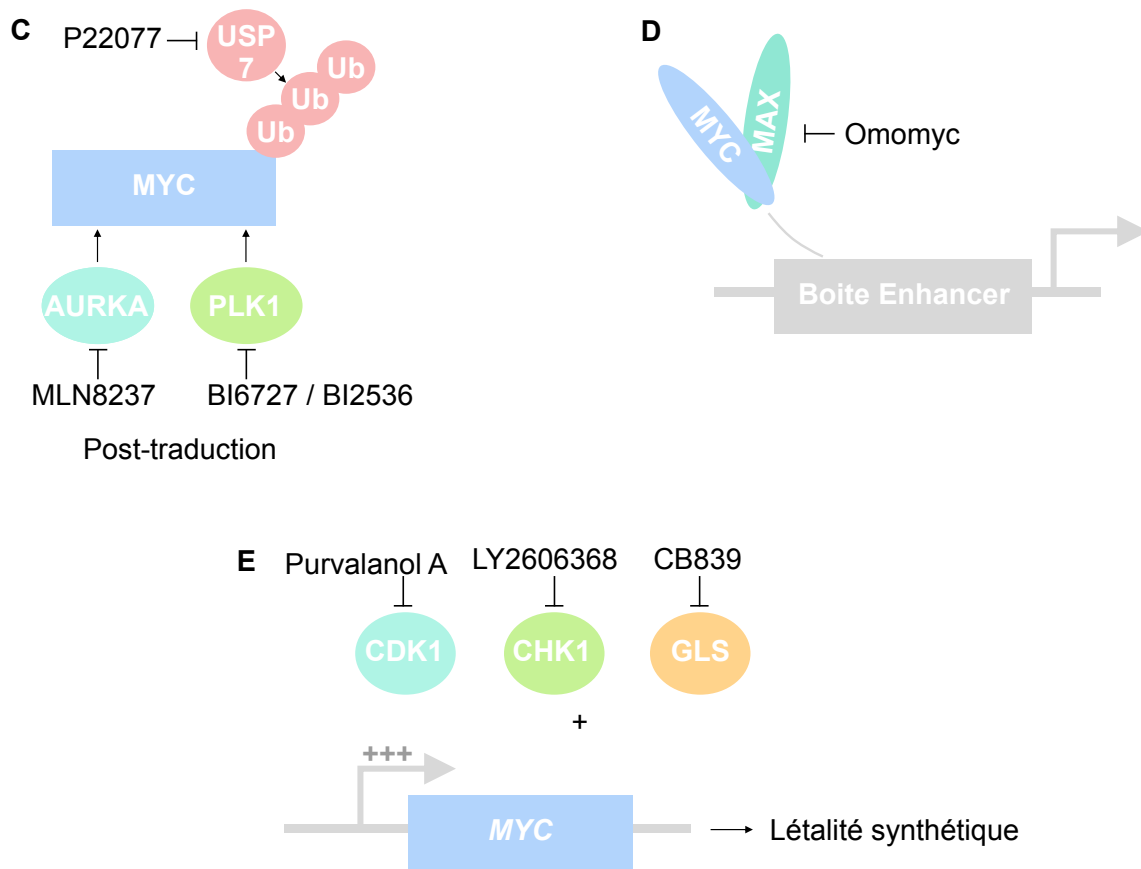


Figure 11: Schéma représentant les différentes classes d'inhibiteurs pharmacologiques de MYC et leurs cibles. **(A)** Inhibiteurs de la transcription de MYC: JQ1 inhibe la liaison de BRD4, THZ1 inhibe le recrutement de P-TFEB et PC585 inhibe l'activation de l'ARN polymérase II (ARN POL II). **(B)** Inhibiteurs de la traduction de MYC qui empêchent la formation du complexe CAP: BEZ235 inhibe les activités catalytiques de PI3K et MTOR, la rapamycine inhibe MTOR et MK206 inhibe l'activité catalytique d'AKT. **(C)** Inhibiteurs post-traductionnels de MYC: P22077 inhibe l'ubiquitinase USP7, MLN8237 inhibe la kinase aurora (AURKA) et BI6727 / BI2536 inhibe la sérine / thréonine kinase 1 (PLK1). **(D)** Inhibiteur de liaison de MYC sur les régions amplificatrices de l'ADN: Omomyc. **(E)** Les inhibiteurs créent une létalité synthétique lorsque MYC est surexprimé: le Purvalanol A qui inhibe CDK1, LY2606368 qui inhibe CHK1 et CB839 qui inhibe la glutaminase (GLS).

Plusieurs de ces stratégies prometteuses sont en essais cliniques pour le traitement de différents cancers incluant les leucémies (NCT02158858) et les sarcomes pédiatriques (NCT03936465). Toutefois, plusieurs de ces stratégies anti-MYC démontrent des résistances dans le traitement des cancers selon différents mécanismes de reprogrammation du kinome des cellules cancéreuses (78, 79). Par exemple, le traitement de cellules leucémiques

myéloïdes aiguës avec des inhibiteurs de bromodomaines résulte à la création d'une population de cellules souches résistantes. Cette résistance est en partie due à une augmentation de l'activité de la voie cellulaire Wnt/ β -catenin se traduisant par la transcription de gènes clefs impliqués dans la survie et la prolifération cellulaire dont MYC (78, 80). Également, plusieurs études ont démontré qu'une inhibition de MYC transitoire dans les tissus sains n'engendre pas d'effet significatif sur l'homéostasie des tissus (81-83). Néanmoins, il est essentiel de designer des thérapies spécifiques aux cellules cancéreuses afin de prévenir les toxicités possibles d'une inhibition prolongée de MYC dans les cellules saines.

2. L'épigénétique

2.1. Généralités

2.1.1. Définition

Le terme épigénétique a été introduit par Conrad Waddington dans les années 1940. Il décrivait alors l'épigénétique comme « l'étude des interactions causales entre les gènes et le produit des gènes qui induisent un phénotype particulier » (84). La notion d'épigénétique a évolué au cours des dernières décennies grâce à l'identification plus précise des mécanismes moléculaires régulant l'épigénome appelés modifications épigénétiques. Globalement, les modifications épigénétiques sont définies par l'ensemble des modifications chimiques de la chromatine et des transcrits de l'ADN qui influencent l'expression et l'activité des gènes sans modifier la séquence nucléotidique de l'ADN (85, 86). Les modifications épigénétiques peuvent être transmises lors des divisions cellulaires mais à l'inverse des mutations qui affectent la séquence nucléotidique de l'ADN, les modifications épigénétiques sont réversibles (85, 86). Elles sont essentielles pour le développement normal d'un organisme adulte et l'établissement des différentes lignées cellulaires le composant. Également, l'épigénome peut être influencé par des stimuli exogènes tels que l'environnement par exemple, et de ce fait, peut contribuer ou être responsable de l'établissement de phénotypes pathologiques (87).

2.1.2. L'enroulement de l'ADN: la chromatine

Chaque brin de l'ADN s'enroule autour de protéines nommées histones afin d'être compacté pour contenir dans le noyau cellulaire (88). Les histones forment une famille de protéines basiques, chargées positivement, ce qui leur permet d'interagir avec l'ADN qui est chargé négativement. Les histones impliquées dans la compaction de l'ADN sont composées de 4 membres appelées histones de base: l'histone 2A (H2A), l'histone 2B (H2B), l'histone 3 (H3) et l'histone 4 (H4) (89). Chacune des histones de bases contient un domaine composé de trois hélices α connectées par deux boucles, qui permet aux histones de bases d'interagir entre-elles (90). Les histones de bases contiennent également une queue N-terminale sur laquelle il y a de nombreuses modifications post-traductionnelles (décrites dans la partie 2.2.3.) (91).

La compaction de l'ADN autour des histones forme des unités que l'on appelle nucléosome. Un nucléosome est composé de 147 paires de bases de l'ADN compactées autour

d'un octamère d'histones, lui-même constitué de deux dimères: un dimère de H3 et de H4 et un dimère de H2A et de H2B (92). Tout d'abord, les histones 3 et 4 forment un tétramère via la liaison des deux histones H3 entre-elles, puis les deux dimères de H2A et H2B interagissent avec le tétramère H3 et H4 par l'association de H2B avec H4 (93). Les queues des histones jouent un rôle important dans la stabilité du nucléosome et facilitent son assemblage et son désassemblage (94). De plus, les différents nucléosomes sur lesquels l'ADN se compacte sont reliés entre-eux par de l'ADN de liaison, constitué de 20 à 30 paires de bases auxquelles s'ajoute l'histone 1 (H1). L'ensemble des nucléosomes et de l'ADN de liaison forme ce que l'on appelle la chromatine (95).

Il existe deux configurations possibles de la chromatine qui est déterminée en fonction de son niveau de condensation (95). La première est l'euchromatine, qui correspond à une chromatine partiellement décondensée et la deuxième est l'hétérochromatine, qui correspond à une chromatine condensée (95). De plus, il existe deux types d'hétérochromatine: l'hétérochromatine constitutive et l'hétérochromatine facultative. L'hétérochromatine constitutive se forme au niveau des régions ne contenant pas de gènes, principalement au niveau des péri-centromères et des télomères, afin d'assurer l'état inerte de la chromatine de ses régions (96). L'hétérochromatine facultative se forme au niveau de régions contenant des gènes impliqués dans le développement et dont l'inactivation est essentielle (96, 97). Dans des contextes particuliers (certains stades du développement), l'hétérochromatine facultative peut se décondenser et permettre la transcription de certains gènes (97).

L'état de condensation de la chromatine détermine le statut d'expression des gènes. Une chromatine partiellement décondensée permet la liaison de l'ARN polymérase et des facteurs nécessaires pour la transcription et sera donc favorable à l'expression des gènes. À l'inverse, une chromatine condensée ne permettra pas la liaison de cette machinerie transcriptionnelle et ne sera donc pas favorable à l'expression des gènes. En résumé, l'euchromatine est associée à un état actif de la transcription et l'hétérochromatine est associée à un état de répression transcriptionnelle (95, 98, 99).

2.2. Les mécanismes épigénétiques

2.2.1. Généralités

Les mécanismes épigénétiques sont divisés en 4 catégories (100):

- La méthylation des cytosines précédant les guanines (CpG) de l'ADN;
- Les modifications post-traductionnelles sur les acides aminés des histones;
- Le positionnement des nucléosomes et la condensation de la chromatine;
- Les ARNs non-codants.

L'ensemble de ces mécanismes épigénétiques est régulé et interprété par différentes enzymes épigénétiques qui permettent de réguler la transcription des gènes et leurs activités (101). Les enzymes épigénétiques sont divisées en 3 catégories:

- Les *Writers*, qui ajoutent les modifications épigénétiques;
- Les *Erasers*, qui enlèvent les modifications épigénétiques;
- Les *Readers*, qui interprètent les modifications épigénétiques.

La transcription et l'activité des gènes dépendent du fonctionnement de ces enzymes épigénétiques. L'altération de l'expression ou de l'activité de ces enzymes peut être responsable de l'établissement de différentes pathologies.

2.2.2. La méthylation de l'ADN

2.2.2.1. La méthylation des cytosines de l'ADN

La méthylation de l'ADN se produit par l'ajout d'un groupement méthyle sur le cinquième carbone des cytosines de l'ADN et résulte par l'obtention de 5-méthylcytosine (5-mC) (102). Le transfert du groupement méthyle qui permet la formation de 5-mC est obtenu par la conversion du S-adénosylméthionine (SAM) en S-adénosylhomocystéine (SAH) par les enzymes nommées ADN méthyltransférases (Figure 12).

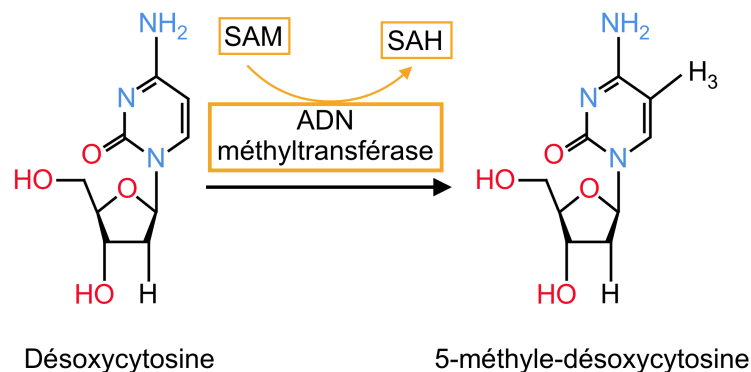


Figure 12: Schéma représentant la formation de 5-mC effectuée via les ADN méthyltransférases.

2.2.2.2. Les ADN méthyltransférases

Chez l'humain, il existe 2 types d'ADN méthyltransférases qui partagent des structures similaires mais des fonctions et des profils d'expression différents. Le premier type est composé par l'ADN méthyltransférase 1 (DNMT1) qui se localise au niveau des fourches de réplication afin d'assurer la méthylation des nouveaux brins de l'ADN synthétisés lors de la division cellulaire. La DNMT1 se lie de manière préférentielle sur les cytosines non méthylées au niveau des sites CpGs hémiméthylés, ce qui lui permet de recopier le profil de méthylation de l'ADN présent avant la réplication: on parle de la DNMT1 comme une ADN méthyltransférase de maintenance car elle permet de conserver les motifs de méthylation de l'ADN au cours des divisions cellulaires (103). Le deuxième type est composé par la famille des ADN méthyltransférases 3 (DNMT3). Trois ADN méthyltransférases forment cette famille: la DNMT3A, la DNMT3B et la DNMT3L. La DNMT3L ne possède pas d'activité catalytique tandis que les DNMT3A et DNMT3B sont capables de méthyler les cytosines présentes dans les sites CpGs non méthylés. Contrairement à la DNMT1, les DNMT3A et DNMT3B ne se lient pas de manière préférentielle sur l'ADN hémiméthylé (104). De ce fait, elles sont définies comme des ADN méthyltransférases dites *de novo*. Elles sont essentielles pour le développement embryonnaire à des stades précoces et la perte de l'une des deux enzymes est létale (105).

2.2.2.3. Les enzymes responsables de la déméthylation de l'ADN

La déméthylation des 5-mC de l'ADN est réalisée par le biais de plusieurs processus biochimiques qui comprennent l'oxydation en série des 5-mC et l'implication des mécanismes de réparation de l'ADN. Les enzymes responsables de ces processus biochimiques sont la famille des *Ten-Eleven Translocation* (TET) et les enzymes impliquées dans un mécanisme de réparation de l'ADN. La famille des TET est composée de trois enzymes nommées TET1, TET2 et TET3. Elles catalysent les réactions d'oxydation en série sur les 5-mC afin de déméthylater l'ADN. TET1 est responsable d'oxyder le 5-mC pour former le 5-hydroxyméthylcytosine (5-hmC), TET2 est responsable d'oxyder le 5-hmC pour former le 5-formylcytosine (5-fC) et TET3 est responsable d'oxyder le 5-fC pour former le 5-carboxylcytosine (5-caC) (Figure 13). De plus, le mécanisme de réparation de l'ADN impliqué dans la déméthylation des 5-mC est la réparation par excision de bases (REB) effectuée par les thymine ADN glycosylases (TDGs). Les TDGs excisent le 5-fC ou le 5-caC afin de générer un site abasique qui sera utilisée par la REB pour générer une cytosine non modifiée (Figure 14) (106, 107).

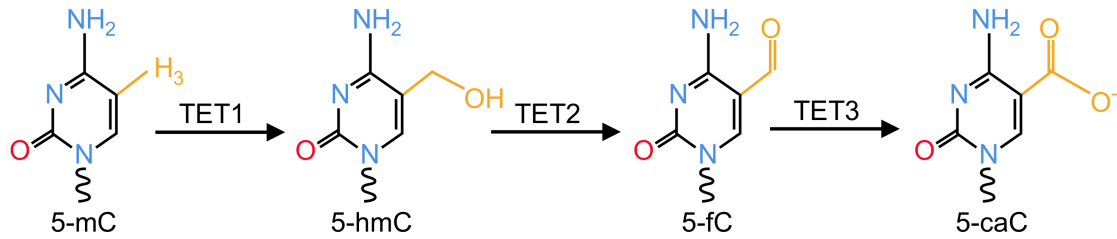


Figure 13: Schéma représentant les réactions d'oxydation en série catalysées par les enzymes TET.

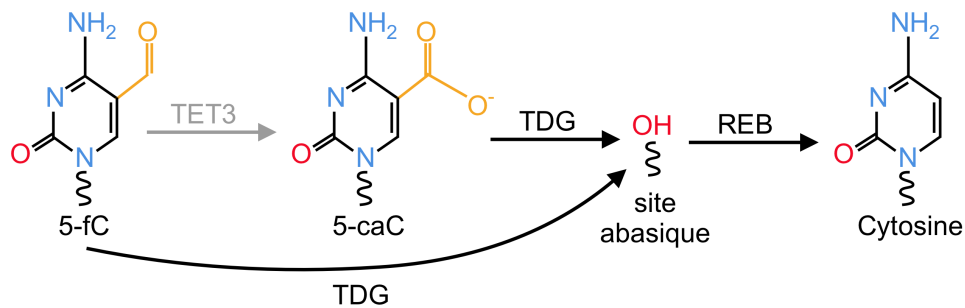


Figure 14: Schéma représentant l'action des TDGs dans le processus de déméthylation des 5-mC.

2.2.2.4. Influence du métabolisme

Le SAM est le principal donneur du groupement méthyle pour la méthylation des CpGs et il provient d'un processus cellulaire cyclique nommé le métabolisme de la méthionine. La présence des différents acteurs de ce cycle est largement régulée par la diète et de ce fait, le métabolisme peut influencer la méthylation de l'ADN (108). Les substrats du cycle du carbone provenant de la diète sont: le folate, la vitamine B6, la vitamine B2, la vitamine B12, la choline, la bétaine et la méthionine (Figure 15).

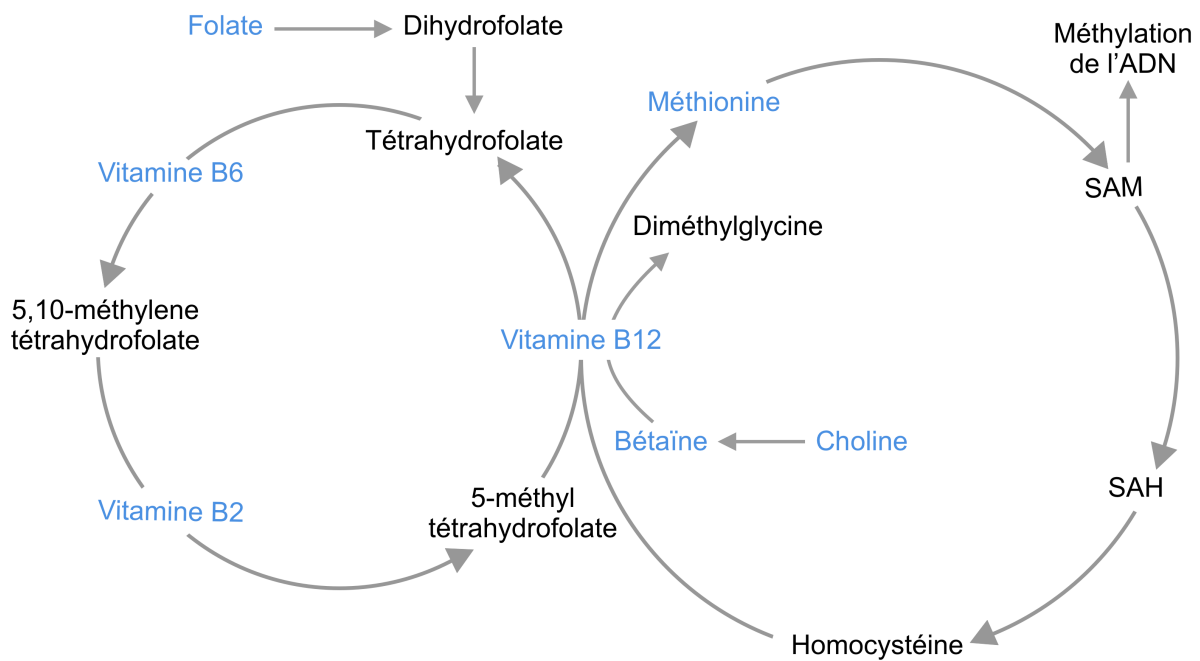


Figure 15: Schéma représentant le métabolisme de la méthionine impliquée dans la formation du SAM. Les substrats du cycle du carbone provenant de la diète sont écrits en bleu.

2.2.2.5. Rôle de la méthylation de l'ADN

La méthylation de l'ADN joue un rôle fondamental dans la régulation de l'expression des gènes. Un état méthylé ou hyperméthylé de l'ADN est associé à une inhibition de l'expression des gènes tandis qu'un état hypométhylé de l'ADN est associé à une transcription active (Figure 16).

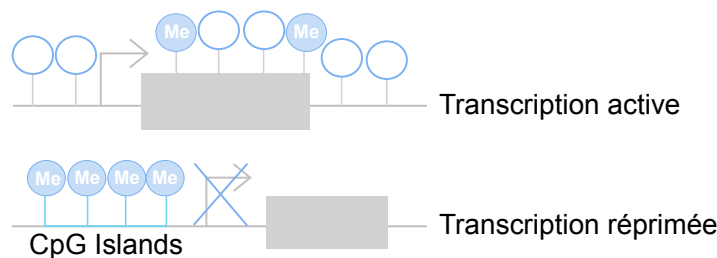


Figure 16: Schéma représentant l'influence de la méthylation de l'ADN sur la transcription des gènes.

La méthylation de l'ADN est donc impliquée dans la régulation de nombreux processus biologiques. Par exemple, elle permet l'inhibition des séquences répétées de l'ADN, l'inhibition de l'activation des rétrotransposons et la stabilité génique pendant la mitose (109). De plus, la méthylation de l'ADN est largement impliquée dans le développement embryonnaire, l'*imprinting* parental, l'inhibition des gènes spécifiques aux cellules germinales dans les cellules embryonnaires et l'inhibition de gènes non spécifiques aux cellules différenciées dans un tissu spécifique (109).

2.2.3. Les modifications post-traductionnelles des histones

2.2.3.1 Généralités

Les modifications post-traductionnelles (MPTs) des histones sont définies par des modifications chimiques des histones elles-mêmes, réalisées sur les acides aminés présents dans leurs queues N-terminales (91). Il existe un grand nombre de MPTs des histones et les plus étudiées sont l'acétylation et la méthylation. Ces MPTs influencent de manière directe la liaison de la chromatine et de l'ADN et régulent l'accessibilité de l'ADN pour la transcription des gènes. La présence des MPTs sur les histones est contrôlée par des enzymes épigénétiques (91).

2.2.3.2 L'acétylation des histones

2.2.3.2.1 L'acylation

La réaction d'acylation se définit par l'addition d'un groupe acyle provenant d'un acyl-Coenzyme A catalysée par une acyltransférase (110). Il existe différents types d'acylation qui se définissent en fonction de la longueur et de la structure du groupe acyle ajouté ainsi que du type d'acide aminé recevant la modification (110). L'acylation la plus connue sur les histones est l'acétylation. Toutefois, les protéines peuvent également subir d'autres types d'acylation tels que par exemple des myristoylations, des crotonylations, des butyrylations et des succinylations (110).

Récemment, plusieurs études scientifiques ont démontré l'influence du métabolisme sur les niveaux des différentes acylations mesurées dans les histones (111-113). Le métabolisme est responsable des niveaux de concentrations intracellulaires des différents groupes acyles disponibles pour les réactions d'acylation (111, 113). Par exemple, l'acétylation des histones a été démontrée pour être en compétition directe avec la crotonylation des

histones (111). Ces deux réactions peuvent être catalysées par les mêmes acyltransférases et se sont les niveaux intracellulaires des différents groupes acyles qui déterminent le type d'acylation subit par les histones (111, 114). De plus, des études ont démontré que ces deux modifications agissent sur la transcription des gènes (111, 114). Dans cette thèse, nous avons uniquement étudié l'altération des acylations de type acétylation dans les cancers que nous allons décrire plus précisément dans la suite de ce chapitre.

2.2.3.2.2 Généralités sur l'acétylation des histones

L'acétylation des histones se décrit par le transfert d'un groupe acétyle provenant d'un acétyl-coenzyme A (acétyl-CoA) vers le groupe aminé ϵ des lysines présentes sur les queues N-terminales des histones (115). L'acétylation des histones est une MPT réversible qui se catalyse par la substitution du groupement acétyle via une réaction d'hydrolyse (Figure 17) (115).

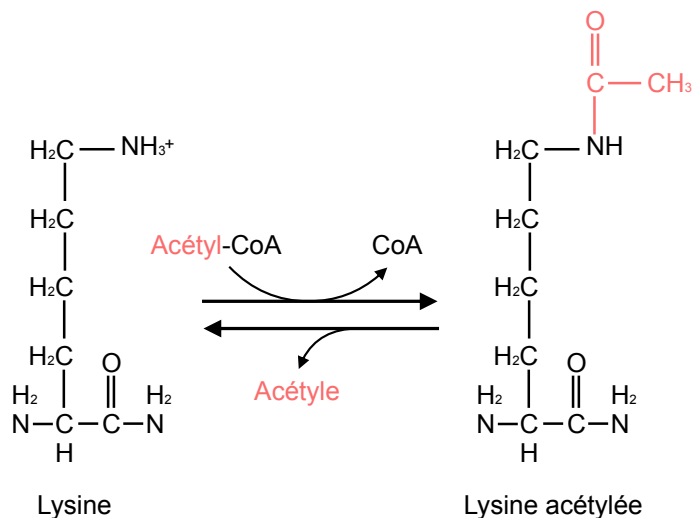


Figure 17: Schéma représentant la formation de lysine acétylée par le transfert d'acétyl-CoA ainsi que la réaction inverse.

L'ajout d'un groupe acétyle sur les lysines des histones permet de neutraliser la charge positive des lysines et, de ce fait, d'affaiblir l'interaction de l'ADN avec les histones (115). La présence d'acétylation sur les lysines des histones est donc associée avec une chromatine décondensée, et donc un état actif de la transcription, tandis qu'une perte d'acétylation sur les lysines des histones est associée avec une forme compactée de la chromatine, et donc un état inactif de la transcription (Figure 18).

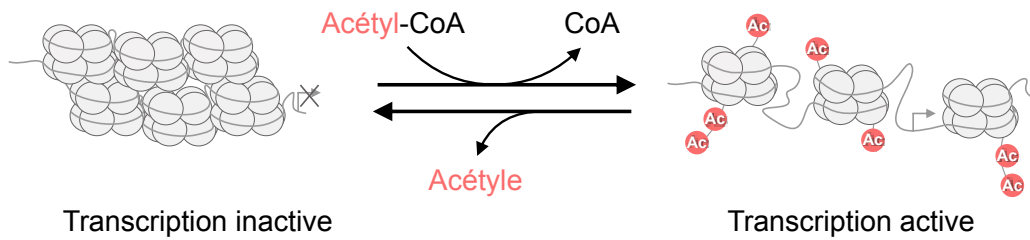


Figure 18: Schéma représentant l'influence de l'acétylation des lysines sur la transcription des gènes.

Également, la présence de lysines acétylées sur les histones est associée avec le recrutement de protéines contenant des bromodomains (BRDs) (116, 117). Lorsque liées aux histones acétylées, ces protéines sont associées avec un contrôle positif de la transcription des gènes (118). Les BRDs diffèrent dans leurs séquences mais leurs liaisons aux lysines acétylées se fait via la création d'une boucle constituant une poche de liaison hydrophobique (116, 117). La présence de BRDs dans certaines protéines permet donc leur liaison au niveau de la chromatine acétylée afin de réguler la transcription des gènes seuls ou en recrutant d'autres partenaires protéiques (Figure 19) (116, 117).

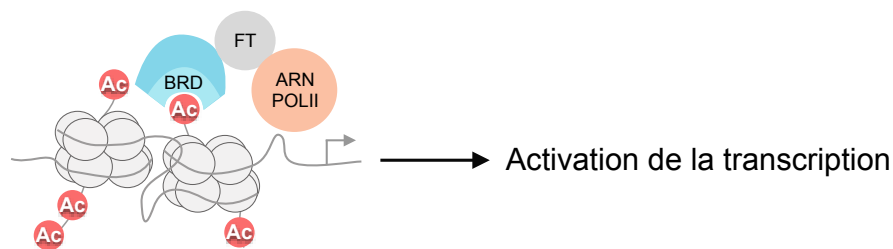


Figure 19: Schéma représentant la liaison des protéines contenant des BRDs (en bleu) sur les histones acétylées. Dans l'exemple représenté ici, la liaison de ces protéines induit le recrutement de facteur de transcription (en gris) et de la machinerie transcriptionnel (en orange) pour activer la transcription des gènes.

Les lysines acétylées peuvent également être reconnues par des protéines contenant le domaine YEATS (119, 120). Chez l'humain, il existe 4 protéines contenant le domaine YEATS capables de se lier à des résidus d'histones acétylés différents selon les protéines (119, 120). Également, certaines de ces protéines sont associées avec des modulateurs de la chromatine et permettent de réguler les gènes avoisinants aux sites fixés (119-121).

De plus, les lysines des histones peuvent subir d'autres MPTs que l'acétylation tel que par exemple la méthylation (91). La présence d'acétylation au niveau des résidus lysine des

histones exerce une compétition avec les autres MPTs possibles à ses résidus (122). Particulièrement, la balance entre l'acétylation et la méthylation de certaines lysines des histones est cruciale pour l'établissement de structures spécifiques de la chromatine (122).

2.2.3.2.3 Les lysines acétyltransférases

Les lysines acétyltransférases (KATs) sont les enzymes qui catalysent l'ajout du groupement acétyle sur les résidus de lysines. Les KATs sont caractérisées par une structure tertiaire similaire au niveau du noyau central qui est importante pour leurs liaisons aux substrats et l'exécution de la catalyse. Les régions avoisinantes du noyau central ont des structures différentes qui vont déterminer la spécificité de chaque enzyme pour leurs différents substrats. Également, les KATs sont majoritairement localisées au sein de complexes protéiques et leurs interactions avec différents partenaires vont influencer leur sélectivité pour un substrat donné. Globalement, l'activité et la spécificité des KATs pour leurs substrats dépendent principalement des partenaires protéiques avec lesquels elles interagissent.

Les KATs sont divisées en deux groupes qui dépendent de leur localisation cellulaire: les KATs de type A sont principalement nucléaires tandis que les KATs de type B sont cytoplasmiques. Les KATs de type A sont responsables de l'acétylation des histones et des protéines non-histones tandis que les KATs de type B sont cruciales pour l'acétylation des histones nouvellement synthétisées dans le cytoplasme et leur transport au niveau du noyau (123).

Les KATs de type A sont composées de 3 familles majeures déterminées selon leurs homologies structurales:

1. La famille GNAT (N-acétyltransférases reliées à GCN5): composée de KAT2A (GCN5), KAT2B (PCAF), KAT9 (ELP3), KAT10 (HPA3) et NUT1 (124). Les enzymes de cette famille sont composées d'une séquence conservée qui permet la reconnaissance et la liaison à l'acétyl-CoA ainsi que la présence de bromodomaines et de chromodomaines qui permettent respectivement la liaison au niveau des lysines acétylées ou méthylées (125). Toutefois, les N et C-terminal de ces enzymes diffèrent ce qui leur permet d'avoir des substrats différents (126). De plus, les différentes enzymes de cette famille ont la capacité d'interagir avec d'autres partenaires protéiques qui vont moduler leurs actions ainsi que la spécificité de leurs substrats. Les principaux processus biologiques dans lesquels les GNATs sont impliqués sont l'activation de la transcription, la progression du cycle cellulaire et la réparation des dommages à l'ADN (127).

2. La famille P300/CBP: composée de KAT3B (P300) et KAT3A (CBP ou CREB *binding protein*). Les deux enzymes composant cette famille ont une similarité structurale de 63% et contiennent un domaine PHD, qui permet leur liaison sur l'ADN, un bromodomaine et un domaine de liaison à l'acétyl-CoA (128). Leurs interactomes comprennent à ce jour plus de 400 partenaires protéiques dont certains interagissent directement avec l'ADN pour recruter KAT3B et KAT3A sur les promoteurs de leurs gènes cibles (129). Ces deux enzymes interagissent avec de nombreux facteurs de transcription et forment des complexes essentiels pour celle-ci. La famille P300/CBP est donc impliquée dans de nombreux processus biologiques tels que la croissance cellulaire, la sénescence, l'apoptose et la réparation des dommages à l'ADN (128).

3. La famille MYST: composée de KAT5 (TIP60), KAT6A (MOZ), KAT6B (MORF), KAT7 (HBO1) et KAT8 (MOF ou MYST1) (124). Cette famille comprend un domaine MYST conservé qui contient un motif à doigt de zinc et le site catalytique avec un motif de liaison à l'acétyl-CoA à l'intérieur (130). Comme pour la famille GNAT, les enzymes composant la famille MYST forment des complexes entre elles ou avec d'autres partenaires protéiques afin d'exercer différentes activités sur des substrats spécifiques. La famille MYST régule de nombreux processus biologiques dont la réponse cellulaire aux dommages à l'ADN, l'apoptose, la stabilité de la chromatine, la régulation du cycle cellulaire, l'auto-renouvellement des cellules souches embryonnaires et la pluripotence (130).

Familles	KAT	Organisme	Substrat sur les histones	Ref
GNAT	KAT2A	Homo Sapiens	H3K9, H3K14, H3K18, H3K23, H3K27, H3K36, H4K8, H4K16	1
	KAT2B	Homo Sapiens	H3K9, H3K14, H3K18, H3K36, H4K8, H4K16, H4K20	2
	KAT9	Homo Sapiens, Saccharomyces cerevisiae, Drosophila Melanogaster	H3	3
	KAT10	Saccharomyces cerevisiae	H3K14, H4K5, H4K12	4
	HPA3	Saccharomyces cerevisiae	H4K8	4
	NUT1	Saccharomyces cerevisiae	H3, H4	5
P300/CBP	KAT3A	Homo Sapiens, Drosophila Melanogaster	H2A, H2B, H3K14, H3K18, H3K23, H3K27, H3K56, H4K5, H4K8, H4K12, H4K16	6, 7

Familles	KAT	Organisme	Substrat sur les histones	Ref
	KAT3B	Homo Sapiens, Drosophila Melanogaster	H2A, H2B, H3K14, H3K18, H3K23, H3K56, H4K5, H4K8, H4K12, H4K16	6
MYST	KAT5	Homo Sapiens, Drosophila Melanogaster	H2AK5, H3K14, H4K5, H4K8, H4K12, H4K16	8
	KAT6A	Homo Sapiens	H3K9, H3K14	9
	KAT6B	Homo Sapiens	H3K9, H3K14	9
	KAT7	Homo Sapiens	H4K5, H4K8, H4K12	10
	KAT8	Homo Sapiens, Drosophila Melanogaster	H4K16	11

Tableau 1: Liste des différents substrats sur les histones des principales KATs de type A. Références du tableau: 1: (131-133); 2: (116, 134, 135); 3: (136); 4: (137); 5: (138); 6: (129, 139, 140), 7: (141), 8: (142), 9: (143, 144), 10: (145), 11: (146)

Il existe d'autres membres moins étudiés de la famille des KAT de type A qui sont soit des composants des complexes des facteurs de transcription (KAT4 et KAT12) ou des co-activateurs des récepteurs nucléaires (KAT13A, KAT13B, KAT13C et KAT13D) (147, 148).

La famille des KATs de type B est composée de deux membres cytoplasmiques. Tout d'abord KAT1 (HAT1) qui est responsable de l'acétylation des H4 nouvellement synthétisés sur les résidus des lysines 5 et 12 et des H2A sur le résidu de lysine 5 (149). Puis HAT4, qui est responsable de l'acétylation des H4 nouvellement synthétisés sur les résidus des lysines 79 et 91 (150).

Il est à noter que les KATs ne sont pas spécifiques aux histones et ont la capacité d'acétyler d'autres protéines dites non-histones (151). La neutralisation des lysines chargées positivement des protéines non-histones induit un changement de conformation de ces protéines et modifie leurs interactions avec leurs différents partenaires protéiques. Également, tout comme pour les histones, le métabolisme régule l'acétylation des protéines non-histones (152). Particulièrement, une des localisations majeures cellulaires des protéines acétylées non-histones sont les mitochondries (153). À travers le processus de cétogenèse et les réactions de β -oxydation et de synthèses des acides gras, les mitochondries peuvent influencer les niveaux d'acétylation des lysines en libérant de grande quantité d'acyl-CoA (152, 154). Également, une acétylation non-enzymatique des lysines est possible et elle se réalise via une réaction directe de l'acétyl-CoA (152, 155). Il existe donc un « bruit métabolique » qui

augmente les niveaux d'acétylation des protéines non-histones et ce, particulièrement dans les mitochondries (152).

2.2.3.2.4 Les lysines désacétylases

Les lysines désacétylases (KDACs) sont les enzymes qui enlèvent le groupement acétyle sur les résidus de lysine des histones et des autres protéines acétylées. Les KDACs sont composées de deux grandes familles. La première famille est formée par les KDACs dépendantes du Zinc qui sont référées comme histones désacétylases ou HDAC. Les HDACs catalysent une réaction d'hydroxylation pour désacétyler leurs substrats (Figure 20). Leur localisation peut être nucléaire et cytoplasmique en fonction de leurs structures et des sous-familles auxquelles elles appartiennent (décrites plus bas) (156).

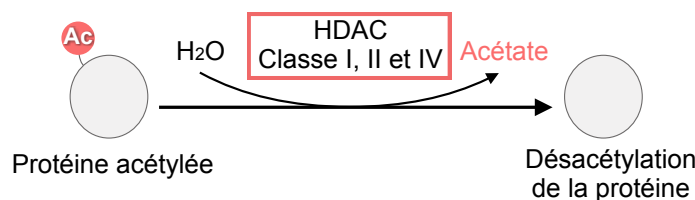


Figure 20: Schéma représentant l'acétylation des protéines catalysées par les HDACs de classe I, II et IV.

La deuxième famille est formée par les KDACs dépendantes du nicotinamide adénine dinucléotide (NAD) appelées sirtuines (157). Les sirtuines catalysent la ribosylation d'un ADP sur une lysine acétylée par la liaison d'un NAD (Figure 21). Comme les HDACs, leur localisation cellulaire dépend de leurs structures et des sous familles auxquelles elles appartiennent. Elles peuvent être nucléaires, cytoplasmiques ou mitochondriales (158).

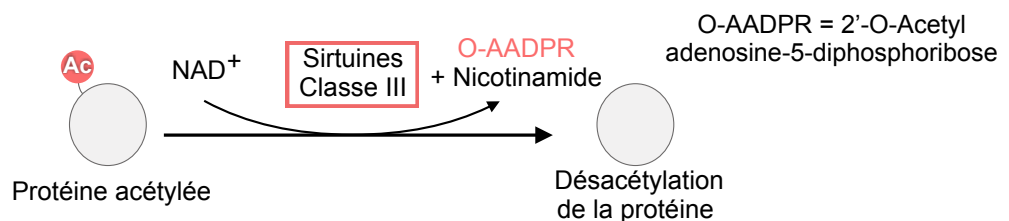


Figure 21: Schéma représentant l'acétylation des protéines catalysées par la famille des sirtuines.

Au total, on dénombre chez l'humain 18 KDACs qui sont divisées en 4 familles (ou classes) selon leurs homologues structurales, fonctionnelles et leur localisation cellulaire (158):

- La classe I, qui comprend les HDACs 1, 2, 3 et 8.
- La classe II est sous-divisée en deux groupes:
 - La classe IIa, qui comprend les HDACs 4, 5, 7 et 9,
 - La classe IIb, qui comprend les HDACs 6 et 10.
- La classe III représente la famille des sirtuines et est divisée en 4 groupes:
 - La classe III (I), qui comprend les sirtuines 1, 2 et 3,
 - La classe III (II), qui comprend la sirtuine 4,
 - La classe III (III), qui comprend la sirtuine 5,
 - La classe III (IV), qui comprend les sirtuines 6 et 7.
- La classe IV, qui comprend la HDAC 11.

2.2.3.3 La méthylation des histones

2.2.3.3.1 Généralités

La méthylation des histones se traduit par l'ajout d'un ou de plusieurs groupements méthyles provenant des donneurs S-adénosyl-méthionine sur les histones (159). Contrairement à l'acétylation des histones, la méthylation peut se produire sur l'ensemble des résidus basiques contenus dans les histones, c'est à dire les lysines, les arginines et les histidines (160). Ces résidus sont méthylés de manière différentielle (160, 161). Dans le cas des lysines, ces résidus peuvent être mono-, di-, ou triméthylés sur leurs groupes aminés ϵ (Figure 19). Quant aux arginines, elles peuvent être monométhylées ou diméthylées de manière symétrique ou asymétrique sur leurs groupes guanidyle (Figure 22). Pour finir, les histidines peuvent être monométhylées sur leurs anneaux imidazole. Toutefois, cette MPT est plus rare et moins étudiée que la méthylation des lysines et des arginines.

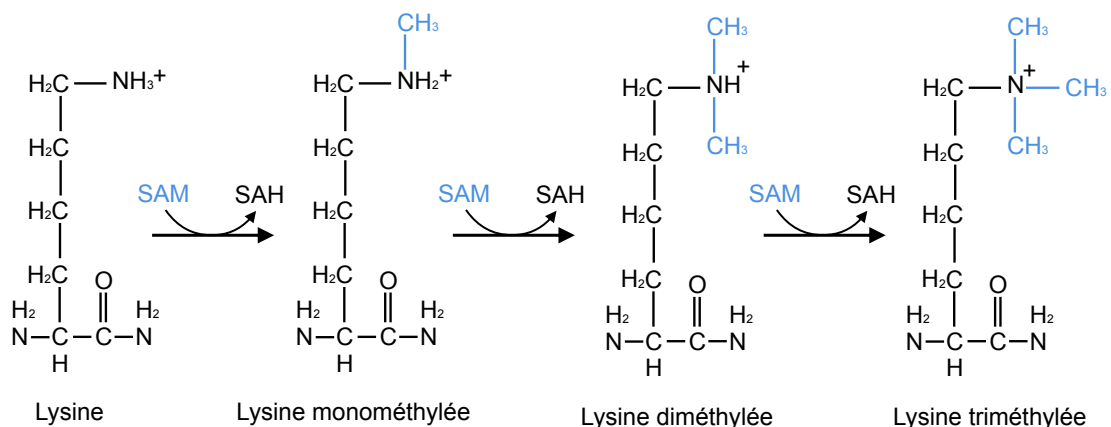


Figure 22: Schéma représentant les structures chimiques d'une lysine sans modification post-traductionnelle et des lysines mono-, di-, et triméthylées.

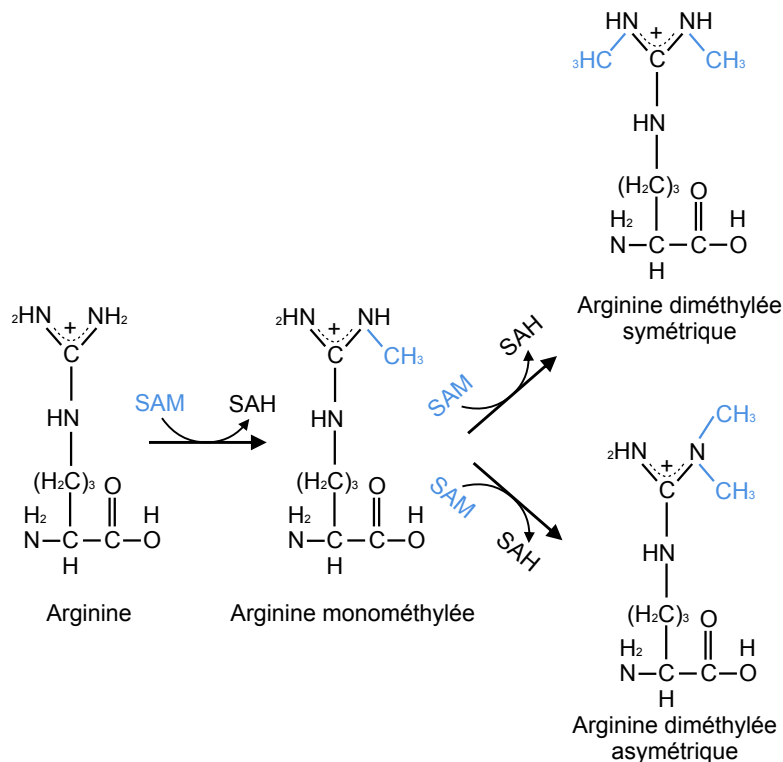


Figure 23: Schéma représentant les structures chimiques d'une arginine sans modification postraductionnelle et des arginines mono-, et diméthylées de manière symétrique et asymétrique.

La méthylation des histones peut induire la condensation de la chromatine ou à l'inverse, son relâchement en fonction des résidus méthylés. Par exemple, la triméthylation de la lysine 4 sur l'histone 3 (H3K4me3) est associée avec une chromatine décondensée, favorable à la transcription, tandis que la triméthylation de la lysine 27 sur l'histone 3 (H3K27me3) est associée avec une chromatine condensée, où la transcription est réprimée (160). De plus, la méthylation et l'acétylation des histones sont deux MPTs qui peuvent affecter les mêmes résidus mais elles sont mutuellement exclusives (162).

2.2.3.3.2 Les protéines méthyltransférases

Les protéines méthyltransférases (PMTs) sont les enzymes responsables de catalyser l'ajout des groupements méthyles sur les histones ainsi que sur les protéines non histones. Il existe différentes catégories de PMTs qui se distinguent en fonction de leurs activités catalytiques et des résidus qu'elles modifient.

La méthylation des lysines sur les histones est effectuée par les histones lysines méthyltransférases (HMTs) qui catalyse l'ajout d'un à trois groupements méthyle sur les lysines. Les HMTs sont divisées en deux familles (163). La première est constituée par la famille des protéines aux domaines SET, composée d'une séquence protéique conservée contenant un suppresseur de variegation, le régulateur de la chromatine *Enhancer of zeste* appartenant au groupe polycomb et le régulateur de la chromatine trithorax (163). Les protéines aux domaines SET sont responsables de la méthylation de l'ensemble des lysines des histones à l'exception de la lysine 79 de l'histone 3 (163). Elles ont également la capacité d'ajouter des groupements méthyle sur des protéines non-histones. Les protéines aux domaines SET sont elles-mêmes divisées en 7 familles en fonction des séquences aminées trouvées aux alentours du domaine SET: SUV39, SET1, SET2, RIZ, SMYD, EZ, SUV4-20 (163). La deuxième famille de HMTs est composée par la famille des seven- β -strand (7BS), composée chez l'humain de 9 enzymes principalement responsables de la méthylation de protéines non-histones à l'exception de *DOT1-like* (DOT1L) qui méthyle la lysine 79 de l'histone 3 (164).

La méthylation des arginines est catalysée par une famille de protéines nommées les arginines méthyltransférases (PRMTs). Les PRMTs sont composées de 9 membres divisés en 3 sous-familles en fonction de leurs activités enzymatiques (165). Tout d'abord, les PRMTs de type I qui sont composées de PRMT1, PRMT2, PRMT3, PRMT4, PRMT6, et PRMT8. Elles sont responsables de la formation d'arginine diméthylée asymétrique (165). Puis les PRMTs de type II qui sont composées de PRMT5 et PRMT9. Elles sont responsables de la formation d'arginine diméthylée symétrique (165). Pour finir la PRMT de type III qui est composée de PRMT7. Elle est responsable de la monométhylation des arginines sur les histones (165).

2.2.3.3. Les histones déméthylases

Les histones déméthylases sont les enzymes responsables d'enlever le groupement méthyle sur les différents résidus basiques des histones. Elles sont divisées en deux grandes familles. La première est l'amine oxydase LSD1 ou KDM1 (166). Elle appartient à une classe d'enzymes dépendantes du FAD (les monoamine oxydase dépendent du FAD) et elle catalyse l'oxydation des groupes amine des lysines méthylées sur les histones (166). La réaction

d'oxydation est suivie d'une hydrolyse afin d'obtenir une déméthylation complète des lysines (166). Cette enzyme induit la déméthylation des lysines mono- et diméthylée des histones (Figure 24) (166).

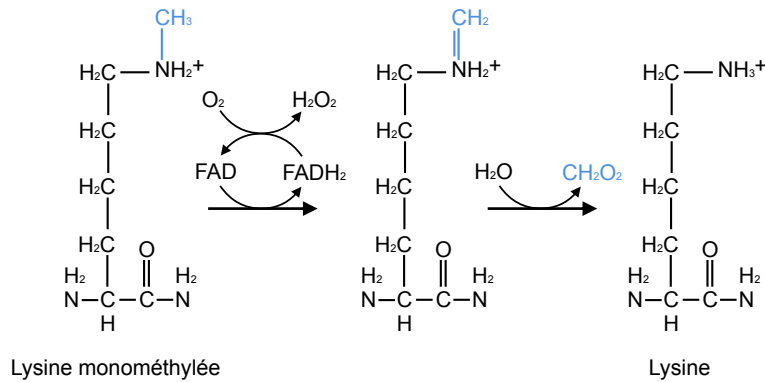


Figure 24: Schéma représentant la déméthylation d'une lysine monométhylée en lysine non-méthylée par l'amine oxydase LSD1 suivie d'une réaction d'hydrolyse.

La deuxième famille est celle des Jumonji qui est caractérisée par la présence de leur domaine conservé Jumonji, responsable de la déméthylation des lysines et des arginines (166). Cette famille est composée de 27 protéines dont 15 sont connues pour exercer des activités de déméthylation (166). Ces enzymes catalysent l'hydroxylation sur les résidus méthylés des histones en utilisant l'alpha cétooglutarate (α -KG) et le fer comme co-facteurs (166). Ces enzymes peuvent enlever la mono-, la di- et la triméthylation des histones (Figure 25) (166).

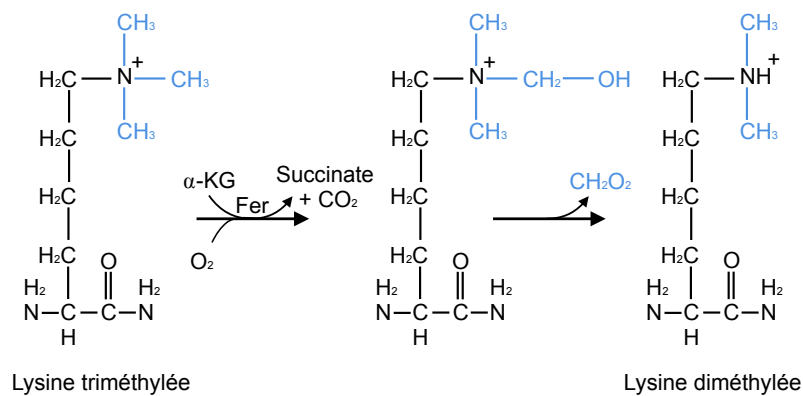


Figure 25: Schéma représentant la déméthylation d'une lysine triméthylée en lysine diméthylée par les enzymes appartenant à la famille Jumonji.

2.3. Les altérations de l'épigénome dans les cancers pédiatriques

2.3.1. Altérations de l'épigénome dans les cancers

2.3.1.1 Généralités

Dans les cancers, l'épigénome des cellules est largement altéré et ces altérations contribuent à l'accumulation des aberrations transcriptomiques et protéomiques impliquées dans la carcinogenèse. Les changements épigénétiques en concert avec les altérations génomiques perturbent les voies de signalisation cellulaire pour acquérir un avantage prolifératif et inhiber la différenciation cellulaire (167). Dans les cancers, la méthylation de l'ADN ainsi que les MPTs des histones sont altérées et dans de nombreux cas, ces deux modifications épigénétiques collaborent pour développer des phénotypes pathologiques (168).

2.3.1.2 La méthylation de l'ADN dans les cancers

Les profils de méthylation de l'ADN sont largement altérés au cours des différents stades de la carcinogenèse et le statut de la méthylation de l'ADN joue un rôle clef dans ce processus. De manière globale, l'ADN des cellules cancéreuses est davantage hypométhylé en comparaison avec les cellules saines (169). Cette hypométhylation induit deux effets: la surexpression de certains oncogènes et l'expression de rétro-transposons ou de micro-ARN normalement réprimés, qui vont alors induire une instabilité génique ainsi que l'expression d'oncogènes (Figure 26) (169):

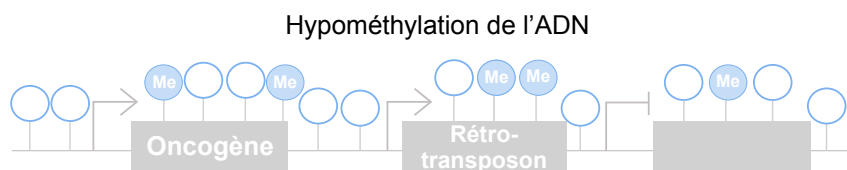


Figure 26: Schéma représentant l'ADN hypométhylé dans les cellules cancéreuses.

Également, les cellules cancéreuses vont acquérir une hyperméthylation dans les régions promotrices contenant les îlots CpGs. La transcription de nombreux gènes suppresseurs de tumeurs est alors inhibée (Figure 27) (170). Dans certains cancers, l'augmentation du niveau de méthylation sur certains îlots CpGs peut se produire à une

fréquence plus élevée et on dit que ces tumeurs ont un profil positif pour « *CpG island methylator phenotype* », ou CIMP (171).

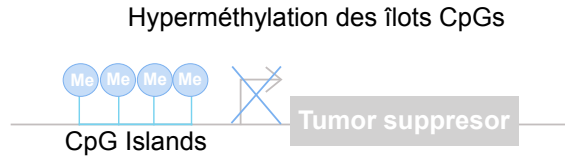


Figure 27: Schéma représentant l'ADN hyperméthylé sur les îlots CpGs des régions promotrices hyperméthylées dans les cancers.

De plus, la méthylation de l'ADN est impliquée dans la création de mutations ponctuelles. Les résidus de 5mC ont la capacité de se désaminer en thymine de manière spontanée et de ce fait, de créer des mutations dans la cas où les changements de cytosine en thymine ne sont pas corrigés par les mécanismes de réparation de l'ADN (Figure 27). Par exemple, les mutations du gène *TP53* dans les cancers au niveau des îlots CpGs se produisent dans 1/3 des cas alors qu'elles se produisent dans les cellules germinales et les cellules somatiques dans la moitié des cas (172). Également, des transversions de guanines en thymines au niveau des îlots CpGs sont facilitées en présence de carcinogènes (Figure 28) (173).

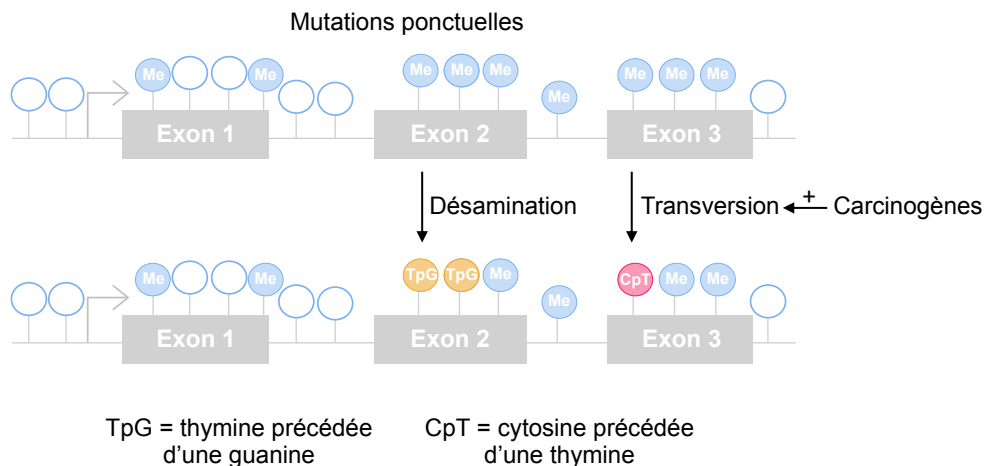


Figure 28: Schéma représentant les mutations ponctuelles de la méthylation de l'ADN mesurées dans les cancers.

Pour finir, des aberrations de la méthylation de l'ADN sont observées avec le vieillissement. L'âge est un facteur de risque de la carcinogenèse et il influence aussi les profils de méthylation. La méthylation globale de l'ADN des cellules somatiques décline lors du vieillissement tandis que la méthylation sur les promoteurs de gènes augmente (174). Cela a pour conséquence de favoriser une instabilité génique et l'inhibition d'expression de gènes suppresseurs de tumeurs.

2.3.1.3 Les MPTs des histones dans les cancers.

L'implication des MPTs des histones dans la régulation transcriptionnelle anormale de gènes impliqués dans la carcinogenèse a été largement décrite. La perte de certaines MPTs des histones telles que les pertes sur H4 de l'acétylation sur la lysine 16 et de la triméthylation sur la lysine 20 est directement associée avec le développement de cancers (175). De plus les enzymes responsables d'interpréter et de réguler ces MPTs vont subir des mutations dans les cancers, entraînant des activités supra-physiologiques de ces dernières.

2.3.1.3.1 L'acétylation des histones dans les cancers

L'acétylation des histones est associée avec une transcription active et elle est localisée au niveau des régions promotrices des gènes ainsi qu'au niveau de régions dites amplificatrices. Les régions amplificatrices sont des régions de l'ADN propices à la transcription des gènes qui, via des MPTs spécifiques des histones (telles que l'acétylation de l'histone 3 sur la lysine 27), avantagent le recrutement de la machinerie transcriptionnelle (176). Dans les cancers, la formation des régions amplificatrices et super-amplificatrices (ou *super-enhancer* en anglais) ont été largement décrites pour être impliquées dans la régulation supra-physiologique d'oncogènes (176). De concert avec l'hyperacétylation, l'hypoacétylation de certains promoteurs contribue à la carcinogenèse en inhibant l'expression de gènes suppresseurs de tumeurs (168).

Également, l'activité des régulateurs épigénétiques de l'acétylation des histones est altérée dans les cancers. Toutefois, il est difficile d'établir si une enzyme épigénétique en particulier détient un rôle de suppresseur de tumeur ou d'oncogène dans les cancers (177). L'homéostasie de l'acétylation des histones et de l'activité de ses régulateurs est essentielle au bon fonctionnement cellulaire. Le contexte cellulaire et oncogénique est donc primordial pour établir le rôle précis des régulateurs enzymatiques de l'acétylation des histones dans les différents cancers (177). Par exemple, les KATs ont des activités enzymatiques redondantes ce

qui permet de compenser la perte d'activité d'une KAT en particulier (178). Pour observer une altération de l'acétylation des histones, il faut assimiler plusieurs changements anormaux des KATs ou des KDACs.

Également, de nombreuses mutations génétiques de KATs ont été mesurées dans différents cancers. Par exemple, les translocations génétiques de KAT3A (*CBP*) avec KMT2A (lysine méthyltransférase 2A ou MLL) ou avec KAT6A (*MOZ*) sont connues pour induire une activité aberrante de KAT3A qui entraîne une hyperacétylation de ses cibles (179). Les KATs peuvent également être recrutées par des protéines de fusion oncogéniques et vont agir comme activateurs transcriptionnels. Par exemple, KAT3A est recrutée par la protéine de fusion AML1-ETO dans les leucémies myéloïdes (180).

De plus, ces enzymes agissent sur des protéines non-histones pour réguler leur stabilité. Par exemple, de nombreuses KATs ont été caractérisées pour augmenter la stabilité du proto-oncogène MYC (181, 182).

Également, les KDACs sont connues pour être dérégulées et cibler de nouvelles protéines impliquées dans la migration et la croissance cellulaire ainsi que dans le développement de métastases (p53 par exemple) (183). Comme les KATs, elles peuvent également être recrutées par des complexes oncogéniques pour agir comme répresseurs transcriptionnels.

L'acétylation des histones est une MPT qui est interprétée par des protéines contenant des bromodomaines dont notamment les *Bromodomain and Extra-Terminal Domains* ou BETs. Dans les cancers, les BETs jouent un rôle majeur dans la formation des régions amplificatrices et super-amplificatrices de la transcription induisant une stimulation des voies de signalisation vers la formation et le développement tumoral (184). Également, le rôle pionnier des BETs dans la transcription de proto-oncogènes tels que MYC a été largement décrit dans différents cancers (185).

2.3.1.3.2 La méthylation des histones dans les cancers

La méthylation des histones joue un rôle différentiel sur la transcription en fonction des résidus méthylés. Selon le contexte oncogénique, le statut de méthylation de certaines histones peut être associé avec des activités pro-oncogéniques ou à l'inverse, avec des activités suppressives de tumeur. Par exemple, la monométhylation de la lysine 4 sur l'histone 3 est une marque associée avec une transcription positive et plus particulièrement avec des régions amplificatrices et supra-amplificatrices mesurées dans certains cancers (176).

Les régulateurs épigénétiques de la méthylation des histones ont été caractérisés pour être anormalement régulés dans les cancers. Particulièrement, de nombreuses

translocations et réarrangements chromosomiques affectent le gène de la KMT2A (MLL) et sont retrouvées dans 70% des leucémies myéloïdes et lymphoïdes pédiatriques (186). Ces translocations induisent une transcription aberrante des gènes cibles de KMT2A dont des gènes critiques pour le développement (186). De plus, le super-complexe protéique MLL contient KDM1 (LSD1), une lysine déméthylase caractérisée pour avoir une activité oncogénique dans de nombreux cancers. En présence des translocations incluant KMT2A dans les leucémies, KDM1 se localise dans les gènes cibles de KMT2A et augmente les voies de signalisation associées à la prolifération et l'invasion cellulaire (187). D'autres exemples d'enzymes épigénétiques régulant la méthylation d'un même résidu et ayant des activités dérégulées dans les cancers sont KMT6A (EZH2) et KDM6A (UTX). Ces enzymes régulent la triméthylation de la lysine 27 sur l'histone 3 et induisent une aberration de la transcription des gènes impliqués dans le développement et la destinée cellulaire (188).

2.3.1.3.3 Les variants d'histones et les oncohistones

Les variants d'histones diffèrent des histones canoniques par le changement d'un faible nombre d'acides aminés dans leurs séquences (189, 190). Ils sont exprimés en très faible quantité en comparaison aux histones canoniques et leur rôle est spécifique à certains tissus (189, 190). Le remplacement d'une histone canonique par un variant d'histone est un processus dynamique qui influe la composition de la chromatine (189, 190). La chromatine peut se différencier aussi bien au niveau des centromères, avec le variant de l'histone 3 CENP-A par exemple, qu'à l'extérieur des centromères, avec un autre variant de l'histone 3 H3.3 par exemple (190). Plus précisément, le rôle de CENP-A est de contribuer à l'identité des centromères des génomes masculins tandis que H3.3 est associée avec une chromatine transcriptionnelle active (191, 192). Également, plusieurs variant de l'histone H2A différencie et régule la chromatine. Par exemple, H2A.X est un variant d'histone dont la forme phosphorylée est caractérisée pour être un des premiers événements impliqués dans le processus de réparation des cassures doubles brins de l'ADN (190). Un autre variant de l'histone H2A largement étudié est H2A.Z. Ce variant est impliqué dans la régulation de l'expression des gènes et il régule de nombreux processus cellulaires dont la progression du cycle cellulaire et la régulation de la transition épithélio-mésenchymateuse (193, 194).

De plus, les variants d'histone sont aussi impliqués dans certaines pathologies dont les cancers. Par exemple, H2A.Z ainsi que ses protéines chaperones du complexe SRCAP (*Snf2 Related CREBBP Activator Protein*) sont surexprimées dans les cancers du poumons, du sein, du côlon, de l'utérus ainsi que dans les mélanomes métastasés (189). Particulièrement, H2A.Z régule différents facteurs de transcription et avantage la prolifération des cellules

cancéreuses (189). Un deuxième exemple est la surexpression de CENP-A dans certains cancers du sein, cancers du poumon et cancer du colon (195-197).

Également, tout comme les histones canoniques, les variants d'histones peuvent être soumis à des MPTs (189). En particulier, des mutations faux sens sur certains résidus de l'histone 3 sont impliquées dans la carcinogenèse et elles sont définies comme des oncohistones (198). Dans certains cancers, la surexpression de différentes oncohistones, de protéines chaperones associées et de modulateurs de la chromatine ont été mesurés (189). Plus récemment, des études ont démontré l'implication des oncohistones dans l'établissement de certains cancers pédiatriques, particulièrement dans les cancers du cerveau et de l'os (198, 199). En particulier, dans 95% des chondrosarcomes, des mutations sur le variant 3 de H3K36 (H3.3K36) sont identifiées. (200). Les mutants de H3.3K36 inhibent les activités méthyltransférases des KMTs qui régulent la méthylation sur H3K36, ce qui conduit à une augmentation du profil de méthylation de H3K27 et à une inhibition de la transcription des gènes impliqués dans la différenciation cellulaire (200, 201). Les mutants de H3K36 inhibent donc les programmes de différenciation cellulaire et génèrent des sarcomes indifférenciés *in vivo* (200, 201). Également, des mutations sur H3K27 ont été caractérisées chez certains patients atteints de LMAs et présentant des altérations du gène *RUNX1* (202). La présence de ces mutants induit une baisse des niveaux de méthylation de H3K27me2 et H3K27me3 chez ces patients (202). De plus, des études *in vivo* démontrent que les oncohistones de H3K27 dans les LMAs collaborent avec les mutations et les translocations impliquant *RUNX1* et accélèrent le développement de la maladie (202).

2.3.2. Altérations de l'épigénome dans les leucémies pédiatriques

De nombreuses altérations de l'épigénome ont été identifiées dans les leucémies pédiatriques, en particulier les leucémies lymphoblastiques aiguës (LLA) et les leucémies myéloïdes aiguës (LMA). Les altérations de l'épigénome dans les leucémies incluent les altérations de la méthylation de l'ADN et les MPTs des histones via des activités anormales des enzymes épigénétiques régulant ces mécanismes.

2.3.2.1 Altérations de la méthylation de l'ADN dans les leucémies pédiatriques

Plusieurs études suggèrent que l'altération de la méthylation de l'ADN serait un évènement primaire à la transformation maligne hématopoïétique. Particulièrement, des mutations hétérozygotes de la DNMT3A sont retrouvées dans 22% des patients adultes

atteints de LMAs et sont caractérisées pour être présentes à des stades précoces de la maladie (203, 204). Toutefois, les mutations de DNMT3A sont rares dans les LMAs pédiatriques avec des taux variant de 0 à 2.1% selon les études (205-207). Les mutants de la DNMT3A jouent un rôle de dominant négatif sur les DNMT3A *wild type* (WT) et DNMT3B, et ils sont responsables d'une baisse de la méthylation de novo (208). De plus, la création de protéines de fusion oncogénique via la translocation de facteurs de transcription dans les LMAs est associée avec une altération de la méthylation au niveau des facteurs de transcription impliqués (209).

Également, l'hydroxyméthylation de l'ADN est altérée dans les LMAs. Des mutations de TET2 ainsi que des isocytates déshydrogénases 1 et 2 (IDH1/2) apparaissent respectivement de manière exclusive dans 20% et 30% des LMAs (210). Les mutations des IDH1/2 se caractérisent par un gain de fonction de ces enzymes et induisent l'accumulation de 2-hydroxyglutarate, un onco-métabolite qui altère la fonction des TETs et des Jumonji (210). Globalement, les mutations de ces enzymes induisent une hyperméthylation de l'ADN (210).

2.3.2.2 Altérations des régulateurs des MPTs des histones dans les leucémies pédiatriques

De nombreux régulateurs épigénétiques impliqués dans les MPTs des histones sont dérégulés dans plusieurs types de leucémies. Tout d'abord, certaines KATs sont impliquées dans des translocations chromosomiques et induisent une dérégulation de gènes impliqués dans le maintien des cellules souches hématopoïétiques tels que KAT6A, KAT3A et KAT3B (210). Également, KAT3A est mutée dans 18% des LLAs pédiatriques en rechute (210, 211).

De plus, l'hématopoïèse est largement régulée par des complexes protéiques impliquant des KMTs tels que le complexe répressif Polycomb 2 (PRC2). PRC2 est composé de 4 membres dont KMT6A, qui est l'enzyme la plus mutée du complexe dans les cancers. Une mutation de KMT6A est retrouvée dans 18% chez les adultes atteints de LLAs de type T (212). De plus, dans une étude réalisée chez des patients pédiatriques atteints de LLAs de type T, 1.3% des patients présentent une perte de fonction de KMT6A (213). Également, deux autres membres du complexe PRC2, SUZ12 et EED, sont fréquemment mutés dans les cellules T initiatrices des LLAs adultes (214). Le complexe PRC2 lui-même peut être régulé par d'autres protéines telles que JARID2, impliquée dans l'inhibition de PRC2 (215). Dans certaines LMAs, JARID2 est inhibée afin d'augmenter l'activité répressive de PRC2 sur la transcription de gènes associés au développement (215). Tel que décrit dans la section 2.3.1.3.2 (la méthylation des histones dans les cancers), KMT2A est dérégulée dans 70% des leucémies diagnostiquées chez les nourrissons (avant l'âge de 1 an) et est impliquée dans de

nombreuses translocation chromosomiques qui sont associées avec un faible pronostic de survie (186).

2.3.3. Altérations de l'épigénome dans les rhabdomyosarcomes pédiatriques

Les rhabdomyosarcomes sont des tumeurs avec un faible nombre de mutations génétiques, suggérant l'importance des altérations épigénétiques dans l'initiation et la progression de ces cancers. Toutefois, peu d'études ont caractérisé des événements épigénétiques précis dans ces cancers.

2.3.3.1 Altérations de la méthylation de l'ADN dans les rhabdomyosarcomes pédiatriques

L'expression de nombreux gènes des muscles squelettiques est inhibée dans les rhabdomyosarcomes via une hyperméthylation de leurs promoteurs (216). Également, des profils spécifiques de méthylation ont été mesurés dans les différents sous-types de rhabdomyosarcomes. Par exemples, les rhabdomyosarcomes à fusion négative ont un profil de méthylation distinct des rhabdomyosarcomes qui détiennent la protéine de fusion PAX:FOXO1 (216). Toutefois, dans une autre étude où les profils de méthylation des rhabdomyosarcomes embryonnaires et alvéolaires sont mesurés, les rhabdomyosarcomes alvéolaires se distinguent en deux groupes qui ne dépendent pas de la présence de fusion (217). Les profils de méthylation des rhabdomyosarcomes embryonnaires se distinguent en deux groupes selon la présence ou non d'une hyperméthylation sur le promoteur du gène PTEN. Ce gène est fréquemment muté dans les cancers et impliqué dans le développement embryonnaire et la régulation du cycle cellulaire (217). De plus, le profil de méthylation des rhabdomyosarcomes à fusion négative dépend également du statut de mutation de l'oncogène RAS (218).

2.3.3.2 Altérations des régulateurs des MPTs des histones dans les rhabdomyosarcomes pédiatriques

Certains régulateurs épigénétiques des MPTs des histones ont été caractérisés pour être surexprimés dans certains types de rhabdomyosarcomes. Par exemple, de nombreuses études ont caractérisé une surexpression de KMT6A (EZH2) dans les rhabdomyosarcomes et plus globalement une augmentation de l'expression des gènes cibles du groupe Polycomb (216, 219). Également, une surexpression de la lysine déméthylase KDM1A (LSD1) a été mesurée

dans des tumeurs primaires de rhabdomyosarcomes et elle joue un rôle clef dans l'induction de la prolifération des cellules cancéreuses (220).

Comme décrit précédemment, les rhabdomyosarcomes sont des tumeurs qui présentent peu de mutations génétiques et la caractérisation des altérations génétiques des régulateurs des MPTs des histones est de ce fait limitée. Toutefois, certaines études ont souligné le rôle des régulateurs épigénétiques des MPTs des histones dans la régulation de voies de signalisation impliquée dans la carcinogenèse ainsi que dans l'activité oncogénique de certains facteurs de transcription. Un membre du PcG Yin Yang-1 (YY1) détient la capacité de recruter différents régulateurs épigénétiques tels que KAT3A, PRMT1, KDAC1 et KDAC2 et agit soit comme activateur ou soit comme inhibiteur de la transcription. Dans les rhabdomyosarcomes embryonnaires, YY1 inhibe le micro-ARN suppresseur de tumeur mir-29 (221). Plus récemment, une étude a démontré la régulation épigénétique de l'axe oncogénique PTEN/AKT/RAC1 par KMT1A (G9a) dans les rhabdomyosarcomes alvéolaires. L'inhibition pharmacologique de KMT1A dans ces cancers induit une inhibition de la prolifération des cellules ainsi qu'une différenciation cellulaire (222).

2.3.4. Altérations de l'épigénome dans les ostéosarcomes pédiatriques

Les ostéosarcomes sont des tumeurs caractérisées par une forte aneuploïdie et une perte de contrôle de la structure des chromosomes. Peu d'aberrations et de lésions génétiques ont été identifiées dans ces cancers, suggérant l'importance des régulations épigénétiques dans la carcinogenèse des ostéosarcomes (223).

2.3.4.1 Altérations de la méthylation de l'ADN dans les ostéosarcomes pédiatriques

Les principaux suppresseurs de tumeurs réprimés dans les ostéosarcomes sont P53 et la protéine du rétinoblastome (Rb) ainsi que les voies cellulaires associées. Ces deux suppresseurs de tumeurs sont dérégulés via des mécanismes génétiques et les membres des voies cellulaires associées sont inhibés via une hyperméthylation de leurs promoteurs (224). D'autres suppresseurs de tumeurs ont été identifiés pour être inhibés via une hyperméthylation de leurs promoteurs dans les ostéosarcomes (RASSF1A, TIMP3, MGMT, DAPK1 et WIF-1). Plus récemment, une étude intégrative de la méthylation de l'ADN dans des échantillons de patients atteints d'ostéosarcomes a démontré que les gènes hyperméthylés appartiennent aux voies de signalisation du récepteur ligand Neuroactive et du récepteur activé par les

proliférateurs du peroxisome (PPAR) et que les gènes dont les promoteurs sont hypométhylés appartiennent à la voie de signalisation des récepteurs Toll (225). Ces patients présentent donc une inhibition de l'expression des gènes impliqués dans la croissance et le syndrome métabolique des cellules cancéreuses et une activation de l'expression des gènes impliqués dans la réponse inflammatoire. Cette étude suggère donc l'implication de ces voies de signalisation dans la pathologie des ostéosarcomes. De manière plus globale, les niveaux de méthylation de l'ADN sont plus élevés chez 17% des patients atteints d'ostéosarcomes et en rechute (226).

2.3.4.2 Altérations des régulateurs des MPTs des histones dans les ostéosarcomes pédiatriques

De même que pour les rhabdomyosarcomes, les ostéosarcomes présentent peu de mutations génétiques et de ce fait, peu de régulateurs épigénétiques des MPTs des histones sont altérés génétiquement. Par exemple, une surexpression de la déméthylase KDM1A a été mesurée dans les ostéosarcomes et l'expression de certaines HDACs (HDAC1, HDAC2 et HDAC3) est associée avec différentes étymologies des ostéosarcomes (224, 227).

De plus, certaines études démontrent l'implication des régulateurs épigénétiques des MPTs des histones dans différentes voies oncogéniques. Par exemple, le suppresseur de tumeur RB est caractérisé pour interagir avec plusieurs régulateurs des MPTs des histones (HDAC1, HDAC2, Suv39h1, RIZ, Suv4-20, RBP2) afin de réprimer la transcription de gènes associés à la régulation du cycle cellulaire (228).

2.4. Les thérapies épigénétiques

2.4.1. Généralités

La première thérapie épigénétique a été approuvée en 2006 pour le traitement du syndrome myélodysplasique (SMD). De nos jours, on dénombre 7 médicaments épigénétiques approuvés par la *Food and Drug Administration* (FDA) des États-Unis pour le traitement de SMD, des lymphomes cutanés à cellules T (LCT), des myélomes multiples (MM), de lymphomes à cellules T périphériques (LTP) et de certains troubles neurologiques (tels que l'épilepsie et les troubles bipolaires par exemple) (229). Le tableau 2 ci-dessous récapitule les différents médicaments épigénétiques approuvés, leurs cibles et leurs applications thérapeutiques.

Nom du médicament épigénétique	Cible	Maladie
Décitabine	Inhibiteur DNMT	SMD
Azacitidine	Inhibiteur DNMT	SMD
Vorinostat	Inhibiteur HDAC	LCT
Romidepsin	Inhibiteur HDAC	LCT
Panobinostat	Inhibiteur HDAC	MM
Belinostat	Inhibiteur HDAC	LTP
Acide valproïque	Inhibiteur HDAC	Troubles neurologies

Tableau 2: Listes des médicaments épigénétiques approuvés par la FDA des États-Unis avec leurs cibles et leurs indications.

De nombreux inhibiteurs des régulateurs épigénétiques ont été créés et sont actuellement en cours d'investigation pour de futures applications cliniques. On dénombre plus de 500 essais cliniques en cours impliquant des médicaments épigénétiques, majoritairement pour des traitements anticancéreux (<http://hedds.org/diseaselist.jsp>). Les médicaments épigénétiques sont classés en 7 catégories selon leurs cibles inhibitrices:

- Les inhibiteurs des DNMTs;
- Les inhibiteurs de KDACs;
- Les inhibiteurs des KATs;
- Les inhibiteurs des histones déméthylases;
- Les inhibiteurs des PMTs;
- Les inhibiteurs des protéines qui se lient aux histones acétylées;
- Les inhibiteurs des protéines qui se lient aux histones méthylées.

Dans le cadre de ma thèse, j'ai travaillé avec des inhibiteurs de la méthylation de l'ADN et des régulateurs l'acétylation des histones. De ce fait, je ne présenterai pas les inhibiteurs liés à la régulation de la méthylation des histones.

2.4.2. Les inhibiteurs de la méthylation de l'ADN

Dans le cadre de ma thèse et en collaboration avec les membres du laboratoire, j'ai écrit une revue scientifique décrivant la découverte et les mécanismes d'action des inhibiteurs de la méthylation de l'ADN. Cette revue aborde également les limites de ces thérapies ainsi

que les solutions proposées actuellement pour contrer ces limites, incluant la création de la seconde génération des inhibiteurs des DNMTs, la combinaison des inhibiteurs de DNMTs avec d'autres médicaments épigénétiques, des chimiothérapies ou encore de l'immunothérapie. Cette revue se trouve en Annexe 1.

2.4.3. Les médicaments qui ciblent l'acétylation des histones

2.4.3.1 Inhibiteurs des lysines désacétylases (KDACi)

Les KDACi sont divisés en 5 classes selon la nature de leurs compositions: les acides hydroxamiques, les acides gras à courte chaîne, les benzamides, les tétrapeptides cycliques et les inhibiteurs des sirtuines (230). Parmi ces différentes classes de médicaments, certains KDACi sont spécifiques à une classe unique de KDAC et d'autres peuvent inhiber l'ensemble des classes des KDACs (pan-inhibiteur) (230). Les classes et les cibles des KDACi actuellement approuvés par la FDA des États-Unis pour le traitement des LCTs, des MMs, des LTPs et des troubles neurologiques sont récapitulés dans le tableau 3 ci-dessous (230):

Nom du médicament épigénétique	Classe	Cible
Vorinostat	Acide hydroxamique	Pan-inhibiteur
Belinostat	Acide hydroxamique	Pan-inhibiteur
Panobinostat	Acide hydroxamique	Pan-inhibiteur
Romidepsin	Tétrapeptide cyclique	Inhibiteur de la classe I
Acide valproïque	Acide gras à courte chaîne	Inhibiteur des classes I et IIa

Tableau 3: Listes des KDACi approuvés par la FDA des États-Unis avec leurs classes et leurs cibles.

De nombreux essais cliniques impliquant l'utilisation de KDACi, appartenant aux différentes classes, pour le traitement de plusieurs types de cancers sont en cours (230). Les mécanismes anticancéreux principaux étudiés des KDACi sont: l'arrêt du cycle cellulaire, l'induction de l'apoptose, l'induction de l'autophagie, l'altération de l'expression des ARNs non codants, des effets anti-angiogéniques, la régulation du système immunitaire, la régulation de plusieurs voies de signalisation (ERK, Wnt et p53), la reprogrammation des cellules souches cancéreuses (230). Ces mécanismes varient selon le type de composés et les types de cancers

dans lesquels ils sont utilisés. Par exemple, le pan inhibiteur de KDAC abexinostat est actuellement en phase II d'essais clinique contre les lymphomes diffus à grandes cellules B chez des patients en rechute ou réfractaires aux thérapies traditionnelles (NCT03936153). Un de ses mécanismes d'action présumé serait de réguler l'expression du long ARN non-codant Xist (231). De plus, différents mécanismes de résistances en fonction des différentes molécules ont également été identifiés (232). Par exemple, une étude a démontré que la lignée leucémique HL-60 augmente l'expression protéique de certaines KDACs après un traitement au vorinostat et devient résistante au traitement (232).

2.4.3.2 Inhibiteurs des lysines acétyltransférases (KATi)

2.4.3.2.1 Généralités

Les KATi sont divisés en 3 sous-familles en fonction de leurs origines et de leurs mécanismes d'action: les produits naturels et leurs dérivés, les produits synthétiques et les inhibiteurs bi-substrats (148). Toutefois, l'obtention de petites molécules inhibitrices de l'activité catalytique des KATs efficaces et sélectives *in vivo* est un challenge difficile pour l'industrie pharmaceutique. Une des difficultés au développement de KATi est la structure très conservée des KATs au niveau de la liaison de leurs substrats, ce qui complique la spécificité des inhibiteurs créés (124). Une deuxième difficulté est le fait que les KATs font partie de complexes protéiques et leurs activités catalytiques sont parfois régulées par leurs partenaires protéiques indépendamment de leurs substrats (124). Également, un manque d'essais biologiques et de modèles cellulaires précis et représentatifs pour étudier l'efficacité et la sélectivité des KATs retardent le développement de KATi (124). L'ensemble de ces contraintes et le manque de connaissances sur la structure cristallisée des KATs résulte à un faible nombre de KATi en étude clinique à ce jour.

Une autre alternative pour altérer la signalisation cellulaire régulée par les KATs est d'inhiber les interactions entre les KATs et leurs partenaires protéiques. Cette alternative permet d'étudier la régulation spécifique de certaines voies cellulaires régulées par la liaison protéique des KATs sans impliquer leurs activités catalytiques.

2.4.3.2.2. Les produits naturels et leurs dérivés

Plusieurs produits naturels et leurs dérivés ont été caractérisés pour détenir des activités inhibitrices de l'activité catalytique des KATs. Toutefois, ces petites molécules ne sont ni spécifiques à une KAT en particulier, ni aux KATs en général et agissent sur d'autres cibles

(124, 148, 233). Principalement, les KATi appartenant à la famille des composés naturels et de leurs dérivés, sont des polyphénols ou des accepteurs de Michael. Les polyphénols sont sujets à être oxydés et les accepteurs de Michael réagissent avec les nucléophiles présents dans les cellules ce qui induit une régulation de nombreux processus biologiques par ces KATi indépendamment de l'inhibition des KATs (124, 148, 233). Parmi les KATi les plus connus appartenant à la famille des produits naturels se trouvent le curcumin (inhibiteur de KAT3B), le garcinol (inhibiteur de KAT3B et KAT2B) et l'acide anacardique (inhibiteur de KAT3B/KAT3A, KAT2B, KAT5 et KAT6A) (124). De nombreux dérivés de ces composés naturels existent aujourd'hui et sont étudiés pour leurs vertus thérapeutiques dans certains cancers, maladies neurales et maladies inflammatoires (124).

2.4.3.2.3. *Les produits synthétiques*

Le développement de bibliothèques de médicaments virtuelles ciblant les KATs et de criblages virtuels ont été réalisés pour identifier de nouveaux KATi potentiels. Ces méthodes ont permis de développer de nombreux KATi avec des propriétés plus spécifiques et plus efficaces. KAT3B est une cible plus évidente pour la découverte d'inhibiteurs spécifiques car c'est la seule KAT dont la structure est cristallisée (124). Les KATi les plus connus découverts grâce au criblage virtuel contre KAT3B sont le thiazinesulfonamide et le C646 (148). Récemment, un nouvel inhibiteur spécifique de KAT3B/KAT3A efficace *in vivo* a été découvert et son utilisation dans des cellules de myélomes multiples et de cancers de la prostate induit des effets antiprolifératifs (234).

2.4.3.2.4. *Les inhibiteurs bi-substrats*

Les inhibiteurs bi-substrats sont composés d'un CoA et d'un pseudo-peptide, qui mime la séquence peptidique des lysines, afin de reproduire les deux substrats naturels des KATs (l'acétyl-CoA et les lysines) (148). Le CoA et le pseudo-peptide sont reliés par une séquence peptidique dont la longueur et la nature peuvent être modulées afin d'ajuster l'affinité des inhibiteurs pour une KAT spécifique (148). Ces inhibiteurs agissent donc comme des dominants négatifs des substrats naturels de certaines KATs mais ils ne peuvent pas être convertis par ces dernières (148).

Des inhibiteurs spécifiques pour KAT2B (H3-CoA-20), KAT3B (Boc-C5-CoA) et KAT5 (H4-K16-CoA) ont été produits (124). Toutefois, leurs applications sont limitées dû à une faible stabilité métabolique et une absence de perméabilité cellulaire (124, 148). Ces limites sont dues à la nature peptidique des composés et à la présence de groupes phosphates dans le

CoA et la modification de ces paramètres dans de nouveaux analogues permettrait l'amélioration de l'efficacité de ces composés (124).

2.4.3.3 Inhibiteurs des protéines qui se lient aux histones acétylées

La liaison de *readers* de l'acétylation des lysines des histones se fait via la présence de bromodomaines ou du domaine YEATS. Les bromodomaines sont formés par des séquences peptidiques conservées et sont contenus dans 46 protéines chez l'humain, dont certaines KATs (235). Comme décrit précédemment dans la partie 2.2.3.2.2., le domaine YEATS est présent dans 4 protéines chez l'humain et il est également composé de séquences peptidiques conservées (119, 120). Une des approches pharmacologiques indirectes pour inhiber la signalisation cellulaire induite par l'acétylation des histones est d'empêcher l'interprétation et le recrutement de facteurs protéiques induits par cette acétylation en interférant la liaison aux bromodomaines ou aux domaines YEATS (76, 236).

Tout d'abord, une des familles des bromodomaines les plus étudiées sont les BETs, composées de BRD2, BRD3, BRD4 et BRDT (76). Les BETs jouent un rôle clef dans la régulation de la transcription des gènes et la régulation du cycle cellulaire (76). Particulièrement, BRD2 et BRD4 sont largement caractérisés pour réguler de manière positive l'expression d'oncogènes dans les cancers (76). Quand à BRDT, il est exprimé exclusivement dans les testicules et principalement impliqué dans la régulation de la spermatogenèse (237). Cependant, dans certains cas de cancers du poumons, une activation aberrante de BRDT a été mesurée (238). Enfin, BRD3 est impliqué dans la biogenèse des ribosomes et la régulation négative de la prolifération cellulaire (239). L'inhibition des bromodomaines représentent donc une stratégie thérapeutique anticancéreuse potentielle et des inhibiteurs de BETs (BETi) ont donc été synthétisés et testés comme stratégie anticancéreuse dans différents cancers.

Les deux premiers BETi synthétisés sont le thieno-triazolo-1,4-diazepine (JQ1), qui inhibe BRD4, et le I-BET762 (76, 240). L'activité anticancéreuse de JQ1 a été étudiée dans de nombreux laboratoires et l'une des caractéristiques clefs de ce composé est d'être un puissant inhibiteur de MYC dans les cancers hématopoïétiques et solides (185). D'autres BETi ciblant l'inhibition spécifique d'un bromodomaine ou de plusieurs bromodomaines sont aujourd'hui en essais cliniques comme thérapies anticancéreuses dans différents cancers (241). Toutefois, certaines résistances aux BETi sont apparus via une reprogrammation du kinome de cellules de cancer de l'ovaire et de leucémies (78, 242). À ce jour, lorsque utilisés en monothérapie, les BETi n'ont pas connu de succès thérapeutique mais de nombreuses études sont en cours afin d'étudier leurs potentiels anticancéreux en combinaison avec d'autres médicaments.

De plus, les protéines contenant le domaine YEATS peuvent également être inhibées. Récemment, une équipe de recherche a développé des inhibiteurs du domaine YEATS ciblant les protéines AF9 et ENL (236). ENL a été caractérisée pour être impliquée dans la transcription de gènes oncogéniques dans certaines LMAs via sa liaison aux lysines acétylées des histones par son domaine YEATS (121). L'utilisation de ces inhibiteurs permettra de découvrir d'éventuelles nouvelles fonctions de ces deux protéines à travers leurs rôles de *readers* de l'acétylation dans différentes pathologies.

2.4.4. Les combinaisons des médicaments épigénétiques

2.4.4.1. Généralités

La combinaison de médicaments est une stratégie thérapeutique qui implique un minimum de deux entités moléculaires données à une concentration fixe de manière concomitante ou de manière séquentielle. La combinaison de médicaments permet de révéler des molécules agissant de manière synergique ou additive. Une combinaison de médicaments dite synergique signifie que l'efficacité thérapeutique des molécules en combinaison est significativement supérieure à l'efficacité thérapeutique des molécules utilisées seules. Une combinaison de médicaments dite additive signifie que l'efficacité thérapeutique des molécules seules s'ajoute les unes aux autres en combinaison.

Les médicaments épigénétiques peuvent être utilisés en combinaison avec d'autres médicaments épigénétiques ou bien avec d'autres chimiothérapies. De nombreux essais cliniques étudient le potentiel de combiner les médicaments épigénétiques pour le traitement de différents cancers (<http://hedds.org/diseaselist.jsp>).

2.4.4.2. Les combinaisons des médicaments épigénétiques entre eux

L'étude du potentiel combinatoire des médicaments épigénétiques entre eux implique principalement l'utilisation des DNMTi en combinaison avec les KDACi. L'utilisation de KDACi avec l'azacitidine ou la décitabine démontre des effets synergiques sur la prolifération et l'induction de l'apoptose dans différentes lignées cancéreuses (230). Des études ont également démontré le potentiel des KDACi pour amplifier la baisse de méthylation produite sur certains promoteurs en réponse aux DNMTi (230, 243). Également, de nombreuses études cliniques ont étudié le potentiel combinatoire des DNMTi avec des KDACi et certaines ont démontré un bénéfice de cette combinaison chez des patients atteints de SMD et de leucémies (244-248). Toutefois, une récente étude n'observe pas d'amélioration de la survie

chez des patients adultes atteints de SMD, de leucémies myélocytiques aiguës et de leucémies myélomonocytiques chroniques ayant reçu des combinaisons du DNMTi azacytidine avec le KDACi panobinostat en comparaison avec les patients ayant seulement reçu la monothérapie d'azacytidine (249). De plus, une autre étude clinique réalisée chez des patients atteints de SMD démontre que la combinaison d'azacytidine avec le KDACi etinostat n'induit aucune amélioration clinique des patients par rapport à la monothérapie d'azacytidine (250). Cette combinaison de médicaments diminue la déméthylation induite par l'azacytidine seule, démontrant un antagonisme pharmacologique de ces deux composés (250). Récemment, les résultats d'une étude clinique de phase 1 évaluant la combinaison du DNMTi CC-486 avec le KDACi la romidepsine chez des patients présentant des tumeurs solides avancées ont révélé qu'aucune activité anticancéreuse significative n'était mesurée chez ces patients en réponse à cette combinaison de médicaments (251). Les activités synergiques anticancéreuses des DNMTi et KDACi chez les patients sont donc controversées. De nombreuses études cliniques et précliniques sont en cours et continuent d'étudier le potentiel combinatoire de ces médicaments pour le traitement de différents cancers (<http://hedds.org/diseaselist.jsp>). Par exemple, une étude clinique de phase 1 a évalué la sécurité et la tolérance d'une combinaison du DNMTi 5-azacytidine avec le KDACi sodium phenylbutyrate chez des patients avec des tumeurs solides réfractaires (NCT00005639) (252).

2.4.4.3. Les combinaisons de médicaments épigénétiques avec d'autres médicaments

De nombreuses études ont démontré que les KDACi et les DNMTi modulent le système immunitaire (253-256). L'utilisation des thérapies épigénétiques en combinaison avec l'immunothérapie apparaît donc comme une thérapie stratégique. La combinaison d'une thérapie anti-PD-1 avec un KDACi permet d'augmenter la réponse à l'immunothérapie dans des adénocarcinomes pulmonaires (257). Également, l'utilisation de décitabine ou d'etinostat (un KDACi) en combinaison avec des anti-PD-1 et des anti-CTLA-4 permet de sensibiliser et d'éradiquer pratiquement l'intégralité de tumeurs immunogéniques chez des souris résistantes à la combinaison anti-PD-1 / anti-CTLA-4 (258). Actuellement, plus de 35 études cliniques investiguent les KDACi et les DNMTi en combinaison avec des immunothérapies dans différents cancers (<https://clinicaltrials.gov>). Par exemple, une étude clinique de phase I/II est actuellement conduite pour étudier la combinaison du DNMTi decitabine en combinaison avec le pembrolizumab chez des patients atteints de LMAs (NCT02996474).

Également, les thérapies épigénétiques sont caractérisées pour augmenter la sensibilité des cellules cancéreuses aux radiothérapies et à certaines chimiothérapies (259,

260). De nombreux essais cliniques sont également en cours chez des patients atteints de différents types de cancers (261) (<https://clinicaltrials.gov>). Par exemple, la combinaison du DNMTi décitabine et du KDACi vorinostat avec des chimiothérapies traditionnelles (vincristine, prednisone, doxorubicin et PEG-asparaginase) ont été étudiées en phase 2 chez des patients réfractaires ou en rechute atteints de LLAs ou de lymphomes (NCT00882206) (262). Sur les 8 patients qui ont complété cette étude, 4 d'entre eux ont démontré une rémission complète, 2 patients une réponse partielle, 1 patient une stabilisation de la maladie et 1 patient une progression de la maladie. La survie des patients sans progression de la maladie après 60 jours chez les participants de l'étude a été mesurée à 45% (262).

3. Les glycosides cardiotoniques

3.1. Généralités

3.1.1. Définition

Les glycosides cardiotoniques (GCs), également appelés les digitalis, sont des composés produits naturellement par différentes espèces de plantes et d'amphibiens utilisés en médecine depuis 1785 pour le traitement des insuffisances cardiaques (263). La structure chimique des GCs est composée d'un cycle stéroïde, identique à tous les GCs, et de deux structures variables selon les différents GCs, une lactone située en position 17 et une molécule de sucre en position 3 (Figure 29) (263).

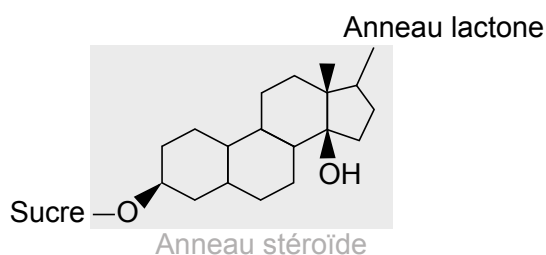


Figure 29: Structure chimique des GCs.

La lactone peut être formée soit de 4 ou de 5 carbones, et cette différence définit les deux sous-familles composant les GCs: les cardénolides, dont la lactone est formée de 4 carbones, et les bufadénolides, dont la lactone est formée de 5 carbones (Figure 30) (263).

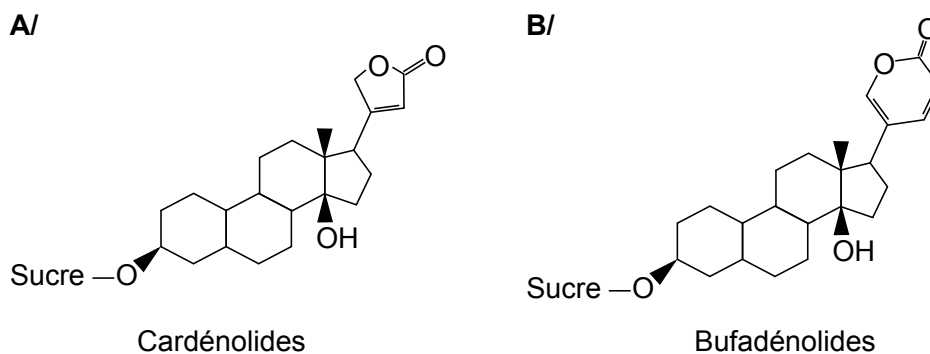


Figure 30: Structures chimiques des cardénolides (A) et des bufadénolides (B).

Les différences structurelles de l'anneau lactone vont influencer la pharmacocinétique et la toxicité potentielle des composés appartenant aux deux sous-familles (263). Également, différents sucres peuvent être attachés aux GCs ce qui influence la vitesse de métabolisation et donc l'efficacité des différents composés chez l'humain (263).

3.1.2. Mécanisme d'action

3.1.2.1 Description de la contraction cardiaque

La contraction des cellules cardiaques s'initie par un potentiel d'action généré par une entrée rapide de calcium (Ca^{2+}) dans les cellules ventriculaires et auriculaires (264). Le potentiel d'action consiste en une dépolarisation des surfaces des membranes cellulaires du potentiel de repos situé à environ 80 mV, vers 200 - 400 mV (264). Cette dépolarisation induit une ouverture transitoire des canaux calciques laissant entrer du Ca^{2+} extracellulaire dans les cellules cardiaques qui permettra l'ouverture des canaux potassiques (K^+) responsables du retour vers le potentiel de repos membranaire (264). Lors de la dépolarisation, la concentration calcique cytoplasmique augmente de 100 nM à 10 μM (264). Pour la relaxation, le Ca^{2+} intracellulaire sera expulsé via l'action de l'échangeur sodium (Na^+) / Ca^{2+} et l'entrée de Na^+ va induire l'activation de la pompe Na^+ / K^+ adénosine triphosphatase (Na^+ / K^+ ATPases) qui va expulser 3 Na^+ intracellulaires contre 2 K^+ extracellulaires.

Le Ca^{2+} intracellulaire relâché lors de la dépolarisation membranaire est libéré par le réticulum sarcoplasmique et re-stocké dans ce dernier lors du retour au potentiel de repos (264). L'augmentation de la concentration calcique lors de la dépolarisation permet l'interaction du Ca^{2+} avec les protéines contractiles dont les deux principales sont la myosine et l'actine (264). Au repos, l'interaction de ces deux protéines est inhibée par les protéines régulatrices tropomyosine et troponine (264). En réponse à un potentiel d'action, le Ca^{2+} libéré se fixe sur les protéines régulatrices, permettant alors l'interaction de la myosine avec l'actine et créant un mouvement contractile (264). La figure 31 récapitule les mécanismes cellulaires impliqués dans la contraction cardiaque.

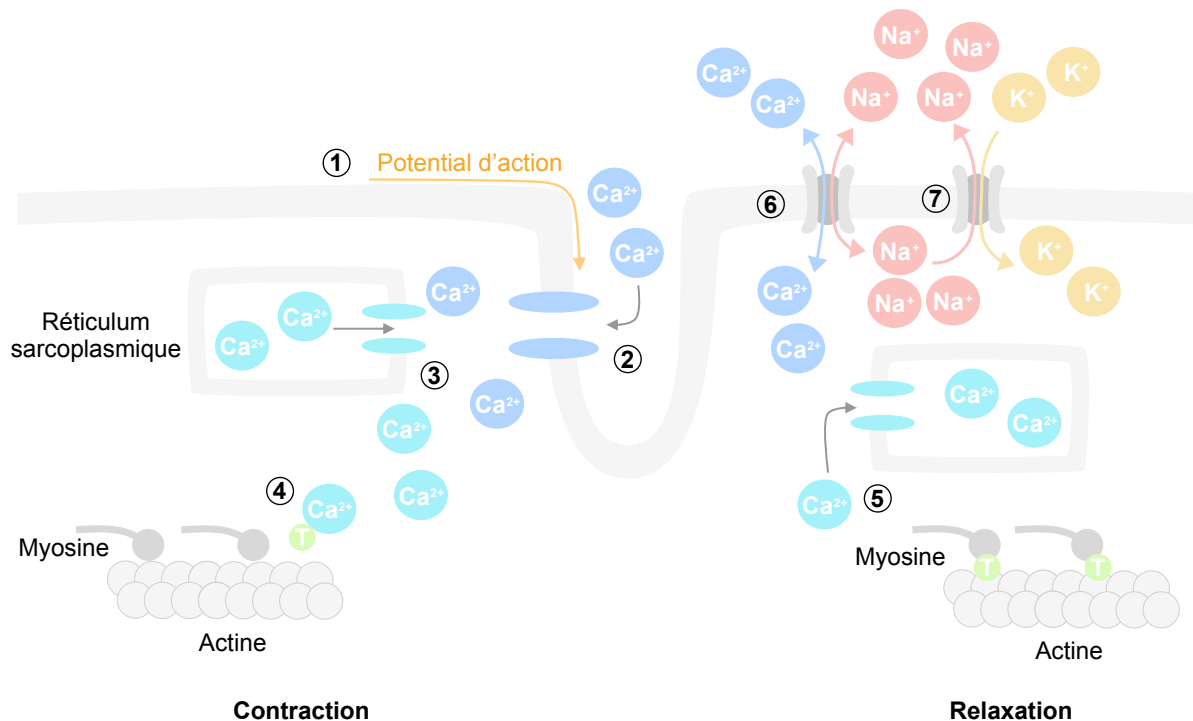


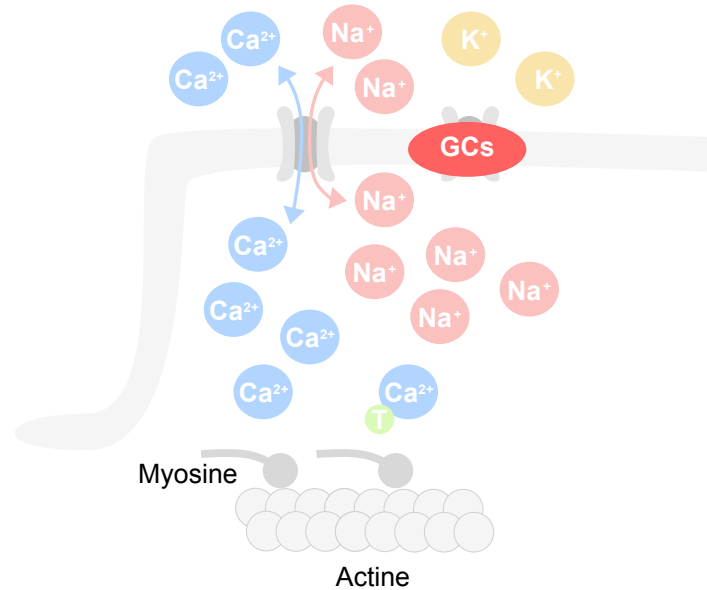
Figure 31: Schéma décrivant les mécanismes cellulaires impliqués dans la contraction cardiaque.

1: Un potentiel d'action dépolarise la membrane plasmique 2: Cette dépolarisation induit l'ouverture de canaux calciques et l'entrée de Ca^{2+} extracellulaire dans les cellules myocardites. 3: L'entrée de Ca^{2+} extracellulaire permet la libération du Ca^{2+} sarcoplasmique dans le cytoplasme des cellules myocardites et la concentration en Ca^{2+} intracellulaire augmente. 4: Le Ca^{2+} interagit avec la troponine et la tropomyosine (T) et l'actine et la myosine peuvent donc interagir entre elles ce qui induit la contraction cardiaque. 5: Le Ca^{2+} se détache des troponines et des tropomyosines pour induire la relaxation du coeur et les stocks calciques du réticulum sarcoplasmique se remplissent à nouveau. 6: L'échangeur $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^{+}$ expulse le Ca^{2+} intracellulaire et fait entrer du Na^{+} extracellulaire. 7: La pompe $\text{Na}^{+} / \text{K}^{+}$ ATPase maintient le gradient $\text{Na}^{+} / \text{K}^{+}$ en échangeant 3 Na^{+} intracellulaires pour 2 K^{+} extracellulaires.

3.1.2.2 Mécanisme d'action des glycosides cardiotoniques

Les GCs exercent un effet inotrope positif en augmentant la concentration calcique intracellulaire. Cette augmentation est le résultat de l'inhibition des pompes $\text{Na}^{+} / \text{K}^{+}$ ATPases

par les GCs, qui entraîne une augmentation de la concentration intracellulaire en Na^+ (264). Cette augmentation du Na^+ intracellulaire induit à son tour une augmentation de la concentration intracellulaire calcique via les échangeurs membranaires $\text{Na}^+ / \text{Ca}^{2+}$ responsables de l'augmentation de la contraction cardiaque (Figure 32) (264). L'augmentation seule du Na^+ intracellulaire n'induit pas de changement de la contraction cardiaque (264). Cet effet inotrope positif stimule le nerf vague qui va alors diminuer la fréquence cardiaque (265).



Effet inotrope positif

Figure 32: Schéma représentant le mécanisme d'action des GCs.

La pompe Na^+ / K^+ ATPase est inhibée par les GCs, ce qui induit une augmentation du Na^+ intracellulaire. Afin de respecter leurs gradients Na^+ , les cellules du myocarde vont expulser le Na^+ intracellulaire via l'échangeur $\text{Na}^+ / \text{Ca}^{2+}$ ce qui entraîne une augmentation de la concentration intracellulaire en Ca^{2+} . Cette augmentation de Ca^{2+} est responsable de l'effet inotrope positif des GCs.

3.1.2.3 Les pompes Na^+ / K^+ ATPases

Les pompes Na^+ / K^+ ATPases sont situées au niveau des membranes plasmiques externes du cytosol et sont responsables du maintien des gradients électrochimiques qui traversent les membranes plasmiques (265). Ces pompes utilisent l'énergie dérivée de l'hydrolyse de l'ATP pour le transport actif de K^+ et de Na^+ à l'extérieur de la cellule et, pour

une molécule d'ATP consommée, trois molécules de Na^+ sont expulsées de la cellule contre deux molécules de K^+ entrants (265). Au repos, les pompes Na^+ / K^+ ATPases consomment 30% de l'énergie cellulaire (265).

Le maintien des gradients électrochimiques est essentiel pour plusieurs processus physiologiques et la stabilisation du potentiel de membrane au repos à la suite d'une dépolarisation membranaire (265). Les principaux processus physiologiques régulés par les pompes Na^+ / K^+ ATPases sont: la communication neurale, la filtration des déchets produits par les néphrons des reins et la motilité des spermatozoïdes (265).

L'inhibition des pompes Na^+ / K^+ ATPases par les GCs cause une accumulation de K^+ à l'extérieur de la cellule et une accumulation de Na^+ intracellulaire (265). Cette accumulation de Na^+ intracellulaire empêche l'échange de Ca^{2+} intracellulaire avec le Na^+ normalement extracellulaire, réalisé par l'échangeur membranaire $\text{Na}^+ / \text{Ca}^{2+}$ qui est, dans ce cas, inhibé de manière indirecte par les GCs (265). Par conséquent, une augmentation de la concentration calcique intracellulaire est également induite par les GCs (265).

3.1.2.4 Toxicité des GCs

L'augmentation du Na^+ intracellulaire produit lors de la dépolarisation membranaire en réponse à la prise de GCs induit une baisse du plateau du potentiel de repos membranaire ainsi qu'une augmentation de l'automaticité des cellules cardiaques créant un potentiel pro-arythmique (266). Cette combinaison est à l'origine de dysrythmies cardiaques telles que des extrasystoles par exemple. Également, la toxicité peut être observée dans différents organes tels que le système gastro-intestinal, les yeux et le système nerveux (266).

La toxicité liée à la prise des GCs peut être classée en trois catégories (266):

- Une toxicité aiguë due à la prise d'une concentration trop élevée de GCs;
- Une toxicité chronique due à une accumulation systémique de GCs secondaire à un dysfonctionnement hépatique ou rénal;
- Une toxicité chronique due à une accumulation systémique de GCs secondaire à une interaction avec des médicaments.

3.1.3. Utilisation clinique des GCs

3.1.3.1 La digoxine

Les GCs sont utilisés en clinique pour le contrôle des tachycardies supraventriculaires et pour le traitement des insuffisances cardiaques congestives. Parmi les différents GCs, la

digoxine est préférentiellement utilisée dû à ses meilleures propriétés pharmacodynamiques et moins d'effets secondaires non désirables chez les patients (267). La digoxine appartient à la famille des cardénolides et sa structure est présentée en Figure 33.

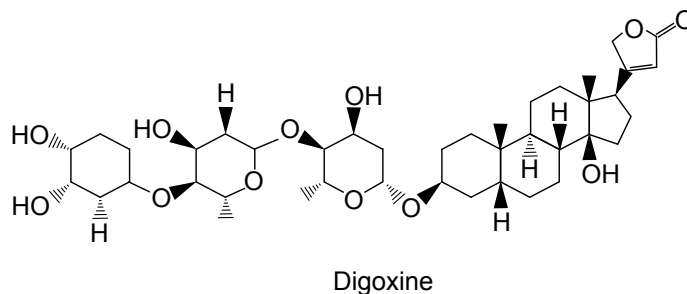


Figure 33: Structure chimique de la digoxine.

La digoxine s'ingère oralement et la concentration plasmatique augmente rapidement après l'ingestion (267). Toutefois, la répartition de la digoxine dans les tissus nécessite plus de temps et le volume de distribution est de 7 à 8 litres par kilogrammes chez l'humain (267). La digoxine n'est pas complètement absorbée: 70 à 85% de la digoxine ingérée sera excrétée non métabolisée par les reins puis libérée dans l'urine (267). La biodisponibilité de la digoxine est de 100% dans les capsules en gélatine et sa demi-vie varie entre 36 et 44 heures (267). La concentration plasmatique nécessaire de digoxine pour le traitement des insuffisances cardiaques est de 0.5 - 1 µg / l (267).

3.1.3.2 La proscillaridine A

La proscillaridine A appartient à la famille des bufadiénolides et était utilisée pour le traitement des insuffisances cardiaques chez les personnes âgées (268-270). Sa structure est présentée en Figure 34. La posologie de proscillaridine A prescrite par la Commission E (commission allemande) pour le traitement de l'insuffisance cardiaque est de 100 à 500 mg par jour (271). Lorsqu'elle est prise oralement, la biodisponibilité de la proscillaridine A est 4 fois plus faible que celle obtenue avec une prise orale d'un comprimé de digoxine (268). De plus, seulement une faible portion de proscillaridine A non métabolisée est excrétée dans l'urine (1%) impliquant que la proscillaridine A est rapidement modifiée après son absorption ou bien qu'elle est rapidement dégradée (268). Globalement, la demi vie de la proscillaridine A est estimée à 24h et son taux d'absorption est évalué entre 20 à 30% (271). Également, des études *in vitro* ont démontré que la proscillaridine A est sensible au pH acide (268). De ce fait, la prise de ce médicament avec ou sans nourriture influence grandement sa biodisponibilité

(272). Malgré le fait que la proscillaridine A est caractérisée pour être un inhibiteur plus puissant des pompes Na^+ / K^+ ATPases par rapport à la digoxine, la toxicité plasmatique de la proscillaridine A est atteinte avec des concentrations deux fois plus faibles que pour la digoxine (268). De ce fait, la proscillaridine A n'est pas privilégiée en clinique en Amérique du Nord pour le traitement des insuffisances cardiaques dû à son faible index thérapeutique en comparaison avec d'autres GCs dont la digoxine.

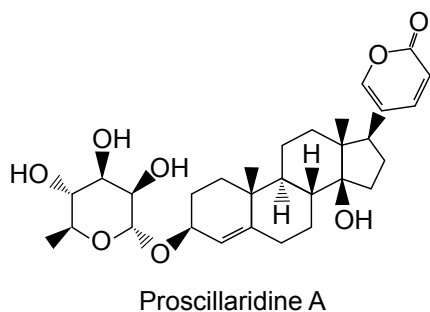


Figure 34: Structure chimique de la proscillaridine A.

3.1.3.3 La digitoxine

La digitoxine appartient à la famille des cardénolides et était utilisée pour le traitement des insuffisances cardiaques. Sa structure est présentée en Figure 35. La biodisponibilité de la digitoxine est de 100% et la distribution est complète après 4 à 6 heures (273). Le volume de distribution de la digitoxine est estimé à 0.6 l par kilogramme ce qui est beaucoup plus faible par rapport à la digoxine (273). Le système hépatique métabolise 70% de la digitoxine et 30% est excrétée de manière non métabolisée dans l'urine (273). Également, la demi-vie de la digitoxine est évaluée à 7 jours, ce qui implique que la digitoxine doit être prescrite chez un patient supportant convenablement les GCs (273). Certains médicaments ont été caractérisés pour diminuer la demi-vie de la digitoxine tels que la cholestyramine, chélateur de l'acide biliaire et utilisé pour faire baisser le niveau de cholestérol sanguin (273).

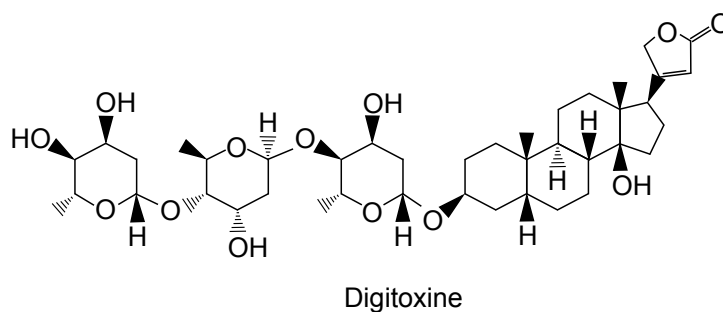


Figure 35: Structure chimique de la digitoxine.

3.2. Activités anticancéreuses

3.2.1. Découvertes

En 1967, l'inhibition de la prolifération de cellules néoplasiques en réponse à un traitement de GCs a été mesurée, démontrant pour la première fois les activités anticancéreuses *in vitro* des GCs (274). De nombreuses études ont suivi démontrant *in vitro* des activités antiprolifératives et pro-apoptotiques des GCs dans différents types de cancers dont les leucémies, les cancers du sein, les neuroblastomes et autres (275). Plusieurs études *in vivo* ont également démontré le potentiel anticancéreux de la proscillaridine A et de la ouabaine dans les glioblastomes et les cancers du sein (négatif pour le récepteur à l'oestrogène) respectivement (276, 277). Toutefois, il est à noter que les GCs ont un faible index thérapeutique, avec une concentration plasmatique maximale estimée à 10 nM, et que la majorité des études sur le potentiel anticancéreux des GCs utilisent des doses supra-physiologiques, limitant l'utilisation de ces concentrations chez l'humain (275, 277, 278). Particulièrement, les rongeurs sont caractérisés pour supporter de plus fortes concentrations de GCs dû aux différences structurales composant leurs pompes Na^+ / K^+ ATPases (276).

De plus, des études épidémiologiques réalisées sur les patients traités avec des GCs pour le traitement d'insuffisances cardiaques ont révélé que ces patients développent moins de cancers que la population en général et que ceux qui développent des cancers présentent des maladies moins agressives et répondent mieux aux thérapies anticancéreuses, suggérant des propriétés chimiopréventives des GCs (275). Toutefois, certaines études épidémiologiques ont également démontré que la prise de GCs augmente le risque de développer des cancers du sein mais que chez ces patientes, la réponse aux thérapies était meilleure en comparaison aux patientes atteintes de cancers du sein qui ne prennent pas de GCs (279). Également, de récentes études épidémiologiques de patients traités avec la digoxine ont démontré que l'activité oestrogénique des GCs induit un plus haut risque de développer des cancers sensibles à l'oestrogène tel que les cancers du sein et de l'ovaire (280, 281).

3.2.2. Mécanismes d'action anticancéreux

Plusieurs mécanismes d'action anticancéreux, secondaires à l'inhibition des pompes Na^+ / K^+ ATPases, ont été proposés dont: la régulation des processus inflammatoires,

l'induction des programmes de mort cellulaire, l'inhibition de la prolifération et de l'angiogenèse.

3.2.2.1 Régulation des processus inflammatoires

Les processus inflammatoires sont régulés selon plusieurs mécanismes par les GCs. Un de ces mécanismes est l'inhibition du senseur de l'ARN RIG-1 qui va altérer la transcription du gène de l'interféron- β activée par les virus ainsi que la translocation nucléaire du facteur NF κ B (282). Également, les GCs induisent les programmes de mort cellulaire immunogénique dans plusieurs lignées cancéreuses *in vitro* (283). De plus, dans cette même étude, la combinaison des GCs *in vivo* avec des chimiothérapies non-immunogéniques induit une augmentation de la réponse antinéoplasique dans des souris immunocompétentes et cette réponse est annulée dans des souris immunodéficientes (283). Par ailleurs, chez des patients atteints de carcinomes, cette combinaison de GCs avec des chimiothérapies non-immunogéniques améliore la réponse aux thérapies en comparaison avec les patients ayant reçu uniquement des traitements de chimiothérapies (283). Cette étude démontre donc que les GCs exercent des activités anticancéreuses via la stimulation de la mort cellulaire immunogénique. Également, une étude a démontré que le GC gamabufotalin inhibe la production de lymphocytes T régulateurs (T-regs) impliqués dans l'inhibition de l'immunité anti-tumorale (284).

3.2.2.2 Induction des programmes de mort cellulaire

Les GCs induisent différents programmes de mort cellulaire selon l'origine des cellules cancéreuses tels que l'apoptose, l'autophagie, la nécrose et l'apoptose immunogénique décrite ci-dessus. Dans des contextes précis, certains GCs, dont la proscillaridine A, induisent le processus d'apoptose mitochondrial via l'activation des membres de la famille BCL-2 BAK et BAX qui permettent le relâchement du cytochrome C et l'activation de la caspase 8 (285-287). La bufaline inhibe l'expression de la protéine régulatrice de l'apoptose MCL-1 via l'activation de la kinase GSK-3 β , ce qui a pour conséquence d'activer la voie cellulaire de l'apoptose (288). Également, la proscillaridine A augmente l'activation de cette kinase GSK-3 β dans des cellules souches de glioblastome en culture 2D et 3D, responsable de l'inhibition de la migration et de l'induction de l'apoptose (289). De plus, des études démontrent que les GCs augmentent la transcription des récepteurs de mort cellulaire et / ou de leurs ligands (290-292).

Certains GCs induisent également les processus d'autophagie dans les cancers du poumon qui ne sont pas à petites cellules, les gliomes et les cancers du pancréas (293, 294).

En particulier, l'oléandrine augmente la formation d'autophagosomes et de l'activité lysosomale dans les gliomes et les cancers du pancréas (293). Également, la ouabaine induit l'autophagie des cellules cancéreuses du poumon via l'inhibition de l'expression de BCL2 dépendante de la signalisation de la voie cellulaire de la kinase C-JUN (295).

De plus, certains GCs tels que UNBS1450 induisent des programmes de mort cellulaire différents selon les types de cancers. UNBS1450 induit:

- L'apoptose dans des lignées leucémiques (286);
- L'autophagie dans des lignées cellulaires de cancers du poumons qui ne sont pas à petites cellules (296);
- L'apoptose, la nécrose et l'autophagie dans les neuroblastomes (297).

3.2.2.3 Inhibition de la prolifération et de l'angiogenèse des cellules cancéreuses

Plusieurs études ont démontré le potentiel anti-prolifératif et anti-angiogénique des GCs dans différentes lignées cancéreuses. Certains GCs tels que la ouabaine et la convallatoxine inhibent la migration et l'invasion cellulaire en régulant l'expression des protéines régulatrices de la migration (les protéines d'adhésion focales et les métalloprotéinases, par exemple) (298, 299). La bufaline inhibe la prolifération cellulaire dans des lignées de cancers du sein via l'induction de la dégradation des récepteurs nucléaires SRC-1 et SRC-3, impliquée dans l'activation de la transcription de *MYC* et de *NF-κB* (300). Dans des lignées de cancers du pancréas, la bufaline induit un arrêt du cycle cellulaire via l'inhibition de la transcription de *MYC* et *NF-κB* (301).

De plus, la convallatoxine, la digoxine et la gamabufotaline inhibent la voie cellulaire de l'angiogenèse en régulant l'expression de certaines protéines régulatrices de cette voie tel que le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire VEGF (302-304). Également, la digitoxine est un GC capable d'inhiber l'expression du VEGF via la suppression du facteur induit par l'hypoxie HIF1 dans les cellules souches cancéreuses de gliomes (305).

3.2.3. Utilisation des GCs en combinaison dans les cancers

Certaines lignées cancéreuses sont extrêmement résistantes à toutes formes de thérapies incluant les GCs. La combinaison de médicaments représente donc une stratégie permettant de cibler différents mécanismes d'action pour augmenter la réponse aux thérapies et le potentiel anticancéreux des différents médicaments. Différentes études ont donc été menées pour mesurer le potentiel combinatoire des GCs avec des chimiothérapies. Par exemple, dans des lignées de cancers de colon la digitoxine en combinaison avec l'oxaliplatine

démontre des activités synergiques anticancéreuses (306). Également, dans des lignées de cancers de la prostate, la proscillaridine A augmente la toxicité induite par un traitement de doxorubicin via l'inhibition de la voie cellulaire JAK2/STAT3 (287). De plus, les combinaisons de cisplatine avec la digoxine, la digitoxine ou la ouabaine, selon certaines concentrations, induisent des effets anticancéreux synergiques ou additifs (307). La combinaison de bufaline avec le sorafenib démontre des activités anticancéreuses synergiques dans des carcinomes hépatocellulaires via l'inhibition de la voie cellulaire MTOR/VEGF (308).

Les GCs présentent également un potentiel combinatoire avec des molécules différentes des chimiothérapies standards utilisées pour les traitements anticancéreux. Par exemple, une récente étude réalisée dans des lignées cancéreuses de poumon à petites cellules démontre que le chlorure de sodium augmente l'inhibition des pompes Na⁺ / K⁺ ATPases induit par la digoxine, ce qui a pour effet d'augmenter l'inhibition de la prolifération des cellules cancéreuses en comparaison avec un traitement singulier de digoxine (309). Également, un traitement combinatoire incluant un inhibiteur de p38 MAPK avec deux GCs, l'arenobufagine ou l'hellebrigenine, augmente la cytotoxicité induite par les GCs seuls dans des cellules humaines de glioblastomes (310).

3.2.4. Repositionnement des GCs comme thérapies anticancéreuses (essais cliniques)

De nombreuses études ont révélé le potentiel anticancéreux des GCs dans différents cancers suggérant le repositionnement des GCs comme traitement anticancéreux. De ce fait, un total de 18 essais cliniques ont été enclenchés pour tester principalement le potentiel anticancéreux de la digoxine dans différents cancers solides (Tableau 4 et 5). Parmi ces 17 essais cliniques, 1 essai clinique a été abandonné, 3 essais sont terminés et 8 sont complétés (Tableau 4).

Glycoside cardiotonique seul ou en combinaison	Cancer	Ref ClinicalTrials.gov
Digoxine		
	Cancer de la prostate récurrent	NCT01162135
+ Capecitabine	Cancer du sein métastatique	NCT01887288
+ Lapatinib	Cancer du sein	NCT00650910
+ Rosuvastatin + Regorafenib	Néoplasmes	NCT02106845
+ Tivantinib	Tumeurs solides	NCT01517399

Glycoside cardiotonique seul ou en combinaison	Cancer	Ref ClinicalTrials.gov
+ Erlotinib	Cancer du poumon non à petites cellules	NCT00281021
+ Rosuvastatin	Tumeurs solides avancées dérégulés pour c-MET	NCT02626234
+ Vemurafenib	Mélanome malin	NCT01765569
+ Trametinib	Melanome	NCT02138292
+ Decitabine	Leucémie et syndrome myéloдисplasique	NCT03113071
+ Dabrafenib + Trametinib	Melanome	NCT02915666
Bufalin + Cinobufagin + Resibufogenin		
+ Gemcitabin	Cancer du pancréas	NCT00837239

Tableau 4: Liste des essais cliniques terminés et complétés étudiant les GCs seuls ou en combinaison comme traitement anticancéreux (source clinicaltrials.gov).

À ce jour, 6 essais cliniques sont en cours pour tester l'activité anticancéreuse des GCs seuls ou en combinaison (Tableau 5).

Glycoside cardiotonique seul ou en combinaison	Cancer	Ref ClinicalTrials.gov
Digoxine		
+Cysplatin	Cancer du coup et de la tête	NCT02906800
	Cancer du sein	NCT01763931
+ Metformin +Simvtastin	Cancer du pancréas et tumeurs solides	NCT03889795
	Cancer du sein et dissolution des cellules cancéreuses circulantes	NCT03928210
	Sarcomes	NCT02212639
Oleandrin (PBI-05204)		
	Cancer du pancréas métastatique	NCT02329717

Tableau 5: Liste des essais cliniques en recrutement et en cours étudiant les GCs seuls ou en combinaison comme traitement anticancéreux (source clinicaltrials.gov).

Toutefois, aucun GC n'est actuellement approuvé par la FDA des États-Unis comme traitement anticancéreux. De plus, parmi les essais cliniques, on remarque que l'efficacité anticancéreuse des GCs est majoritairement testée dans des cancers solides. Cependant, aucune étude dans la littérature ne démontre le fait que les GCs détiennent des activités anticancéreuses plus élevées dans les cancers solides par rapport aux cancers hématologiques.

3.3. Activités épigénétiques

3.3.1. Découverte

En 2016, l'équipe du Dr. Issa a créé un modèle cellulaire de cancer de colon permettant de mesurer la capacité d'une ou plusieurs molécules à induire l'expression d'un gène GFP précédé d'un promoteur hyperméthylé (311). En résumé, ce modèle permet d'identifier la capacité des molécules testées à moduler l'expression des gènes, et donc, à évaluer si elles détiennent des propriétés épigénétiques (Figure 36).

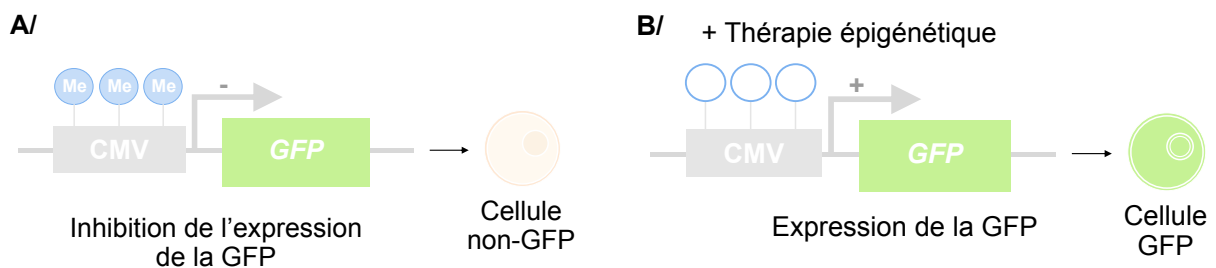


Figure 36: Schéma représentant la construction génétique du promoteur CMV suivi du gène GFP en absence (A) ou en présence (B) d'une thérapie épigénétique dans les cellules de cancers du colon et leurs conséquences sur les cellules.

Plus de 1000 médicaments approuvés par la FDA des États-Unis ont été criblés afin de découvrir s'ils détiennent des propriétés épigénétiques (311). Au total, 12 médicaments capables de réactiver l'expression de la GFP et donc, présentant des propriétés épigénétiques, ont été identifiés, dont 5 appartenant à la famille des GCs (311). Les GCs identifiés, classés selon leur potentiel épigénétique sont la proscillaridine A, la digitoxine, la digoxine, la ouabaine

et le lanatoside C (311). De plus, l'expression de 3 gènes suppresseurs de tumeurs normalement inhibés dans ces cellules de cancer de colon, sont exprimés en réponse aux traitements avec les GCs confirmant les activités épigénétiques de ces GCs (311).

3.3.2. Mécanisme d'action

Afin de comprendre comment les GCs modulent l'expression des gènes dans ce modèle, la modulation de différentes voies de signalisation épigénétiques en réponse aux GCs a été investiguée. Aucun changement de la méthylation de l'ADN sur les promoteurs des gènes n'a été mesuré ainsi qu'aucune modification post-traductionnelle des histones 3 et 4 (311). Toutefois, les GCs induisent un changement de la concentration calcique qui est responsable de l'activation de la kinase Ca^{2+} calmoduline (CAMK), dont l'activité est essentielle pour la réexpression des gènes suppresseurs de tumeurs (311). De plus, l'activation de la CAMK induit l'expulsion du noyau de la protéine qui se lie aux CpGs méthylés MECP2 et cela permettrait la réexpression des gènes suppresseurs de tumeurs en réponse aux GCs (311). Cette étude démontre donc que les flux de concentration calcique induit par les GCs seraient essentiels pour leurs activités épigénétiques (311).

II/ Hypothèses et objectifs

L'hypothèse générale de cette thèse est que la proscillaridine A détient des activités anticancéreuses différentielles selon les contextes cellulaires oncogéniques. Cette hypothèse se base sur le fait que jusqu'à présent, les études réalisées avec la proscillaridine A n'ont pas identifié clairement un mécanisme anticancéreux et à l'inverse, plusieurs mécanismes ont été suggérés selon les lignées cancéreuses étudiées. Pour étudier cette hypothèse, nous allons tout d'abord réaliser un criblage de la proscillaridine A dans un panel de lignées cancéreuses afin de discriminer les lignées cancéreuses les plus sensibles et les plus résistantes à ce médicament. Par la suite, nous allons essayer de déterminer les mécanismes anticancéreux de la proscillaridine A ainsi que ses mécanismes épigénétiques dans les lignées cancéreuses les plus sensibles. Pour finir, dans le but de proposer de nouvelles stratégies combinatoires anticancéreuses, nous allons étudier le potentiel combinatoire de la proscillaridine A avec le médicament épigénétique la décitabine.

1. Identification des lignées cancéreuses les plus sensibles à un traitement de proscillaridine A et caractérisation des mécanismes anticancéreux et épigénétiques.

À la suite de l'identification des activités épigénétiques de la proscillaridine A dans une étude précédente réalisée par le Dr. Raynal, nous avons voulu identifier les mécanismes sous-jacents à ses activités (311). Pour ce faire, nous avons tout d'abord criblé le potentiel anticancéreux de la proscillaridine A dans un panel de lignées cancéreuses afin d'identifier les lignées cellulaires cancéreuses les plus sensibles à ce médicament. Afin de déterminer le mécanisme d'action de la proscillaridine A dans ces cellules, nous avons utilisé des techniques transcriptomiques, comprenant le séquençage de l'ARN et des analyses de réactions en chaîne par polymérase en temps réel, des techniques protéomiques, comprenant des expériences d'immunobuvardage de type Western, et nous avons effectué des analyses bio-informatiques. Également, nous avons comparé certains mécanismes identifiés dans les lignées cellulaires sensibles à la proscillaridine A avec des lignées cellulaires plus résistantes à ce traitement. Pour valider les hypothèses émises dans nos études, nous avons re-constitué les différents contextes cellulaires observés dans des lignées cellulaires soit immortalisées, soit cancéreuses, en utilisant des transductions virales.

2. Études du potentiel combinatoire de la proscillaridine A avec la décitabine: identification du potentiel synergique des activités anticancéreuses et épigénétiques de ces deux médicaments.

La décitabine est un médicament approuvé pour le traitement des syndromes myélodysplasiques et son utilisation en combinaison avec différents médicaments, dont certains glycosides cardiotoniques, est étudiée dans plusieurs types de cancers. Dans le but de proposer des stratégies combinatoires anticancéreuses, nous avons étudié le potentiel combinatoire de la décitabine avec la proscillaridine A dans des lignées cellulaires sensibles et résistantes à la proscillaridine A. Pour cela, nous avons mesuré la viabilité cellulaire en réponse à différents types de combinaisons avec différents temps de traitements et concentrations. Nous avons calculé le score synergique de ces combinaisons en utilisant la méthode HSA. De plus, nous avons étudié le potentiel synergique de cette combinaison de médicaments à inhiber la formation de clones. Également, par des analyses d'immunobuvardage de type Western, nous avons étudié les mécanismes d'action potentiels activés par la combinaison de décitabine et de proscillaridine A. Pour finir, nous avons criblé le potentiel synergique de cette combinaison de médicaments à exacerber des activités épigénétiques.

III/ Résultats

1. Première publication

1.1. Introduction et mise en contexte du premier article

Les modifications épigénétiques, tels que la méthylation de l'ADN et les modifications post-traductionnelles des histones, jouent un rôle majeur dans l'établissement et le maintien du profil d'expression des gènes. Dans les cellules cancéreuses, l'épigénome est altéré ce qui conduit de façon générale à une inhibition de l'expression des gènes impliqués dans la différenciation cellulaire et à une surexpression des gènes impliqués dans la prolifération cellulaire (312). Depuis les dernières décennies, l'apparition de thérapies épigénétiques ciblant ses altérations permettent de rétablir l'expression de gènes suppresseurs de tumeurs et d'inhiber l'expression d'oncogènes (313). Différents médicaments ciblant la méthylation de l'ADN, tel que la décitabine, et l'acétylation des histones, tel que le vorinostat, ont été approuvés dans le traitement de cancers hématologiques (313, 314). Toutefois, lorsque les médicaments épigénétiques sont utilisés en monothérapie, la rémission complète des patients est de courte durée soulevant l'importance de potentialiser la réponse des patients aux thérapies épigénétiques en utilisant des approches combinatoire (315, 316).

Afin d'identifier de nouvelles stratégies combinatoires de thérapies épigénétiques synergiques, nous avons utilisé une lignée cellulaire de cancers de côlon transduite avec un promoteur CMV hyperméthylé subséquent d'un gène GFP (311). L'intensité lumineuse produite par les cellules exprimant la GFP en réponse à un traitement ou à une combinaison de traitement permet de mesurer le potentiel épigénétique des médicaments seuls ou en combinaison. Dans cette étude, nous avons mesuré le potentiel synergique des combinaisons simultanées ou séquentielles de la décitabine ou de la trichostatine A avec des médicaments approuvés par la FDA des États-Unis d'Amérique. Des études transcriptomiques et bio-informatiques sur la combinaison de médicaments la plus synergique ont permis d'identifier les mécanismes transcriptionnels spécifiques de la combinaison de médicaments en comparaison avec les monothérapies. Mon rôle dans cette étude a été de réaliser l'analyse et l'interprétation des données de séquençage de l'ARN.

Cette article a été publié dans la revue de littérature *Molecular Cancer Therapeutics* en 2016 (*Mol Cancer Ther* December 15 2016 **DOI:** 10.1158/1535-7163.MCT-16-0588).

1.2. Premier article

REPOSITIONING FDA-APPROVED DRUGS IN COMBINATION WITH EPIGENETIC DRUGS TO REPROGRAM COLON CANCER EPIGENOME

Noël J.-M. Raynal^{1,2}, Elodie M. Da Costa², Justin T. Lee¹, Vazganush Gharibyan³, Saira Ahmed³, Hanghang Zhang¹, Takahiro Sato¹, Gabriel G. Malouf⁴, and Jean-Pierre J. Issa¹

¹Fels Institute for Cancer Research and Molecular Biology, Temple University School of Medicine, 3307 North Broad Street, Philadelphia, PA, 19140, USA. ²Département de pharmacologie, Université de Montréal and Sainte-Justine University Hospital Research Center, 3175, Chemin de la Côte-Sainte-Catherine, Montréal (Québec) H3T 1C5, Canada. ³Department of Leukemia, The University of Texas MD Anderson Cancer Center, 1515 Holcombe Blvd., Houston, TX, 77030, USA. ⁴Department of Medical Oncology, Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière, University Pierre and Marie Curie (Paris VI), Institut Universitaire de cancérologie, AP-HP, Paris, France.

Note: Supplementary data for this article are available at Molecular Cancer Therapeutics Online (<http://mct.aacrjournals.org/>).

Corresponding Author: Noël J.-M. Raynal, Département de Pharmacologie, Université de Montréal, Centre de recherche de l'Hôpital Sainte-Justine, 3175, Chemin de la Côte-Sainte-Catherine, Montréal (Québec), H3T 1C5, Canada. Phone : (514) 345-4931 ext. 6763. Email : noel.raynal@umontreal.ca

Running title: High-throughput screening for epigenetic drug combinations

Key words: Drug repurposing, Drug combination, High-throughput drug screening, Epigenetic therapy

The authors declare no potential conflicts of interest.

Financial Information

This work was supported by NIH grants CA100632 and CA046939 to J-P J. Issa. J-P J. Issa is an American Cancer Society Clinical Research professor supported by a generous gift from the F. M. Kirby Foundation.

Abstract

Epigenetic drugs, such as DNA methylation inhibitors (DNMTi) or histone deacetylase inhibitors (HDACi), are approved in monotherapy for cancer treatment. These drugs reprogram gene expression profiles, reactivate tumor suppressor genes (TSG) producing cancer cell differentiation and apoptosis. Epigenetic drugs have been shown to synergize with other epigenetic drugs or various anticancer drugs. To discover new molecular entities that enhance epigenetic therapy, we performed a high-throughput screening using FDA-approved libraries in combination with DNMTi or HDACi. As a screening model, we used YB5 system, a human colon cancer cell line, which contains an epigenetically silenced *CMV-GFP* locus, mimicking TSG silencing in cancer. *CMV-GFP* reactivation is triggered by DNMTi or HDACi and responds synergistically to DNMTi/HDACi combination, which phenocopies TSG reactivation upon epigenetic therapy. GFP fluorescence was used as a quantitative readout for epigenetic activity. We discovered that 45 FDA-approved drugs (4% of all drugs tested) in our FDA-approved libraries enhanced DNMTi and HDACi activity, mainly belonging to anticancer and antiarrhythmic drug classes. Transcriptome analysis revealed that combination of decitabine (DNMTi) with the antiarrhythmic proscillaridin A, produced profound gene expression reprogramming which was associated with down-regulation of 153 epigenetic regulators, including two known oncogenes in colon cancer (*SYMD3* and *KDM8*). Also, we identified about 85 FDA-approved drugs that antagonized DNMTi and HDACi activity through cytotoxic mechanisms, suggesting detrimental drug interactions for patients undergoing epigenetic therapy. Overall, our drug screening identified new combinations of epigenetic and FDA-approved drugs, which can be rapidly implemented into clinical trials.

Introduction

Epigenetic alterations play major roles in establishing and maintaining aberrant gene expression profiles in cancer cells. Epigenetics is defined by molecular mechanisms, such as DNA methylation, histone modifications, nucleosome occupancy and miRNA, that are involved in heritable gene expression patterns (1). Advances in epigenetics have revealed the importance and the diversity of epigenetic proteins encompassing more than 300 enzymes and regulators (2,3). In cancer, the epigenome is characterized by hundreds of epigenetic abnormalities occurring at DNA methylation and chromatin levels. These epigenetic aberrations are caused by altered expression or mutations in epigenetic enzymes and regulators, which are implicated in unlimited cell proliferation, loss of cell differentiation, resistance to apoptosis and metastasis (1,4,5). A well-known example of epigenetic reprogramming in cancer cells is the silencing of tumor suppressor genes (TSG) and the activation of oncogenes (5). TSG silencing involves promoter DNA hypermethylation and repressive chromatin marks catalyzed by DNA methyltransferases (DNMTs) and by histone deacetylases (HDAC), respectively (5,6).

Targeting epigenetic alterations in cancer cells is a new frontier in drug discovery, which is referred to as epigenetic therapy. The efficacy of epigenetic drugs, such as DNMT inhibitors (DNMTi) azacitidine and decitabine or HDAC inhibitors (HDACi) vorinostat, romidespin and belinostat, has led to their approval as monotherapy, in hematological malignancies (5). These drugs induce gene expression changes in cancer cells, which results in cancer cell differentiation, apoptosis and recognition by the immune system (5). Epigenetic drugs, when used in monotherapy, produce complete responses in a subset of patients and remissions are generally of short duration (7,8). Strategies are being explored to improve the efficacy of epigenetic drugs by increasing epigenetic drug specificity and using combination strategies.

It is well known that epigenetic drugs can produce synergistic responses when used in combination with other epigenetic drugs, chemotherapy, immunotherapy or targeted drugs. Early preclinical studies have focused on the combination of DNMTi and HDACi which produced concomitant synergistic reactivation of TSG and anticancer effects (9). The goal of this approach is to relieve epigenetic silencing mechanisms associated with TSG silencing to produce a robust epigenetic reprogramming in cancer cells. Several combinations of DNMTi and HDACi have been identified in preclinical studies and are currently tested in clinical trials (10,11). With the development of new epigenetic agents targeting histone methyltransferases, histone

demethylases or bromodomains, novel synergistic combinations are being explored with DNMTi and/or HDACi (12-15). The combination of epigenetic drugs with standard chemotherapy, targeted drugs or immunotherapy is also a promising avenue. The rationale behind these combinatorial treatments is to use epigenetic drugs to lower apoptotic threshold, reverse drug resistance, or induce immunological responses (16-19). For example, synergistic combinations were reported with chemotherapeutic drugs (retinoic acids, cisplatin, carboplatin, and clofarabine); with targeted drugs such as erlotinib; and with immunotherapy (interleukin-2) (20-26). The potential of epigenetic drugs to synergize with a variety of anticancer approaches may be related to the high number of molecular targets associated with epigenetic dysregulation in carcinogenesis (3).

In multifactorial diseases such as cancer, there is strong rationale for the development of drug combinations over single-drug approaches, where combinational therapies are likely to be more effective than monotherapy (27). High-throughput screenings (HTS) based on phenotypic (cytotoxicity) or target-based assays are commonly used in drug discovery. Despite the availability of HTS approaches that can be used in combinatorial setting, the majority of HTS studies involve single drug screening, potentially missing the discovery of positive synergistic drug interactions. Innovative technologies suitable for combinatorial HTS are needed to accelerate drug development.

A promising strategy for drug development is to screen approved drugs for novel indications, a process called drug repositioning or repurposing (28). FDA-approved drug libraries can be used in combinatorial HTS which allows screening a wide diversity of molecular combinations. Conventional drug discovery takes an average of 13 years prior to approval and as much as US\$ 1.8 billion. Drug repositioning may lead to faster approval and at lower costs, since FDA-approved drugs have successfully passed costly toxicological studies and their pharmacodynamic and pharmacokinetic properties are well-characterized.

To perform a combinatorial epigenetic HTS, we used YB5 cell-based system (29,30). This human colon cancer cell line is derived from SW48 cells, in which a single transgene was inserted containing green fluorescent protein (*GFP*) gene. *GFP* is driven by a cytomegalovirus (*CMV*) promoter, which is epigenetically silenced by promoter DNA hypermethylation and condensed chromatin marked by H3K27 trimethylation and loss of H3K9 acetylation (29,30). These epigenetic marks result in a stable silencing of *GFP* expression in 99.9% of YB5 cells. We

previously demonstrated that DNMTi and HDACi trigger *GFP* expression, which phenocopies endogenous TSG reactivation induced by epigenetic therapy (29,30). After DNMT inhibition, *GFP* expression was dependent on both promoter DNA demethylation and chromatin gain of active marks (29). HDACi also reactivate *GFP* expression by switching chromatin repressive signals into active marks in the promoter region without changing DNA methylation (30). YB5 system is a model suitable for combinatorial HTS since *GFP* expression responds synergistically to the combination of DNMTi and HDACi, to a similar extent as endogenous TSG (29). Recently, YB5 cell-based system was used in a HTS to discover new epigenetic drugs among FDA-approved drug libraries in monotherapy. We have reported that a dozen of FDA-approved drugs exhibited unsuspected epigenetic and anticancer effects with promising repositioning potential (31).

Here, we used YB5 cells to screen FDA-approved drug libraries in sequential or simultaneous combination with DNMTi decitabine and HDACi trichostatin A (TSA) (32). This epigenetic HTS revealed new combinations between DNMTi or HDACi and FDA-approved drugs that can be rapidly tested into new clinical trials. We described specifically that one of these combinations produced a profound transcriptome cell reprogramming by targeting the down-regulation of epigenetic regulators with oncogenic activities in colon cancer. In addition, the results also revealed a list of FDA-approved drugs that antagonize DNMTi and HDACi activity, whose interaction should be carefully considered in patients treated with these epigenetic drugs.

Materials and Methods

Cell-based drug screening system

YB5 cell-based system was used as a platform for epigenetic drug screening. YB5 cells are derived from human colon cancer cell line SW48, as previously described (29,30). YB5 cells were authenticated at MD Anderson Cancer Center genomic core facility by DNA fingerprinting prior drug screening and validation experiments. YB5 cells have a single insertion of a DNA hypermethylated cytomegalovirus (*CMV*) promoter driving green fluorescent protein (*GFP*) gene. *GFP* expression is silenced in >99.9% of YB5 cells because *CMV* promoter has more than 90% cytosine DNA methylation, which is embedded into repressive chromatin with histone deacetylation, histone methylation repressive marks and nucleosome density around the transcriptional start site. YB5 cell line is cultured in L-15 medium supplemented with 10% fetal bovine serum and grown in log phase in 1% CO₂ atmosphere, as previously described (29-31).

FDA-approved drug libraries and drug treatments

FDA-approved drug libraries were purchased at MS Discovery (US Drug collection library with 1040 drugs) or obtained from the NCI-Developmental Therapeutics Program (Combo Plate 3948/99 containing 77 drugs, NCI Oncology Drug sets with 89 drugs). A total of 1,206 drugs were screened. Because of redundancy between drug libraries, 1,118 unique FDA-approved drugs were screened in our libraries (Supplementary Fig. S1). Drugs are dissolved in DMSO in 96 well-plate format and were kept at -80°C before use. YB5 cells were grown in log-phase in 96 well-plates and treated with drug libraries ($n \geq 1$) with 3 different schedules (Fig.1A). First schedule was a sequential combination with decitabine at 50 nM for 72h followed by treatment with FDA-approved drugs at 50 μ M for 24h prior to flow cytometry analysis. The second HTS was a simultaneous combination with 50 nM decitabine concomitantly with FDA-approved drugs at 10 μ M for 72h followed by 24h without drug treatment prior to flow cytometry analysis. The third HTS was a sequential combination of FDA-approved drugs at 10 μ M for 72h followed by HDACi trichostatin A (TSA) at 0.2 μ M for 24h prior flow cytometry analysis. Drugs and media were replaced every day. The results were compared with single drug screens with FDA-approved drug libraries (10 μ M for 72h or 24h at 50 μ M prior to flow cytometry analysis), as previously reported (31). Each experimental 96-well plate contained 80 different drug treatments. In addition, we included in each 96-well plate 16 controls for untreated cells (4

wells), for decitabine in monotherapy (50 nM, 72h, 4 wells), for TSA in monotherapy (0.2 μ M, 24h, 4 wells), and 4 wells of sequential combination of decitabine (50 nM, 72h) followed by TSA (0.2 μ M, 24h). For validation purposes, drugs were purchased at Sigma-Aldrich.

Flow cytometry for epigenetic *GFP* reactivation and data analysis

After drug treatments, YB5 cells were trypsinized in 96-well plates for 15 minutes and resuspended in L-15 media containing propidium iodide (PI) to stain for dead cells. Fluorescence obtained by GFP expression and PI staining were measured by flow cytometry using BD LSR II flow cytometer with a 96 well-plate adapter. A total of 10,000 cells were analyzed per well. Validations were performed using Millipore Guava flow cytometer (EMD, Millipore). All autofluorescent drugs (such as antimalarials) were removed from the analysis because autofluorescence creates a false positive signal that bleaches into GFP channel. Autofluorescent drugs were defined as those drugs producing more than 8% of the cells positive for both PI and GFP fluorescence, as previously described (31). All screening data were expressed as a GFP ratio which was calculated as follows: $\text{GFP ratio} = \frac{\text{GFP fluorescence of drug combination}}{\text{GFP fluorescence of epigenetic drug alone}}$ (either decitabine or TSA). GFP signals of decitabine or TSA were obtained in the control wells in the same 96-well plate as the GFP signals obtained for the combination. PI fluorescence was plotted against GFP ratios to evaluate the effects of cytotoxic drugs in combination with epigenetic drugs.

Transcriptome, and gene ontology pathway analysis

For transcriptome analysis by RNA-sequencing, YB5 cells were treated with decitabine at 100 nM for 48h with or without 50 nM proscillaridin A for an additional 48h. RNA was isolated using Rneasy Mini Kit (Qiagen). Strand-specific RNA libraries were generated from 1 μ g of RNA using TruSeq stranded total RNA with Ribo-Zero Gold (Illumina). Sequencing was performed at Fox Chase Cancer Center genome facility (Temple University) using single end reads (50bp, average 50 million reads per sample) on the HiSeq2500 platform from Illumina. Sequenced reads were aligned to the hg19 genome assembly using TopHat2. Expression level and fold change of each treatment group was evaluated using edgeR (33). Differentially expressed genes were defined by at least two-fold change compared to control and a q-value lower than 0.1. Gene ontology analyses were performed using Metascape (34). RNA sequencing

data were deposited in the Gene Expression Omnibus (GEO) database with the accession number GSE89154.

Statistical analysis

One-way ANOVA was used for statistical analysis and *P* value was evaluated by the Tukey–Kramer Multiple Comparison Test. Statistics and graphs were made using GraphPad Prism[®] software.

Results

Combinatorial drug screening results

YB5 system was used to screen among 1,118 FDA-approved drugs to discover combinations that enhances GFP reactivation induced by epigenetic drugs decitabine and TSA. Three combinations were tested: 1) sequential combination with decitabine at 50 nM for 72h, followed by 24h exposure with FDA-approved drugs at 50 μ M before flow cytometry analysis; 2) simultaneous combination for 72h with decitabine (50 nM) and FDA-approved drugs (10 μ M) followed by 24h without treatment prior to analysis; and 3) sequential combination with TSA, in which YB5 cells were treated with FDA-approved drugs at 10 μ M for 72h followed by 24h exposure to TSA at 200 nM before flow cytometry analysis (Fig. 1A). Dose and schedule chosen for decitabine and TSA treatments were selected to allow the detection of synergistic interactions. Low doses of each epigenetic drug alone produced GFP reactivation in less than 20% of YB5 cells. Their sequential combination produced synergistic GFP reactivation in around 60% of the YB5 cells (Supplementary Fig. S2A). Sequential or simultaneous combinations with decitabine have been chosen to discover drugs that enhance its activity similarly to HDACi (9). Sequential combination with HDACi was performed to discover new drugs that produce synergistic interaction such as the one observed with decitabine (9). In this case, cells were treated with drug libraries followed by TSA. This sequence order was chosen since decitabine treatment followed by TSA produces synergistic responses (9). The opposite sequence order was not selected since HDACi followed by decitabine produced antagonistic effects due to HDACi-induced cell cycle arrest, which blocked the activity of S-phase specific drugs such as decitabine (35,36). For each drug combination, a GFP ratio was calculated using the percentage of YB5 cells expressing GFP in the combinatorial treatment divided by the percentage of YB5 cells expressing GFP after decitabine or TSA in monotherapy. Positive hits (synergistic) or negative hits (antagonistic) were determined as drug combinations producing a GFP ratio above or below GFP ratio of 1 plus or minus 3 standard deviations, respectively (Fig 1B-D).

Sequential HTS with decitabine identified 31 drugs that increased GFP expression induced by decitabine (up to 4-fold) and 37 drugs that antagonized and even completely abolished its activity (Fig. 1B). Among top hits, epigenetic drugs azacitidine (DNMTi) and vorinostat (HDACi) had GFP ratios of 3.75 and 3.31, respectively, which validated our combinatorial HTS.

We identified as positive hits all 4 antiarrhythmic drugs present in the libraries, belonging to the cardiac glycoside sub-family (ouabain, digoxin, digitoxin and proscillaridin A) suggesting a class effect. In addition, the combination with arsenic trioxide produced a 3-fold increase in GFP ratio. Other drug combinations involving several antibacterials and antidiabetic drugs (phenformin and acetohexamide) induced decitabine activity with a GFP ratio up to 2.5-fold. Interestingly, out of the 31 positive combinations, 21 drugs (68%) did not induce GFP reactivation as single treatment, as previously described (31).

In simultaneous combinations with decitabine, 9 drugs increased decitabine effects (up to 2.5-fold), while 69 drugs reduced GFP expression (Fig. 1C). In this combination, all positive hits, except decitabine did not induce GFP reactivation in our single drug screen (31). The range of GFP ratio, among positive hits, was between 2.2 to 2.57-fold.

In combination with TSA, GFP expression was induced up to 12-fold by 9 drugs, whereas 30 drugs decreased GFP expression induced by TSA (Fig. 1D). Nine hits were identified, including decitabine and azacitidine with GFP ratios of 13.27 and 6.69, further validating the screening system. Among the other 7 hits, 3 anticancer drugs enhanced TSA activity. These drugs encompassed methotrexate, pemetrexed and sorafenib, which produced GFP ratios between 2.9 to 4.2. Interestingly, these anticancer drugs did not produce GFP reactivation alone in YB5 cells (31). Similarly to the HTS with decitabine, antiarrhythmic drugs, digitoxin and digoxin enhanced TSA epigenetic activity.

Validation experiments on selected combinations confirmed our HTS results. For instance, the sequential combination with decitabine and cardiac glycosides (proscillaridin A and digitoxin) or the anticancer drug arsenic trioxide (Fig. 1 E-F; Supplementary Fig. S2B-C). All FDA-approved drugs, that enhanced GFP expression induced by decitabine or TSA, are listed in Table 1. Altogether, these 3 HTS revealed that about 45 FDA-approved drugs enhanced the activity of epigenetic drugs such as DNMTi and HDACi. Some of these drugs represent interesting candidates for drug repositioning, particularly, the class of antiarrhythmic drugs.

Decitabine and proscillaridin A combination reactivated genes associated with calcium signaling and decreased epigenetic genes with oncogenic activity.

To further explore the repositioning potential of antiarrhythmic drugs in combination with decitabine, we selected the cardiac glycoside proscillaridin A, which was the most active in our

validation experiments (Fig. 1E). To characterize the epigenetic effects of the combination between decitabine and proscillaridin A, we measured drug-induced transcriptome changes by RNA-sequencing. First, we defined the optimal experimental condition by treating YB5 cells with various doses and schedules of decitabine and proscillaridin A and measured GFP reactivation by flow cytometry. Maximal GFP reactivation was obtained after the sequential combination of decitabine at 100 nM for 48h followed by proscillaridin A at 50 nM for 48h (Supplemental Fig. S3). RNA-sequencing was performed for drug combination, single drug treatments and untreated cells.

Venn diagram analysis on up-regulated genes (fold change >2 and FDR <0.01) showed that proscillaridin A induced the reactivation of 5,622 genes while decitabine alone reactivated 248 genes (Fig. 2A). The combination produced the reactivation of 5,891 genes which were mainly caused by the effect of proscillaridin A treatment. Indeed, 87% of the genes (5,159 genes) were shared between the combination and the proscillaridin A treatment. Venn diagram analysis on down-regulated genes (fold change <0.5 and FDR <0.01) showed a potent effect of proscillaridin A alone which decreased the expression of 5,277 genes (Fig. 2B). Decitabine decreased only 2 genes in these conditions. The combinatorial treatment produced a down-regulation of 5,187 genes and the majority of them (95%, 4,928 genes) were down-regulated by proscillaridin A alone. Therefore, our transcriptome analysis showed that proscillaridin induced a potent reprogramming, which was mainly driving gene expression changes in the combination treatment for either up- or down-regulated genes.

To determine the impact of gene expression changes, we performed gene ontology (GO) analysis using Metascape (34). First, we focused our analysis on up-regulated genes. Among 460 genes specifically up-regulated by proscillaridin A (non-overlapping to other treatments), Metascape analysis revealed that gene expression involved in metal ion transport was increased (Supplemental Fig. S4A). In this gene set, we identified a series of 22 up-regulated genes (from 2 to 7-fold), which were associated with GO-Terms associated with calcium pathways (Fig. 2C; list of GO-Term in Supplementary Table S1). The effects of proscillaridin A on the calcium signalling were corroborated by our recent report, demonstrating that epigenetic changes can be triggered by drugs targeting calcium signaling (31). Among 693 genes up-regulated (from 2 to 6-fold) specifically by the combination (non-overlapping to other treatments), Metascape analysis also showed an increase in expression in calcium ion transport genes. Specifically, 13 genes

belonged to GO-Terms related to calcium pathways, further reinforcing the importance of calcium signaling in the epigenetic effects triggered by proscillaridin A alone or in combination with decitabine (Fig. 2D; Supplemental Fig. S4B, list of GO-Term in Supplementary Table S1).

Since most of the differentially expressed genes were shared between the treatment of proscillaridin A and the combination, we asked whether gene expression levels (i.e., fold changes) would differ between the combination and the treatment with proscillaridin A alone. We analyzed fold change ratios in gene expression between the combination and proscillaridin A. Among 5,043 genes, only two genes (*ANKRD20A12P* and *TIMP3*) had a more than 2-fold expression increase in the combination as compared to the single drug treatment. Among up-regulated genes shared between the 3 conditions (overlapping genes between decitabine, proscillaridin A and combination), less than 0.1% doubled their expression levels in the combinatorial treatments, also confirming that the effects observed in the combination were mostly driven by the effects of proscillaridin A treatment.

We then focused our analysis on down-regulated genes. Interestingly, the expression levels of almost half of these genes (2,163 genes) were more down-regulated specifically in the combination (up to 3.7-fold) as compared to proscillaridin A alone. Metascape analysis demonstrated that 153 of those were associated with GO-Terms belonging to epigenetic pathways (list of GO-Term in Supplementary Table S2). Most down-regulated genes specifically in the combination as compared to proscillaridin A alone belonged to chromatin modifiers such as *INO80B*, *HDAC8*, *SMYD3*, *HMGN3*, and *KDM8* (Fig. 2E). Interestingly, *SMYD3* and *KDM8* were recently identified by others as potent oncogenes in colorectal cancer (37,38). These data highlight the epigenetic component of the combination between decitabine and proscillaridin A that down-regulates epigenetic pathways specifically involved in colon cancer development.

Epigenetic activity as single drugs is not a prerequisite to enhance DNMTi or HDACi

We next asked whether minimal epigenetic activity is a requirement for any drug to enhance epigenetic drug activity. To answer this question, we compared GFP ratios of combination treatment with decitabine and TSA to the percentage of GFP expressing cells measured in single drug HTS (31). Cut-off values for GFP positivity in single drug screening was established at 2.2% of YB5 cells expressing GFP as previously reported (shown by vertical grey dotted lines; Fig 3A-C) (31). We found that the number of positive hits in the combinatorial HTS was equally

distributed above and below the cut-off for GFP positivity in single drug screening suggesting that epigenetic activity is not required for drugs to enhance DNMTi or HDACi.

In sequential combination with decitabine (31 hits identified), most drugs producing synergistic GFP reactivation were drugs lacking the ability to induce GFP reactivation in monotherapy (Fig. 3A). Only 10 drugs (32%) induced GFP activity as single agent, as previously reported (31). In simultaneous combination with decitabine, all hits (n=9), except one (decitabine), did not produce GFP reactivation activity when used in monotherapy (Fig. 3B). In sequential combination with TSA, all 9 positive hits produced synergistic GFP ratio including 5 drugs, which produced GFP reactivation in monotherapy (Fig. 3C). Two of those, decitabine and azacitidine were excluded from the graph since their synergistic interaction with HDACi is well-characterized (29). Interestingly, pre-treatment with 4 FDA-approved drugs (methotrexate, pemetrexed, bromocriptine mesylate, and sorafenib) enhanced TSA-induced GFP reactivation but these drugs lacked epigenetic effects in monotherapy. Therefore, the data showed that synergistic responses obtained in our combinatorial HTS with decitabine or TSA are achievable by several types of FDA-approved drugs, where epigenetic activity in monotherapy is not required.

Identification of antiarrhythmic and anticancer drugs that synergize with epigenetic therapies

We then asked whether we could identify specific drug classes that enhance epigenetic activities of DNMTi or HDACi. We grouped the drugs by medical classes and compared the percentage of GFP positive cells in the combination treatments to the single drug screening previously published (31). In these analyzes, we removed epigenetic drugs contained in the libraries. In the sequential HTS with decitabine, drug classes producing the most striking synergistic responses belonged to the antiarrhythmic class, mainly represented by cardiac glycosides and the anticancer drugs (Fig. 3D). Interestingly, other groups of drugs, such as antiparasitics, antiinfectives and antidiabetics also produced potent GFP reactivation as compared to decitabine alone. Synergistic combination in simultaneous HTS with decitabine was achieved mainly by antiinfective drugs (Fig. 3E). In the combinatorial screen with TSA, anticancers and antiarrhythmics were drug classes producing synergistic GFP reactivation (Fig. 3F). In this case, the anticancer drug group encompassed two antifolate drugs (methotrexate and pemetrexed).

Since folate contribute to production of S-adenosylmethionine, the donor moiety for methylation reactions, it is likely that antifolate drugs may influence DNA methylation content, thereby enhancing HDACi activity. Overall, the data suggest that several drug classes, mainly antiarrhythmic and anticancer drugs, synergize with epigenetic therapy suggesting new possible drug combinations that can be evaluated in clinical trials.

FDA-approved drugs producing cytotoxicity antagonize DNMTi or HDACi epigenetic effects

We found that some FDA-approved drugs blocked or interfered the epigenetic effects of DNMTi or HDACi (Fig. 1 B-D). This observation revealed potential antagonist drug interactions, which can be deleterious for cancer patients undergoing epigenetic therapy who are being prescribed several drugs simultaneously. Indeed, the HTS identified a series of 85 drugs that reduced or blocked GFP expression induced by decitabine or TSA (Table 2 and Supplementary Table S3-5). The use of these drugs in the clinics may decrease the epigenetic effects of decitabine or TSA in cancer patients.

We analyzed the drugs that decreased GFP expression induced with DNMTi or HDACi by 3 standard deviations. Antagonistic drugs were grouped according to their drug functions. In sequential combination with decitabine, we identified 7 drug classes that repressed GFP expression, while 3 classes were identified in simultaneous combination (Fig. 4A-B). In sequential combination with TSA, we found 4 drug classes that repressed GFP reactivation (Fig. 4C). In all three combinatorial drug screens, antibiotics and anticancer drugs were commonly identified as antagonistic drug classes (Fig. 4A-C, Table 2 and Supplementary Table S3-S5). Interestingly, in all HTS, 3 drugs, nitrogen mustard, mechlorethamine, and dactinomycin, completely abolished GFP expression. These drugs belong to the cytotoxic chemotherapy drug class, which are known to trigger cell cycle block and apoptosis. These results confirm the notion that drugs inducing cytotoxicity or blocking cell cycle antagonize the effect of epigenetic drugs (5). The effect of cytotoxic drugs to GFP expressing cells could be due to a decreased ability to maintain GFP activation or alternatively to an increased cell toxicity. Since the percentage of GFP positive cells is specifically decreased when YB5 cells were exposed to cytotoxic drug combinations, it is possible that the epigenetic treatments reversed some drug-resistance mechanisms causing a lower apoptosis threshold specifically among GFP positive cell

population. Such effects could be beneficial to cancer treatment by using epigenetic therapy to increase cancer cell sensitivity to chemotherapeutic agents without causing more side effects.

To further analyze these results, we compared the percentage of dead cells (measured by propidium iodide staining) obtained after HTS either in monotherapy or in combination. Average percentage of dead cell was calculated for drug combinations producing GFP ratios below 3 standard deviations of the average GFP value (referred as low levels of GFP ratio), above 3 standard deviations of the average GFP value (referred as high levels of GFP ratio) and between 3 standard deviation limits of the average GFP value (referred as no variation in GFP ratio) in monotherapy or combinatorial HTS (31). In sequential combination with decitabine, there was no significant difference in dead cell percentage between single or combination groups suggesting that toxic drugs in monotherapy can produce synergistic GFP reactivation in combination with decitabine. Comparison among GFP ratio categories showed that drug combinations producing low GFP ratios exhibited a significantly high number of dead cells compared to other groups ($P < 0.001$; Fig. 4D). Similar results were obtained in the simultaneous combination screen with decitabine, where drug combinations in low GFP ratio category were significantly more toxic as compared to the groups ($P < 0.05$; Fig. 4E). However, the percentage of dead cells did not significantly change in the sequential treatment with TSA following FDA-approved drug treatments (Fig. 4F). Overall, these data validate in a large drug collection that cytotoxic drugs, such as anticancer drugs or antibiotics can blunt the epigenetic effects of DNMTi or HDACi.

Discussion

Drug discovery in oncology has focused on the development of single molecular entities with well-defined mechanism of action. However, cancer treatment is highly dependent on drug combinations. Thus, combinatorial drug screening is an approach that can be used to discover new combinations that are more likely to bring clinical benefits for oncology patients. In order to accelerate drug discovery, screening among FDA-approved drug libraries, a process called drug repositioning, has been shown to be an effective strategy in oncology (27). Drug repositioning has several advantages compared to classical drug development including cheaper, faster and safer preclinical and clinical validation steps (27).

Here, we described combinatorial HTS using FDA-approved libraries in association with DNMTi and HDACi to discover new epigenetic drug combinations in colon cancer. We used YB5 cell line system which responds quantitatively to epigenetic drug combinations by the induction of GFP, as a surrogate epigenetically silenced TSG (29-31). The rationale to target epigenetic abnormalities in colon cancer is justified by the importance of DNA methylation alterations (characterized by cases harboring high levels of DNA methylation called CpG Island Methylator Phenotype) and chromatin alterations in this malignancy (5,39). Combinations between DNMTi decitabine and antiarrhythmics or anticancer drugs were the most potent combination in this screen. Particularly, proscillaridin A and arsenic trioxide produced synergistic GFP reactivation in sequential combination (31). These drug combinations demonstrate promising activity which should be investigated in clinical trials against colon cancer. Interestingly, the combination of decitabine with arsenic trioxide is currently the focus of several clinical trials (NCT00671697, NCT02188706, NCT02190695) against acute myelogenous leukemia and myelodysplastic syndromes (40). We focused on the understanding of the epigenomics effects of the combination of DNMTi decitabine and proscillaridin A. This combination produced a potent epigenetic reprogramming in colon cancer cells, highlighted by hundreds of differentially expressed genes. Importantly, this combination is targeting calcium signaling which we previously linked to epigenetic therapeutic effects (31). In addition, this combination specifically down-regulated around 150 genes involved in epigenetic reprogramming which may explain why thousands of genes are differentially regulated by the treatment. More precisely, this combination induced a pronounced down-regulation of epigenetic modifiers with oncogenic properties in colon cancer such as *SMYD3* and *KDM8* (37,38).

A novel finding arising from these combinatorial HTS is that epigenetic synergy could be obtained in our model with drug combinations involving FDA-approved drugs lacking epigenetic activity. This finding paves the way for new epigenetic drug combinations and justifies our rationale for combinatorial HTS. Interestingly, we also noted that synergistic GFP reactivation was dependent on cell viability immediately after treatment. Indeed, drug combinations (at the selected dose level in these HTS) that produced elevated cell kills did not allow GFP reactivation.

We conclude that combinatorial HTS is a promising strategy for a drug discovery in oncology. Investigation of FDA-approved libraries in combination with epigenetic drugs allows us to propose new drug combinations for clinical trials. Here, we have focused on the combination of decitabine and proscillaridin A, which holds promising effects in down-regulating oncogenic signals carried by specific epigenetic modifiers in colon cancer. More studies are needed to explore these epigenetic combinations reported in colon cancer and other malignancies as a source for new epigenetic drug combinations. Finally, these 3 HTS also suggest potential detrimental drug interactions that should be carefully considered for patients treated with epigenetic drugs.

References

1. Baylin SB, Jones PA. A decade of exploring the cancer epigenome - biological and translational implications. *Nat Rev Cancer* 2011;11:726-34.
2. Jones PA, Baylin SB. The epigenomics of cancer. *Cell* 2007;128:683-92.
3. Huston A, Arrowsmith CH, Knapp S, Schapira M. Probing the epigenome. *Nat Chem Biol* 2015;11:542-5.
4. You JS, Jones PA. Cancer genetics and epigenetics: two sides of the same coin? *Cancer Cell* 2012;22:9-20.
5. Taby R, Issa JP. Cancer epigenetics. *CA Cancer J Clin* 2010;60:376-92.
6. Kondo Y, Shen L, Cheng AS, Ahmed S, Boumber Y, Charo C, et al. Gene silencing in cancer by histone H3 lysine 27 trimethylation independent of promoter DNA methylation. *Nat Genet* 2008;40:741-50.
7. Estey EH. Epigenetics in clinical practice: the examples of azacitidine and decitabine in myelodysplasia and acute myeloid leukemia. *Leukemia* 2013;27:1803-12.
8. Falkenberg KJ, Johnstone RW. Histone deacetylases and their inhibitors in cancer, neurological diseases and immune disorders. *Nat Rev Drug Discov* 2014;13:673-91.
9. Cameron EE, Bachman KE, Myohanen S, Herman JG, Baylin SB. Synergy of demethylation and histone deacetylase inhibition in the re-expression of genes silenced in cancer. *Nat Genet* 1999;21:103-7.
10. Kirschbaum M, Gojo I, Goldberg SL, Bredeson C, Kujawski LA, Yang A, et al. A phase 1 clinical trial of vorinostat in combination with decitabine in patients with acute myeloid leukaemia or myelodysplastic syndrome. *Br J Haematol* 2014;167:185-93.
11. Juergens RA, Wrangle J, Vendetti FP, Murphy SC, Zhao M, Coleman B, et al. Combination epigenetic therapy has efficacy in patients with refractory advanced non-small cell lung cancer. *Cancer Discov* 2011;1:598-607.
12. Momparler RL, Idaghdour Y, Marquez VE, Momparler LF. Synergistic antileukemic action of a combination of inhibitors of DNA methylation and histone methylation. *Leuk Res* 2012;36:1049-54.
13. Bhadury J, Nilsson LM, Muralidharan SV, Green LC, Li Z, Gesner EM, et al. BET and HDAC inhibitors induce similar genes and biological effects and synergize to kill in Myc-induced murine lymphoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 2014;111:2721-30.
14. Fiskus W, Sharma S, Shah B, Portier BP, Devaraj SG, Liu K, et al. Highly effective combination of LSD1 (KDM1A) antagonist and pan-histone deacetylase inhibitor against human AML cells. *Leukemia* 2014;28:2155-64.
15. Fiskus W, Wang Y, Sreekumar A, Buckley KM, Shi H, Jillella A, et al. Combined epigenetic therapy with the histone methyltransferase EZH2 inhibitor 3-deazaneplanocin A and the histone deacetylase inhibitor panobinostat against human AML cells. *Blood* 2009;114:2733-43.
16. Owonikoko TK, Ramalingam SS, Kanterewicz B, Balius TE, Belani CP, Hershberger PA. Vorinostat increases carboplatin and paclitaxel activity in non-small-cell lung cancer cells. *Int J Cancer* 2010;126:743-55.
17. Bachmann PS, Piazza RG, Janes ME, Wong NC, Davies C, Mogavero A, et al. Epigenetic silencing of BIM in glucocorticoid poor-responsive pediatric acute lymphoblastic leukemia, and its reversal by histone deacetylase inhibition. *Blood* 2010;116:3013-22.

18. Wrangle J, Wang W, Koch A, Easwaran H, Mohammad HP, Vendetti F, et al. Alterations of immune response of Non-Small Cell Lung Cancer with Azacytidine. *Oncotarget* 2013;4:2067-79.
19. Li H, Chiappinelli KB, Guzzetta AA, Easwaran H, Yen RW, Vatapalli R, et al. Immune regulation by low doses of the DNA methyltransferase inhibitor 5-azacitidine in common human epithelial cancers. *Oncotarget* 2014;5:587-98.
20. Qin T, Si J, Raynal NJ, Wang X, Gharibyan V, Ahmed S, et al. Epigenetic synergy between decitabine and platinum derivatives. *Clin Epigenetics* 2015;7:97.
21. Lainey E, Wolffromm A, Marie N, Enot D, Scoazec M, Bouteloup C, et al. Azacytidine and erlotinib exert synergistic effects against acute myeloid leukemia. *Oncogene* 2013;32:4331-42.
22. Gollob JA, Sciambi CJ, Peterson BL, Richmond T, Thoreson M, Moran K, et al. Phase I trial of sequential low-dose 5-aza-2'-deoxycytidine plus high-dose intravenous bolus interleukin-2 in patients with melanoma or renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 2006;12:4619-27.
23. Schwartzmann G, Schunemann H, Gorini CN, Filho AF, Garbino C, Sabini G, et al. A phase I trial of cisplatin plus decitabine, a new DNA-hypomethylating agent, in patients with advanced solid tumors and a follow-up early phase II evaluation in patients with inoperable non-small cell lung cancer. *Invest New Drugs* 2000;18:83-91.
24. Glasspool RM, Brown R, Gore ME, Rustin GJ, McNeish IA, Wilson RH, et al. A randomised, phase II trial of the DNA-hypomethylating agent 5-aza-2'-deoxycytidine (decitabine) in combination with carboplatin vs carboplatin alone in patients with recurrent, partially platinum-sensitive ovarian cancer. *Br J Cancer* 2014;110:1923-9.
25. Kadia TM, Faderl S, Ravandi F, Jabbour E, Garcia-Manero G, Borthakur G, et al. Final results of a phase 2 trial of clofarabine and low-dose cytarabine alternating with decitabine in older patients with newly diagnosed acute myeloid leukemia. *Cancer* 2015;121:2375-82.
26. 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;54:21-8.
27. Bertolini F, Sukhatme VP, Bouche G. Drug repurposing in oncology--patient and health systems opportunities. *Nat Rev Clin Oncol* 2015;12:732-42.
28. Blatt J, Corey SJ. Drug repurposing in pediatrics and pediatric hematology oncology. *Drug Discov Today* 2013;18:4-10.
29. Si J, Boumber YA, Shu J, Qin T, Ahmed S, He R, et al. Chromatin remodeling is required for gene reactivation after decitabine-mediated DNA hypomethylation. *Cancer Res* 2010;70:6968-77.
30. Raynal NJ, Si J, Taby RF, Gharibyan V, Ahmed S, Jelinek J, et al. DNA methylation does not stably lock gene expression but instead serves as a molecular mark for gene silencing memory. *Cancer Res* 2012;72:1170-81.
31. Raynal NJ, Lee JT, Wang Y, Beaudry A, Madireddi P, Garriga J, et al. Targeting Calcium Signaling Induces Epigenetic Reactivation of Tumor Suppressor Genes in Cancer. *Cancer Res* 2016;76:1494-505.
32. Monneret C. Histone deacetylase inhibitors. *Eur J Med Chem* 2005;40:1-13.
33. Robinson MD, McCarthy DJ, Smyth GK. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics* 2010;26:139-40.

34. Tripathi S, Pohl MO, Zhou Y, Rodriguez-Frandsen A, Wang G, Stein DA, et al. Meta- and Orthogonal Integration of Influenza "OMICs" Data Defines a Role for UBR4 in Virus Budding. *Cell Host Microbe* 2015;18:723-35.
35. Griffiths EA, Gore SD. DNA methyltransferase and histone deacetylase inhibitors in the treatment of myelodysplastic syndromes. *Semin Hematol* 2008;45:23-30.
36. Gore SD, Baylin S, Sugar E, Carraway H, Miller CB, Carducci M, et al. Combined DNA methyltransferase and histone deacetylase inhibition in the treatment of myeloid neoplasms. *Cancer Res* 2006;66:6361-9.
37. Zhang R, Huang Q, Li Y, Song Y, Li Y. JMJD5 is a potential oncogene for colon carcinogenesis. *Int J Clin Exp Pathol* 2015;8:6482-9.
38. Sarris ME, Moulos P, Haroniti A, Giakountis A, Talianidis I. Smyd3 Is a Transcriptional Potentiator of Multiple Cancer-Promoting Genes and Required for Liver and Colon Cancer Development. *Cancer Cell* 2016;29:354-66.
39. Toyota M, Ahuja N, Ohe-Toyota M, Herman JG, Baylin SB, Issa JP. CpG island methylator phenotype in colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:8681-6.
40. Welch JS, Klco JM, Gao F, Procknow E, Uy GL, Stockerl-Goldstein KE, et al. Combination decitabine, arsenic trioxide, and ascorbic acid for the treatment of myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia: a phase I study. *Am J Hematol* 2011;86:796-800.

Tables

Table 1: Positive hits identified in combination screen with decitabine (sequential and simultaneous treatment) or TSA (sequential treatment). Drug names, drug function and GFP ratio are shown. Drug names marked by a star (*) indicate drugs without epigenetic activity in monotherapy, as previously published (31).

Combination	Drug name	Drug function	GFP Ratio
Sequential	Ronnel*	Insecticide	4.02
with decitabine	Azacitidine	Anticancer, DNA methylation inhibitor	3.75
	Ouabain	Antiarrhythmic, Na ⁺ /K ⁺ channel blocker	3.42
	Cycloheximide	Antipsoriatic, protein synthesis inhibitor	3.39
	Proscillaridin	Antiarrhythmic, Na ⁺ /K ⁺ channel blocker	3.37
	Lanatoside C	Antiarrhythmic, Na ⁺ /K ⁺ channel blocker	3.33
	Altrenogest*	Progestin, estrus cycle suppression	3.33
	Vorinostat	Anticancer, histone deacetylase inhibitor	3.31
	Butylated hydroxytoluene*	Antioxidant	3.12
	Digoxin	Antiarrhythmic, Na ⁺ /K ⁺ channel blocker	3.11
	Bromperidol*	Antipsychotic	3.09
	Arsenic trioxide	Anticancer	3.08
	Terbinafine hydrochloride*	Antifungal	3.05
	Oxybutynin chloride*	Anticholinergic	3.00
	Tacrine hydrochloride*	Anticholinesterase, K ⁺ channel blocker	2.98
	Digitoxin	Antiarrhythmic, Na ⁺ /K ⁺ channel blocker	2.95
	Amoxapine*	Antidepressant	2.94
	Ethinyl estradiol*	Estrogen	2.92
	Phenformin hydrochloride*	Antidiabetic	2.91
	Diloxanide furoate*	Amoebicide	2.79
	Acetohexamide	Antidiabetic	2.72
	Oxantel pamoate*	Anthelmintic	2.71
	Cyproheptadine*	Antipruritic	2.69
	Ticlopidine hydrochloride*	Antiplatelet	2.68
	Rolitetracycline*	Antibacterial	2.67
	Nialamide*	Antidepressant	2.67
	Rabeprazole sodium*	Gastric acid secretion inhibitor	2.64
	Toltrazuril*	Coccidiostat	2.64
	Lamotrigine*	Anticonvulsant	2.63
	Pyridoxine*	Vitamin B6 dietary supplement	2.62
	Benzoxiquine*	Antiinfective	2.60
Simultaneous	Trientine hydrochloride*	Chelating Agent	2.57
with decitabine	Decitabine	Anticancer, DNA methylation inhibitor	2.51
	Nitrofurazone*	Antiinfective	2.49
	Nitromide*	Antibacterial	2.47

	Triclosan*	Antiinfective	2.37
	Etidronate disodium*	Bone resorption inhibitor	2.22
	Netilmicin sulfate*	Antibacterial	2.22
	Arsanilic acid*	Antibacterial	2.22
	Levobunolol hydrochloride*	Antiglaucoma	2.21
<u>Sequential</u>	Decitabine	Anticancer, DNA methylation inhibitor	13.27
<u>with TSA</u>	Azacitidine	Anticancer, DNA methylation inhibitor	6.69
	Digitoxin	Antiarrhythmic, Na ⁺ /K ⁺ channel blocker	5.76
	Methotrexate*	Anticancer	4.26
	Pemetrexed*	Anticancer	4.22
	Bromocriptine mesylate*	Antiparkinsonian	3.13
	Thiram	Antifungal	3.08
	Sorafenib*	Anticancer	2.97
	Digoxin	Antiarrhythmic, Na ⁺ /K ⁺ channel blocker	2.90

Table 2: Antagonistic hits identified in combination HTS with decitabine (sequential and simultaneous) or TSA (sequential). Drug names, drug function and GFP ratio are shown. Only top hits are shown in this table. Complete list of antagonistic drugs is shown in Supplemental Table S3-5.

Combination	Drug name	Drug function	GFP Ratio
<u>Sequential</u> <u>with decitabine</u>	Fluphenazine hydrochloride	Antipsychotic	0,00
	Penfluridol	Antipsychotic	0,00
	Toremiphen citrate	Anticancer	0,00
	Hexylresorcinol	Antiseptic	0,00
	Gentian violet	Antibacterial	0,00
	Econazole nitrate	Antifungal	0,01
	Tamoxifen citrate	Anticancer	0,01
	Thioridazine hydrochloride	Antipsychotic	0,01
	Selamectin	Anthelmintic	0,02
	Sertraline hydrochloride	Antidepressant	0,02
	Perhexiline maleate	Coronary vasodilator	0,02
	Gramicidin A	Antibacterial	0,02
	Mefloquine	Antimalarial	0,04
	Dioxybenzone	Sunscreen	0,04
	Estradiol valerate	Estrogen	0,05
<u>Simultaneous</u> <u>with decitabine</u>	Methylbenzethonium chloride	Antiinfective	0.00
	Valrubicin	Anticancer	0.00
	Benzethonium chloride	Antiseptic	0.00
	Gentian violet	Antibacterial	0.00
	Dactinomycin	Anticancer	0.00
	Epirubicin hydrochloride	Anticancer	0.01
	Mitomycin	Anticancer	0.01
	Nitrogen mustard	Anticancer	0.01
	Nilotinib	Anticancer	0.02
	Gemcitabine hydrochloride	Anticancer	0.03
	Plicamycin	Anticancer	0.03
	Cytarabine	Anticancer	0.03
	Mitoxantrone hydrochloride	Anticancer	0.03
	Rapamycin	Anticancer	0.03
	Cladribine	Anticancer	0.03
<u>Sequential</u> <u>with TSA</u>	Valrubicin	Anticancer	0.00
	Epirubicin hydrochloride	Anticancer	0.00
	Dactinomycin	Anticancer	0.00
	Plicamycin	Anticancer	0.02
	Mitoxantrone	Anticancer	0.02
Teniposide	Anticancer	0.09	

Penicillin V potassium	Antibacterial	0.11
Cycloheximide	Antipsoriatic	0.15
Oxymetazoline hydrochloride	Nasal decongestant	0.17
Bortezomib	Anticancer	0.17
Fuchsin N	Anthelmintic	0.18
Mechlorethamine	Anticancer	0.19
Nitrogen mustard	Anticancer	0.19
Mepenzolate bromide	Anticholinergic	0.20
Benzethonium chloride	Antiseptic	0.23

Figure legends:

Figure 1. Combinatorial epigenetic HTS using FDA-approved libraries with DNMTi or HDACi. A, Design of HTS testing the combination of FDA-approved drug libraries (DL, time of treatment and doses are indicated) with DNMTi (decitabine, DAC at 50 nM for 72h) and HDACi (TSA at 0.2 μ M for 24h). GFP fluorescence was used as a quantitative readout for epigenetic effect and was measured by high-throughput flow cytometry ($n \leq 1$). GFP ratios were calculated by the percentage of GFP positive cells obtained after the combinatorial treatment divided by the percentage of GFP positive cells induced by either decitabine or TSA. GFP ratio of 1 marks the baseline epigenetic effect induced either by DAC or TSA alone (dotted line in bold type). Threshold for synergistic or antagonistic interaction was determined by the GFP ratios average value \pm 3 standard deviations for each HTS condition (dotted lines). GFP ratio and number of hits are shown for sequential treatment with decitabine (B), for simultaneous treatment with decitabine (C), and for sequential treatment with TSA (D). Validation experiments were performed using YB5 cells in sequential combination with decitabine (50nM, 72h) and a 24h treatment with selected hits such as proscillaridin A (E) and arsenic trioxide (F) at the doses indicated on the graph ($n=3$).

Figure 2. Reprogramming colon cancer cells by massively down-regulating epigenetic genes. RNA-sequencing was performed on YB5 cells that were either untreated, or treated with decitabine (48h at 100 nM), proscillaridin A (48h at 50 nM), or their sequential combination ($n=3$). A, Venn diagram analysis of the number of up-regulated genes in treated cells versus untreated cells. B, Venn diagram analysis of the number of down-regulated genes in treated cells versus untreated cells. Metascape analysis was performed on both up and down-regulated gene data sets. C, Fold-changes in expression of genes exclusively up-regulated by proscillaridin A and belonging to calcium pathway associated genes by Metascape analysis. D, Fold-changes in expression of genes exclusively up-regulated by the combination and belonging to calcium pathway associated genes by Metascape analysis. E, Heat map of genes specifically down-regulated by the combination as compared to single drug treatment, belonging to epigenetic pathways by Metascape analysis. Fold-change ratios were calculated for down-regulated genes shared between proscillaridin A and the combination ($n=4,928$). Gene sets with ratio greater

than 1 (n=2,146) were analyzed by Metascape. The results show that 153 epigenetic genes were specifically down-regulated (left panel). Most down-regulated genes are shown (right panel), which included 2 known oncogenes in colon cancer, *SMYD3* and *KDM8*.

Figure 3. Synergy between the combination of FDA-approved drugs with DNMTi or HDACi is obtained regardless of epigenetic activity of FDA-approved drugs in monotherapy. GFP ratios in each HTS condition were plotted against percentages of YB5 cells expressing GFP after single drug treatments in A, sequential combination with decitabine; B, in simultaneous combination with decitabine; and C, sequential treatment with TSA. Horizontal dotted lines represent levels of 3 standard deviations above and below average GFP ratio in each screening condition. Vertical dotted lines represent threshold for GFP positivity calculated in the single drug screening as previously reported (31). Percentage of GFP positive cells was expressed by drug classes to compare the combination treatment to the single drug treatment in D, sequential combination with decitabine; E, simultaneous combination with decitabine; and F sequential combination with TSA. As a baseline level, vertical dotted lines represent percentage of GFP positive cells obtained after decitabine (in D and E) and TSA (F) treatment.

Figure 4. Epigenetic combinatorial HTS reveals antagonist interactions with 85 FDA-approved drugs. Blockers of GFP-induction induced by epigenetic drugs were defined as those drugs producing GFP ratios more than 3 standard deviations below GFP ratio average value in each HTS condition. Drugs producing antagonistic interaction were grouped according to their drug classes in A, sequential combination with decitabine, B, simultaneous treatment with decitabine and C, sequential treatment with TSA. Percentage of dead cells (measured by propidium iodide staining) was shown for drug combinations with GFP ratios below (group name: in Low levels), in between (group name: No variation) and above (group name: High levels) 3 standard deviation intervals. As a control, percentage of dead cells was shown for the same drugs in the single HTS, as previously published (31). These analyzes were performed in HTS with D, sequential combination with decitabine, E, simultaneous combination with decitabine and F, sequential combination with TSA. Statistical analysis was done by One-way ANOVA followed by the Tukey–Kramer Multiple Comparison Test ($P < 0.05$).

Figure 1.

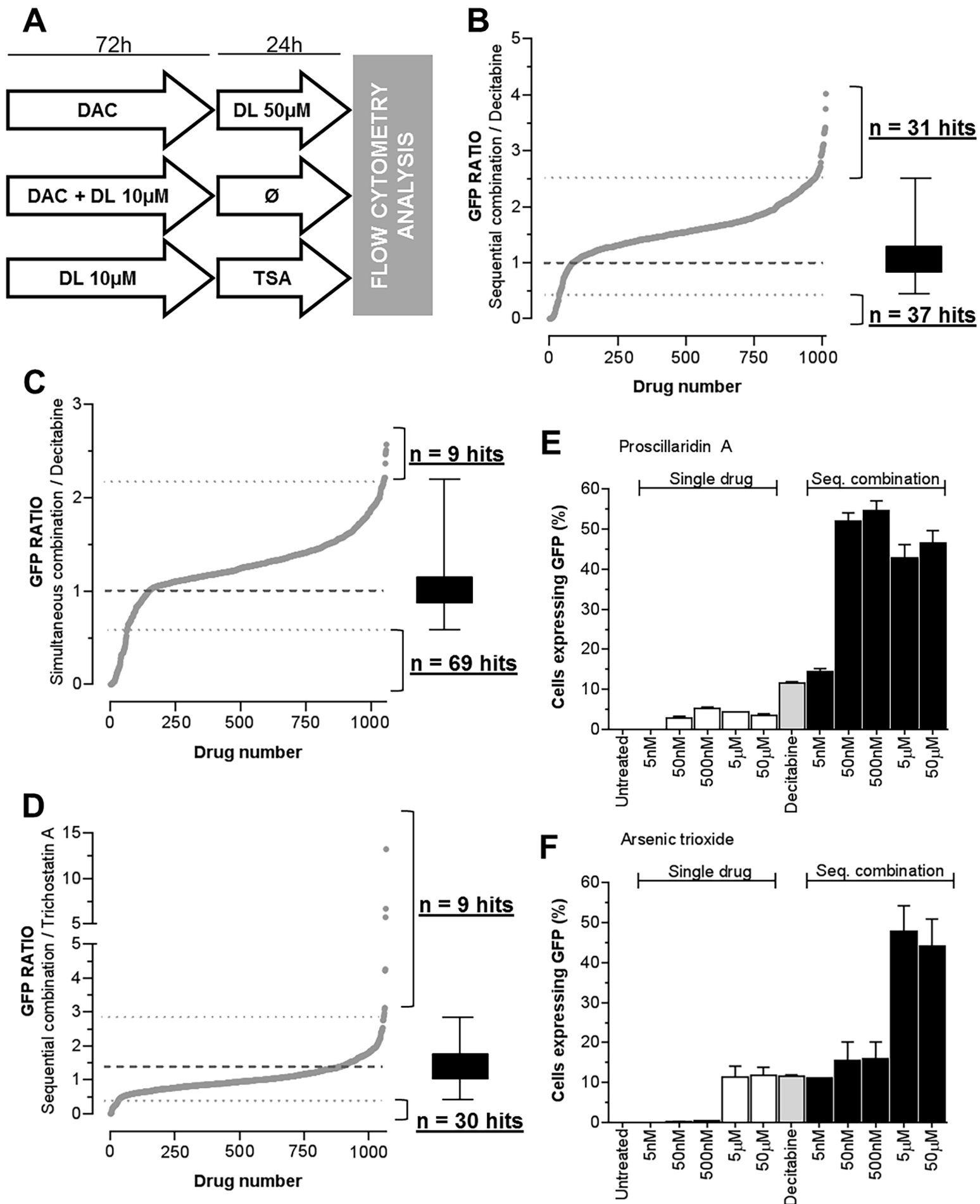


Figure 2.

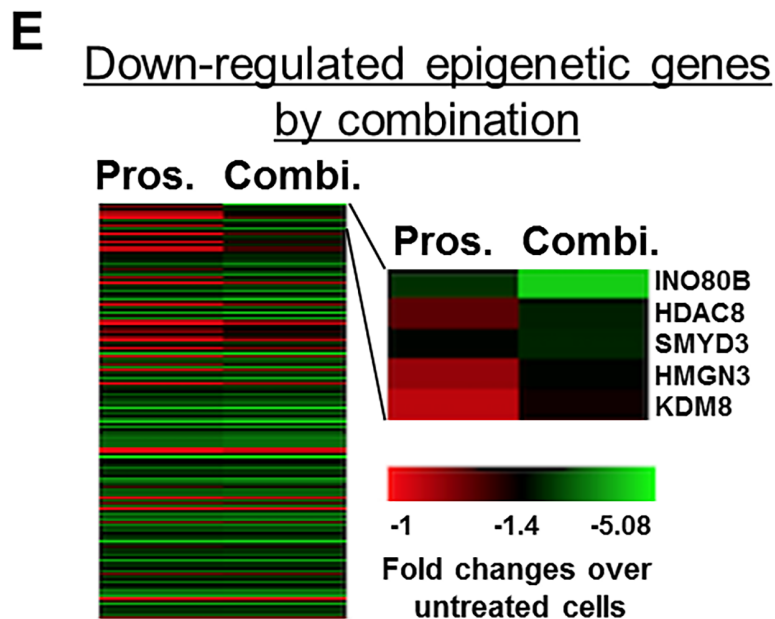
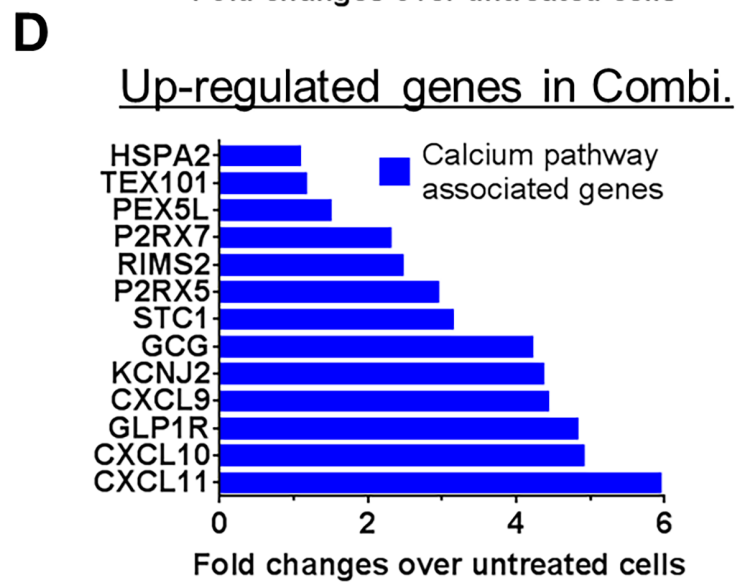
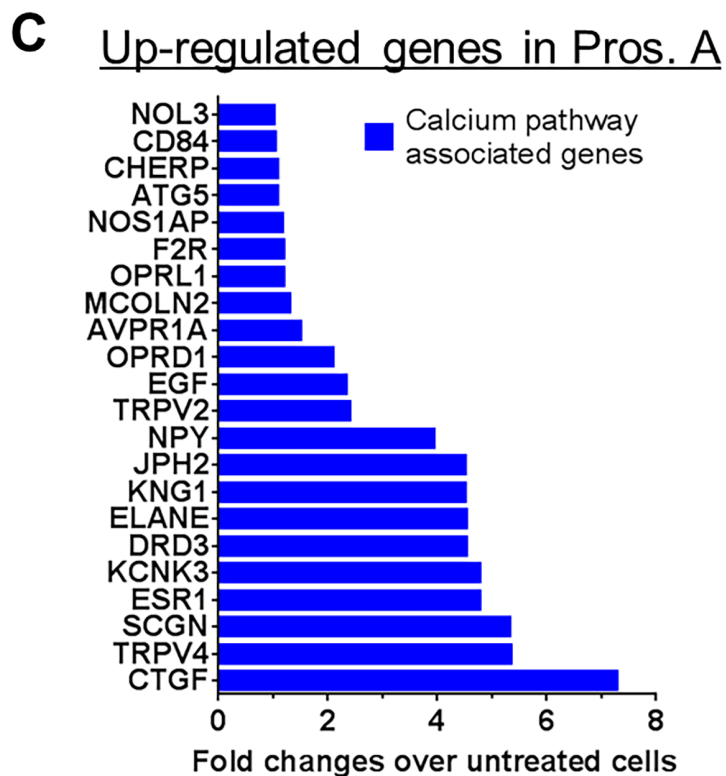
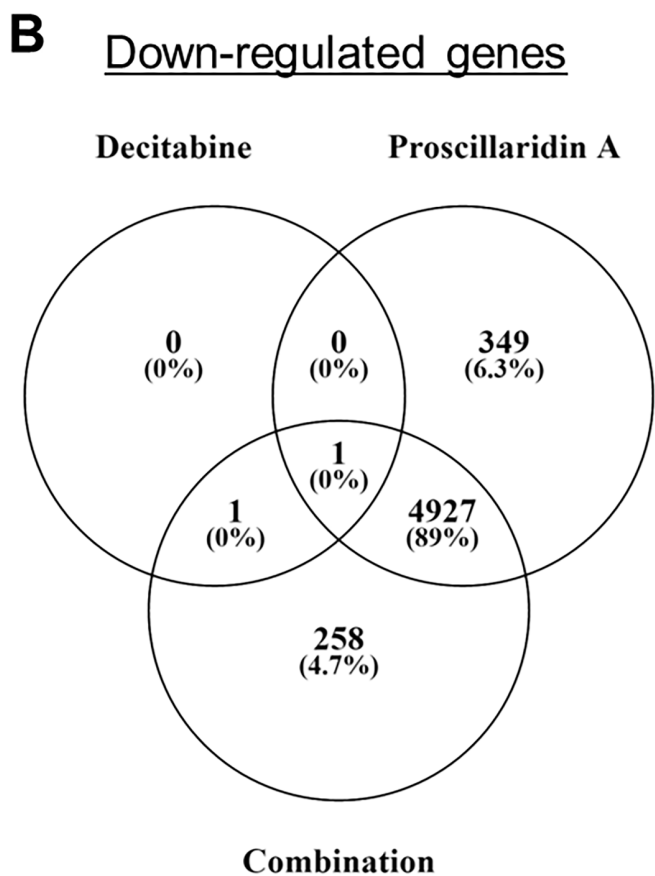
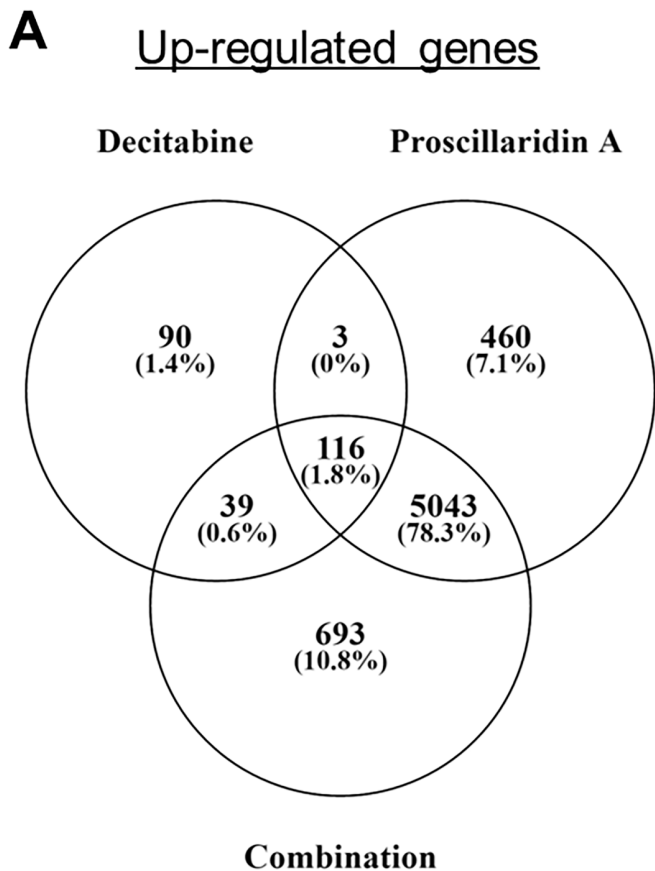


Figure 3.

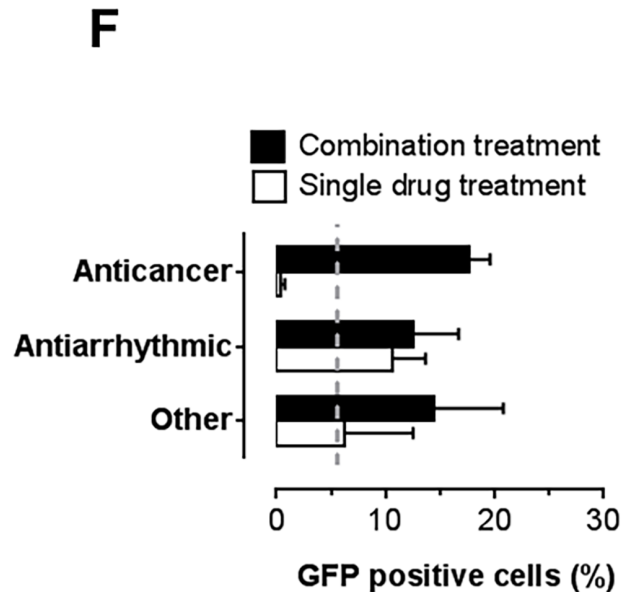
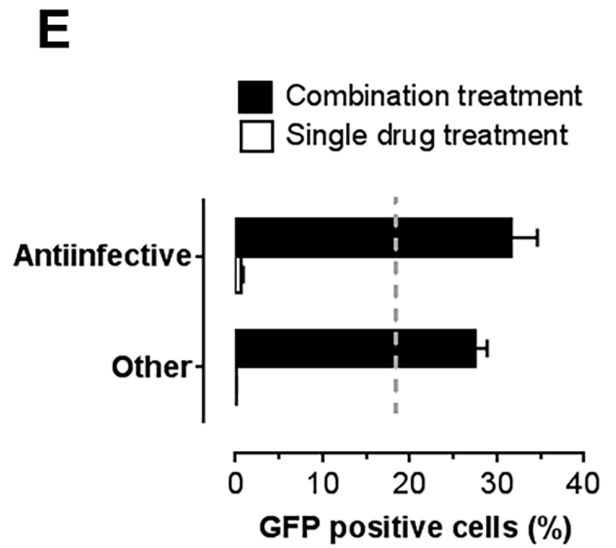
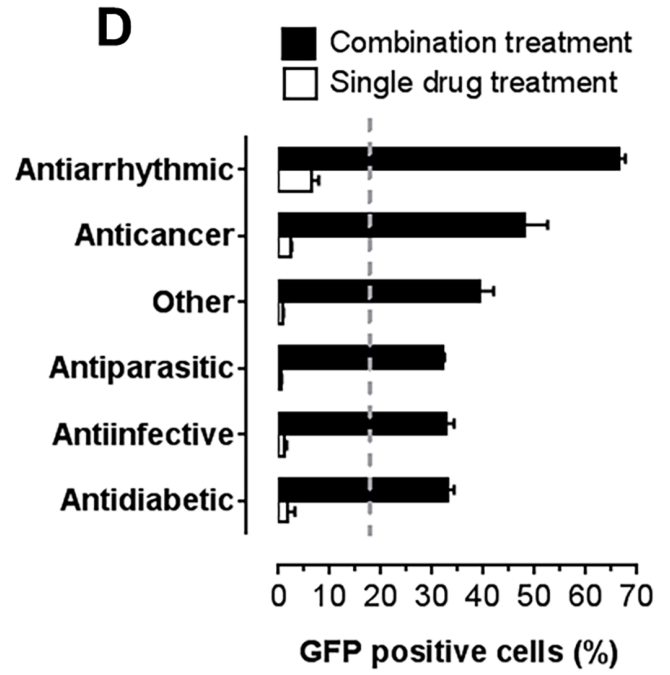
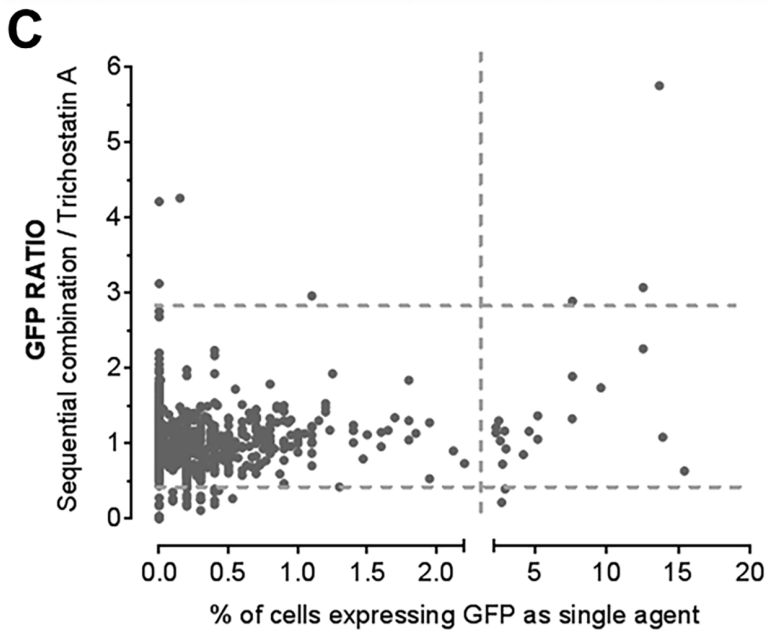
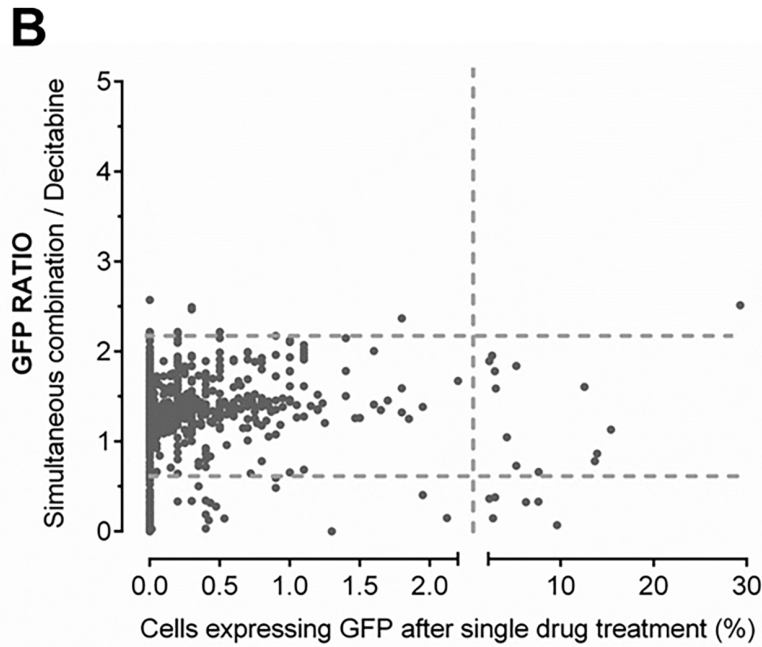
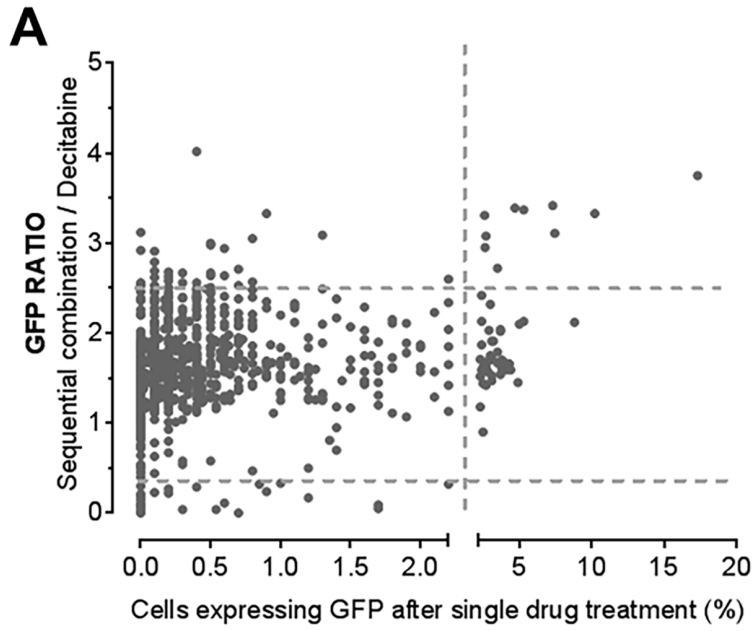
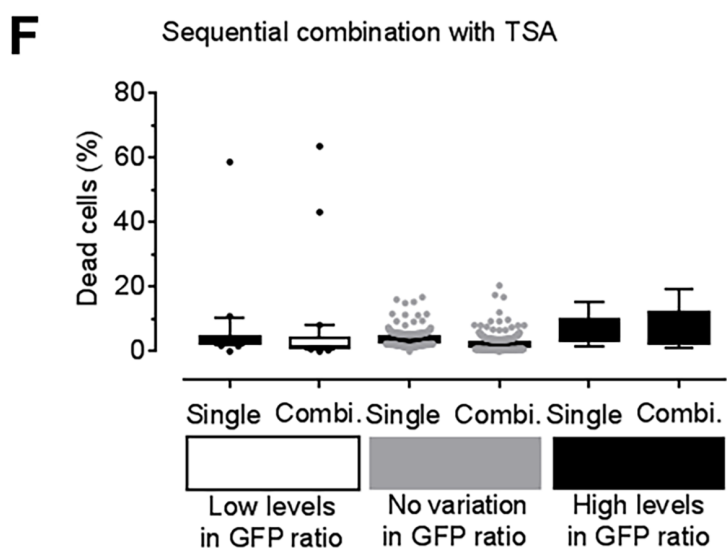
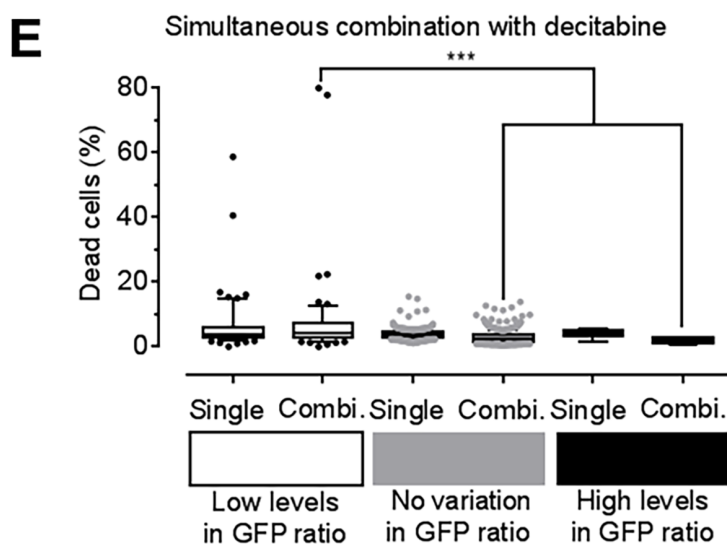
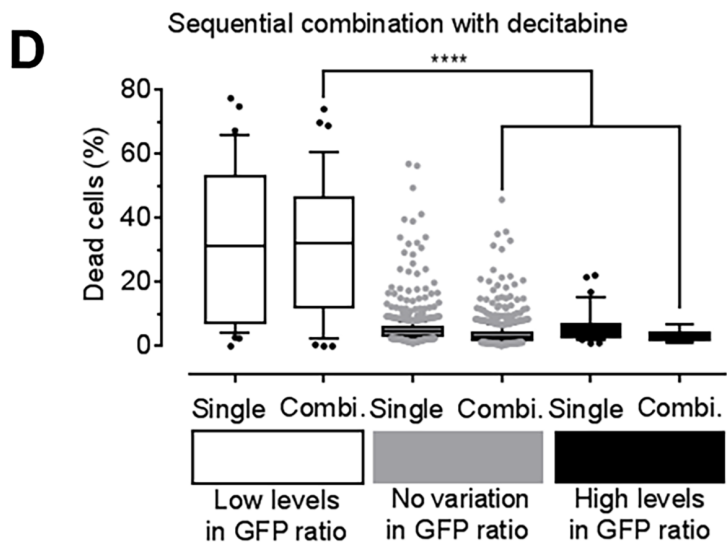
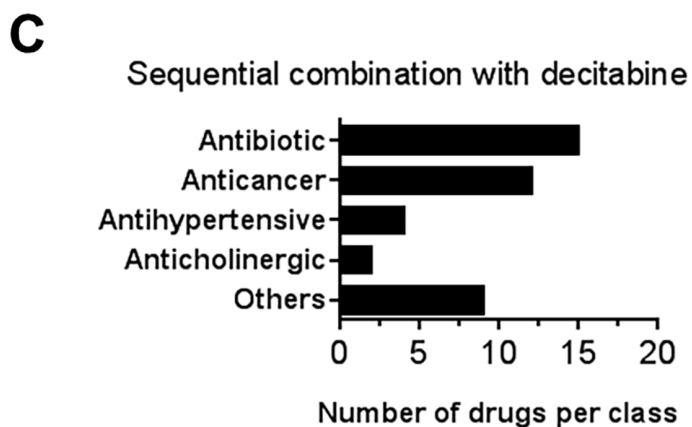
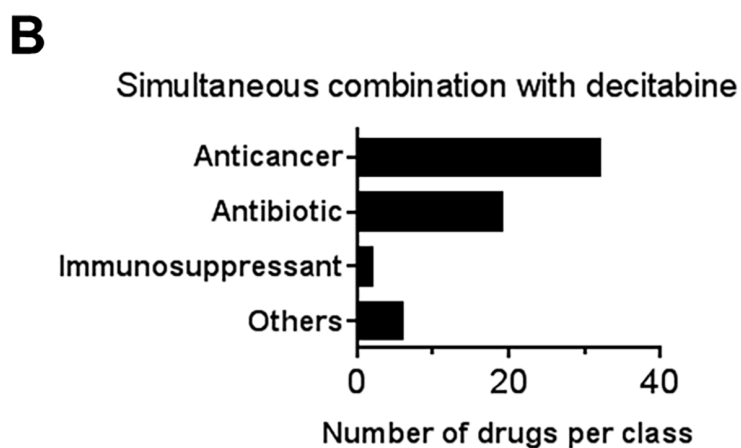
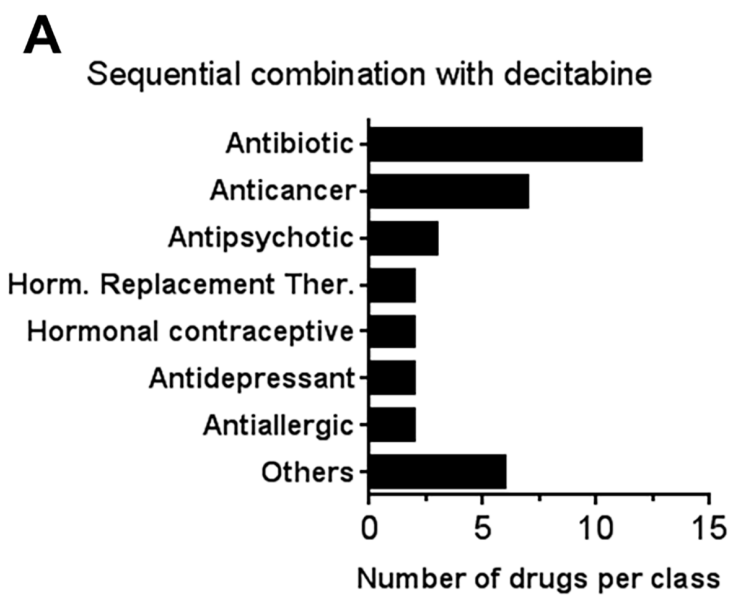


Figure 4.



Supplementary Legends:

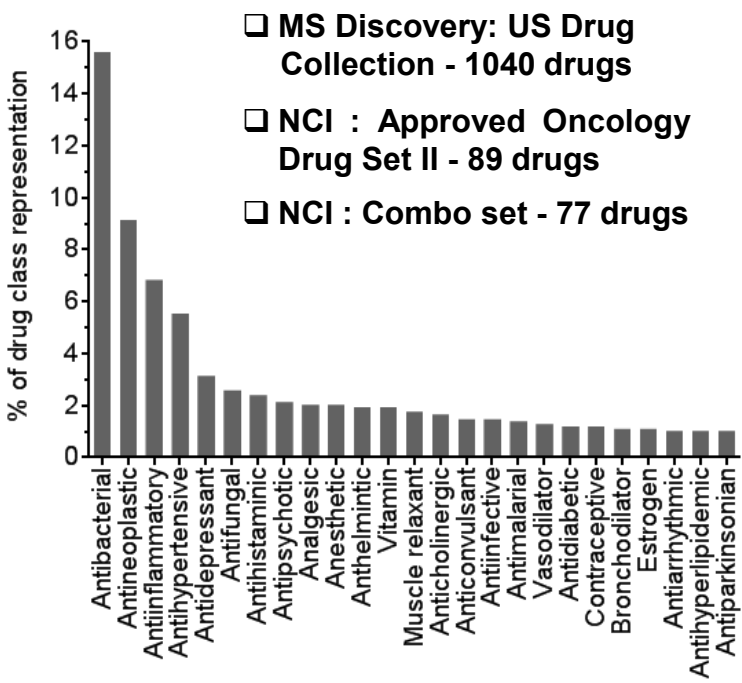
Supplementary Fig. S1: Percentage of drugs per drug class among drug libraries used in the HTS. Three libraries of FDA-approved drugs were used in this screen (MS Discovery US Drug Collection, NCI Approved Oncology Drug Set II and the NCI Combo Set).

Supplementary Fig. S2: Synergistic GFP reactivation in YB5 cells by HDACi TSA and positive hits identified in the HTS. A, Average values of all positive controls, included in each 96 well-plates (in quadruplicates), during HTS, with HDACi TSA (24h, 0.2 μ M) and decitabine (DAC, 72h, 50 nM) and their sequential combination. Statistical analysis was done by One-way ANOVA followed by the Tukey–Kramer Multiple Comparison Test ($P < 0.0001$). B, Validation experiment with digitoxin (24h treatment) in sequential combination after decitabine (72h treatment) and the doses indicated on the graph. GFP expression was measured immediately after digitoxin treatments by flow cytometry (n=3). C, Validation experiments with positive hits identified in the HTS in combination with decitabine (sequential and simultaneous) or with TSA (sequential).

Supplementary Fig. S3. Optimization of the treatment schedule of the decitabine and proscillaridin A combination. Time of exposure was modified to identify which schedule would induce the most potent GFP reactivation. Simultaneous combination of 24, 48, and 72h were compared with sequential combination with decitabine (48h, 100 nM) followed by proscillaridin A (24h and 48h at 50 nM).

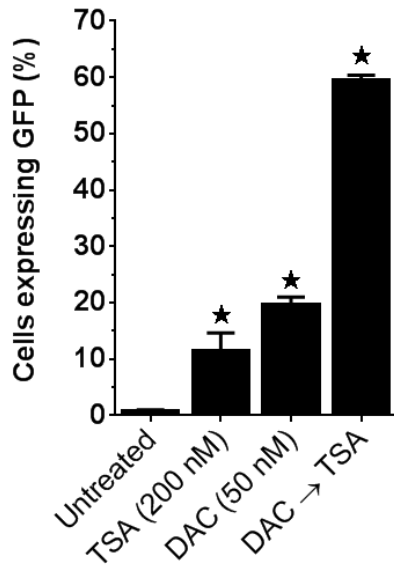
Supplementary Fig. S4. Transcriptome analysis using Metascape. A, Results of Metascape analysis in genes exclusively up-regulated with proscillaridin A treatment. B, Results of Metascape analysis in genes exclusively up-regulated by the combination treatment.

n=1,118 drugs

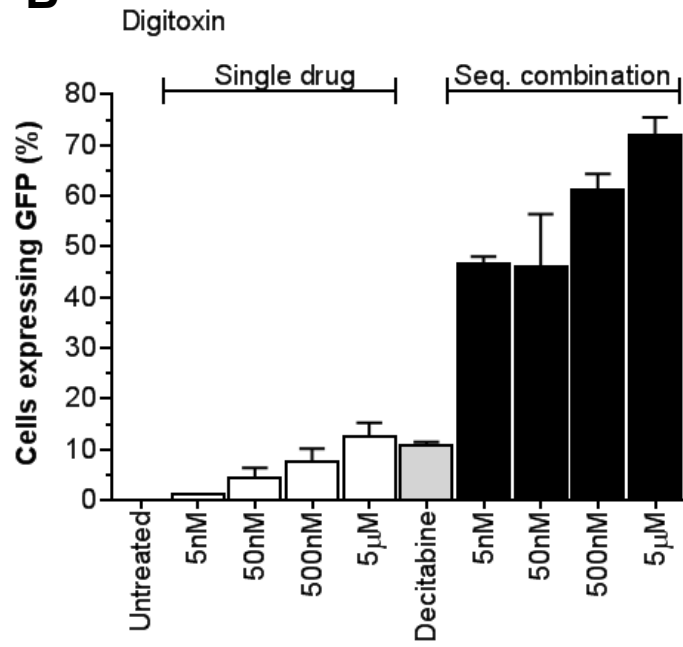


Supplementary Fig. S2.

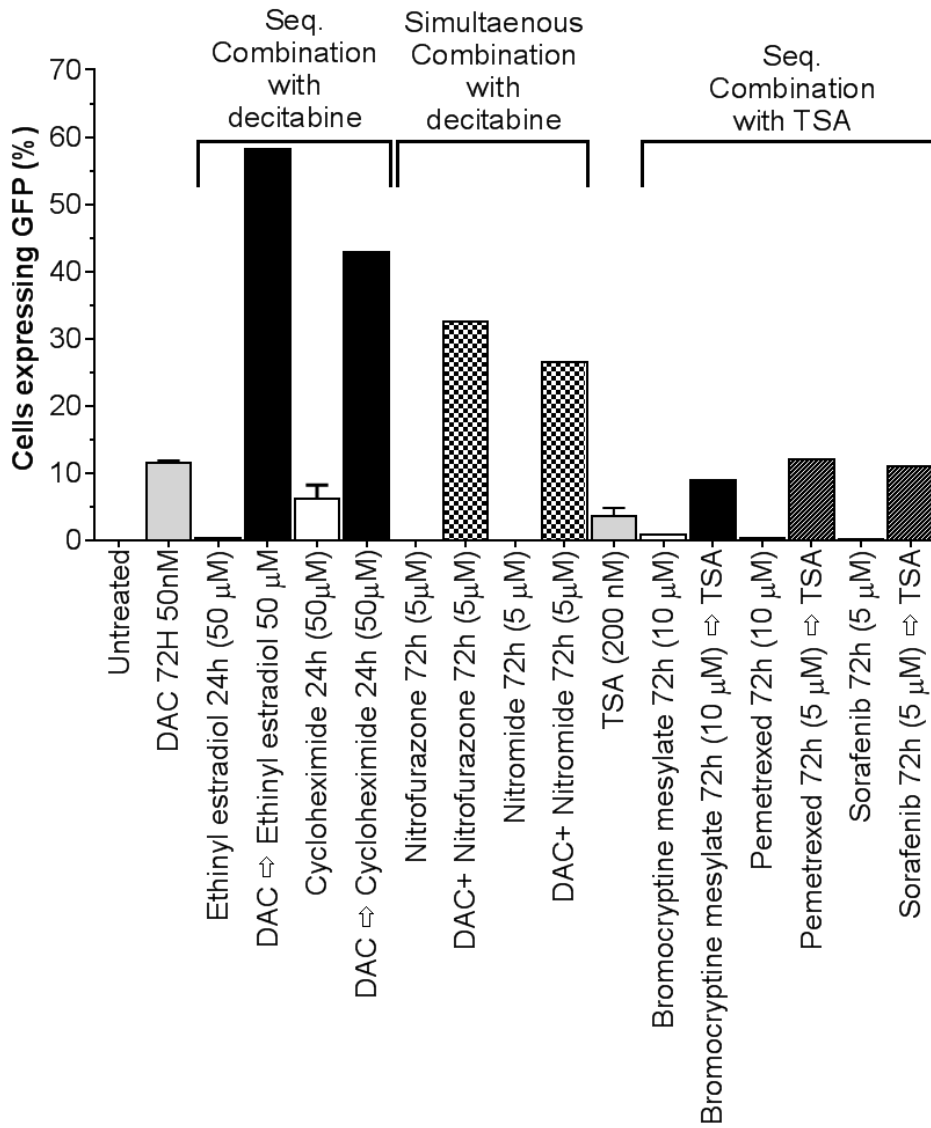
A



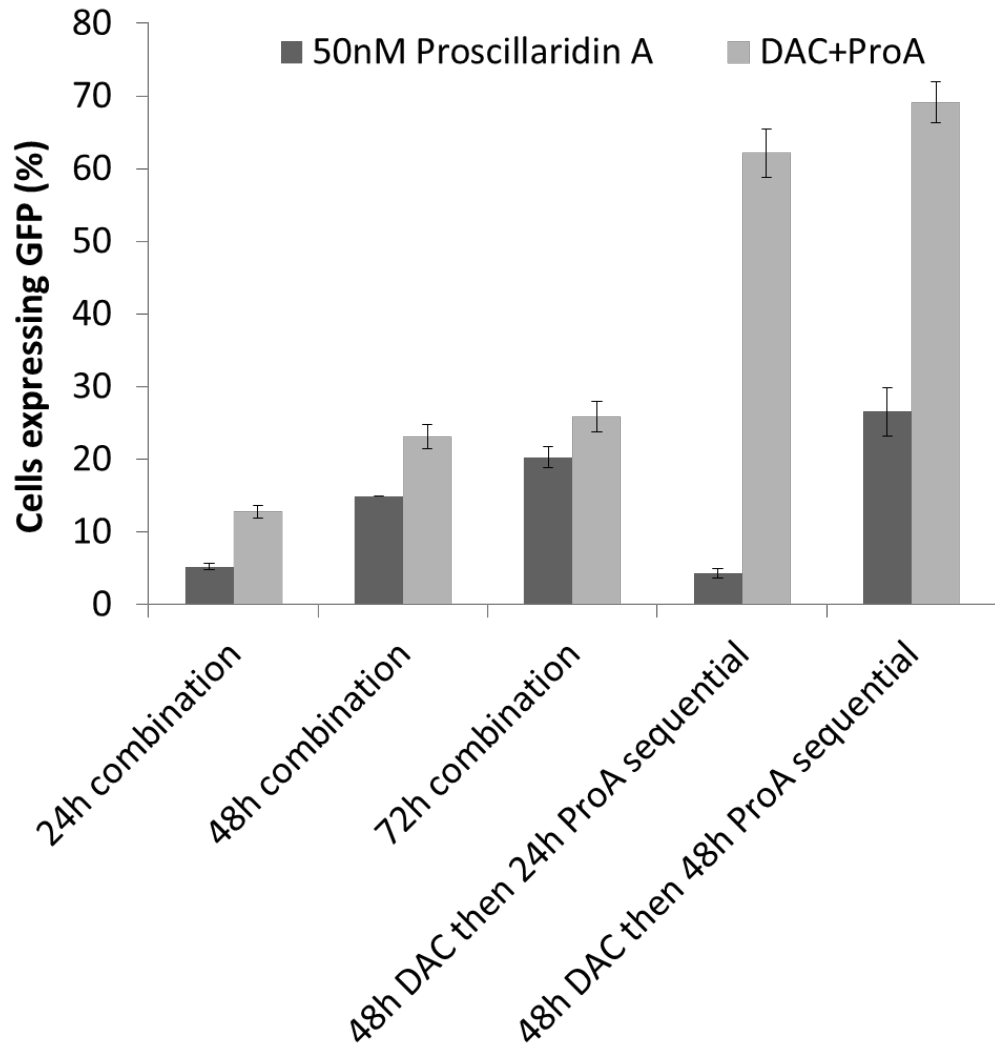
B



C



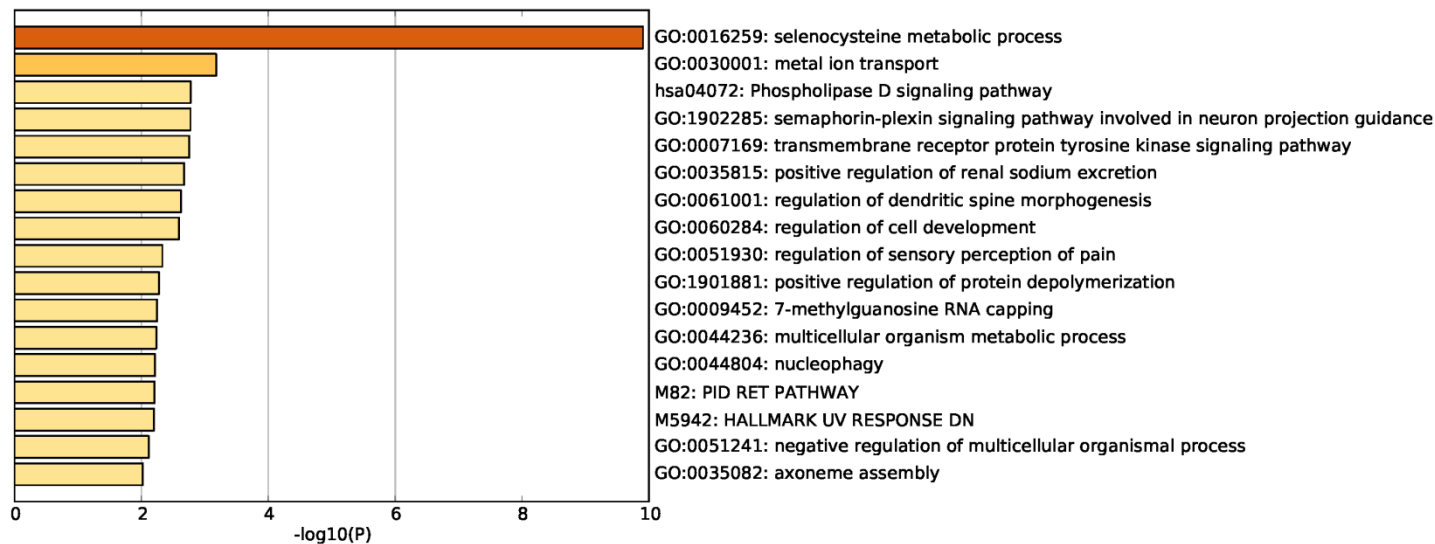
Supplementary Fig. S3.



Supplementary Fig. S4.

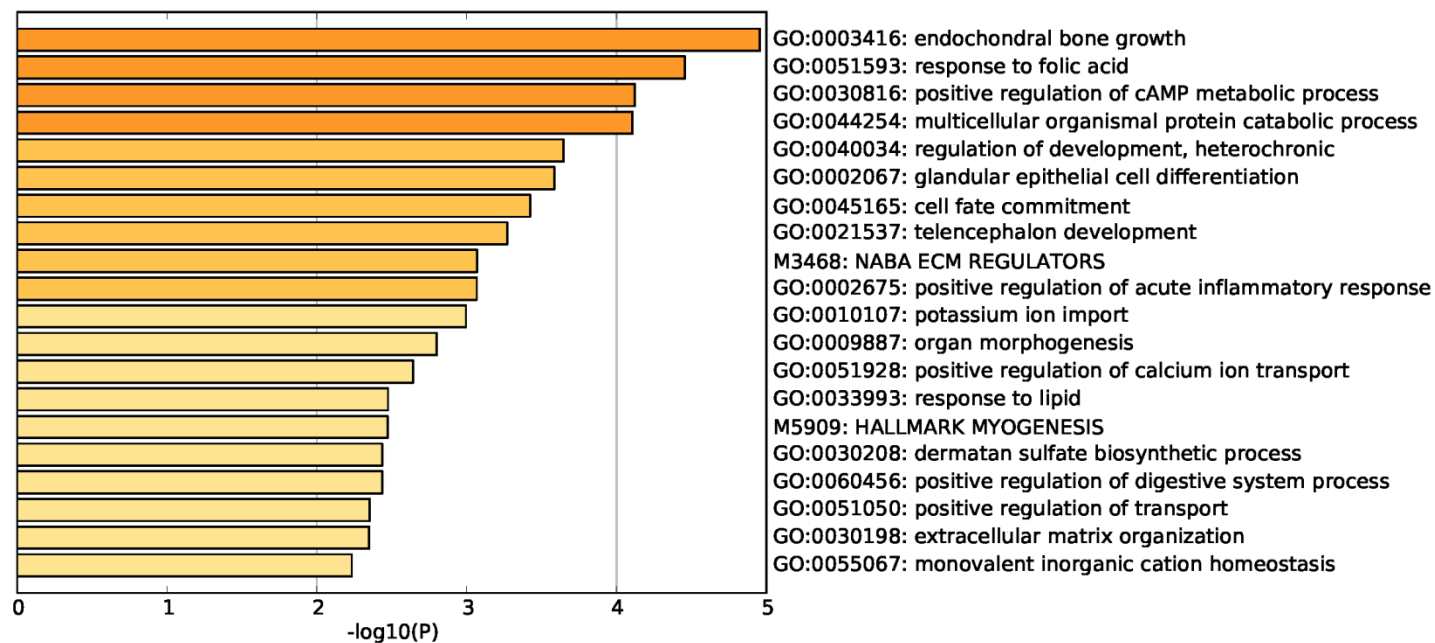
A

Up-regulated genes in Pros. A



B

Up-regulated genes in Combi.



Supplementary Table S1. List of GO-Terms identified by Metascape analysis in gene data sets exclusively up-regulated by proscillaridin A treatment and exclusively up-regulated by the combination treatment.

Treatment	GO-Term numbers	Descriptions
<u>Proscillaridin A</u> (non overlapping genes)	GO:0070509	Calcium Ion Import
	GO:0006816	Calcium Ion Transport
	GO:0006874	Cellular Calcium Ion Homeostasis
	GO:0051480	Regulation of Cytosolic Calcium Ion Concentration
<u>Combination</u> (non overlapping genes)	GO:0090280	Positive Regulation of Calcium Ion Import
	GO:0051928	Positive Regulation of Calcium Ion Transport
	GO:0051928	Positive Regulation of Calcium Ion Transport
	GO:0010524	Positive Regulation of Calcium Ion Transport Into Cytosol

Supplementary Table S2. List of GO-Terms identified by Metascape analysis among down-regulated genes shared by proscillaridin A and the combinatorial treatment with decitabine.

GO-Term numbers	Descriptions
GO:0031497	Chromatin Assembly
GO:0006333	Chromatin Assembly or Disassembly
GO:0006325	Chromatin Organization
GO:0006325	Chromatin Organization
GO:0006338	Chromatin Remodeling
GO:0031055	Chromatin Remodeling at Centromere
GO:0006342	Chromatin Silencing
GO:0000183	Chromatin Silencing at RDNA
GO:0032776	DNA Methylation on Cytosine
GO:0006304	DNA Modification
GO:0006335	DNA Replication-dependent Nucleosome Assembly
GO:0034723	DNA Replication-dependent Nucleosome Organization
GO:0006336	DNA Replication-independent Nucleosome Assembly
GO:0034724	DNA Replication-independent Nucleosome Organization
GO:0016458	Gene Silencing
GO:0043486	Histone Exchange
GO:0016570	Histone Modification
GO:0045814	Negative Regulation of Gene Expression, Epigenetic
GO:0006334	Nucleosome Assembly
GO:0034728	Nucleosome Organization
GO:0045815	Positive Regulation of Gene Expression, Epigenetic
GO:0040029	Regulation of Gene Expression, Epigenetic

Supplementary Table S3. Antagonistic hits identified in combination HTS with sequential decitabine treatment. Drug names, drug function and GFP ratio are shown.

<u>Combination</u>	<u>Drug name</u>	<u>Drug function</u>	<u>GFP Ratio</u>
<u>Sequential with decitabine</u>	Fluphenazine hydrochloride	Antipsychotic	0.00
	Penfluridol	Antipsychotic	0.00
	Toremiphen citrate	Anticancer	0.00
	Hexylresorcinol	Antiseptic	0.00
	Gentian violet	Antibacterial	0.00
	Econazole nitrate	Antifungal	0.01
	Tamoxifen citrate	Anticancer	0.01
	Thioridazine hydrochloride	Antipsychotic	0.01
	Selamectin	Anthelmintic	0.02
	Sertraline hydrochloride	Antidepressant	0.02
	Perhexiline maleate	Coronary vasodilator	0.02
	Gramicidin A	Antibacterial	0.02
	Mefloquine	Antimalarial	0.04
	Dioxybenzone	Sunscreen	0.04
	Estradiol valerate	Estrogen	0.05
	Perphenazine	Antipsychotic	0.05
	Cetylpyridinium chloride	Antiinfective	0.06
	Fluoxetine	Antidepressant	0.09
	Norgestimate	Contraceptive	0.09
	Diphenhydramine hydrochloride	Antihistaminic	0.10
	Thiothixene	Antipsychotic	0.11
	Triclosan	Antiinfective	0.15
	Astemizole	Antihistaminic	0.17
	Nitrogen mustard	Anticancer	0.19
	Mepartricin	Antifungal	0.21
	Nylidrin hydrochloride	Vasodilator	0.22
	Mechlorethamine	Anticancer	0.23
	Pyrrithione Zinc	Antibacterial	0.24
	Ethinodiol Diacetate	Contraceptive	0.27
	Phenolphthalein	Cathartic	0.29
	Clotrimazole	Antifungal	0.30
	Mitoxantrone hydrochloride	Anticancer	0.32
	Estradiol cypionate	Estrogen	0.32
Acrisorcin	Antifungal	0.33	
Dactinomycin	Anticancer	0.40	
Methicillin sodium	Antibacterial	0.44	
Candesartan cilextil	Antihypertensive	0.45	

Supplementary Table S4. Antagonistic hits identified in combination HTS with simultaneous decitabine treatment. Drug names, drug function and GFP ratio are shown.

<u>Combination</u>	<u>Drug name</u>	<u>Drug function</u>	<u>GFP Ratio</u>
<u>Simultaneous with decitabine</u>	Methylbenzethonium chloride	Antiinfective	0.00
	Valrubicin	Anticancer	0.00
	Benzethonium chloride	Antiseptic	0.00
	Gentian violet	Antibacterial	0.00
	Dactinomycin	Anticancer	0.00
	Epirubicin hydrochloride	Anticancer	0.01
	Mitomycin	Anticancer	0.01
	Nitrogen mustard	Anticancer	0.01
	Nilotinib	Anticancer	0.02
	Gemcitabine hydrochloride	Anticancer	0.03
	Plicamycin	Anticancer	0.03
	Cytarabine	Anticancer	0.03
	Mitoxantrone hydrochloride	Anticancer	0.03
	Rapamycin	Anticancer	0.03
	Cladribine	Anticancer	0.03
	Mechlorethamine	Anticancer	0.03
	Topotecan hydrochloride	Anticancer	0.05
	Dipyridamole	Coronary vasodilator	0.05
	Everolimus	Anticancer	0.07
	Pyrrithione zinc	Antibacterial	0.07
	Clofarabine	Anticancer	0.09
	Dasatinib	Anticancer	0.09
	Amsacrine	Anticancer	0.10
	Teniposide	Anticancer	0.12
	Ciclopirox olamine	Antifungal	0.12
	Erlotinib hydrochloride	Anticancer	0.13
	Thimerosal	Antiinfective	0.14
	Fuchsin N	Anthelmintic	0.14
	Tyrothricin	Antibacterial	0.15
	Cetylpyridinium chloride	Antiinfective	0.15
	Triethylenemelamine	Anticancer	0.16
	Gefitinib	Anticancer	0.16
	Vinorelbine tartrate	Anticancer	0.18
	Cycloheximide	Antipsoriatic	0.18
	Methylene blue	Antimethemoglobinemic	0.19
	Hexachlorophene	Antiinfective	0.19
	Etoposide	Anticancer	0.19
	Benzalkonium chloride	Antiinfective	0.20
	Fluorouracil	Anticancer	0.21
	Ixabepilone	Anticancer	0.22
Bortezomib	Anticancer	0.25	
Paclitaxel	Anticancer	0.28	
Aminacrine	Antiseptic	0.29	

Supplementary Table 4 (continued).

<u>Combination</u>	<u>Drug name</u>	<u>Drug function</u>	<u>GFP Ratio</u>
<u>Simultaneous</u>	Oxaliplatin	Anticancer	0.31
<u>With decitabine</u>	Bromocriptine mesylate	Antiparkinsonian	0.32
	Sirolimus	Anticancer	0.32
	Azacitidine	Anticancer	0.33
	Avermectin B1	Antiparasitic	0.33
	Ouabain	Heart failure treatment	0.33
	Irinotecan hydrochloride	Anticancer	0.33
	Fenbendazole	Anthelmintic	0.34
	Mebendazole	Anthelmintic	0.34
	Oxyphenbutazone	Antiinflammatory	0.34
	Thiostrepton	Antibacterial	0.36
	Monensin A	Antibacterial	0.37
	Selamectin	Anthelmintic	0.38
	Tacrolimus	Immunosuppressant	0.39
	Clioquinol	Antiseptic	0.40
	Mycophenolic acid	Immunosuppressant	0.40
	Acrisorcin	Antifungal	0.40
	Nonoxynol-9	Contraceptive	0.43
	Floxuridine	Anticancer	0.45
	Podofilox	Anticancer	0.48
	Doxazosin mesylate	Antihypertensive	0.50
	Bleomycin B2	Anticancer	0.52
	Hycanthone	Anthelmintic	0.57
	Uracil mustard	Anticancer	0.58
	Docetaxel	Anticancer	0.59
	Vinblastine sulfate	Anticancer	0.59

Supplementary Table S5. Antagonistic hits identified in combination HTS with sequential TSA treatment. Drug names, drug function and GFP ratio are shown.

<u>Combination</u>	<u>Drug name</u>	<u>Drug function</u>	<u>GFP Ratio</u>
<u>Sequential with TSA</u>	Valrubicin	Anticancer	0.00
	Epirubicin hydrochloride	Anticancer	0.00
	Dactinomycin	Anticancer	0.00
	Plicamycin	Anticancer	0.02
	Mitoxantrone	Anticancer	0.02
	Teniposide	Anticancer	0.09
	Penicillin V potassium	Antibacterial	0.11
	Cycloheximide	Antipsoriatic	0.15
	Oxymetazoline hydrochloride	Nasal decongestant	0.17
	Bortezomib	Anticancer	0.17
	Fuchsin N	Anthelmintic	0.18
	Mechlorethamine	Anticancer	0.19
	Nitrogen mustard	Anticancer	0.19
	Mepenzolate bromide	Anticholinergic	0.20
	Benzethonium chloride	Antiseptic	0.23
	Ivermectin	Antiparasitic	0.23
	Methscopolamine bromide	Anticholinergic	0.24
	Mebendazole	Anthelmintic	0.24
	Novobiocin sodium	Antibacterial	0.25
	Fenbendazole	Anthelmintic	0.25
	Tyrothricin	Antibacterial	0.25
	Nylidrin hydrochloride	Vasodilator	0.26
	Nifedipine	Antihypertensive	0.27
	Mafenide hydrochloride	Antibacterial	0.27
	Lincomycin hydrochloride	Antibacterial	0.31
	Minocycline hydrochloride	Antibacterial	0.32
	Minoxidil	Antihypertensive	0.32
	Menadione	Prothrombogenic agent	0.33
	Gramicidin A	Antibacterial	0.36
	Noscapine hydrochloride	Antitussive	0.36

2. Deuxième publication

2.1. Introduction et mise en contexte du deuxième article

Lors d'un projet de criblage réalisé pour découvrir des nouveaux médicaments épigénétiques parmi des pharmacothèques de médicaments approuvés, le Dr. Raynal et al. ont découvert dans un modèle de cellules de cancer du côlon, qu'une dizaine de médicaments approuvés possédaient des activités épigénétiques et anticancéreuses jusqu'alors inconnues. (311). Parmi ces médicaments, les glycosides cardiotoniques, dont la proscillaridine A (approuvée pour le traitement de maladies cardiaques), présentaient des caractéristiques prometteuses comme nouvel agent épigénétique. De plus, nous avons récemment publié que les glycosides cardiotoniques interagissaient de façon synergique avec d'autres médicaments épigénétiques approuvés comme les inhibiteurs de la méthylation de l'ADN (314, 317). Dans le but de repositionner la proscillaridine A comme traitement anticancéreux, nous avons investigué les mécanismes sous-jacents à ces activités anticancéreuses et épigénétiques. Toutefois, le repositionnement des glycosides cardiotoniques est limité par leurs faibles index thérapeutiques, dont les niveaux plasmatiques ne peuvent pas excéder la concentration de 10 nM (275). Afin de ne pas dépasser cette concentration maximale tolérée, nous avons criblé l'activité anticancéreuse de la proscillaridine A dans un panel de 14 lignées cellulaires cancéreuses dans le but d'identifier les lignées cellulaires les plus sensibles. Nous avons identifié que la proscillaridine A démontre une activité anticancéreuse plus forte dans les cancers sur exprimants MYC, dont en particulier les leucémies.

MYC est un proto-oncogène impliqué dans l'induction des programmes cellulaires associés à la prolifération et l'inhibition des programmes cellulaires associés à la différenciation (61, 318). L'activité et l'expression de MYC sont déréglés dans plus de 50% des cancers (41). De ce fait, la découverte de stratégies thérapeutiques anti-MYC fait l'objet de nombreuses études. Cependant, malgré l'apparition de stratégies prometteuses, les thérapies actuelles anti-MYC sont soumises à l'apparition de résistances (78, 242). Dans cette étude, nous révélons pour la première fois que la proscillaridine A est un inhibiteur de MYC spécifiquement dans les cellules surexprimant ce proto-oncogène. Par le biais d'analyses transcriptomiques, bio-informatiques et protéomiques, nous décrivons les mécanismes d'action sous-jacent à cette inhibition dans des lignées de leucémies lymphoblastiques aigües surexprimant MYC. De plus, nous révélons les mécanismes épigénétiques de la proscillaridine A et leurs implications dans l'inhibition de MYC et l'activité anticancéreuse de ce médicament.

Mon rôle dans cette étude a été d'élaborer et de réaliser les expériences de culture cellulaire (traitement avec les différents médicaments, transduction des cellules),

d'immunobuvardage de type Western Blot, de cytométrie en flux et de PCR quantitative. J'ai également préparé les échantillons pour les analyses de séquençage de l'ARN et spectrométrie de masse. J'ai analysé et interprété les données de séquençage de l'ARN. Finalement, j'ai écrit l'article et élaboré les figures.

Cette article a été publié dans la revue de littérature *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* en Juin 2019 (*J Exp Clin Cancer Res* **38**, 251 (2019). <https://doi.org/10.1186/s13046-019-1242-8>).

2.2 Deuxième article

**Heart failure drug Proscillaridin A
targets MYC overexpressing leukemia through global loss of lysine acetylation**

Elodie M. Da Costa^{1,2}, Gregory Armaos^{1,2}, Gabrielle McInnes^{1,2}, Annie Beaudry², Gaël Moquin-Beaudry^{1,2}, Virginie Bertrand-Lehouillier^{2,3}, Maxime Caron², Chantal Richer², Pascal St-Onge², Jeffrey R. Johnson⁴, Nevan Krogan⁴, Yuka Sai⁵, Michael Downey⁵, Moutih Rafei^{1,6,7}, Meaghan Boileau⁸, Kolja Eppert⁸, Ema Flores-Díaz⁹, André Haman⁹, Trang Hoang^{1,9}, Daniel Sinnett^{2,10}, Christian Beauséjour^{1,2}, Serge McGraw^{2,3,11} & Noël J-M Raynal^{1,2,*}

Affiliations

¹Département de pharmacologie et physiologie, Université de Montréal, Montréal (Québec), Canada. ²Sainte-Justine University Hospital Research Center, Montréal (Québec), Canada. ³Département de biochimie et biologie moléculaire, Université de Montréal, Montréal (Québec), Canada. ⁴Department of Cellular and Molecular Pharmacology, University of California, San Francisco, USA. ⁵Department of Cellular and Molecular Medicine, Ottawa Institute of Systems Biology, Ottawa (Ontario), Canada. ⁶Département de microbiologie, infectiologie et immunité, Université de Montréal, Montréal (Québec), Canada. ⁷Department of Microbiology and Immunology, McGill University, Montreal (Québec), Canada. ⁸Department of Pediatrics, McGill University, Montreal (Québec), Canada. ⁹Institute of Research in Immunology and Cancer, Université de Montréal, Montreal (Québec), Canada. ¹⁰Département de pédiatrie, Université de Montréal, Montréal (Québec), Canada. ¹¹Département Obstétrique-Gynécologie, Université de Montréal, Montréal (Québec), Canada.

Da Costa *et al.*

Corresponding author: Noël J-M Raynal, Département de pharmacologie et physiologie, Université de Montréal, Montréal (Québec), Canada, Sainte-Justine University Hospital Research Center (7.17.020), 3175, Chemin de la Côte-Sainte-Catherine, Montréal (Québec) H3T 1C5, Canada, noel.raynal@umontreal.ca

ABSTRACT

Background: Cardiac glycosides are approved for the treatment of heart failure as Na⁺/K⁺ pump inhibitors. Their repurposing in oncology is currently investigated in preclinical and clinical studies. However, the identification of a specific cancer type defined by a molecular signature to design targeted clinical trials with cardiac glycosides remains to be characterized. Here, we demonstrate that cardiac glycoside Proscillaridin A specifically targets MYC overexpressing leukemia cells and leukemia stem cells by causing MYC degradation, epigenetic reprogramming and leukemia differentiation through loss of lysine acetylation.

Methods: Proscillaridin A anticancer activity was investigated against a panel of human leukemia and solid tumor cell lines with different MYC expression levels, overexpression *in vitro* systems and leukemia stem cells. RNA-sequencing and differentiation studies were used to characterize transcriptional and phenotypic changes. Drug-induced epigenetic changes were studied by chromatin post-translational modification analysis, expression of chromatin regulators, chromatin immunoprecipitation, and mass-spectrometry.

Results: At a clinically relevant dose, Proscillaridin A rapidly altered MYC protein half-life causing MYC degradation and growth inhibition. Transcriptomic profile of leukemic cells after treatment showed a downregulation of genes involved in MYC pathways, cell replication and an upregulation of hematopoietic differentiation genes. Functional studies confirmed cell cycle inhibition and the onset of leukemia differentiation even after drug removal. Proscillaridin A induced a significant loss of lysine acetylation in histone H3 (at lysine 9, 14, 18 and 27) and in non-histone proteins such as MYC itself, MYC target proteins, and a series of histone acetylation regulators. Global loss of acetylation correlated with the rapid downregulation of histone

Da Costa *et al.*

acetyltransferases. Importantly, Proscillaridin A demonstrated anticancer activity against lymphoid and myeloid stem cell populations characterized by MYC overexpression.

Conclusion: Overall, these results strongly support the repurposing of Proscillaridin A in MYC overexpressing leukemia.

Keywords: Cardiac glycosides, Proscillaridin A , MYC, leukemia, lysine acetylation, chromatin remodelling, lysine acetyltransferase, leukemia stem cells.

Background

MYC (c-MYC) transcription factor is a driver of oncogenic programs. It contributes to gene deregulation in cancer by promoting expression of genes involved in cell proliferation (1). High MYC expression drives tumor initiation, progression, and maintenance and is associated with aggressive cancers and poor prognoses (2). MYC is a potent driver in leukemia inducing cell proliferation and blocking cell differentiation (3). Moreover, MYC contributes to long-term self-renewal of leukemic stem cells (4). Conversely, genetic suppression of MYC in transgenic mouse models induces differentiation and cell growth arrest of leukemic cells (5, 6). Therefore, targeting MYC addiction in leukemia is a major therapeutic goal. Since MYC lacks a catalytic site, its direct inhibition has been extremely challenging. Indirect MYC inhibition demonstrated therapeutic efficacy with bromodomain inhibitors (such as JQ1 or THZ1), by blocking MYC transcriptional effects (7-9). Unfortunately, cancer cells, such as leukemia, breast and ovarian cancers, develop resistance to these inhibitors by compensatory mechanisms using other bromodomain containing proteins or kinome reprogramming (10, 11). Together, these studies highlight the need to develop new strategies to abrogate MYC addiction in cancer.

MYC stability is regulated by post-translational modifications and MYC acetylation increases its stability (12). The deposition of acetyl groups on lysine residues is catalyzed by lysine acetyltransferases (KATs), which acetylate also histone proteins causing chromatin opening and gene activation (13). Pharmacological inhibition of KATs represents an interesting strategy to target indirectly MYC by blocking upstream mechanisms involved in its stability. However, KATs have overlapping targets and commercially available KAT inhibitors require further optimization (14).

Recently, we reported that cardiac glycosides, which are Na⁺/K⁺ pump inhibitors and approved for heart failure treatment, exhibit significant epigenetic and anticancer effects (15, 16). Cardiac glycosides, including digitoxin, digoxin, lanatoside, ouabain and Proscillaridin A, triggered reactivation of epigenetically silenced tumor suppressor genes, supporting their repurposing potential (16). Interestingly, all cardiac glycosides produced synergistic responses when used in combination with the epigenetic drug decitabine (demethylating agent), further supporting their epigenetic activity (15). Several epidemiological studies argue in favor of repurposing cardiac glycosides in oncology. Indeed, patients treated with cardiac glycosides for heart failure have a lower rate of cancer diagnosis as compared to the general population and upon cancer diagnosis; these patients exhibit generally a less aggressive disease and respond better to therapy (17). However, the repurposing of cardiac glycosides in oncology is limited by their narrow therapeutic window. Indeed, maximal plasmatic level is around 10 nanomolar, due to cardiac toxicities (17-19). Several *in vitro* and *in vivo* studies tested their anticancer activity at supra-pharmacological doses, which are not reachable in humans; in particular, in rodents who can tolerate high doses of these drugs due to structural differences in Na⁺/K⁺ pump as compared to human (19-21). Since the repurposing of cardiac glycosides is restricted to the low nanomolar range, we sought to identify cancer types highly sensitive to these drugs. To do so, we screened a panel of human cancer cell lines with Proscillaridin A, which was identified as the most potent cardiac glycoside in our previous screens (15, 16). Proscillaridin A produced antiproliferative effects with a preferential selectivity towards MYC overexpressing leukemia cells. We demonstrated that Proscillaridin A produced a global loss of acetylation in chromatin and MYC itself, producing epigenetic effects and MYC downregulation. These results provide compelling

Da Costa *et al.*

evidence for the repurposing of cardiac glycoside Proscillaridin A against leukemia driven by MYC oncogenic signature.

MATERIALS AND METHODS

Cell Culture and Drug Treatments

A panel of 14 human cancer cell lines and *hTERT/SV40ER*-immortalized human primary fibroblasts were used in the study. Leukemia cell lines MOLT-4 and REH were transduced with MYC lentivirus and *hTERT/SV40ER*-immortalized human primary fibroblasts were transduced with MYC, *RAS^{V12}* or MYC and *RAS^{V12}* lentiviruses. MYC lentivirus MYC_pLX307 was a gift from William Hahn & Sefi Rosenbluh (Addgene plasmid # 98363). *RAS^{V12}* lentivirus was a gift from Dr. Christian Beauséjour laboratory. Cell types and culture conditions are described in Supplementary Materials and Methods. Proscillaridin A was purchased from Santa Cruz Biotechnologies (CAS number: 466-06-8; purity \geq 90%) and cycloheximide was purchased from Acros Organics (CAS: 66-81-9; purity \geq 95%). IC₅₀ values were calculated with GraphPad Prism software.

Protein and Histone Extractions

Whole cell proteins were extracted using cold whole-cell lysis buffer (50 mM Tris-Cl pH 7.4, 5 mM EDTA, 250 mM NaCl, 50 mM NaF, 0.1% Triton, 0.1 mM Na₃VO₄, and 1 mM PMSF), supplemented with Complete™ Protease Inhibitor Cocktail (Roche). Histones were harvested using acid-extraction method with cold Triton Extraction Buffer (TEB; 0.5% Triton, 2 mM PMSF, 0.02% NaN₃, 10 mM sodium butyrate), supplemented with protease inhibitor cocktail. Protein extracts were separated by SDS-PAGE and transferred onto a polyvinyl difluoride membrane. All experiments were performed in triplicate. Densitometric analysis was performed using ImageJ software. ANOVA tests were performed with GraphPad Prism software. Antibodies are listed in the Supplemental Materials and Methods section.

RNA Extraction, Sequencing and Analysis

QIAshredder was used to homogenize cell lysates and eliminate debris prior to RNA extraction using RNeasy Mini Kit. Briefly, 10 µg of purified RNA was treated with DNase and quantified by Agilent RNA 6,000 Nano kit bioanalyser chips. 1 µg of mRNA was used for library preparation with TruSeq Stranded mRNA LT. RNA sequencing was performed using HiSeq 2500. Experiments were performed in triplicate. Reads were aligned to human genome (hg19) using STAR v2.4.2 and differential gene expression analysis between untreated and treated cells was done using DESeq2 v1.10.1 (22, 23). For bioinformatics analyses, data were processed using gene set enrichment analyses (GSEA, broadinstitute.org/gsea), metascap (metascap.org) and gene mania (genemania.org). MOLT-4 cells H3K27ac ChIP-seq data from publicly available dataset (GEO: GSM2037790) were used in associated with transcriptomic data. GSEA analysis of 8227 AML fractions and the LSC signatures was performed using the control sample data from GSE55814. GEO2R was used to generate a ranked list of LSC-related genes (6 LSC CD34⁺CD38⁻ samples vs 12 non-LSC CD34⁻ samples) used in GSEA analysis.

Acetylation Analysis by Immunoprecipitation and Mass Spectrometry

Whole cell protein extracts were incubated overnight with 5 µg/ml of MYC antibody (Abcam, AB32072). After immunoprecipitation and transfer, proteins were probed with lysine pan-acetyl antibody (1:2500 Cell Signaling 9681). For acetylome analysis by mass spectrometry, samples were prepared as previously described (24). Briefly, 4 biological replicates of untreated and Proscillaridin A-treated MOLT-4 cells (5 nM, 48h) were digested with trypsin. Peptides were analyzed by mass-spectrometry and data were extracted with the MaxQuant software package

Da Costa *et al.*

(version 1.5.5.1) and subsequently analyzed using an in-house computational pipeline for statistical analysis of relative quantification with fixed and/or mixed effect models, implemented in the MSstats Bioconductor package (version 3.3.10) (25, 26). Peptides were searched with SwissProt human protein database.

RESULTS

Cardiac Glycoside Proscillaridin A Targets MYC-Driven Leukemic Cells

To identify cancer types with high sensitivity to Proscillaridin A in order to obtain concentrations within their therapeutic window, we screened a panel of 14 human cancer cell lines and measured cancer cell proliferation after a 24h treatment. After calculating the half-maximal inhibitory concentration (IC_{50}), we noticed a 2,800-fold difference in IC_{50} values, with leukemic cells being more sensitive to Proscillaridin A (Supplementary Fig. S1A). To explore the cause of this striking difference, we hypothesized that the oncogenic context in leukemia cells might influence drug efficacy. Since MYC is often overexpressed in leukemia, we compared MYC protein expression (in untreated cancer cells) with Proscillaridin A IC_{50} values. Interestingly, we found a significant inverse correlation between MYC expression and Proscillaridin A IC_{50} values ($p = 0.0172$; Supplementary Fig. S1A and S1B). Proscillaridin A produced a more potent growth inhibition in cells expressing high levels of MYC protein, such as acute lymphoblastic T-cell (MOLT-4) and B-cell (NALM-6) leukemia while being less effective in colorectal (SW48) and lung (A549) cancer cells expressing low levels of MYC (Fig. 1A).

To evaluate MYC contribution to Proscillaridin A therapeutic efficacy in cancer cells, we investigated drug response using an isogenic cell system consisting of *hTERT/SV40ER*-immortalized human primary fibroblasts, transformed with different oncogenes including *MYC*, *RAS^{V12}* or the combination of both oncogenes. This system allowed exploring the effect of oncogenic transformation within the same genetic background. After transduction, *MYC*-transformed fibroblasts had a small and round phenotype whereas *RAS^{V12}*-transformed cells displayed increased vacuole formation and large cytoplasm. *MYC* and *RAS^{V12}*-transformed cells exhibited a round phenotype with vacuole formation in the cytoplasm (Supplementary Fig. S1C).

High levels of MYC and RAS protein were detected after transductions when compared to non-transduced cells (Fig. 1B). Using a wide range of Proscillaridin A concentrations (from 0.01 nM to 100 μ M) for 48h, we measured cell viability and calculated IC₅₀ values (Fig. 1C). Untransformed fibroblasts were fully resistant to Proscillaridin A. Likewise, *RAS*^{V12} transformed cells were mildly affected by the treatment where Proscillaridin A at high doses failed to impact cell viability by more than 50%. Conversely, *MYC* transformed fibroblasts were highly sensitive to Proscillaridin A with an IC₅₀ value of 70 nM. Moreover, *MYC* and *RAS*^{V12} transformed fibroblasts (referred as to *RAS*^{V12}+*MYC*) had a low IC₅₀ value (132 nM) despite the presence of *RAS*^{V12}. Consequently, *MYC* overexpression was driving Proscillaridin A sensitivity in transformed fibroblasts.

To achieve clinically concentration in the *MYC* overexpressing leukemic cells (up to 10 nM), we treat MOLT-4 and NALM-6 cells during 48h and measured IC₅₀ values of 2.3 nM and 3 nM, respectively (Fig. 1D). To further confirm the role of MYC protein levels to Proscillaridin A sensitivity, we transduced high MYC expressing (MOTL-4) and low MYC expressing (REH) leukemia cells, with MYC oncogene. After transduction and selection steps, MOLT-4 cells had similar MYC protein levels than WT cells, most likely due to an increased cell death upon additional MYC expression (Supplementary Fig. S1D). In these cells, Proscillaridin A sensitivity was unchanged (Supplementary Fig. S1D). However, *MYC* transduced REH cells expressed higher MYC levels, which increased Proscillaridin A sensitivity (Supplementary Fig. S1E). Altogether, these results support Proscillaridin A repurposing against MYC overexpressing leukemia.

To explore the mechanism by which *MYC* overexpression in cancer cells correlates with Proscillaridin A sensitivity, we compared its effects between *MYC* driven leukemic cells

(MOLT-4 and NALM-6) and low expressing *MYC* cancers driven by *KRAS* mutations (SW48 colon and A549 lung cancer cells). We found that Proscillaridin A (5 nM; 48h) significantly reduced *MYC* protein level by more than 50% in MOLT-4 and NALM-6 cells but not in SW48 and A549 cells (Fig. 1E). Time-course experiments with both leukemic cell lines (8h to 96h) showed that Proscillaridin A induced a significant (up to 80%) and rapid *MYC* downregulation (Fig. 1F; Supplementary Fig. S1F). These results demonstrate that low dose Proscillaridin A inhibits efficiently leukemia growth causing rapid *MYC* downregulation. Lastly, we performed a cycloheximide-chase assay in MOLT-4 cells treated with Proscillaridin A at low dose (5 nM; 16h). We observed that drug treatment produced almost a 50% reduction in *MYC* protein half-life (*MYC* $t_{1/2}$: 41 min in untreated cells vs 23 min in Proscillaridin A treated cells; Fig. 1G and 1H). Therefore, Proscillaridin A targets *MYC* overexpressing leukemia cells by reducing *MYC* protein half-life, causing a rapid degradation.

Proscillaridin A Downregulates Cell Proliferation Programs and Induces T-Cell Differentiation

To gain insight into Proscillaridin A effects against *MYC*-driven leukemic cells, we investigated drug-induced gene expression changes in T-ALL cells (MOLT-4). By quantitative RT-PCR (qPCR), we found that Proscillaridin A significantly downregulated *MYC* mRNA after 16h treatment and up to 90% after 48h (Fig. 2A). Then, we used RNA-sequencing to explore transcriptomic effects of Proscillaridin A (5 nM; 48h) in MOLT-4 cells. After drug treatment, transcriptome analysis showed a downregulation of 2,759 genes ($\log_2FC < 0.5$; P-value adjusted < 0.05) and concomitant upregulation of 3,271 genes ($\log_2FC > 1$; P-value adjusted < 0.05 ; Supplementary Fig. S2A and S2B). Using Metascape, gene ontology analysis revealed that

downregulated genes were involved in DNA replication, biosynthesis and metabolic processes (Fig 2B; Supplementary Fig. S2C). Consistent with qPCR results, *MYC* transcript was significantly downregulated in our RNA-sequencing data set (Fig. 2C). Gene Set Enrichment Analysis showed that MYC PATHWAY (which includes 30 MYC target genes) was significantly downregulated (Fig. 2C). Notably, these transcriptomic effects correlated with a 25% decrease of S-phase cells as measured by BrdU staining (Fig. 2D; Supplemental Fig. S2D). Proscillaridin A also significantly downregulated 11 T-cell leukemia master transcription factors (Fig. 2E) (27-29). These data support that Proscillaridin A efficiently inhibits proliferation programs in MYC-driven leukemia.

Gene ontology analysis also revealed that upregulated genes were enriched for hematopoietic and lymphoid organ development, suggesting the onset of leukemia differentiation (Fig. 2F and Supplemental Fig. S2E). To probe the functional significance of this change, we measured T-cell differentiation markers in MOLT-4 cells before and after treatment. By qPCR, mRNA levels of T-cell differentiation markers *NOTCH3* and its target *HES1* were upregulated after 48h treatment and remained expressed for 2 days after drug removal (Fig. 2G) (30). By flow cytometry, we measured a significant increase in TCR and CD3 expression, which lasted up to 4 days after drug removal, suggesting the onset of normal T-cell activation (Fig. 2H and 2I) (31). Upregulation of these differentiation markers were in the same range than the levels measured after TPA treatment, a well-known inducer of leukemia differentiation (Fig. 2H and 2I) (32). Altogether, Proscillaridin A treatment produced a transcriptomic shift from a proliferative program to the induction of T-cell leukemia differentiation.

Proscillaridin A Induces Global Loss of Histone H3 Acetylation

Since Proscillaridin A induced gene expression and phenotypic changes, we hypothesized that it triggers epigenetic effects in high MYC-driven leukemia. We analyzed histone H3 and H4 post-translational modifications by western blotting after 16h to 96h of Proscillaridin A treatment (5 nM). We found that Proscillaridin A produced a significant time-dependent reduction (by 75%) of lysine acetylation at H3K9, H3K14, H3K18, H3K27 residues and global loss of H3 acetylation in MOLT-4 cells (Fig. 3A; Supplemental Fig. S3A). The dramatic reduction in H3K27ac level was confirmed by chromatin immunoprecipitation in which H3K27ac antibody pulled-down similar levels of DNA than IgG after treatment (Supplemental Fig. S3B). Similar results were obtained in NALM-6 cells after Proscillaridin A A treatment (Supplemental Fig. S3C). No change was detected on H4 acetylation or H3 methylation marks (Supplemental Fig. S3D, S3E, S4A and S4B). Interestingly, loss of H3 acetylation induced global chromatin reorganization in MOLT-4 cells after treatment, as shown by DAPI staining (Supplemental Fig. S4C).

We next asked if there was a correlation between loss of H3 acetylation and gene expression changes after Proscillaridin A treatment. To address this question, we combined our RNA-Seq data pre- and post-treatment with H3K27ac ChIP-seq data of untreated MOLT-4 since this mark is associated with transcribed regions and is globally lost after treatment (17). Among 7,097 genes marked at their promoters with H3K27ac (-500 to +500 bp) in untreated MOLT-4 cells, 2,169 genes were differentially expressed after Proscillaridin A treatment. Seventy-four percent of those (1,608 genes), marked by H3K27ac in untreated cells, were significantly downregulated after treatment (Fig. 3B), which is consistent with the loss of this active epigenetic mark (Fig. 3C). Gene ontology analysis of these 1,608 downregulated genes showed a significant relationship with metabolism and proliferation processes (Fig. 3D; Supplemental Fig.

S5A). Among these genes, all MYC PATHWAY genes (n=30) previously described (Fig. 2C) were marked by H3K27ac in untreated MOLT-4 cells and were all downregulated by treatment (Fig. 3C and 3E). Network analysis showed that these MYC target genes are co-expressed simultaneously, and are known to exhibit protein-protein interactions with MYC, confirming the global effect of Proscillaridin A on MYC pathway (Supplemental Fig. S6A and S6B). By contrast, upregulated genes marked by H3K27ac in untreated cells were associated with apoptosis, negative regulation of proliferation and cell differentiation (Supplemental Fig. S5B) corroborating our transcriptomic and functional analyses. Collectively, these results demonstrate that Proscillaridin A produces global loss of H3 acetylation, which was associated with silencing of genes involved in proliferation and MYC pathway.

Proscillaridin A Induces Loss of Lysine Acetylation in MYC Target Genes and Chromatin Regulators

We then asked whether depletion of lysine acetylation was extended to non-histone proteins after treatment. First, we measured MYC acetylation levels after 8, 16 and 24h of Proscillaridin A treatment (5 nM) in MOLT-4 cells, since this post-translational modification plays a role in its stability (12, 33). After MYC immunoprecipitation and probing with a pan-acetyl antibody, we measured a time dependent decrease (up to 75%) of MYC total acetylation (Fig. 4A).

To further characterize the extent of acetylation loss, we conducted an acetylome study by mass spectrometry on untreated and Proscillaridin A-treated (5 nM; 48h) MOLT-4 cells (Fig. 4B). Two distinct MYC peptides showed a significant reduction in lysine acetylation after treatment, which confirmed our immunoprecipitation results (Supplemental Fig. S7A). Mass spectrometry analysis showed that 28 peptides (including MYC) had a significant loss of lysine

acetylation after treatment, associated with chromatin organization (Fig. 4C). Among them, 8 are known MYC target proteins and 6 are involved in chromatin organization (Fig. 4D and 4E). Networks analysis showed that these 28 proteins are generally co-expressed, suggesting a connection between their acetylation and expression levels (Supplemental Fig S7B). Interestingly, 8 out of 28 proteins were MYC target proteins, including MYC itself and 6 out of 28 are involved in histone acetylation regulation (Fig.4D and 4E). Altogether, Proscillaridin A reduces lysine acetylation of MYC, its protein partners and several histone acetylation regulators.

Proscillaridin A Efficiently Downregulates Histone Acetyltransferases Involved in MYC Acetylation

We next investigated whether acetylation loss was due to a dysregulation of histone acetyltransferases (KATs). We measured, by western blotting, KAT levels before and after Proscillaridin A treatment (5 nM; 8h-96h) in MOLT-4 cells. Proscillaridin A produced a time-dependent reduction (up to 80%) of several KATs including KAT3A (CBP), KAT3B (P300), KAT5 (TIP60), KAT2A (GCN5) and KAT6A (MOZ) (Fig. 5A, Supplemental Fig. S8A). Expression of KAT2B (PCAF) and KAT7 (HBO1) were not altered by the treatment (Supplemental Fig. S8A and S8B). No significant changes were observed in class I histone deacetylases (HDACs) expression, suggesting that acetylation loss mainly involved KATs downregulation (Supplemental Fig. S8C). Interestingly, KAT downregulation was observed only at the protein level, since Proscillaridin A did not significantly decrease their mRNA levels except for KAT2A (Supplemental Fig. S8D). Significant reduction in KAT protein expression including KAT2A, KAT3A, KAT3B and KAT6A, which target histone H3, occurred 8h prior to significant H3 acetylation loss (34-36). Despite KAT5 decrease, a KAT known to acetylate H2A,

H3 and H4, no changes in H4 acetylation (total or on specific lysines) were measured after treatment (Supplemental Fig. S3D) (37). This result can be explained by the fact that KAT7 (HBO1) expression, which is also involved in H4 acetylation, was not affected by the treatment (38). To confirm the effects of KAT downregulation in MOLT-4 cells, we used KAT3A/B pharmacological inhibitor C646. Similar to Proscillaridin A treatment, C646 (10 μ M; 48h) significantly reduced lysine acetylation (H3K14, H3K18, H3K27, and total H3-acetylation), depleted KATs (KAT3A, and KAT3B) and MYC protein levels (Fig. 5B and 5C; Supplemental Fig. S8E and S8F).

Since KATs have overlapping enzymatic activities, we asked if the extent KAT protein downregulation was associated with Proscillaridin A sensitivity. We compared KAT protein levels before and after Proscillaridin A treatment in *MYC* overexpressing cancer cells (MOLT-4, NALM-6, *MYC* and *RAS^{V12}+MYC* transformed fibroblasts) versus low *MYC* expressing cancer cells (SW48, A549, and *RAS^{V12}* transformed fibroblasts; Fig. 5D; Supplemental Fig. S9A). Cancer cell lines were treated at 5 nM for 48h, which was clinically relevant and close the IC₅₀ values of leukemic cells. Transformed fibroblasts were treated at 70 nM for 48h, which was the IC₅₀ value of *MYC* transduced fibroblasts as described in Figure 1C. After treatment, we observed that KAT protein downregulation was more pronounced in drug-sensitive cells with high *MYC* expression as compared to drug-resistant cells with low *MYC* expression. Indeed, Proscillaridin A induced a significant downregulation of 4/7 KATs in MOLT-4 cells, 3/7 KATs in NALM-6 cells, 3/7 KATs in *RAS^{V12}+MYC* transformed fibroblasts, and 7/7 KATs in *MYC* transformed fibroblasts (Fig. 5D). Interestingly, downregulated KATs (KAT2A/GCN5, KAT3A/CBP, KAT3B/P300, KAT5/TIP60 and KAT6A/MOZ) in *MYC* overexpressing cells, were shown to acetylate MYC and increase its stability (33, 39-41). In stark contrast, Proscillaridin A failed

to downregulate more than one KATs in low *MYC* expressing cancer cells (SW48, A549 and *RAS^{V12}* transformed fibroblasts, Fig. 5D). Thus, Proscillaridin A-induced KAT proteins downregulation was more important in high *MYC* expressing cells, which correlated with IC₅₀ values within its therapeutic range.

Similar analysis was performed on histone H3 acetylation between high *MYC* expressing cancer cells versus low *MYC* expressing cancer cells (Supplemental Fig. S9B and S9C). Proscillaridin A induced a significant loss of H3 acetylation in drug-sensitive and *MYC* overexpressing cells (MOLT-4, NALM-6, *MYC* and *RAS^{V12}+MYC* transformed fibroblasts). In Proscillaridin A-resistant and low expressing *MYC* cancer cells, histone acetylation levels were unchanged in SW48 cells after treatment, which correlated with our previous report (Supplemental Fig. S8B and S8C) (16). By contrast, A549 cells lost significantly H3 acetylation after treatment while *RAS^{V12}* transformed fibroblasts lost acetylation on some sites (K9, K27 and pan-acetyl) and other sites were not affected (K14 and K18) (Supplemental Fig. S9B and S9C). These data suggest that Proscillaridin A sensitivity is not entirely dependent on histone acetylation loss, suggesting the importance of non-histone acetylation. In summary, Proscillaridin A antiproliferative effect was associated with its ability to downregulate several simultaneously KATs resulting loss of acetylation in histone and non-histone proteins (Fig. 5E).

Proscillaridin A Efficiently Targets MYC-Driven Leukemic Stem Cell Populations

We sought to determine whether Proscillaridin A could target leukemic stem cells (LSCs) (42, 43). To explore this possibility, we used two LSC models, a mouse model of T-ALL and a LSC model of human acute myeloid leukemia (AML) (42, 44, 45). First, pre-LSCs T-ALL cells were isolated from a transgenic mouse model that closely reproduces human T-ALL (46). We

previously showed that these pre-LSCs are driven by the *SCL/TAL1* and *LMO1* oncogenes, which depend on *NOTCH1-MYC* pathways, and are resistant to chemotherapeutic drugs used against leukemia (doxorubicin, camptothecin and dexamethasone) (4, 42). Low concentrations (3-10 nM) of Proscillaridin A significantly decreased pre-LSC T-ALL viability by 70% after 4 days of treatment (Fig. 6A). Despite being resistant to chemotherapeutic drugs, these pre-LSCs (T-ALL) were sensitive to Proscillaridin A at clinically relevant doses (42).

Then, we used primary human AML 8227 cells, which contain functional LSCs within the CD34⁺ sub-population, and non-LSC cells characterized by CD34⁻ with or without CD15⁺ expression (Fig. 6B) (44, 45). Gene set enrichment analysis published by Lechman et al. revealed that the LSCs-enriched fraction (CD34⁺/CD38⁻) in AML 8227 are enriched for MYC target genes expression as compared to non-LSCs (CD34⁻) (Fig 6C) (44). After 6 days of Proscillaridin A treatment, bulk AML 8227 cells had an IC₅₀ of 29 nM (Fig. 6D). Likewise, CD34⁻ with or without CD15⁺ non-LSC cells had IC₅₀ of 38 nM and 29 nM, respectively. In contrast, all CD34⁺ AML cells (CD34⁺, CD34⁺/CD38⁺ and CD34⁺/CD38⁻) were more sensitive to Proscillaridin A with IC₅₀ values of 15 nM. Altogether, Proscillaridin A efficiently targets LSC-enriched populations, in both T-ALL and AML models marked by high MYC expression, further supporting its repurposing against MYC-dependent leukemia.

Discussion

The repurposing potential of cardiac glycosides in oncology has been suggested several decades ago and is currently under intense clinical investigation either alone (in prostate cancers, NCT01162135; breast cancer, NCT01763931; and sarcoma, NCT00017446) or in combination with chemotherapy (digoxin with cisplatin in head and neck cancers, NCT02906800; or with epigenetic drug decitabine, NCT03113071) (47). However, none of these preclinical studies emphasize a rationale to use cardiac glycosides against cancer with specific oncogene dependencies, such as MYC, although previous research studies identified MYC inhibition induced by cardiac glycosides (48, 49). Moreover, Proscillaridin A is rarely chosen for clinical and research investigations due to its short therapeutic window, which highlight the need of a specific rationale to use this compound. Our study is the first to describe the negative correlation between MYC dependency and Proscillaridin A anticancer activity which provide a strong rationale to repurpose Proscillaridin A specifically against leukemia with *MYC* oncogenic dependency.

One of the key driver of leukemogenesis is MYC deregulation (3). Here, we focused our mechanistic study on lymphoblastoid leukemia models. However, Proscillaridin A exhibited a strong anticancer activity on myeloid leukemic stem cells overexpressing MYC in our study and myeloid leukemia cells are characterized to be deregulated for MYC activity in 90% of patients, which lead us to hypothesize that Proscillaridin A should also be potent in high-MYC expressing myeloid leukemia (50). Mice experiments should be conducted in both leukemic lineages overexpressing MYC to consider Proscillaridin A repurposing in different leukemia with MYC dependency.

Proscillaridin A induced a rapid loss of MYC protein expression in *MYC*-driven leukemia cells. Importantly, Proscillaridin A efficiently targeted *MYC*-dependent leukemic stem cells, indicating the potential of controlling leukemia self-renewal capacity. We also demonstrated that Proscillaridin A targeted *MYC* overexpressing leukemic cells by downregulating KATs involved specifically in *MYC* acetylation and transcriptional program (KAT2A, KAT3A, KAT3B, KAT5 and KAT6A) (33, 39-41, 51). These KATs are positive regulators of *MYC* stability and *MYC* pathway. Importantly, KATs have overlapping activity and targets, suggesting the relevance of targeting these enzymes simultaneously to efficiently reduce acetylation of *MYC* and its partners (12, 39, 41, 51). Indeed, Proscillaridin A -induced downregulation of several KATs was observed in Proscillaridin A-sensitive and *MYC* overexpressing leukemic cells, whereas this effect was sporadic in resistant and low *MYC* expressing cells. Proscillaridin A treatment induced a significant loss of H3 acetylation levels in *MYC* overexpressing cells whereas loss of histone acetylation was not observed in SW48 cells but was significantly reduced in A549 and in two lysine residues in *RAS*^{v12}-transfected fibroblasts, suggesting that loss of H3 acetylation is not sufficient to modulate cell viability in these low *MYC* expressing cells. These data highlight the importance of acetylation levels in non-histone proteins as a potential therapeutic target in *MYC* overexpressing leukemia. Experiments are ongoing to address this specific question. Moreover, in this study, a low level of non-histone protein acetylations is maintained through a long-term inhibition of several KAT expressions. Typically, pharmacological regulation of acetylation as anticancer strategy has been performed through single KAT inhibition (52). However, lysine acetylation is a dynamic process that can be modulated within minutes and it is maintained on histone and non-histone proteins by the redundant activity of KATs. Therefore, cancer cells may

rapidly recover from incomplete pharmacological inhibition or from the specific inhibition of a particular KAT (53).

Conclusion

Here, we demonstrated that Proscillaridin A treatment in MYC overexpressing leukemia cells, led to the downregulation of several KATs, induced significant acetylation loss, produced MYC degradation, and induced persistent leukemia cell differentiation, which was maintained for several days after drug removal. Therefore, this study supports a strategy of simultaneously targeting several KATs to reduce efficiently acetylation in histone and in non-histone proteins, which overcome the redundant activity of KATs. The mechanism implicated in Proscillaridin A-induced KATs downregulation is under investigation. Overall, we conclude that Proscillaridin A has a promising potential to be repurposed as an epigenetic drug in oncology, particularly in MYC overexpressing leukemia.

List of abbreviations

AML: Acute myeloid leukemia

H3: Histone 3

H4: Histone 4

HDAC: Histone deacetylase

IC₅₀: Half-maximal inhibitory concentration

KAT: Lysine acetyltransferase

LSCs: leukemic stem cells

MYC: c-MYC

qPCR: quantitative RT-PCR

T-ALL: T-cell acute lymphoblastic leukemia

TPA: 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetate

Declarations

Ethics approval and consent to participate: Not applicable

Consent for publication: Not applicable

Availability of data and materials: The datasets used and/or analysed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Competing interest: The author declares that they have no competing of interests.

Funding: We acknowledge the Cole Foundation for the Transition Award (to N. J-M R) and a PhD fellowship (E.M,D.C.), the Charles-Bruneau immuno-hemato-oncology Unit, the Cancer Research Society, the Canadian Foundation for Innovation for funding, and the Fond de Recherche du Québec en Santé.

Author contributions: E.M.D.C. and N.J-M.R. designed the study and wrote the manuscript. E.M.D.C., G.A., G. McI., A.B., V. B-L., C.R., M. R., M. B., K. E., EE. F-D., A. H., T. H., C. B., and S. McG. performed the experiments. C.R., M.C., P.S.O and D.S performed RNA sequencing experiments and bioinformatics analyses. J.R. J., N. K., Y. S., M. D. performed mass spectrometry experiments and acetylome studies. The authors declare no conflict of interest.

Da Costa *et al.*

Acknowledgements: We thank Catherine Legros for the graphical help, and Dr André Tremblay, Dr Audrey Claing, Dr Elie Haddad and Dr Carolina Alfieri for providing cell lines and materials.

References:

1. Bradner JE, Hnisz D, Young RA. Transcriptional Addiction in Cancer. *Cell*. 2017;168(4):629-43.
2. Dang CV. MYC on the path to cancer. *Cell*. 2012;149(1):22-35.
3. Delgado MD, Leon J. Myc roles in hematopoiesis and leukemia. *Genes Cancer*. 2010;1(6):605-16.
4. Gerby B, Tremblay CS, Tremblay M, Rojas-Sutterlin S, Herblot S, Hebert J, et al. SCL, LMO1 and Notch1 reprogram thymocytes into self-renewing cells. *PLoS Genet*. 2014;10(12):e1004768.
5. Felsher DW, Bishop JM. Reversible tumorigenesis by MYC in hematopoietic lineages. *Molecular cell*. 1999;4(2):199-207.
6. Marinkovic D, Marinkovic T, Mahr B, Hess J, Wirth T. Reversible lymphomagenesis in conditionally c-MYC expressing mice. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 2004;110(3):336-42.
7. Filippakopoulos P, Qi J, Picaud S, Shen Y, Smith WB, Fedorov O, et al. Selective inhibition of BET bromodomains. *Nature*. 2010;468(7327):1067-73.
8. Delmore JE, Issa GC, Lemieux ME, Rahl PB, Shi J, Jacobs HM, et al. BET bromodomain inhibition as a therapeutic strategy to target c-Myc. *Cell*. 2011;146(6):904-17.
9. Roe JS, Mercan F, Rivera K, Pappin DJ, Vakoc CR. BET Bromodomain Inhibition Suppresses the Function of Hematopoietic Transcription Factors in Acute Myeloid Leukemia. *Molecular cell*. 2015;58(6):1028-39.
10. Fong CY, Gilan O, Lam EY, Rubin AF, Ftouni S, Tyler D, et al. BET inhibitor resistance emerges from leukaemia stem cells. *Nature*. 2015;525(7570):538-42.
11. Kurimchak AM, Shelton C, Duncan KE, Johnson KJ, Brown J, O'Brien S, et al. Resistance to BET Bromodomain Inhibitors Is Mediated by Kinome Reprogramming in Ovarian Cancer. *Cell Rep*. 2016;16(5):1273-86.
12. Faiola F, Liu X, Lo S, Pan S, Zhang K, Lyman E, et al. Dual regulation of c-Myc by p300 via acetylation-dependent control of Myc protein turnover and coactivation of Myc-induced transcription. *Molecular and cellular biology*. 2005;25(23):10220-34.
13. Luebben WR, Sharma N, Nyborg JK. Nucleosome eviction and activated transcription require p300 acetylation of histone H3 lysine 14. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(45):19254-9.
14. Dahlin JL, Nelson KM, Strasser JM, Barsyte-Lovejoy D, Szewczyk MM, Organ S, et al. Assay interference and off-target liabilities of reported histone acetyltransferase inhibitors. *Nature communications*. 2017;8(1):1527.
15. Raynal NJ, Da Costa EM, Lee JT, Gharibyan V, Ahmed S, Zhang H, et al. Repositioning FDA-Approved Drugs In Combination With Epigenetic Drugs To Reprogram Colon Cancer Epigenome. *Molecular cancer therapeutics*. 2017;16(2):397-407.
16. Raynal NJ, Lee JT, Wang Y, Beaudry A, Madireddi P, Garriga J, et al. Targeting Calcium Signaling Induces Epigenetic Reactivation of Tumor Suppressor Genes in Cancer. *Cancer Res*. 2016;76(6):1494-505.
17. Prassas I, Diamandis EP. Novel therapeutic applications of cardiac glycosides. *Nature reviews Drug discovery*. 2008;7(11):926-35.
18. Jain S, Vaidyanathan B. Digoxin in management of heart failure in children: Should it be continued or relegated to the history books? *Ann Pediatr Cardiol*. 2009;2(2):149-52.

19. Tailler M, Senovilla L, Lainey E, Thepot S, Metivier D, Sebert M, et al. Antineoplastic activity of ouabain and pyrithione zinc in acute myeloid leukemia. *Oncogene*. 2012;31(30):3536-46.
20. Denicolai E, Baeza-Kallee N, Tchoghandjian A, Carre M, Colin C, Jiglaire CJ, et al. Proscillaridin A is cytotoxic for glioblastoma cell lines and controls tumor xenograft growth in vivo. *Oncotarget*. 2014;5(21):10934-48.
21. Kometiani P, Liu L, Askari A. Digitalis-induced signaling by Na⁺/K⁺-ATPase in human breast cancer cells. *Mol Pharmacol*. 2005;67(3):929-36.
22. Dobin A, Davis CA, Schlesinger F, Drenkow J, Zaleski C, Jha S, et al. STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics*. 2013;29(1):15-21.
23. Love MI, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome biology*. 2014;15(12):550.
24. Downey M, Johnson JR, Davey NE, Newton BW, Johnson TL, Galaang S, et al. Acetylome profiling reveals overlap in the regulation of diverse processes by sirtuins, *gcn5*, and *esal*. *Mol Cell Proteomics*. 2015;14(1):162-76.
25. Cox J, Mann M. MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. *Nat Biotechnol*. 2008;26(12):1367-72.
26. Choi M, Chang CY, Clough T, Broudy D, Killeen T, MacLean B, et al. MSstats: an R package for statistical analysis of quantitative mass spectrometry-based proteomic experiments. *Bioinformatics*. 2014;30(17):2524-6.
27. Hnisz D, Abraham BJ, Lee TI, Lau A, Saint-Andre V, Sigova AA, et al. Super-enhancers in the control of cell identity and disease. *Cell*. 2013;155(4):934-47.
28. Niederriter AR, Varshney A, Parker SC, Martin DM. Super Enhancers in Cancers, Complex Disease, and Developmental Disorders. *Genes (Basel)*. 2015;6(4):1183-200.
29. Whyte WA, Orlando DA, Hnisz D, Abraham BJ, Lin CY, Kagey MH, et al. Master transcription factors and mediator establish super-enhancers at key cell identity genes. *Cell*. 2013;153(2):307-19.
30. Bellavia D, Campese AF, Vacca A, Gulino A, Screpanti I. Notch3, another Notch in T cell development. *Semin Immunol*. 2003;15(2):107-12.
31. Kuhns MS, Davis MM, Garcia KC. Deconstructing the form and function of the TCR/CD3 complex. *Immunity*. 2006;24(2):133-9.
32. Carlsson M, Matsson P, Rosen A, Sundstrom C, Totterman TH, Nilsson K. Phorbol ester and B cell-stimulatory factor synergize to induce B-chronic lymphocytic leukemia cells to simultaneous immunoglobulin secretion and DNA synthesis. *Leukemia*. 1988;2(11):734-44.
33. Vervoorts J, Luscher-Firzlaff JM, Rottmann S, Lilischkis R, Walsemann G, Dohmann K, et al. Stimulation of c-MYC transcriptional activity and acetylation by recruitment of the cofactor CBP. *EMBO Rep*. 2003;4(5):484-90.
34. Huang F, Abmayr SM, Workman JL. Regulation of KAT6 Acetyltransferases and Their Roles in Cell Cycle Progression, Stem Cell Maintenance, and Human Disease. *Mol Cell Biol*. 2016;36(14):1900-7.
35. Jin Q, Yu LR, Wang L, Zhang Z, Kasper LH, Lee JE, et al. Distinct roles of GCN5/PCAF-mediated H3K9ac and CBP/p300-mediated H3K18/27ac in nuclear receptor transactivation. *EMBO J*. 2011;30(2):249-62.
36. Henry RA, Kuo YM, Andrews AJ. Differences in specificity and selectivity between CBP and p300 acetylation of histone H3 and H3/H4. *Biochemistry*. 2013;52(34):5746-59.

37. Kimura A, Horikoshi M. Tip60 acetylates six lysines of a specific class in core histones in vitro. *Genes Cells*. 1998;3(12):789-800.
38. Avvakumov N, Cote J. The MYST family of histone acetyltransferases and their intimate links to cancer. *Oncogene*. 2007;26(37):5395-407.
39. Zhang K, Faiola F, Martinez E. Six lysine residues on c-Myc are direct substrates for acetylation by p300. *Biochemical and biophysical research communications*. 2005;336(1):274-80.
40. Sheikh BN, Lee SC, El-Saafin F, Vanyai HK, Hu Y, Pang SH, et al. MOZ regulates B-cell progenitors and, consequently, Moz haploinsufficiency dramatically retards MYC-induced lymphoma development. *Blood*. 2015;125(12):1910-21.
41. Patel JH, Du Y, Ard PG, Phillips C, Carella B, Chen CJ, et al. The c-MYC oncoprotein is a substrate of the acetyltransferases hGCN5/PCAF and TIP60. *Mol Cell Biol*. 2004;24(24):10826-34.
42. Gerby B, Veiga DFT, Kros J, Nourreddine S, Ouellette J, Haman A, et al. High-throughput screening in niche-based assay identifies compounds to target preleukemic stem cells. *The Journal of Clinical Investigation*. 2016;126(12):4569-84.
43. Shlush LI, Zandi S, Mitchell A, Chen WC, Brandwein JM, Gupta V, et al. Identification of pre-leukaemic haematopoietic stem cells in acute leukaemia. *Nature*. 2014;506(7488):328-33.
44. Lechman ER, Gentner B, Ng SW, Schoof EM, van Galen P, Kennedy JA, et al. miR-126 Regulates Distinct Self-Renewal Outcomes in Normal and Malignant Hematopoietic Stem Cells. *Cancer Cell*. 2016;29(2):214-28.
45. Laverdiere I, Boileau M, Neumann AL, Frison H, Mitchell A, Ng SWK, et al. Leukemic stem cell signatures identify novel therapeutics targeting acute myeloid leukemia. *Blood Cancer J*. 2018;8(6):52.
46. Tremblay M, Tremblay CS, Herblot S, Aplan PD, Hebert J, Perreault C, et al. Modeling T-cell acute lymphoblastic leukemia induced by the SCL and LMO1 oncogenes. *Genes & development*. 2010;24(11):1093-105.
47. Stenkvist B, Bengtsson E, Eklund G, Eriksson O, Holmquist J, Nordin B, et al. Evidence of a modifying influence of heart glucosides on the development of breast cancer. *Anal Quant Cytol*. 1980;2(1):49-54.
48. Yang QF, Dalgard CL, Eidelman O, Jozwik C, Pollard BS, Srivastava M, et al. Digitoxin induces apoptosis in cancer cells by inhibiting nuclear factor of activated T-cells-driven c-MYC expression. *J Carcinog*. 2013;12:8.
49. Didiot MC, Hewett J, Varin T, Freuler F, Selinger D, Nick H, et al. Identification of cardiac glycoside molecules as inhibitors of c-Myc IRES-mediated translation. *J Biomol Screen*. 2013;18(4):407-19.
50. Ohanian M, Rozovski U, Kanagal-Shamanna R, Abruzzo LV, Loghavi S, Kadia T, et al. MYC protein expression is an important prognostic factor in acute myeloid leukemia. *Leuk Lymphoma*. 2019;60(1):37-48.
51. Frank SR, Parisi T, Taubert S, Fernandez P, Fuchs M, Chan HM, et al. MYC recruits the TIP60 histone acetyltransferase complex to chromatin. *EMBO Rep*. 2003;4(6):575-80.
52. Wapenaar H, Dekker FJ. Histone acetyltransferases: challenges in targeting bi-substrate enzymes. *Clin Epigenetics*. 2016;8:59.
53. Di Martile M, Del Bufalo D, Trisciuglio D. The multifaceted role of lysine acetylation in cancer: prognostic biomarker and therapeutic target. *Oncotarget*. 2016;7(34):55789-810.

Figure legends:

Fig. 1. Targeting High MYC Expressing Cancer Cells with Cardiac Glycoside Proscillaridin A. **a** Cell viability and half-maximal inhibitory concentration (IC_{50}) calculations after a 24h Proscillaridin A treatment (ranging from 1 nM to 100 μ M) in a high MYC expressing human leukemia cell lines (MOLT-4 and NALM-6) and in low MYC expressing human cancer cell lines (SW48 and A549) (n=4). **b** MYC and RAS protein expression assessed by western blotting in immortalized fibroblasts and fibroblasts transfected with RAS^{V12} , MYC and RAS^{V12}/MYC (n=3). **c** Dose response curves after 48h Proscillaridin A treatment (0.01 nM to 50 μ M) in immortalized fibroblasts and fibroblasts transfected with RAS^{V12} , MYC and RAS^{V12}/MYC (n=4). **d** Dose response curves and IC_{50} values after 48h Proscillaridin A treatment (ranging from 0.1 nM to 100 nM) in MOLT-4 (T-cell leukemia), and NALM-6 (B-cell leukemia) (n=3) Maximum tolerated dose in human is indicated. **e** MYC protein expression after Proscillaridin A treatment (5 nM; 48h) in MOLT-4, NALM-6, SW48 (colon cancer) and A549 (lung cancer) cells assessed by western blotting. MYC expression is calculated as a ratio over ACTIN levels (*indicates $P < 0.05$; One-way ANOVA; n = 3). **f** Time course experiment in MOLT-4 cells treated with Proscillaridin A at 5 nM (8h to 96h). MYC protein expression is calculated as a ratio over ACTIN levels (*indicates $P < 0.05$; One-way ANOVA; n = 3). **g** Effect of Proscillaridin A on MYC half-life in MOLT-4 cells. MYC half-life was estimated by cycloheximide (CHX) treatment (150 μ g/ml) in MOLT-4 cells pretreated or not with Proscillaridin A (5 nM, 16h). MYC protein expression was performed by Western blotting and ACTIN expression was used as loading control. **h** MYC expression level after cycloheximide treatment (150 μ g/ml) was quantified over ACTIN levels and represented relative to the level at time zero (grey) or represented relative to the level

following Proscillaridin A treatment (5 nM, 16h; blue). Linear regression analysis was conducted and MYC half-life was calculated.

Fig. 2. Transcriptomic Profiles from Replicative To Differentiated Phenotype After Low Dose Proscillaridin A Treatment in High MYC Expressing Leukemic Cells. **a** Quantitative PCR (qPCR) analysis of *MYC* mRNA expression after Proscillaridin A treatment (5 nM; 8h to 48h) in MOLT-4 cells, relative to untreated cells and normalized to β -2-microglobulin (*indicates $P < 0.05$; One-way ANOVA; $n = 3$). **b** Transcriptomic analysis by RNA-Sequencing of untreated and Proscillaridin A-treated (5 nM; 48h) MOLT-4 cells ($n = 3$). Genes downregulated by Proscillaridin A treatment ($\text{Log}_2 \text{FC} < -0.5$) were analyzed by Metascape and the top 7 Gene Ontology (GO) pathways are displayed. **c** Left panel, *MYC* transcript (RPKM) expression after Proscillaridin A treatment (5 nM; 48h) in RNA-sequencing data set (*indicates $P < 0.02$, paired t-test, $n = 3$). Right panel, gene set enrichment analysis of *MYC* pathway before and after Proscillaridin A treatment (5 nM; 48h) in MOLT-4 cells. Enrichment score (ES) and false discovery rate (FDR) rates are shown on the graph. **d** Effect of Proscillaridin A treatment (5 nM; 48h) on the percentage of S phase cell population on MOLT-4 cells (* indicates $P < 0.017$, paired t-test, $n = 3$). **e** Gene expression values (Log_2 fold change) obtained from RNA-sequencing in 11 genes downregulated after Proscillaridin A treatment (5 nM; 48h) in MOLT-4 cells. These genes were selected due to their role as master transcription factors associated in T-cell leukemia. **f** Heat map of gene expression levels (RPKM) involved in differentiation pathways (MOLT-4 cells) before and after Proscillaridin A treatment (5nM; 48h). **g** Quantitative PCR (qPCR) analysis of *NOTCH3* and *HES1* mRNA expression measured after Proscillaridin A treatment (5 nM; 48h) and 2 days post treatment, relative to untreated cells and normalized to GAPDH in MOLT-4 cells ($n = 2$). **h** and **i** Left panel, T-cell differentiation markers TCR and CD3 are measured by flow cytometry in MOLT-4 cells after Proscillaridin A treatment (5 nM; 48h), as well as 2 and 4 days post treatment ($n = 3$). Right panel, percentage of TCR and CD3 expression

in MOLT-4 cells. TPA treatment (10 nM; 48h, followed by a 24h resting period) was used as positive control of T-cell differentiation (*indicates $P < 0.05$; Two-way ANOVA; $n=3$).

Fig. 3. Gene Reprogramming Induced by Proscillaridin A Is Associated with Global Acetylation Loss in Histone H3. **a** Right panel, MOLT-4 cells were treated with Proscillaridin A (5 nM) and histones were acid-extracted after 8, 16, 24, 48, 72 and 96 hours. Histone 3 acetylation levels were assessed using antibodies against K9ac, K14ac, K18ac, K27ac, and total histone 3 acetylation. H3 was used as loading control. Left panel, H3 acetylation levels at 48h treatment were quantified and expressed as a percentage of untreated cells (* indicates $P < 0.05$; Two-way ANOVA; $n = 3$). **b** 2,169 genes are marked by H3K27ac in promoter regions (-500/+500 bp) in untreated MOLT-4 cells. RPKM values of differentially expressed genes ($FC > 1$; $FC < -0.5$) from RNA-sequencing data before and after Proscillaridin A treatment are displayed (* indicates $P < 0.006$; paired t-test; $n = 3$). **c** Pie chart shows percentage of upregulated (black) and downregulated (grey, including 30 MYC target) genes marked by H3K27ac in promoters of untreated MOLT-4 cells (5 nM, 48h). **d** Metascape analysis of genes marked by H3K27ac in promoters in untreated MOLT-4 cells and downregulated after Proscillaridin A treatment (5 nM; 48h). Top 9 GO pathways are displayed. **e** Metascape analysis of the 30 MYC target genes.

Fig. 4. Acetylation Decrease In MYC Targets And Chromatin Regulators Induced by Proscillaridin A In High MYC Expressing Cells. **a** Right panel, immunoprecipitation (IP) of MYC total lysine acetylation (K-AC) after Proscillaridin A treatment (5 nM; 8h-16h-24h) in MOLT-4 cells. Left panel, total lysine acetylation level on MYC was quantified and expressed as a percentage of untreated cells (* indicates $P < 0.05$; One-way ANOVA; $n = 3$). **b** Lysine acetylome profiling of MOLT-4 cells before and after Proscillaridin A treatment (5 nM; 48h). **c** Lysine acetylome metascape analysis in 28 peptides with significant loss of acetylation ($\text{Log}_2\text{FC} < -1$) after Proscillaridin A treatment (5 nM; 48h) in MOLT-4 cells. **d** Log_2FC of

acetylation levels in MYC target proteins (untreated VS treated). **e** Log₂FC of acetylation levels of histone regulators (untreated VS treated).

Fig. 5. Proscillaridin A Treatment Induces Downregulation of KATs Involved In MYC Acetylation. **a** KAT2A (GCN5), KAT3A (CBP), KAT3B (P300), KAT5 (TIP60), and KAT6A (MOZ) expression levels after Proscillaridin A treatment (5 nM, 48h) were assessed by western blotting in MOLT-4 cells (ACTIN was used as loading control). **b** Quantification of H3 acetylation levels after treatment with KAT3B/A inhibitor C646 (10 μM, 48h) (* indicates P<0.05; Two-way ANOVA; n=3). **c** MYC protein expression after C646 treatment and Proscillaridin A treatment (5 nM; 48h). ACTIN was used as loading control. **d** MOLT-4, NALM-6, SW48 and A549 cell lines were treated with Proscillaridin A (5 nM, 48h) and fibroblasts transfected with *RAS*^{V12}, *MYC* and *RAS*^{V12}/*MYC* were treated with Proscillaridin A (70 nM, 48h). KAT3A (CBP), KAT3B (P300), KAT5 (TIP60), KAT2A (GCN5), KAT2B (PCAF), KAT6A (MOZ) and KAT7 (HBO1) expression levels were assessed by western blotting, quantified and expressed as percentage of untreated cells (* indicates P<0.05; One-way ANOVA; n=3). **e** Scheme showing that Proscillaridin A targets high MYC expressing leukemic cells by inhibiting the histone acetyltransferases involved in MYC acetylation and stability.

Fig. 6. Proscillaridin A Targets Leukemic Stem Cells (LSCs). **a** Cell viability assay of T-ALL pre-LSC co-cultured with MS5-DL4 cells. Proscillaridin A (3 nM or 10 nM) was added 24h after co-culture, and cells were sorted for pre-LSC viability 4-days post treatment (*indicates P<0.05; One-way ANOVA; n≤3). **b** Cell viability assay of AML 8227 population composed of LSCs (CD34⁺) and non-LSCs (CD34⁻/CD15^{+/-}). AML 8227 were treated with Proscillaridin A (10 nM to 100 nM) for 6 days and cell viability was measured for each cell subgroup by flow cytometry.

Da Costa *et al.*

c Gene set enrichment analysis of MYC pathway between two AML 8227 subgroups: LSC-enriched population CD34⁺/CD38⁻ compared to non-LSC population CD34⁻. Enrichment score (ES) and false discovery rate (FDR) rates are shown on the graph. **d** Dose response curves and IC₅₀ values after a 6-day Proscillaridin A treatment (ranging from 10 nM to 100 nM) in each AML 8227 subgroup (n=3).

Figure 1

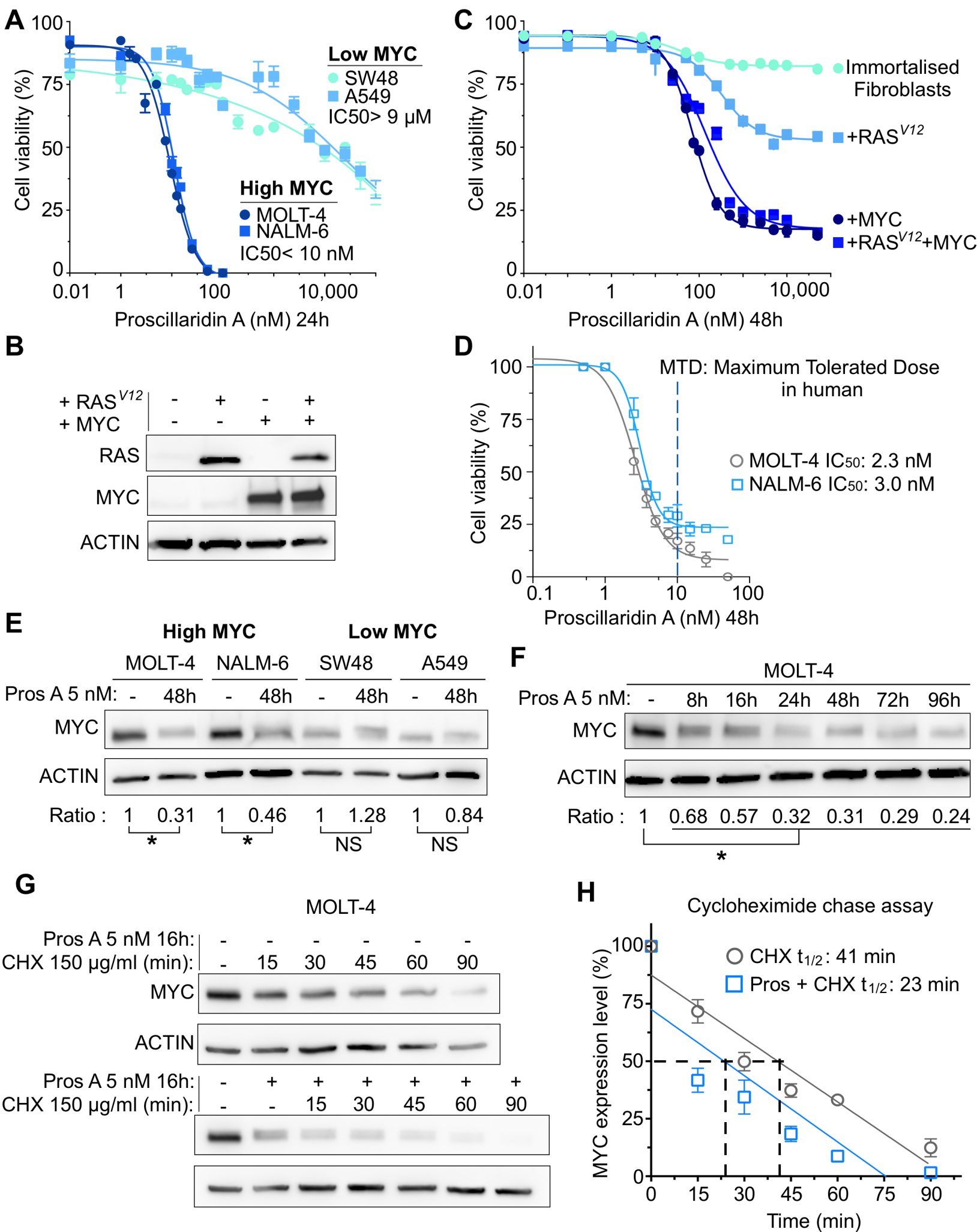


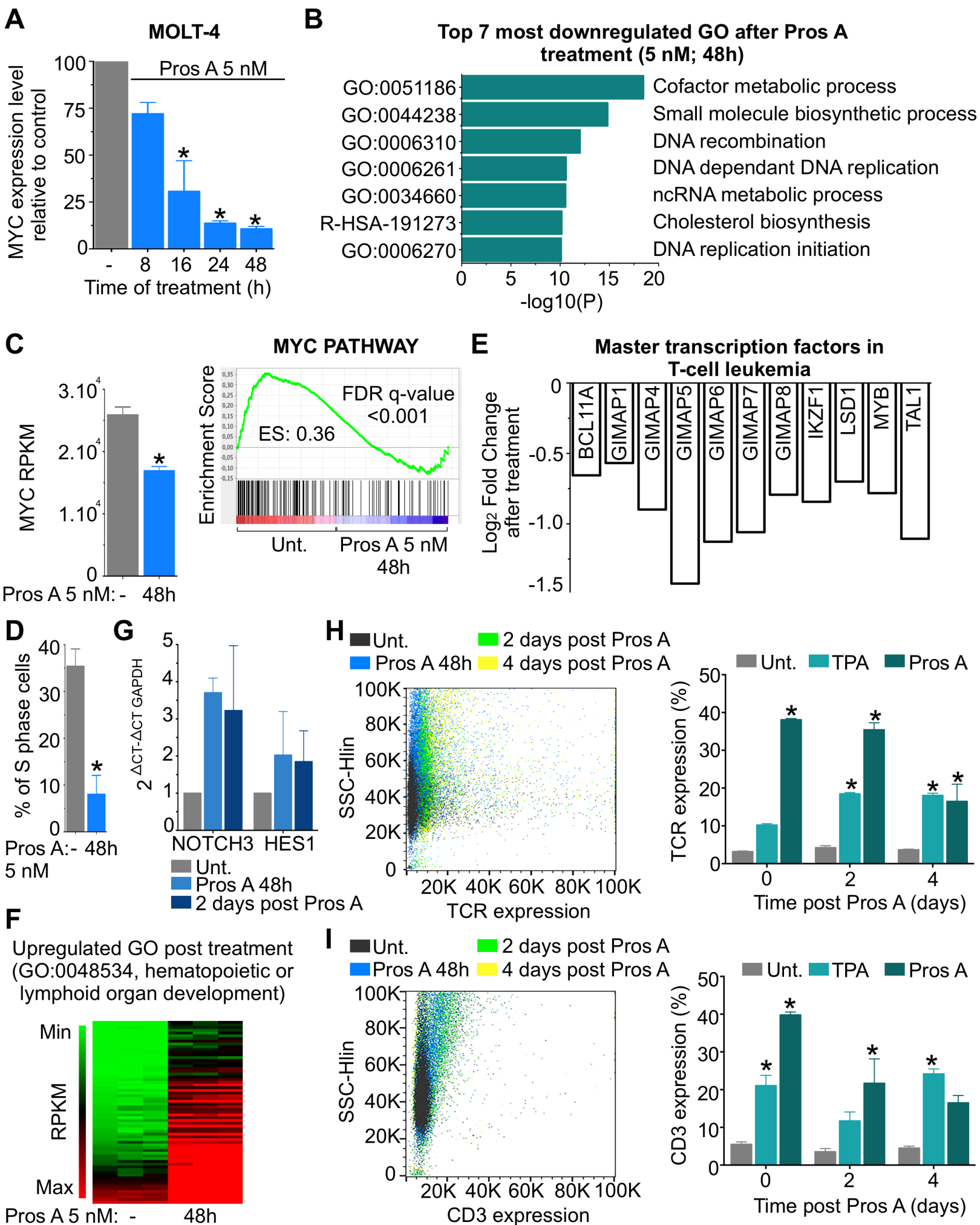
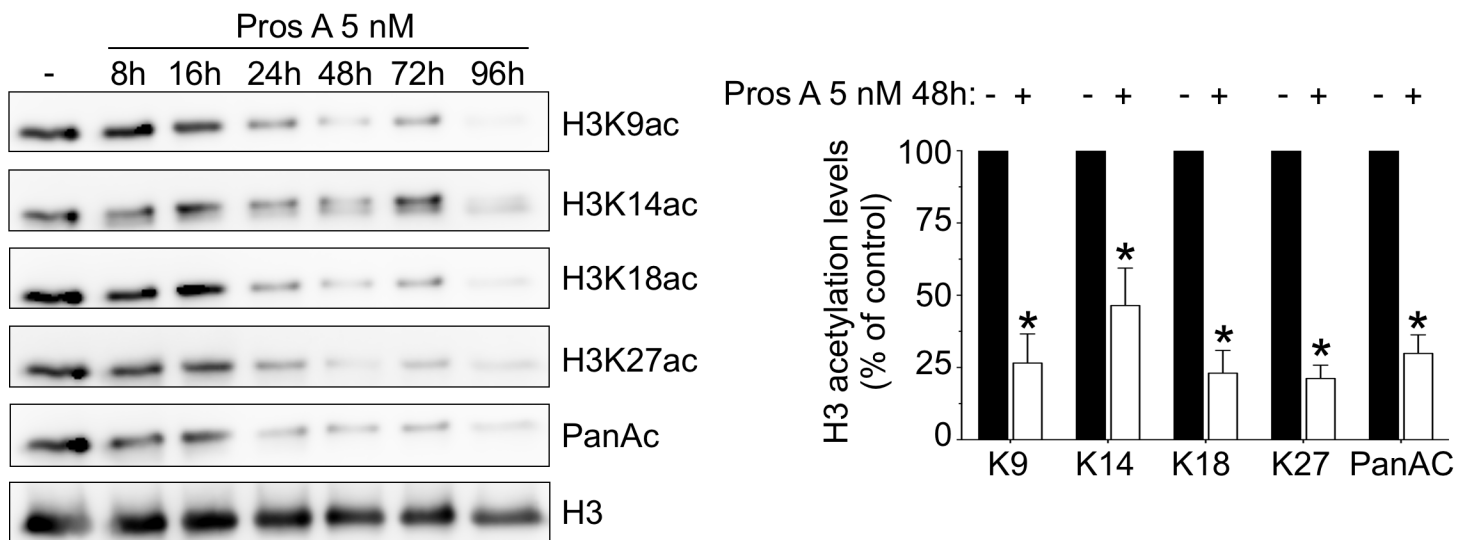
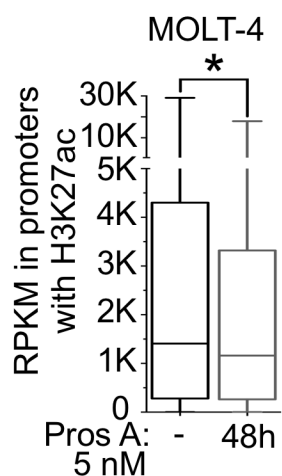
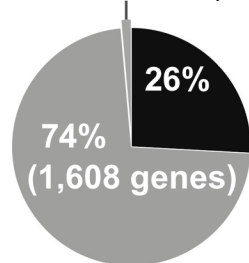
Figure 2

Figure 3**A****B****C**

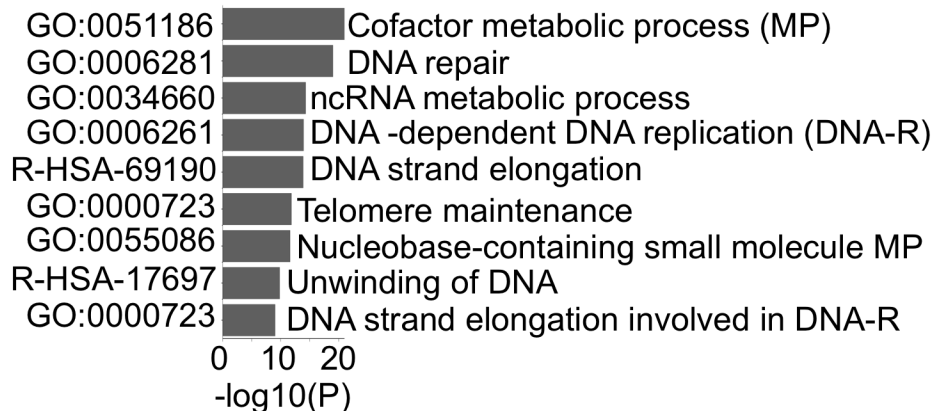
Promoters marked by H3K27ac in untreated cells

■ Upregulated
■ Downregulated

MYC PATHWAY (n=30)

**D**

GO of Pros A (5 nM; 48h) -induced downregulated genes with promoters marked by H3K27ac in untreated cells

**E**

GO of Pros A (5 nM; 48h) -induced downregulated genes with promoters marked by MYC binding and H3K27ac in untreated cells

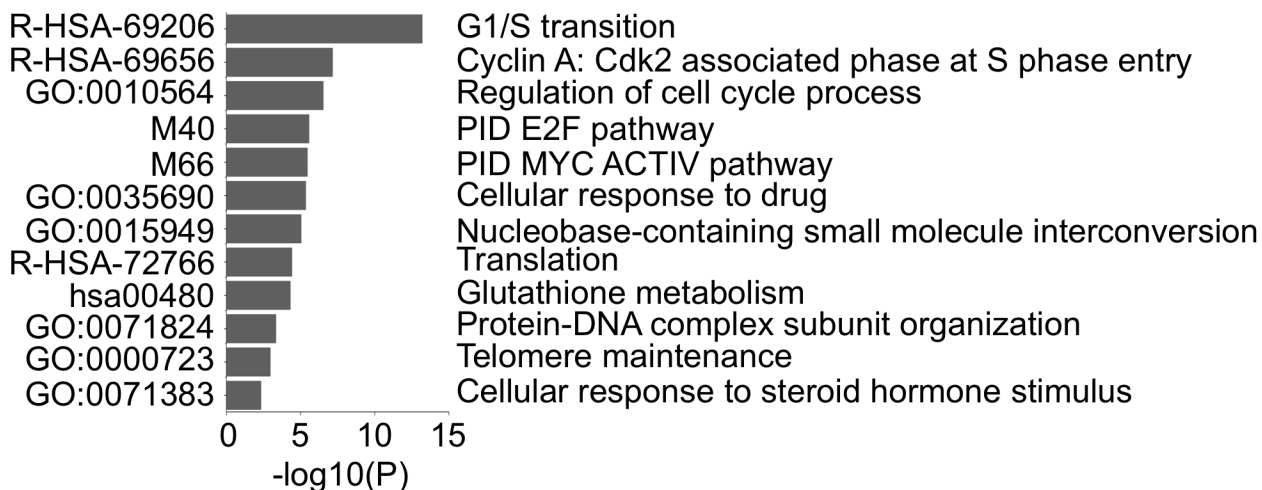
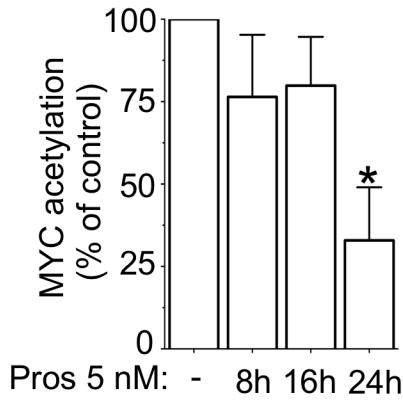
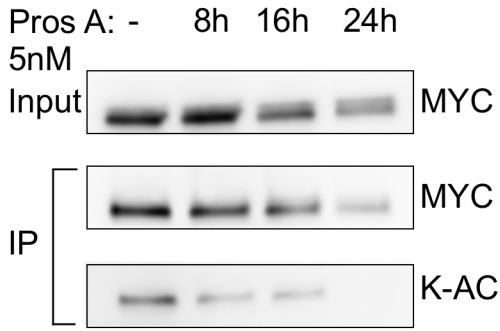
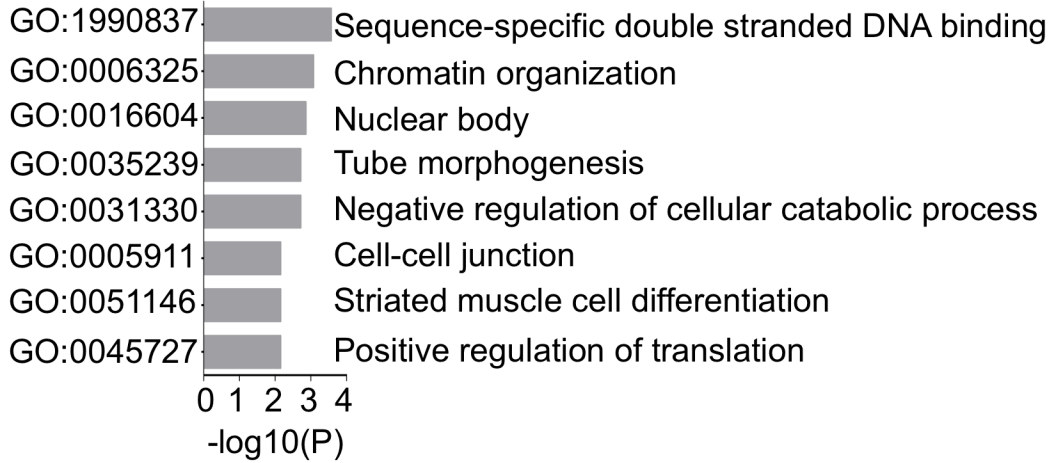


Figure 4

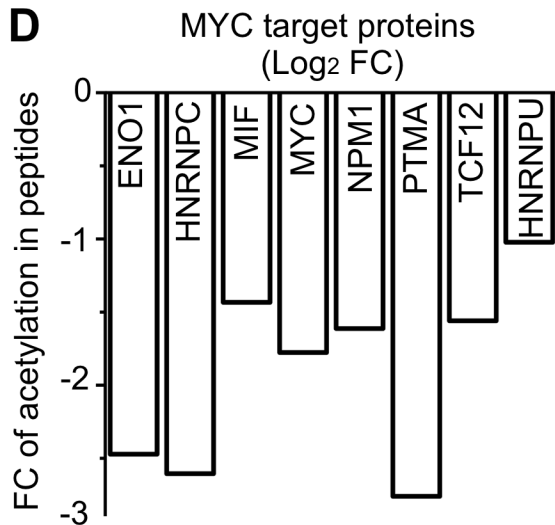
A



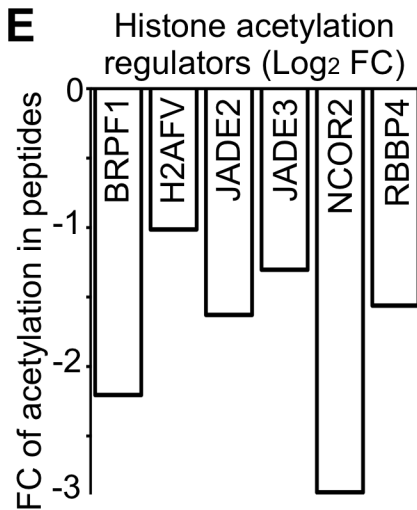
C



D



E



B

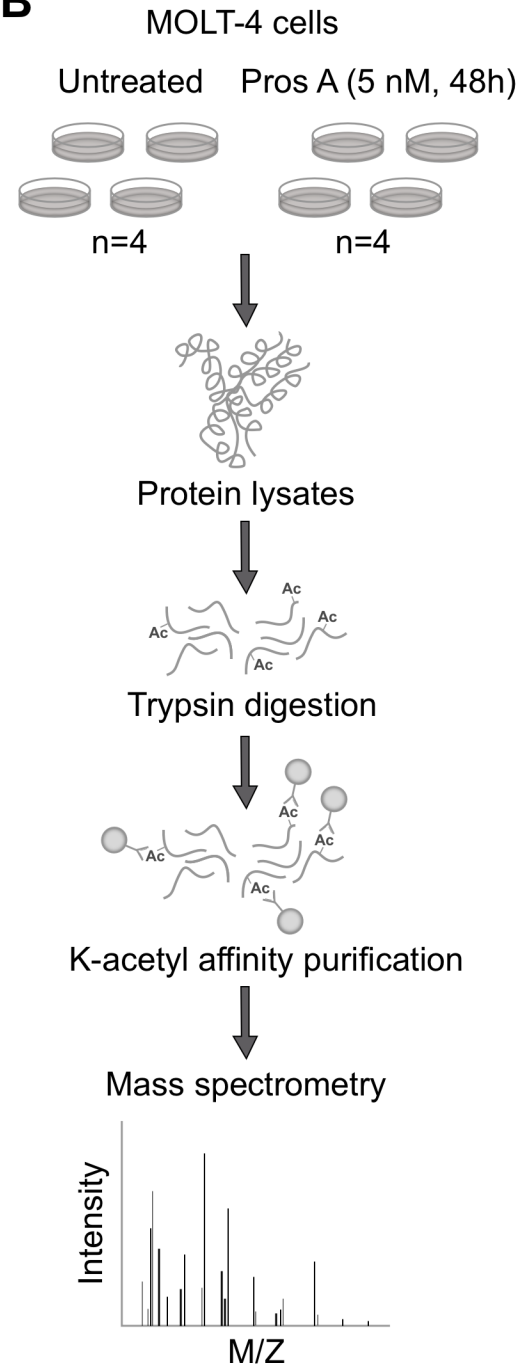


Figure 5

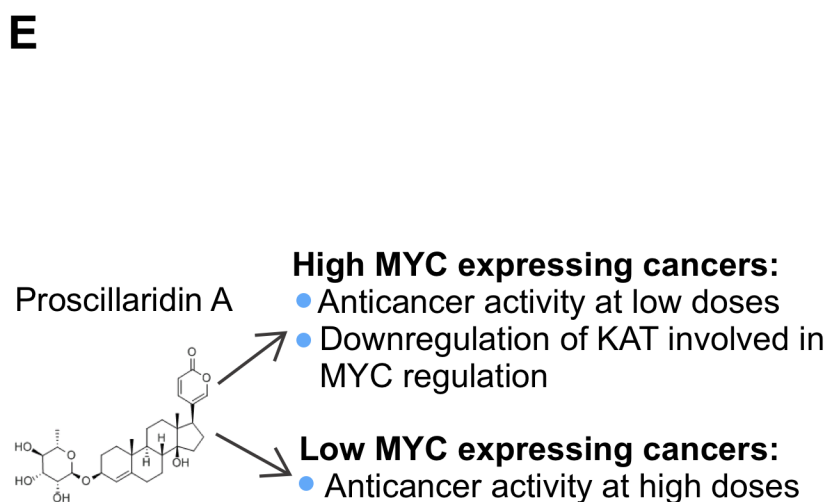
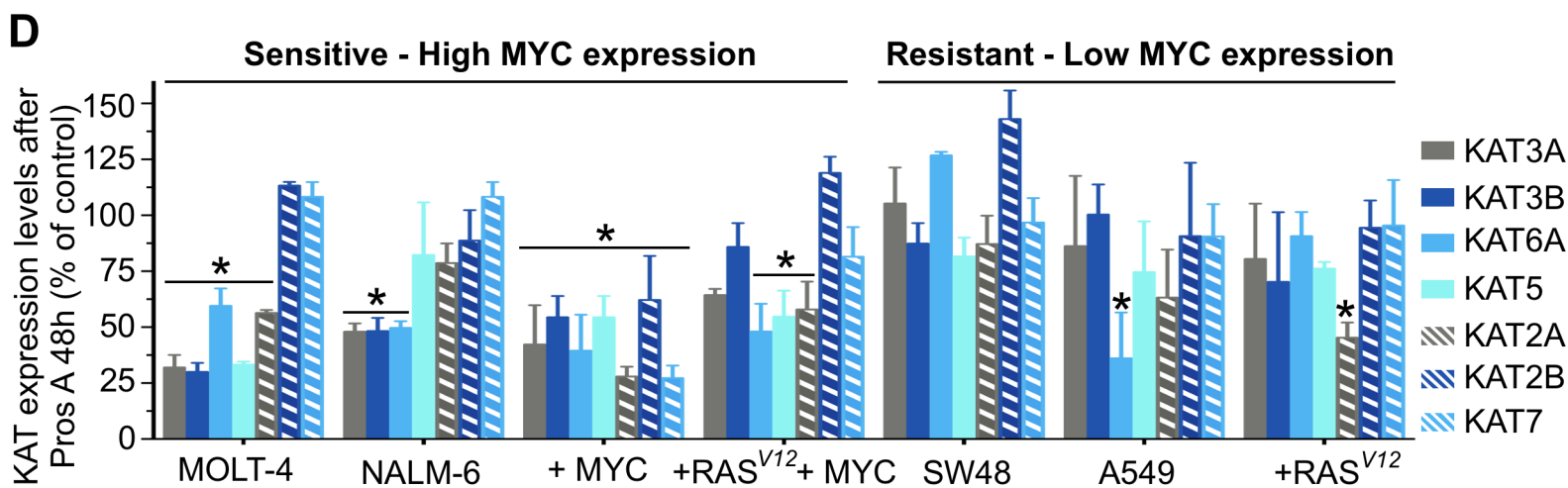
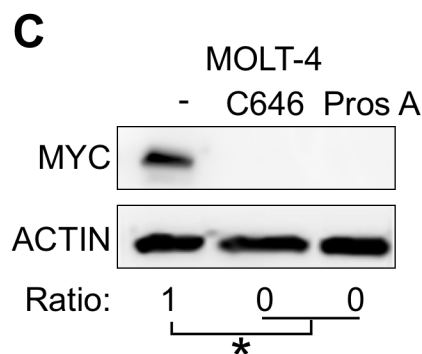
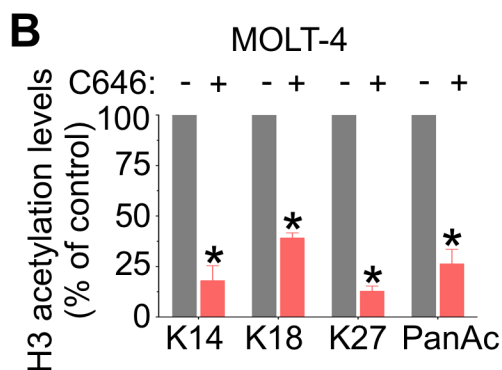
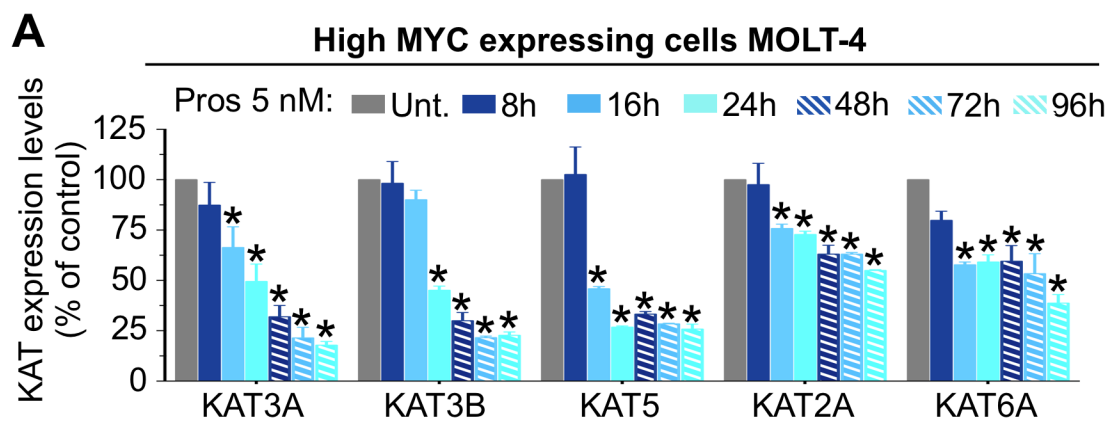
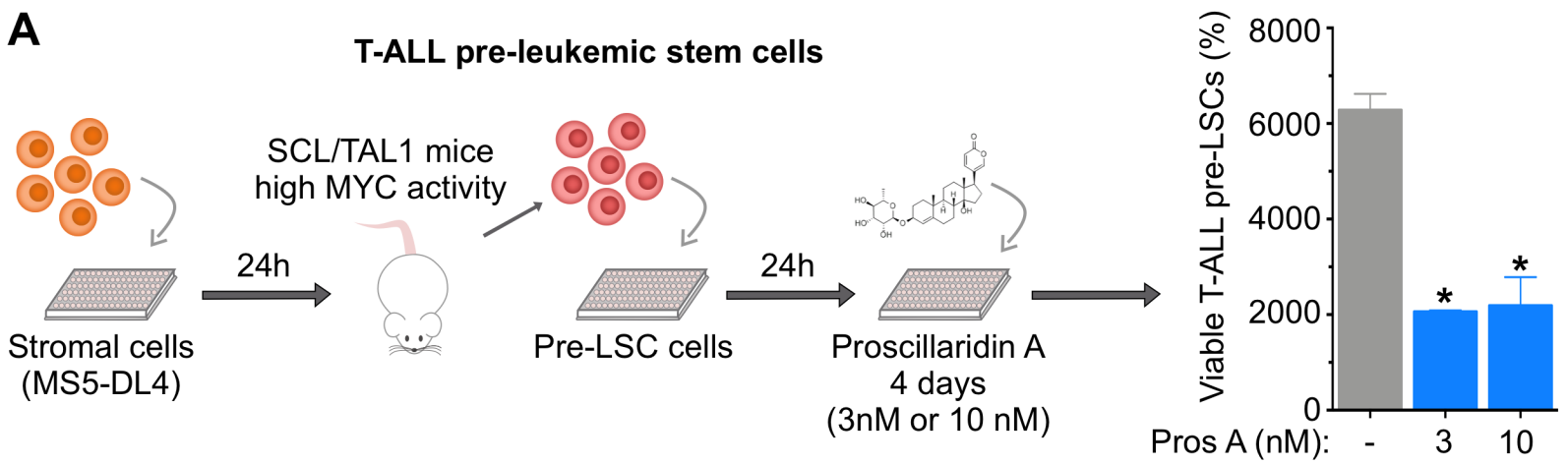
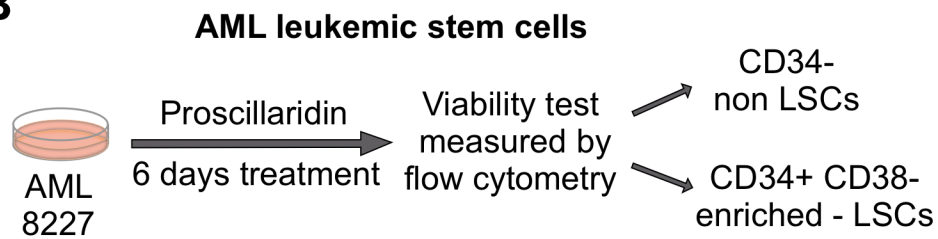
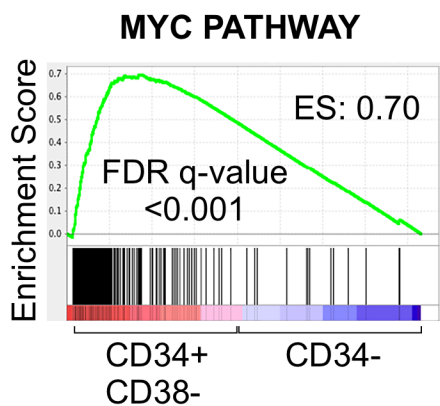
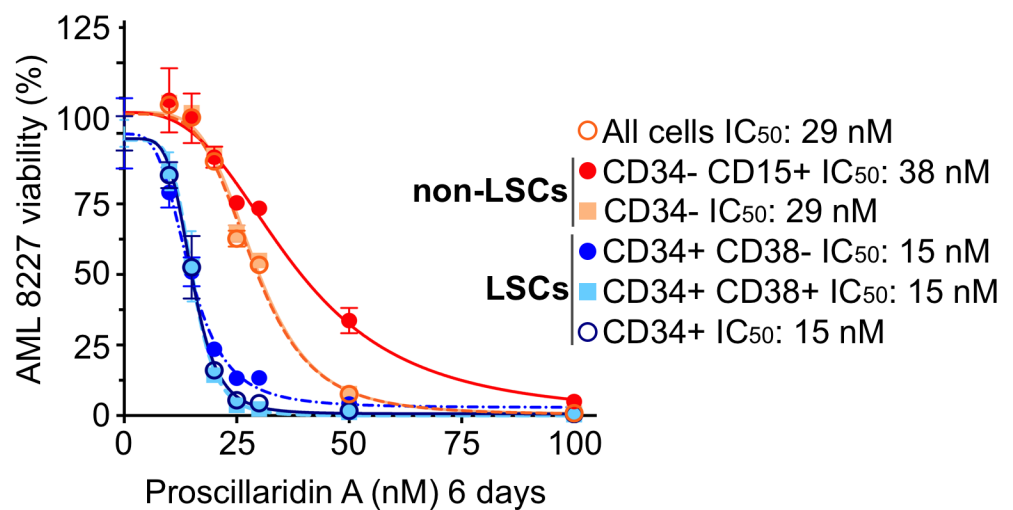


Figure 6**A****B****C****D**

Supplementary Materials and Methods

Cell Culture and Drug Treatments

MOLT-4 (T-cell acute lymphoblastic leukemia), NALM-6 (pre-B-cell acute lymphoblastic leukemia), REH (pre-B acute lymphoblastic leukemia), KOPN-8 (B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia), CCRF-CEM (T-cell acute lymphoblastic leukemia), K562 (chronic myelogenous leukemia) and DLD-1 (colorectal-adenocarcinoma) cells were cultured in RPMI-1640 (Life Technologies, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS, Wisent Inc., Canada). CALU-6 (anaplastic carcinoma) cells were cultured in MEM (Life Technologies, USA). RD (embryonal rhabdomyosarcoma) and MCF7 (breast adenocarcinoma) cells were cultured in DMEM (Life Technologies, USA) supplemented with 10% FBS. U2OS (osteosarcoma) cells were cultured in McCoy's (Life Technologies, United Kingdom) supplemented with 10% FBS. A549 (lung carcinoma) cells were cultured in F12K (GE Healthcare Life Sciences, Canada) supplemented with 10% of FBS. SW48 (colorectal adenocarcinoma) cells were cultured in Leibovitz L-15 supplemented with 10% FBS. Cell lines were purchased from American Type Culture Collection and tested for mycoplasma contamination. All cell lines were culture in a humidified incubator with 5% CO₂ at 37°C, except SW48 cells that were cultured with 1% CO₂. K562 cells were provided by Dr Elie Haddad and MCF7 cells were supplied by Dr Audrey Claing. AML 8227 were cultured in StemSpan™ SFEM II (STEMCELL Technologies) supplemented with growth factors (Life Technologies: 10 ng/mL IL3, IL6 and G-CSF, 25 ng/mL TPO, 50 ng/mL SCF and FLT3L, and 100 ng/mL SCF) and penicillin-streptomycin (Life Technologies). Phorbol 12-myristate 13-acetate (TPA) was purchased from Sigma-Aldrich, and C646 (Histone Acetyltransferase KAT3B/KAT3A Inhibitor) was purchased from EMD Millipore.

Growth Inhibition

ORFLO MOXI Mini Automated Cell Counter was used to analyze growth inhibition after 48h treatment. IC₅₀ values were calculated with GraphPad Prism software. GUAVA EasyCyte (Millipore Sigma-Aldrich) was used to measure cell viability after 24h treatment. Viacount reagent (Millipore Sigma-Aldrich cat#4000-0040) was added prior to analysis. For AML 8227 cells, Proscillaridin A was added at specified concentrations and incubated for 6 days. Cells were analyzed by flow cytometry. Phenotype and viability were assessed using CD34-APC (581), CD38-PE (HB-7), CD15-FITC (HI98) and SYTOX Blue (Life Technologies). All antibodies were purchased from BioLegend. Flow cytometry was performed using a LSRT Fortessa fitted with a high-throughput sampler (BD Biosciences).

Nuclei Imaging

Cell pellets were fixed for 10 minutes at room temperature with 3.7% formaldehyde (Anachemia, cat#41883-360) and then permeabilized for 10 minutes at room temperature with 0.1% triton (PBS). Nuclei were stained and mounted with ProLong[®] Diamond Antifade Mountant with DAPI (Invitrogen; cat#36962). Images were acquired using Leica TCS SP8 confocal microscope.

Cell Cycle Analysis

Cells were treated with Proscillaridin A for 48 hours at 3 different concentrations (2.5, 5, or 7.5 nM). Cells were then harvested, fixed, and stained with bromodeoxyuridine (BrdU) and/or 7-

amino-actinomycin (7-AAD) (BD Pharmingen BrdU Flow Kit). Samples were analyzed by Fluorescence-activated Cell Sorting (FACS) on a BD FACS Canto II.

T-cell differentiation assay

GUAVA EasyCyte (Millipore Sigma-Aldrich) was used to measure T-cells differentiation on MOLT-4 cells. TCR expression was measured by staining MOLT-4 cells with APC IGM κ Isotype Control (BD pharmigen; cat#550883APC) and TCR alpha beta (BD pharmigen, cat#563826) and IGG. CD3 expression was measured by staining MOLT-4 cells with PE-Cytm IGG1 κ isotype (BD pharmigen, cat#557872) and PE-Cytm CD3 (BD pharmigen, cat#560910).

Antibodies for western blots

The following primary antibodies were used to detect expression levels of isolated proteins: C-MYC (1:5000 Abcam cat#AB32072), RAS (1:2500 Millipore HA-RAS clone MC57, cat#ng1905692); KAT3A (1:1000 Cell Signaling cat#7389), KAT3B (1:2000 Active Motif cat#61402), KAT2A (1:1000 Santa Cruz cat#sc-365321), KAT2B (1:1000 Cell Signaling cat#3378), KAT5 (1:2500 Abcam cat#ab137518), KAT6A (1:1000 Active Motif cat#39868), KAT7 (1:1000 Bethyl Labs cat#A302-224A-T); and Actin (1:5000 Sigma-Aldrich cat#A2228).

The following primary antibodies were used to detect histone acetylation marks on H3 and H4 subunits: H3K9ac (1:5000 Active Motif cat#39917), H3K14ac (1:5000 Active Motif cat#39698), H3K18ac (1:2500 Active Motif #39588), H3K27ac (1:5000 Active Motif #39134), H3ac (pan-acetyl) (1:5000 Active Motif cat#39140), H3 (1:5000 Active Motif cat#39763), H4K5ac (1:2000 Active Motif cat#39700), H4K8ac (1:5000 Active Motif cat#39172); H4K12ac (1:5000 Active Motif cat#39928), H4K16ac (1:5000 Active Motif cat#39167), H4K20ac (1:2000

Active Motif cat#61531), H4ac (pan-acetyl) (1:5000 Active Motif cat#39244) and H4 (1:5000 Active Motif cat#39270).

Acetylome analysis by mass spectrometry

Sample preparation: Pellets were resuspended in 1 ml of lysis buffer (8 M Urea, 0.1 M Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 10 mM sodium butyrate (Sigma 303410), 10 mM nicotinamide (Sigma 3376), with Roche protease inhibitor tablet w/o EDTA and lysed using 5 passes through a 21-gauge needle followed by clarification at 15,000 g for 10 minutes at room temperature. The supernatant was quantitated using a Pierce BCA protein kit. One mg of protein was reduced with TCEP (Sigma C4706-2, 4 mM final concentration), alkylated with iodoacetamide (Sigma L1149-5G, prepared fresh in water at 10 mM), and quenched with 10 mM DTT. Samples were diluted to < 2 M urea with 0.1 M Tris-HCl pH 8.0 prior to overnight digestion with trypsin (Pierce 90058, in 50 mM acetic acid, ~15 µg/sample) at room temperature.

Digested samples were acidified using 10% Trifluoroacetic acid (TFA) to a final pH of < 3. Subsequently, insoluble material was precipitated by centrifugation at 10,000 g at room temperature. Clarified supernatant was loaded onto a Sep Pak tC18 column (Waters) activated with 1 ml 80% ACN/0.1% TFA and equilibrated with 3 × 1 ml 0.1% TFA. The columns were washed with 5 × 1 ml 0.1% TFA and eluted with 1 ml 40% ACN/0.1% TFA. The eluted material was frozen and lyophilized over 48 h to completely remove TFA. Dried peptides were resuspended in 800 µl IP buffer (0.1 M Tris-HCl pH 8, 50 mM NaCl, Roche protease inhibitor tablet w/o EDTA) and clarified by centrifugation for 2 minutes at 10,000 g. For purification of acetylated peptides, supernatant was incubated with 50 µl packed volume of ImmuneChem anti-acetyl-lysine agarose beads (ICP0388). Immunoprecipitation was carried out at 4°C for 2 hours.

Beads were washed twice with 1 ml lysis buffer and twice with 1 ml water prior to elution with 0.15% TFA at room temperature. Two elutions of 60 μ l (10 minutes each) were pooled for analysis.

Mass spectrometry set up: In preparation for mass spectrometry, samples were loaded onto Pierce C18 spin tips (84850) previously activated with 0.1% TFA/80% acetonitrile (ACN) and washed with 0.1% TFA. Following application of the sample, tips were washed twice with 0.1 % TFA and eluted with 0.1% TFA/40% ACN. The elutions were dried on a speed-vac without heat for 4 hours. Acetyl-lysine-enriched peptides were run in technical duplicate on a Thermo Fisher Orbitrap Fusion mass spectrometry system. This system is equipped with an Easy nLC 1200 ultra-high pressure liquid chromatography system interfaced via a Nanospray Flex nanoelectrospray source. The samples were injected on a C18 reverse phase column (25 cm x 75 μ m packed with ReprosilPur C18 AQ 1.9 μ m particles). An organic gradient from 5% to 30% ACN in 0.1% formic acid over 112 minutes at a flow rate of 300 nl/min was used to separate peptides. Spectra were continuously collected by the MS in a data-dependent manner throughout the gradient, acquiring a full scan in the Orbitrap (at 120,000 resolution with an AGC target of 200,000 and a maximum injection time of 100 ms) followed by as many MS/MS scans as could be acquired on the most abundant ions in 3s in the dual linear ion trap. A rapid scan type with an intensity threshold of 5000, HCD collision energy of 29%, AGC target of 10,000, a maximum injection time of 35 ms, and an isolation width of 1.6 m/z was used. All singly and unassigned charge states were rejected. Dynamic exclusion was enabled with a repeat count of 1. The exclusion duration used was 20 s with an exclusion mass width of +/- 10 ppm.

Modification and determination of changes: Variable modifications were allowed for N-terminal protein acetylation, methionine oxidation, and lysine acetylation. A static modification

was indicated for carbamidomethyl cysteine. All other settings were left as default in the MaxQuant program. Decoy hits, contaminants and peptides that did not contain acetyl-lysine residues were removed. All samples were normalized across fractions by median-centering the log₂-transformed MS1-intensity distributions. MSstats group comparison function was run with the following options: no interaction terms for missing values, no interference, unequal intensity feature variance, restricted technical and biological scope of replication. Statistically significant changing proteins were selected by applying a log₂-fold-change (>1.0) and an adjusted p-value (< 0.05) corrected for multiple testing threshold.

Supplementary Figures:

Supplemental Figure S1. MYC Expression Correlates with Proscillaridin A Anticancer Efficacy. **A** Upper panel, half maximal inhibitory concentration (IC_{50}) after a 24h Proscillaridin A treatment (ranging from 1 nM to 100 μ M) in a panel of human cancer cell lines (n=4). Lower panel, MYC protein level in each untreated cell line, assessed by western blotting. ACTIN was used as a loading control (n \geq 3). **B** Graph showing MYC expression (relative to ACTIN) compared to Proscillaridin A IC_{50} (24h) in 14 cancer cell lines. Correlation was evaluated by linear regression analysis; P-value is shown on the graph (n=3). **C** Representative pictures of transformed primary human fibroblasts before and after transfection with RAS^{V12} , *MYC* and RAS^{V12}/MYC were taken by light microscopy (400X magnification). **D** and **E** Upper case; MYC expression was assessed by Western blotting in WT and MYC-transduced MOLT-4 cells (**D**) and REH cells (**E**). MYC expression was calculated as a ratio over ACTIN levels (*indicates $P < 0.05$; One-way ANOVA; n = 3). Lower case; IC_{50} values after 24h Proscillaridin A treatment (ranging from 0.1 nM to 1 μ M) in MOLT-4 cells (**D**) and REH cells (**E**) (n \geq 3). **F** Time course experiment where NALM-6 cells were treated with 5 nM for up to 96h. MYC expression was calculated as a ratio over ACTIN levels (*indicates $P < 0.05$; One-way ANOVA; n = 3).

Supplemental Figure S2. Transcriptomic Analysis In MOLT-4 Cells Treated with Proscillaridin A (5 nM, 48h). **A** Heat map representing RPKM similarities between triplicates of untreated (U) and Proscillaridin A-treated (5 nM; 48h; T) MOLT-4 cells (n = 3). Red color corresponds to the highest similarity and yellow corresponds to the lowest similarity. **B** Proscillaridin A (5 nM, 48h) induced gene expression reprogramming of MOLT-4 cells. Volcano plots of gene expression changes in MOLT-4 cells in untreated versus treated samples. Black dots correspond to genes

with P-value adjusted > 0.5 . Grey dots correspond to genes with P-value adjusted < 0.5 but without significant fold change expression difference between untreated and treated cells ($-0.5 < FC < 1$). Downregulated genes with P-value adjusted < 0.5 and $FC < -0.5$ are shown in green. Upregulated genes with P-value adjusted < 0.5 and $FC > 1$ are shown in red. Numbers of downregulated and upregulated genes are shown on the graphs. **C** Metascape analysis of genes downregulated by Proscillaridin A treatment (5 nM; 48h). **D** Cell cycle analysis after BrdU staining in MOLT-4 and NALM-6 cell lines exposed to Proscillaridin A (5 nM, 48h). Cell fluorescence was measured by flow cytometry (* indicates $P < 0.05$; Two-way ANOVA; $n=3$). **E** Metascape analysis of genes upregulated by Proscillaridin A treatment (5 nM; 48h).

Supplemental Figure S3. Proscillaridin A Induced Histone 3 Acetylation Loss By In MOLT-4 And NALM-6 Cells. **A** MOLT-4 cells were treated with Proscillaridin A (5 nM) and histones were acid-extracted after 8, 16, 24, 48, 72 and 96 hours. H3 acetylation levels were quantified and expressed as a percentage of untreated cells (* indicates $P < 0.05$; Two-way ANOVA; $n = 3$). **B** Ratio of chromatin immunoprecipitation (ChIP) of H3K27 acetylation in MOLT-4 cells before and after Proscillaridin A treatment (5 nM; 48h) (*indicates $P < 0.001$; paired t-test, $n=3$). **C** NALM-6 cells were treated with Proscillaridin A (5 nM) and histones were acid-extracted after 8, 16, 24, 48, 72 and 96 hours. H3 acetylation levels were quantified and expressed as a percentage of untreated cells (* indicates $P < 0.05$; Two-way ANOVA; $n = 3$). **D** MOLT-4 and **E** NALM-6 cells were treated with Proscillaridin A (5 nM) and histones were acid-extracted after 8, 16, 24, 48, 72 and 96 hours. Histone 4 acetylation levels were assessed using antibodies against K5ac, K8ac, K16ac, K20ac, and total histone 4 acetylation. H4 was used as loading

control. H4 acetylation levels were quantified and expressed as a percentage of untreated cells (* indicates $P < 0.05$; Two-way ANOVA; $n = 3$).

Supplemental Figure S4. Proscillaridin A doesn't change the methylation profile on H3 lysines. **A** and **B** Right panel, MOLT-4 (**A**) and NALM-6 (**B**) cells were treated with Proscillaridin A (5 nM) and histones were acid-extracted after 8, 16, 24, 48, 72 and 96 hours. Histone 3 trimethylation levels were assessed using antibodies against K4me3, K9me3, K27me3 and total histone 3 acetylation. H3 was used as loading control. Left panel, H3 methylation levels were quantified and expressed as a percentage of untreated cells (Two-way ANOVA; $n = 3$). **C** Confocal microscopy (60X) of MOLT-4 cells stained with DAPI revealed heterochromatin modulation after Proscillaridin A treatment (5 nM; 48h). White arrows indicate loss of heterochromatin regions.

Supplemental Figure S5. H3K27 Acetylation DNA Occupancy Is Lost After Proscillaridin A Treatment In MOLT-4 Cells. Metascape analysis of **A** downregulated genes and **B** upregulated genes after Proscillaridin A treatment (5 nM; 48h) marked by H3K27ac in their promoter regions (-500 bp / +500 bp).

Supplemental Figure S6. Proscillaridin A Treatment Downregulated MYC Target Genes That Are Marked By H3K27ac In Promoter Regions. Map of **A** co-expression pathways and **B** protein-protein physical interactions of MYC target genes marked by H3K27ac in untreated MOLT-4 cells.

Supplemental Figure S7. Loss of Acetylation In MYC Protein And MYC After Proscillaridin A Treatment In High MYC Expressing Cells. **A** Mass spectrometry analysis on 2 MYC peptides (LVSEK(ac)LASYQAAR) after Proscillaridin A treatment (5nM; 48h) in MOLT-4. Log₂ normalized intensity is shown (* indicates P<0.001; paired t-test; n=4). **B** Map of co-expression pathways of the 28 proteins that lost acetylation after Proscillaridin A treatment (5 nM; 48h) in MOLT-4 cells.

Supplemental Figure S8. MYC Inhibition Induced By Proscillaridin A Is Regulated By KAT Activities. **A** MOLT-4 cells were treated with Proscillaridin A (5 nM) and KAT3A, KAT3B, KAT5, KAT2A, KAT2B, KAT6A and KAT7 expression levels were assessed by western blotting. ACTIN was used as loading control. **B** KAT2B and KAT7 expression levels were quantified and expressed as percentage of untreated cells (n=3). **C** Class I KDAC expression. **D** KAT transcripts (RPKM) expression after Proscillaridin A treatment (5 nM; 48h) in RNA-sequencing data set (*indicates Log₂ FC<-0.5 and \$ indicates Log₂ FC > 1). **E** MOLT-4 cells were treated with KAT3B/A inhibitor C646 (10 μM) and with Proscillaridin A (5 nM) and histones were acid-extracted after 48 hours. Histone 3 acetylation levels were assessed using antibodies against K14ac, K18ac, K27ac, and total histone 3 acetylation. H3 was used as loading control. **F** Left panel, MOLT-4 cells were treated with KAT3B/A inhibitor C646 (10 μM) and with Proscillaridin A (5 nM) and KAT5, KAT3A and KAT3B expression levels were assessed by western blotting. ACTIN was used as loading control. Right panel, KAT5, KAT3A and KAT3B levels were quantified and expressed as a percentage of untreated cells (* indicates P<0.05; Two-way ANOVA; n = 3).

Supplemental Figure S9. Proscillaridin A Induces KAT Downregulation Specifically In High MYC Expressing Cells. **A-C** MOLT-4, NALM-6, SW48 and A549 cell lines were treated with Proscillaridin A (5 nM, 48h) and fibroblasts transfected with *RAS^{V12}*, *MYC* and *RAS^{V12}/MYC* were treated with Proscillaridin A (5 nM or 70 nM, 48h). **A** KAT3A (CBP), KAT3B (P300), KAT5 (TIP60), KAT2A (GCN5), KAT2B (PCAF), KAT6A (MOZ) and KAT7 (HBO1) expression levels were assessed by western blotting. ACTIN was used as loading control. **B** Histone 3 acetylation levels were assessed by using antibodies against K9ac, K14ac, K18ac, K27ac, and total histone 3 acetylation. H3 total was used as loading control. **C** Histone 3 acetylation levels were quantified and expressed as percentage of control (* indicates P<0.05; One-way ANOVA; n=3).

Figure S1

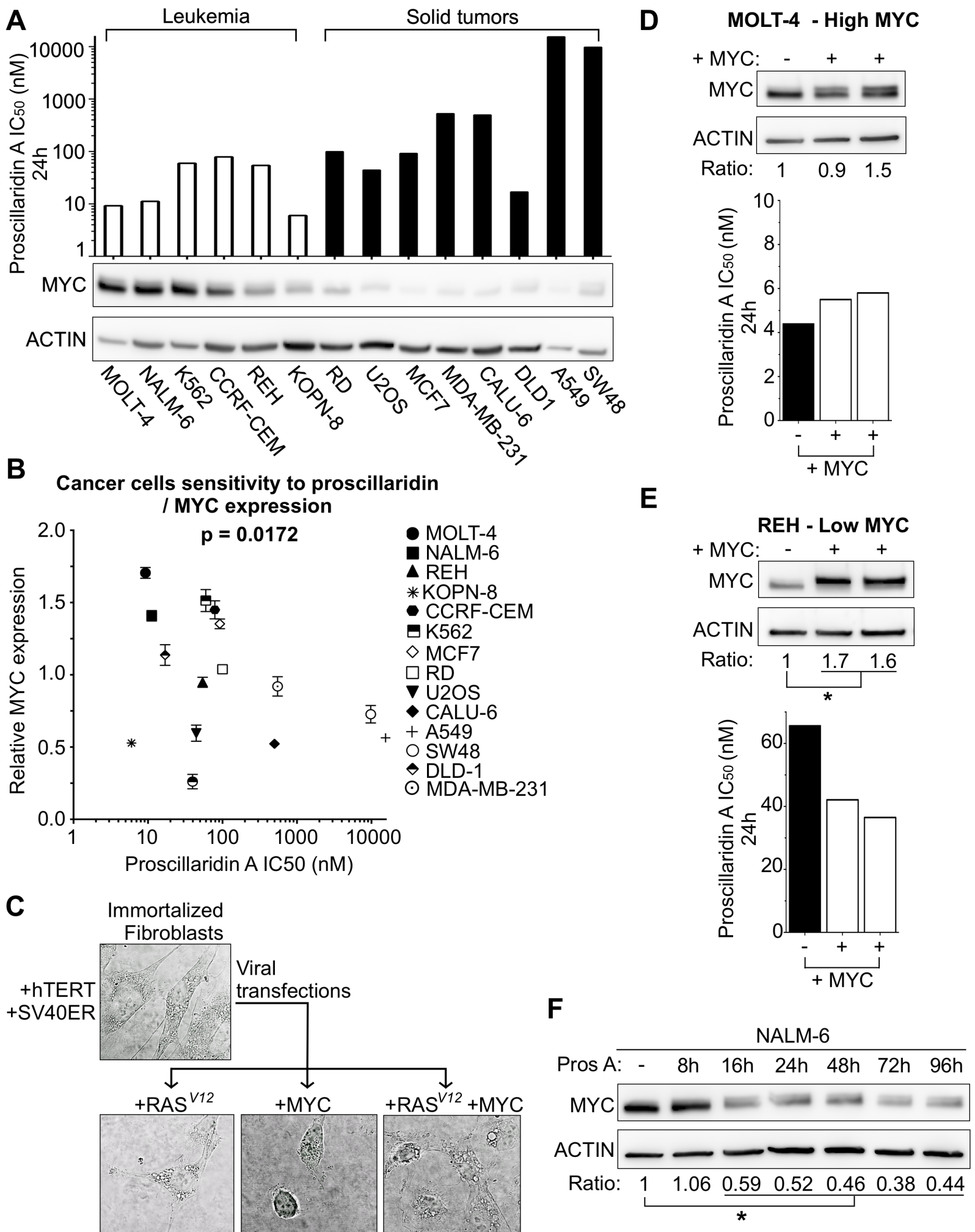


Figure S2

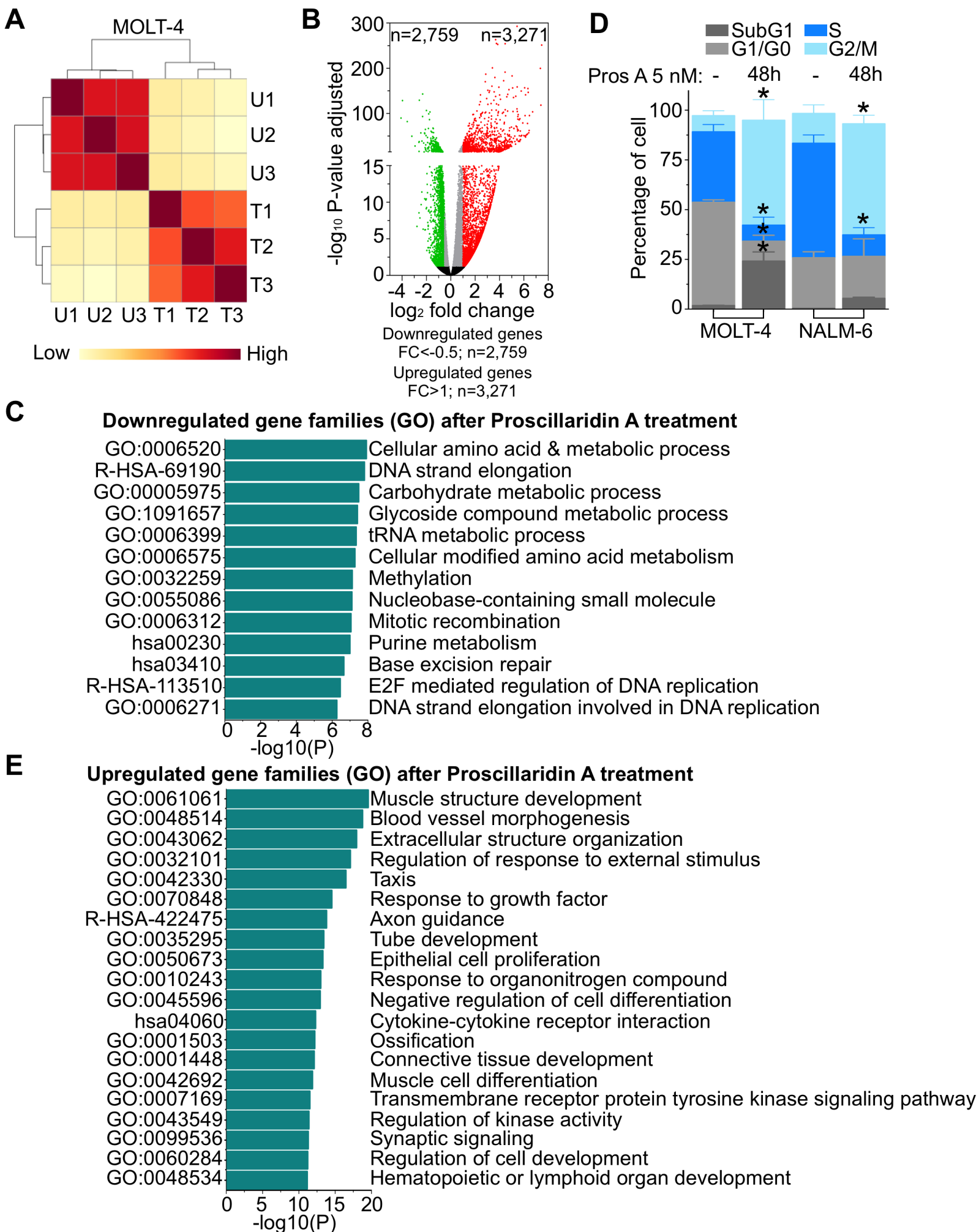


Figure S3

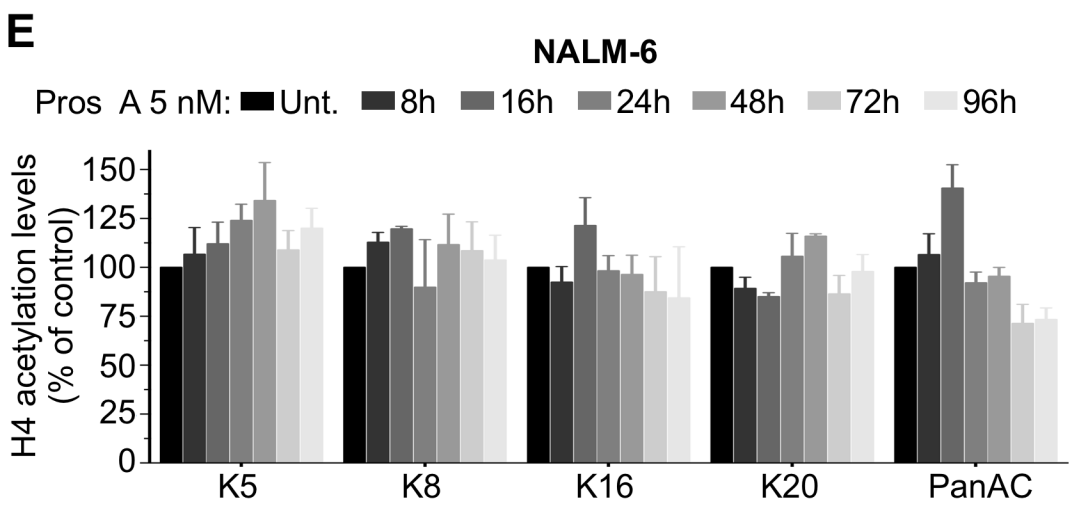
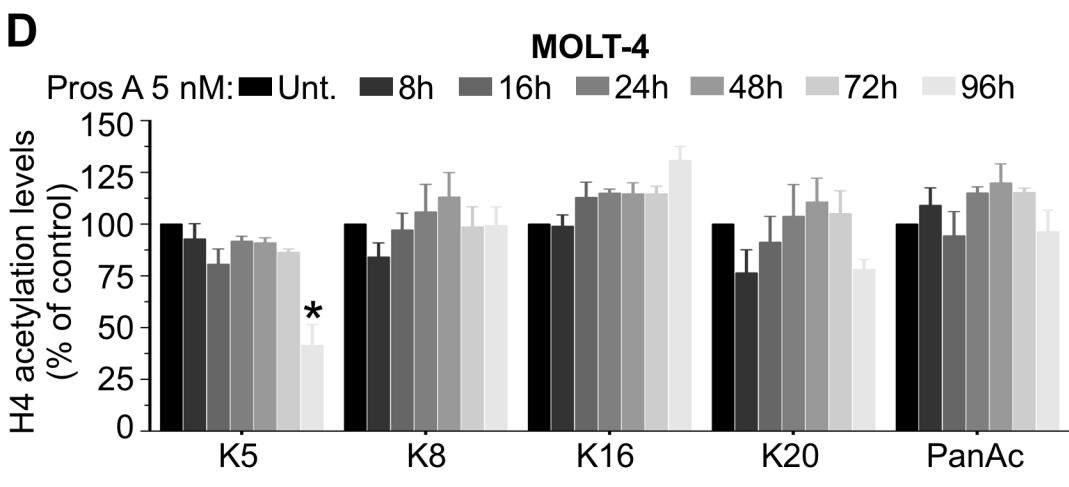
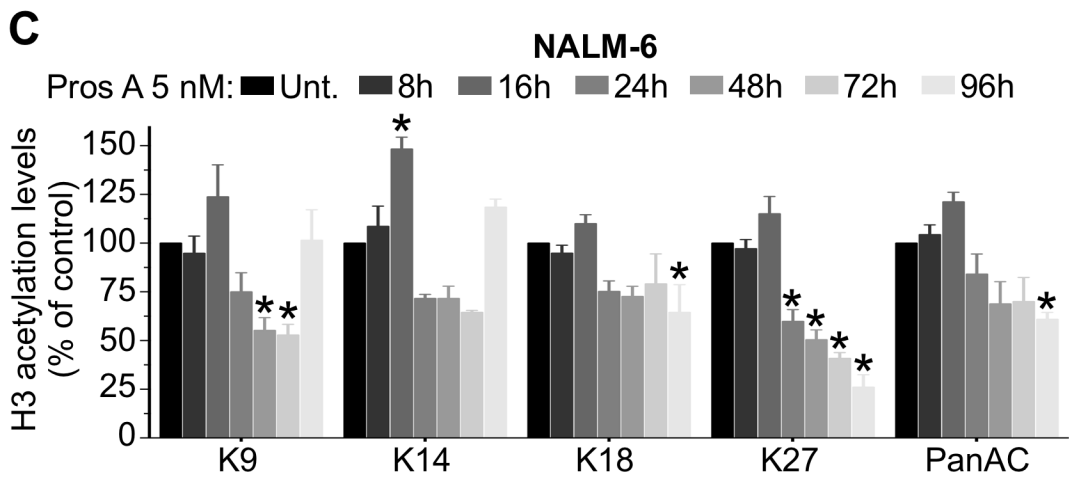
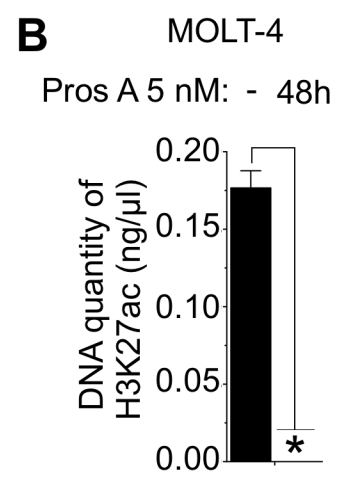
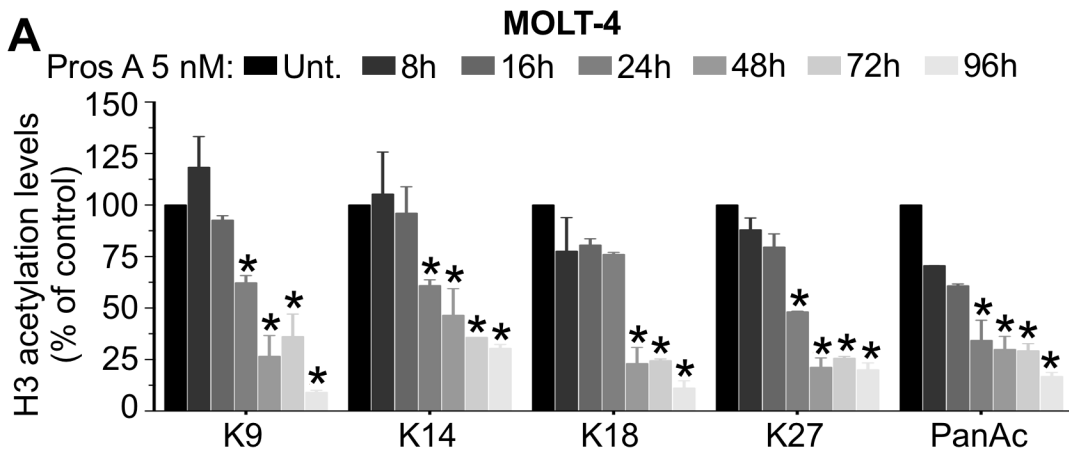
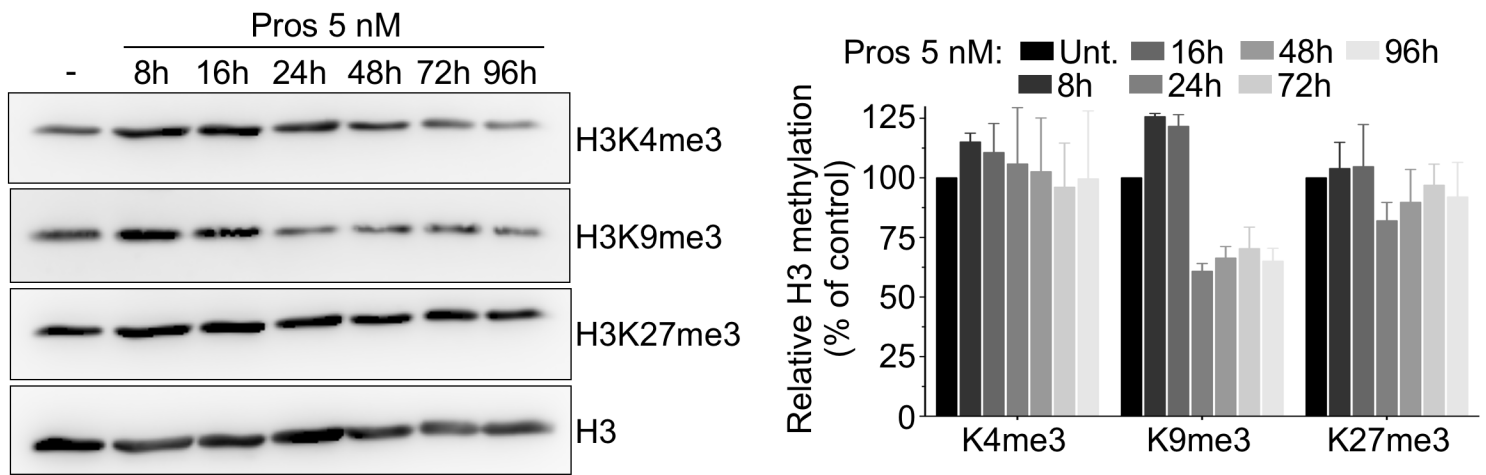
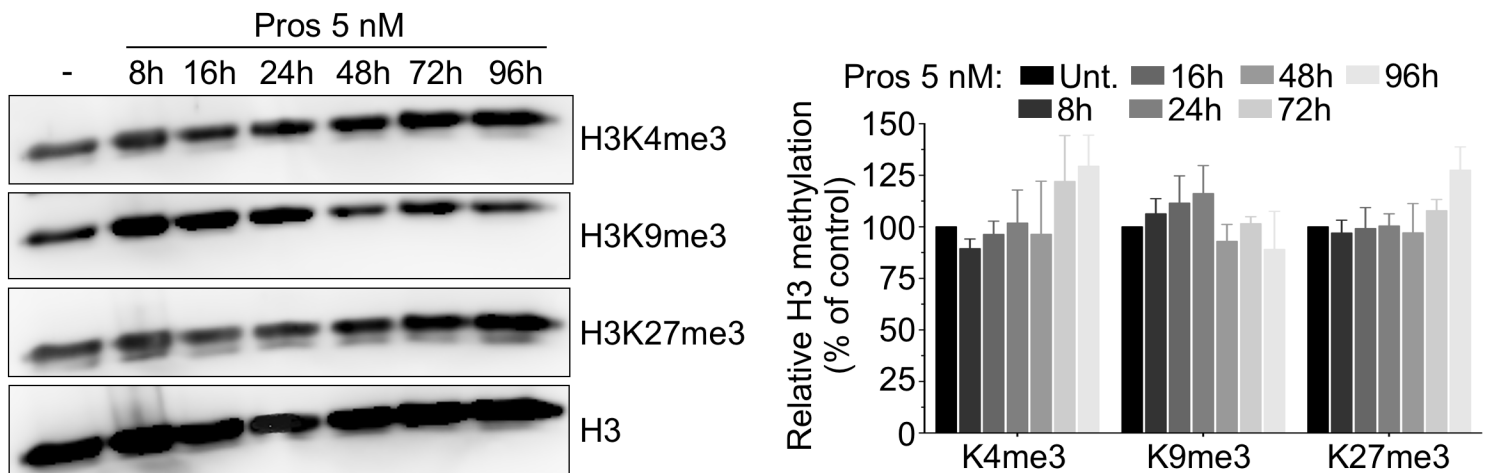


Figure S4**A****MOLT-4****B****NALM-6****C****MOLT-4 - DAPI**

Pros A 5 nM:

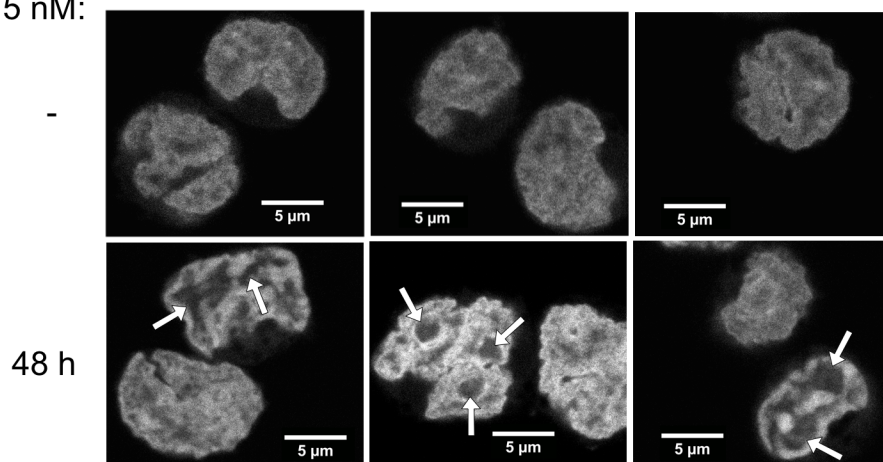
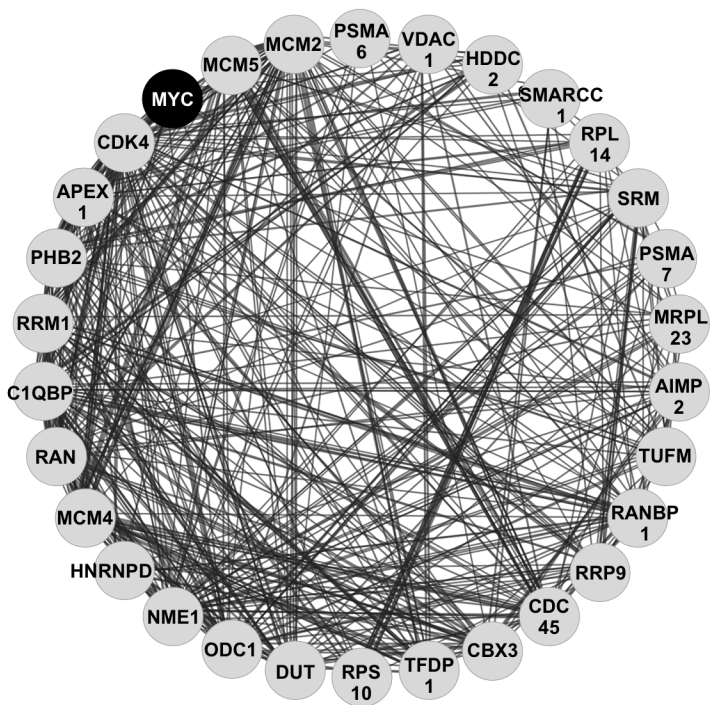


Figure S6

A

Map of co-expression pathways of MYC target genes downregulated by Pros A (5 nM; 48h) treatment and marked by H3K27ac in untreated cells



B

Map of physical interactions of MYC target genes downregulated by Pros A (5nM; 48h) treatment and marked by H3K27ac in untreated cells

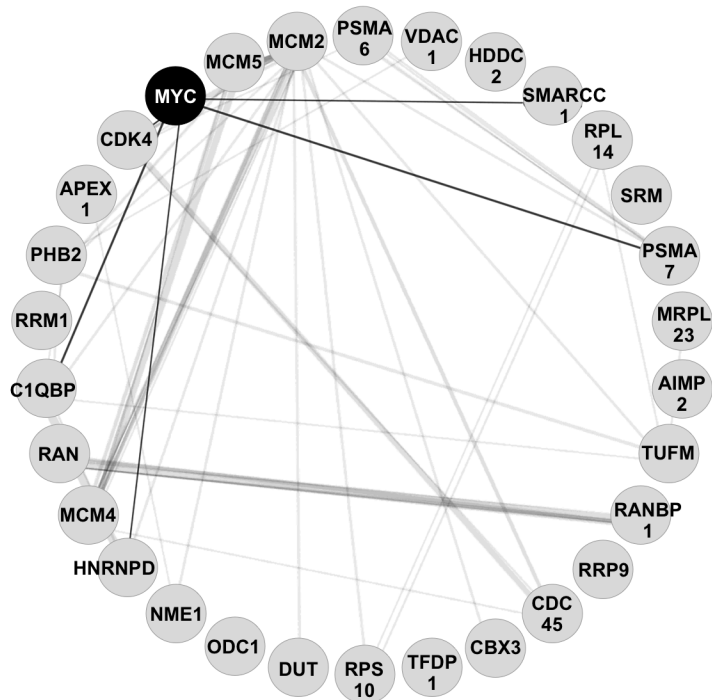
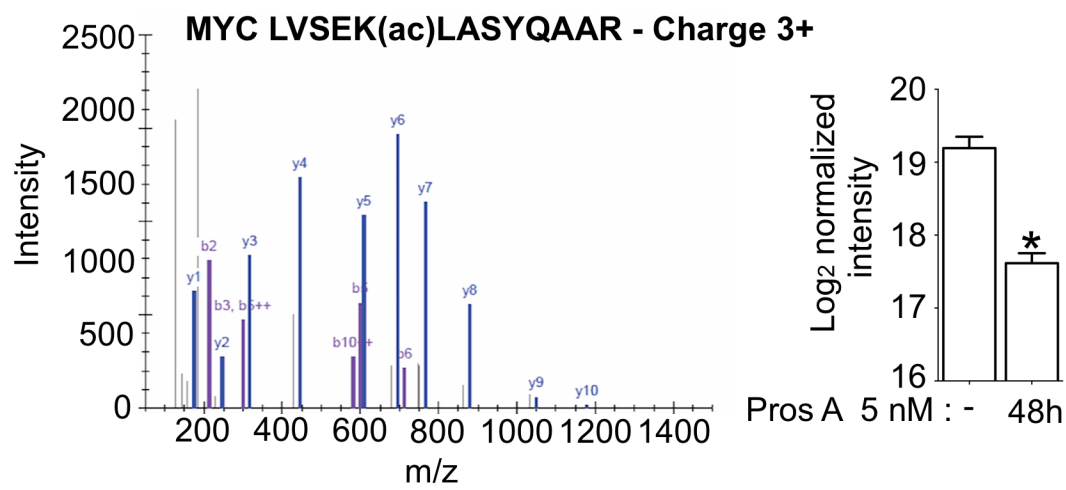
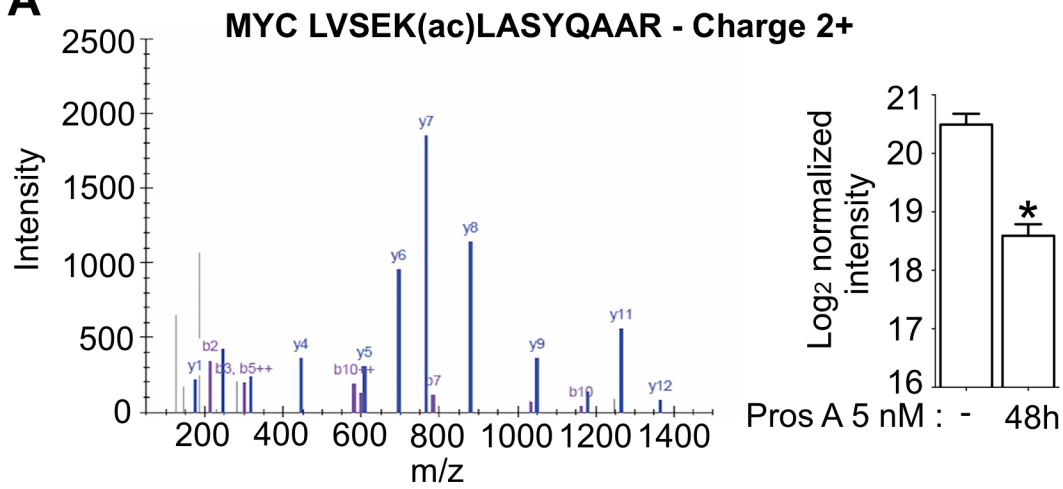


Figure S7

A



B

Map of co-expression pathways of MYC targets losing acetylation after Pros treatment

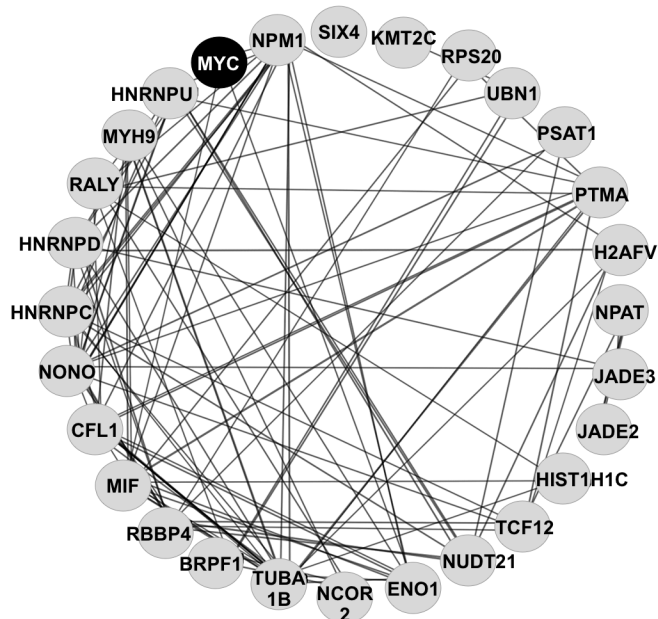
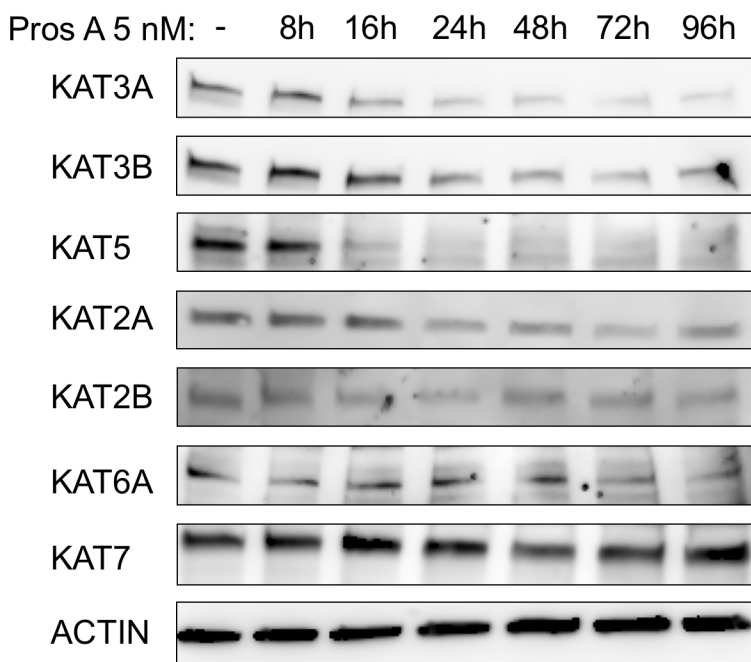
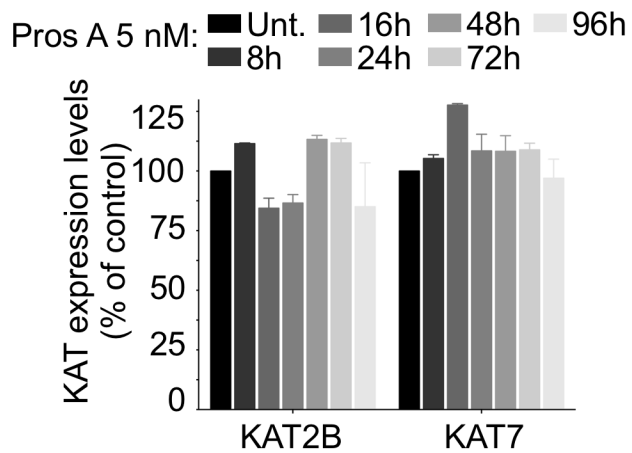


Figure S8

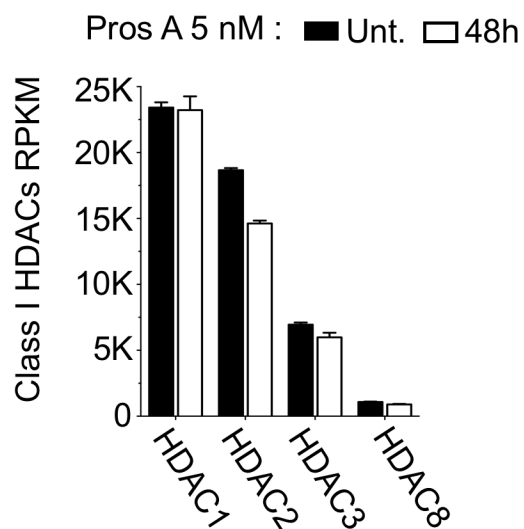
A



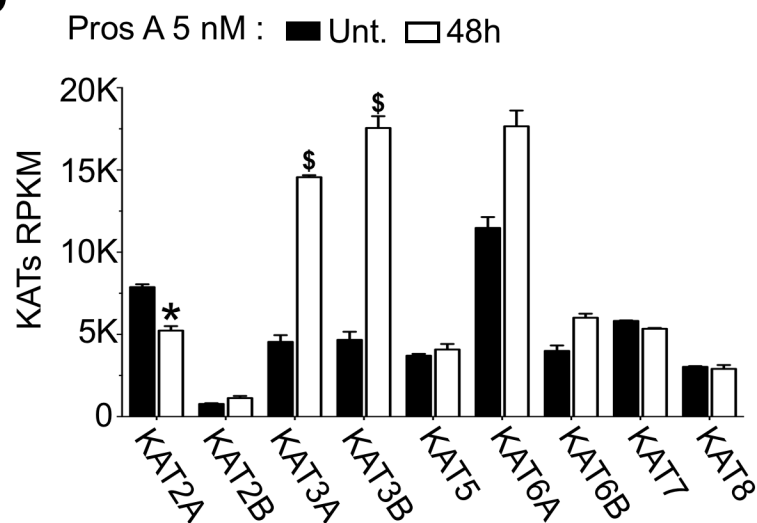
B



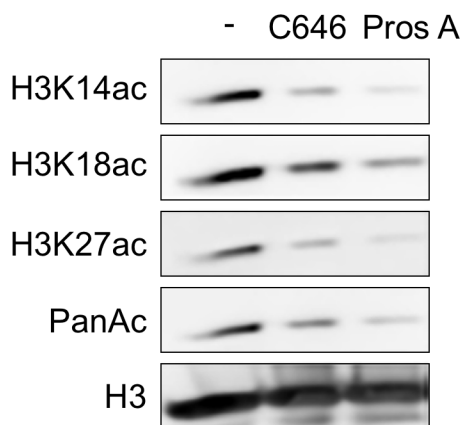
C



D



E



F

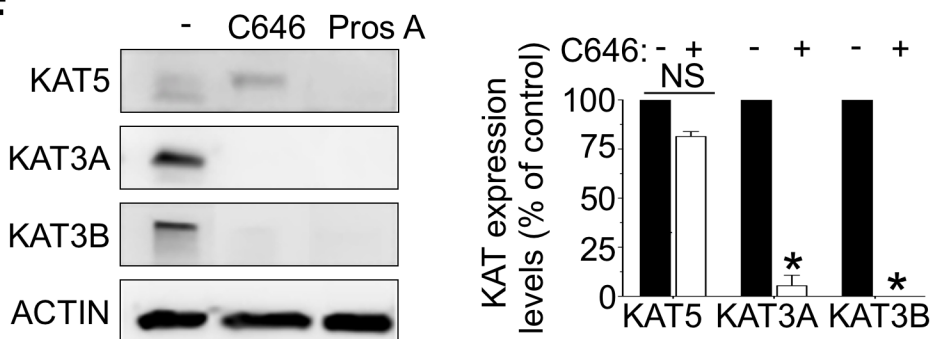
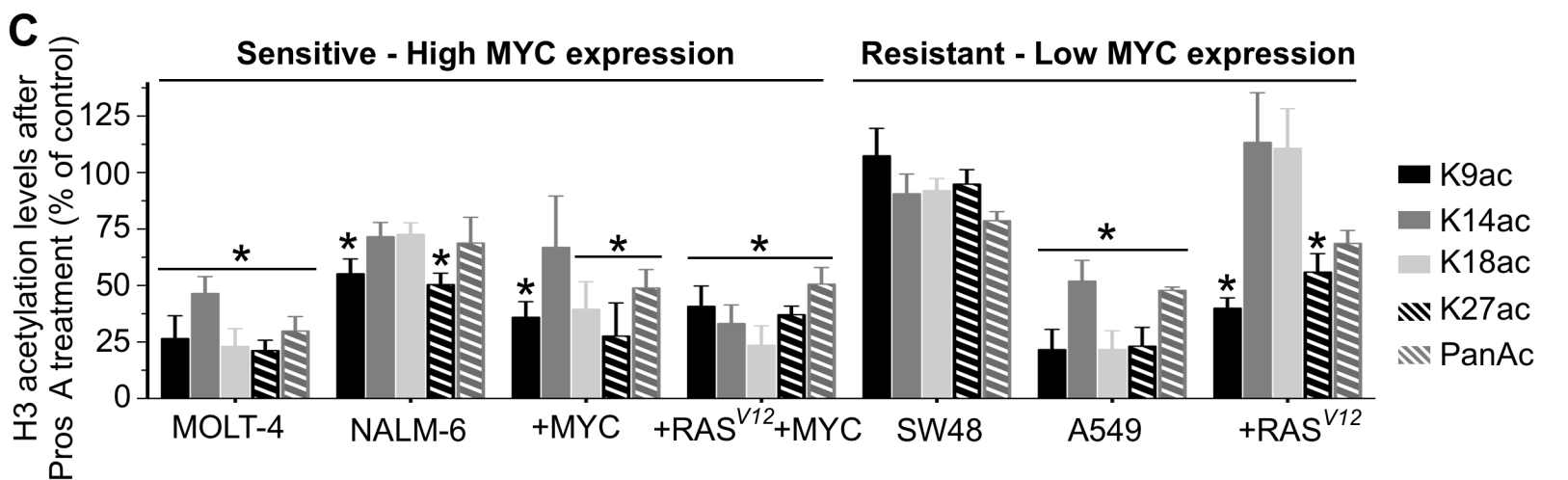
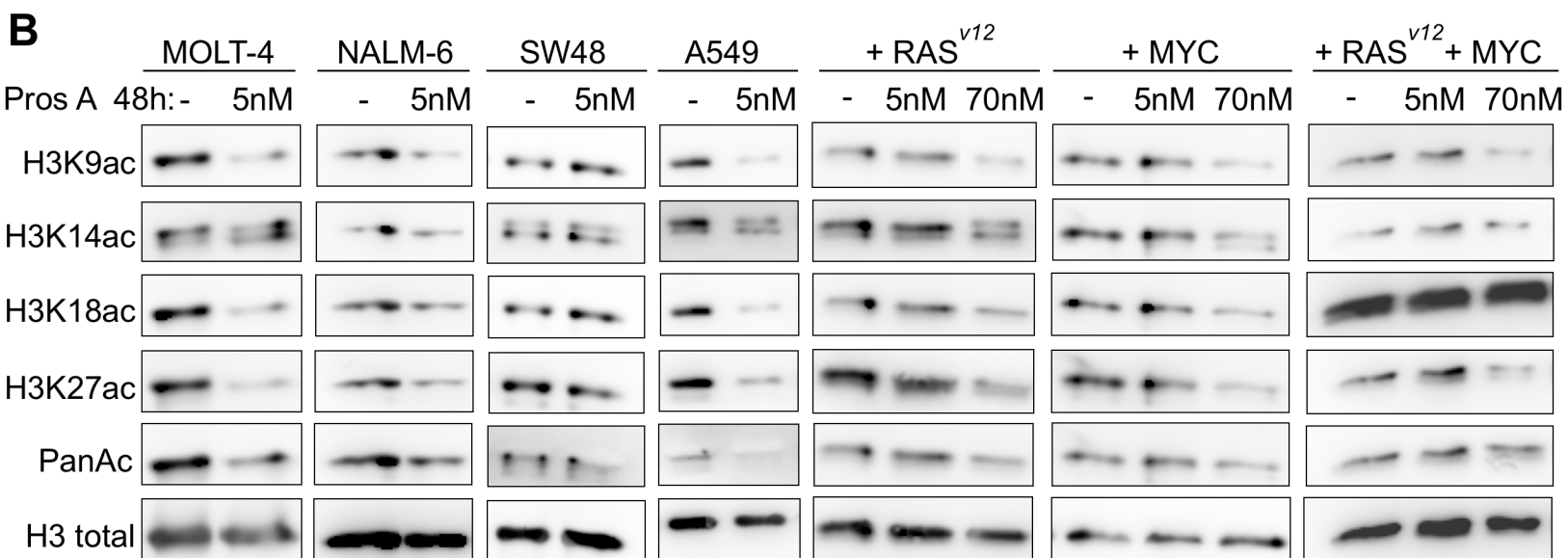
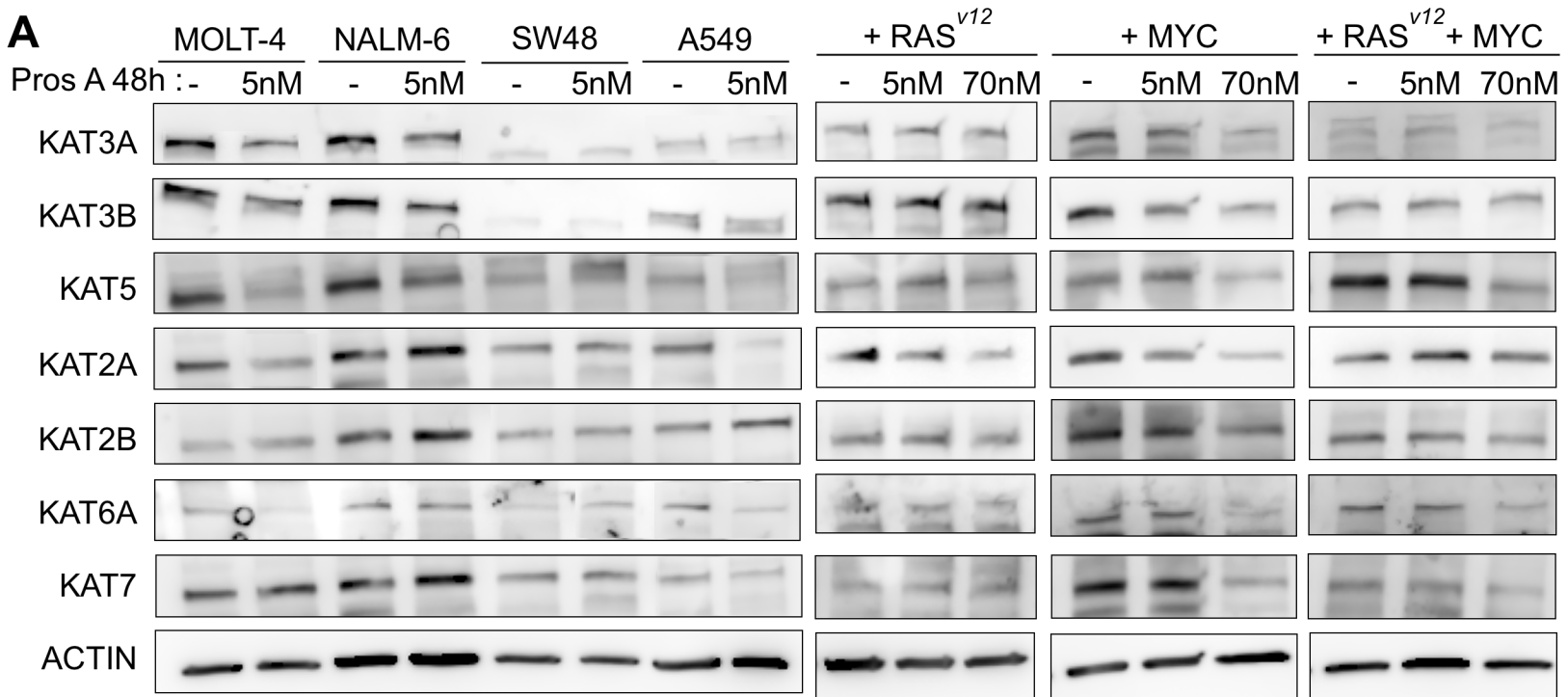


Figure S9



3. Troisième publication

3.1. Introduction et mise en contexte du troisième article

Dans notre précédente publication, nous avons démontré que la proscillaridine A détient des activités anticancéreuses plus forte dans les cancers surexprimant MYC et particulièrement dans les leucémies surexprimant MYC (319). Nous avons également caractérisé les mécanismes d'action épigénétiques et anticancéreux de la proscillaridine A dans ces cancers (319). Parmi les lignées cellulaires de cancers solides de notre panel d'étude, nous avons caractérisé que la lignée cellulaire de rhabdomyosarcome embryonnaire RD exprime un haut niveau de MYC. Dans cette présente étude, nous cherchons donc à identifier si la proscillaridine A détient les mêmes mécanismes d'action anticancéreux et épigénétiques dans les cancers solides surexprimant MYC que dans les cancers hématopoïétiques surexprimant MYC. Pour répondre à cette question, nous avons réalisé des études transcriptomiques, bio-informatiques et protéomiques.

De plus, dans notre première publication nous avons identifié un potentiel synergique épigénétique entre la proscillaridine A et la décitabine dans des lignées de cancers de côlon, caractérisées comme étant des lignées résistantes à la proscillaridine A dans notre seconde étude (317, 319). Nous avons donc investigué si des combinaisons simultanées et séquentielles de ces deux médicaments produisaient des activités anticancéreuses synergiques dans les lignées de rhabdomyosarcomes embryonnaires.

Mon rôle dans cette étude a été d'élaborer et de réaliser les expériences de culture cellulaire (traitement et criblage de l'activité anticancéreuses avec les différents médicaments, transduction des cellules, essais clonogéniques), les analyses du cycle cellulaire et les immunobuvardages de type Western Blot. J'ai également préparé les échantillons pour les analyses de séquençage de l'ARN et j'ai analysé et interprété les données du séquençage. Finalement, j'ai écrit l'article et élaboré les figures.

L'article 3 est en préparation et devrait soumis dans une revue de scientifique en Mai 2020.

3.2. Troisième publication

Repurposing proscillaridin A in combination with decitabine against MYC-driven embryonal rhabdomyosarcoma

Elodie M. Da Costa^{1, 2}, Maxime Caron², Chantal Richer², Pascal St-Onge², Daniel Sinnett^{2, 3} & Noël J.M. Raynal ^{1, 2*}

Affiliations

¹Département de pharmacologie et physiologie, Université de Montréal, Montréal (Québec), Canada. ²Sainte-Justine University Hospital Research Center, Montréal (Québec), Canada.

³Département de pédiatrie, Université de Montréal, Montréal (Québec), Canada.

Corresponding author: Noël J-M Raynal, Département de pharmacologie et physiologie, Université de Montréal, Montréal (Québec), Canada, Sainte-Justine University Hospital Research Center, 3175, Chemin de la Côte-Sainte-Catherine, Montréal (Québec) H3T 1C5, Canada, noel.raynal@umontreal.ca

Abstract

Embryonal rhabdomyosarcoma (ERMS) is the most common soft-tissue sarcoma in children. ERMS is composed of malignant skeletal muscle cells with dysregulated oncogenic signaling pathways leading to MYC hyperactivation. Targeting MYC in cancer has been extremely challenging. However, we have demonstrated that the heart failure drug, proscillaridin A, produced anticancer specificity toward MYC-driven leukemia. Here, we investigated whether proscillaridin A exhibit epigenetic and anticancer activity against ERMS cells overexpressing MYC oncogene. Clinically relevant concentration of proscillaridin A (5nM) produced growth inhibition, cell cycle arrest and loss of clonogenic potential in ERMS cells. Proscillaridin A produced a significant downregulation of MYC protein expression and inhibition of oncogenic transcriptional programs controlled by MYOGENIN, RAS and MYC itself. Drug-induced gene expression reprogramming was associated with loss of histone H3 lysine acetylation (on H3K9, H3K14, H3K18, and H3K27 residues), which was associated with significant protein downregulation of several lysine acetyltransferases (KAT3A, KAT3B, KAT2A, KAT2B, KAT5). Interestingly, proscillaridin A produced synergistic growth inhibition and loss of clonogenicity in combination with the approved DNA demethylating drug decitabine. In conclusion, proscillaridin A produces anticancer and epigenetic effects in the low nanomolar range and its combination with decitabine warrants further investigation for the treatment of MYC-driven ERMS.

Introduction

Rhabdomyosarcoma (RMS) represents the most common soft-tissue solid tumor in children and young adults [1]. The main subtype is embryonal rhabdomyosarcoma (ERMS), which accounts for 70% of cases and is associated with younger age and better prognosis as compared to RMS subtypes [2-4]. The estimated 3-year event-free survival for low-risk RMS in children is 90%, for standard risk children is 70–80%, and for high-risk children is 50–55% while for very high-risk children is 30–40% [2]. At relapse, which usually occurs within the first 3 years, patients have a poor prognosis. Combination therapy remains the only option for patients in relapse until the disease becomes resistant. Then, these children should be considered for early phase clinical trials [2].

Pediatric RMS arises from skeletal muscle progenitor cells that have lost the ability to complete cell differentiation. The ERMS subgroup represents a heterogeneous subtype mostly characterized by activated RAS oncogenic signaling, which is acting through the RAF–MEK (mitogen-activated protein kinase and extracellular signal-regulated kinase) pathway and triggers MYC (c-MYC) protein accumulation [5-7].

MYC is a potent proto-oncogene that regulates 15% of total gene transcription [8]. MYC hyperactivation is involved in ERMS cell transformation and is associated with resistance to radiotherapy. MEK/ERK inhibitors induce MYC downregulation causing the reduction of tumor growth and induction myogenic differentiation, suggesting the potential of targeting MYC in ERMS [9, 10]. MEK inhibition induces *MYOG* expression and subsequent induction of MYOG-dependent programs through chromatin opening and the establishment of super-enhancers at

genes required for terminal myogenic differentiation [7]. Therefore, the downregulation of MYC signaling may represent an interesting option in ERMS treatment.

Targeting MYC in cancer chemotherapy has been extremely challenging. Indeed, MYC protein is a basic helix-loop-helix that lacks a catalytic site. However, its indirect inhibition using bromodomain inhibitors (such as JQ1 or THZ1) induces efficiently MYC downregulation [11-13]. Unfortunately, cancer cells have demonstrated the ability to develop drug resistance to bromodomain inhibitors, which occurred through intrinsic or acquired resistance mechanisms involving rewiring of core development signaling, modified apoptotic response, and reprogramming in kinome signaling [14-16]. Altogether, these studies support that the identification of alternative targets to induce MYC downregulation in ERMS.

Repurposing approved medications to novel indications is a promising strategy in drug discovery allowing the identification of new disease targets with known drugs. During a drug screening to discover putative epigenetic modulators among FDA-approved drug libraries, we reported that cardiac glycosides produced unexpected epigenetic effects. These drugs that are prescribed as treatments for congestive heart failure and cardiac arrhythmias, produced silenced tumor suppressor gene reactivation in cancer cells [17]. Interestingly, cardiac glycosides demonstrated anticancer and epigenetic synergistic effects in combination with the approved DNA demethylating drug, decitabine [18]. Among all cardiac glycosides tested, proscillaridin A demonstrated the most potent anticancer and epigenetic effects [17, 18]. Furthermore, we demonstrated that proscillaridin A showed anticancer specificity toward MYC-driven cancer cells and in particular for leukemia cell lines [19]. Proscillaridin A, at a clinically relevant concentration (5 nM), induced protein downregulation of several histone acetyltransferases,

significant reduction of histone 3 acetylation levels and downregulation of MYC protein and associated gene expression programs [19].

Here, we asked whether proscillaridin A, at clinically relevant concentration, could demonstrate epigenetic and anticancer effects in solid tumors driven by MYC oncogenic such as in ERMS cells. We focused on proscillaridin A effects at inducing post-translational modifications in chromatin and on the expression of epigenetic regulators. Transcriptional analyses coupled with chromatin immunoprecipitation sequencing revealed the onset of epigenetic reprogramming as exemplified by the downregulation of several ERMS-oncogenic pathways and the onset of myogenic differentiation. Finally, we investigated the effects of the combination of decitabine with proscillaridin A in ERMS cells.

Materials and methods

Cell culture and drug treatments

Embryonal rhabdomyosarcoma RD cell line (ATCC) was cultured in DMEM (Life Technologies, USA) supplemented with 10% FBS in a humidified incubator with 5% CO₂ at 37°C. Proscillaridin A was purchased from Santa Cruz Biotechnologies (CAS number: 466-06-8; purity \geq 90%). Decitabine was purchased from Cayman Chemicals (CAS 2353-33-5; purity \geq 98%).

Growth Inhibition

ORFLO MOXI Z Mini Automated Cell Counter was used to analyze growth inhibition after 48h proscillaridin A treatment. GUAVA EasyCyte (Millipore Sigma-Aldrich) was used to measure cell viability for the combination assay. The experiments were repeated three times and IC₅₀ values were calculated with GraphPad Prism software.

Clonogenic assay

750 RD cells were plated on day 0 in 6 well-plates. Cells were treated next day with proscillaridin A for 48h. Drug and cell culture medium were replaced every 24h. After treatment, cell culture medium was replaced and cells were incubated for 12 days without drug until the formation of visible colonies. Colonies were stained with methylene blue and manually counted. To assess the effect of proscillaridin A on self-renewal capacity of colony-forming RD cells, cells from individual colonies were harvested, counted with ORFLO MOXI Z Mini Automated Cell Counter and replated in 6 well-plates. Cell growth was followed by counting cell number every other day. All experiments were performed in triplicate.

Whole Protein and Histone Protein Extractions

Whole cell proteins were extracted using cold whole-cell lysis buffer (50 mM Tris-Cl pH 7.4, 5 mM EDTA, 250 mM NaCl, 50 mM NaF, 0.1% Triton, 0.1 mM Na₃VO₄, and 1 mM PMSF), supplemented with Complete™ Protease Inhibitor Cocktail (Roche). Histone proteins were harvested using acid-extraction protocol with cold Triton Extraction Buffer (TEB; 0.5% Triton, 2 mM PMSF, 0.02% NaN₃, 10 mM sodium butyrate), supplemented with protease inhibitor cocktail, as previously described [19]. Protein extracts were separated by SDS-PAGE and transferred onto a polyvinyl difluoride membrane. All experiments were performed in triplicate. Densitometric analysis was performed using ImageJ software. The following primary antibodies were used to detect expression levels of isolated proteins: C-MYC (1:5000, Abcam cat#AB32072), KAT3A (1:1000, Cell Signaling cat#7389), KAT3B (1:2000, Active Motif cat#61402), KAT2A (1:1000, Santa Cruz cat#sc-365321), KAT2B (1:1000, Cell Signaling cat#3378), KAT5 (1:2500, Abcam cat#ab137518), KAT6A (1:1000, Active Motif cat#39868), KAT7 (1:1000, Bethyl Labs cat#A302-224A-T); and Actin (1:5000, Sigma-Aldrich cat#A2228). The following primary antibodies were used to detect histone acetylation marks on histone H3 and H4 proteins: H3K9ac (1:5000, Active Motif cat#39917), H3K14ac (1:5000, Active Motif cat#39698), H3K18ac (1:2500, Active Motif #39588), H3K27ac (1:5000, Active Motif #39134), H3ac pan-acetyl (1:5000, Active Motif cat#39140), H3 (1:5000, Active Motif cat#39763), H4K5ac (1:2000, Active Motif cat#39700), H4K8ac (1:5000, Active Motif cat#39172); H4K12ac (1:5000, Active Motif cat#39928), H4K16ac (1:5000, Active Motif cat#39167),

H4K20ac (1:2000, Active Motif cat#61531), H4ac pan-acetyl (1:5000, Active Motif cat#39244) and H4 (1:5000, Active Motif cat#39270).

RNA Extraction, Sequencing and Analysis

Untreated and proscillaridin A-treated (5 nM, 48h) RD cells (n=3) were used for transcriptomic analyses. QIAshredder was used to homogenize cell lysates and eliminate debris prior to RNA extraction using RNeasy Mini Kit. Briefly, 10 µg of purified RNA was treated with DNase and quantified by Agilent RNA 6,000 Nano kit bioanalyser chips. 1 µg of mRNA was used for library preparation with TruSeq Stranded mRNA LT. RNA sequencing was performed using HiSeq 2500. Experiments were performed in triplicate. Reads were aligned to human genome (hg19) using STAR v2.4.2 and differential gene expression analysis between untreated and treated cells was done using DESeq2 v1.10.1. For bioinformatics analyses, data were processed using gene set enrichment analyses (GSEA, broadinstitute.org/gsea) and metascape (metascape.org). MYC pathway was created by combining the following GSEA pathways and erasing duplicates: BENPORATH_MYC_MAX; DANG_MYC_TARGETS_UP; COLLER_MYC_TARGETS_DNs; HALLMARK_MYC_TARGETS_V1; HALLMARK_MYC_TARGETS_V2. Untreated RD cells H3K27ac ChIP-sequencing mapping was obtained from GEO: GSM2214095 and associated with our transcriptomic data.

Statistical analysis

All experiments were performed using at least 3 independent samples. Data are presented as means ± standard errors of the mean. Analysis between two groups was done using Student's t

test. For comparison between multiple groups, one-way analysis (ANOVA) followed by Tukey's multiple comparison test was used. Statistical analysis was performed with Kaleida Graph version 4.5.1 software (Synergy Software, PA, USA). p value < 0.05 was considered to be statistically significant. Decitabine and proscillaridin A synergistic effects were evaluated using Synergy Finder software (<https://synergyfinder.fimm.fi/synergy/202002212116530200/>). HSA scores were calculated and then represented in a synergy interaction map. Positive d-score is associated with synergistic effect and negative d-score is associated with antagonistic effect.

Results

Proscillaridin A reduces RD cells self-renewal capacity and MYC protein expression in ERMS

We compared the anticancer activity of proscillaridin A following a 24h- and a 48h-treatment in the ERMS cell line RD. We calculated IC₅₀ values of ~17 nM at 24h and ~7 nM at 48h, respectively, suggesting dose and time-dependent effects (Figure 1A). IC₅₀ values were clinically relevant. Using BrdU staining, we measured the effect of proscillaridin A (5 nM, 48h) on the cell cycle. At low dose (5 nM, 48h), RD cells showed a significant increase in sub-G1 and G2/M cell populations while treatment resulted in a significant reduction in S-phase cells (Figure 1B). Since proscillaridin A produced short-term cytotoxic effects, we also investigated whether it could produce long-term anticancer activity. Using clonogenic assays, we measured that low concentrations of proscillaridin A could significantly reduce (5-10 nM) and up to completely abolish (15 nM) RD cells clonogenic potential after 48h-treatment followed by 12 days incubation without drug exposure (Figure 1C). Then, we asked if proscillaridin A could abrogate the self-renewal capacity of RD cells. Remaining clones obtained in the lowest dose of proscillaridin A treatment (5 nM; causing 25% reduction in clonogenic potential) were replated after trypsinization and cell growth was measured in drug-free media as compared to cells arising from untreated colonies. Cell growth was followed every other day (Figure 1D). Two days after replating, we measured ~90% cell growth reduction in treated cells as compared to untreated cells. In the treated group, the number of cells remained low and stable for 6 days and then dropped by half after 8 days. No cells from the treated group survived 10 days after replating, demonstrating that a low dose proscillaridin A treatment abolished completely RD cells self-renewal capacity (Figure 1E).

We previously demonstrated that proscillaridin A anticancer activity correlated positively with MYC protein expression causing MYC protein downregulation. Given the high activity of MYC in RD cell line, we measured MYC protein expression in response to 5 nM proscillaridin A [19]. From 8h to 96h of proscillaridin A treatment, MYC protein was significantly decreased from 40% to 80%, respectively (Figure 1F). Similar to leukemia cell lines, proscillaridin A inhibits MYC expression in high MYC expressing ERMS solid tumors. To conclude, these experiments suggest that proscillaridin A has a biphasic effect composed of a cytotoxic phase, followed by a long-term reprogramming inducing self-renewal abrogation in MYC-driven ERMS cells.

Proscillaridin A decreases KAT expression and histone 3 acetylation in RD cells

In a previous study, we demonstrated that proscillaridin A induced leukemic cell reprogramming by downregulating the expression of lysine acetyltransferases (KAT) [19]. Therefore, we performed a time-course treatment with proscillaridin A (5 nM, from 8h to 96) in RD cells. We measured that KAT5 (TIP60) expression was significantly decreased after 16h-treatment and that KAT3A (CBP), KAT3B (P300), KAT2A (GCN5) and KAT2B (PCAF) were significantly downregulated after 24h of treatment (Figures 2A and 2B). No expression change of KAT6A (MOZ) and KAT7 (HBO1) was induced by proscillaridin A in RD cells (Supplementary figures S1A and S1B). As in high MYC expressing leukemia cells, proscillaridin A reduces KAT protein expression in ERMS cells. We then asked if histone acetylation was affected by proscillaridin A treatment. Acetylation levels were significantly reduced in histone 3 (H3) at lysine 9, 27 and on pan-H3 acetylation from 24 to 96h, at lysine 14 after 48 to 96h and at lysine 18 after 72h, after

proscillaridin A treatment (5 nM, Figures 2C and 2D). Interestingly, no significant change of acetylation was measured in histone 4 on lysine 5, 8, 16, 20 and on pan-H4 (Supplementary figures S1C and S1D). Therefore, proscillaridin A produces loss of H3 acetylation in RD cells through KAT protein downregulation, which may impact cell reprogramming.

Transcriptional oncogenic reprogramming induced by proscillaridin A in RD cells

Because of proscillaridin A-induced epigenetic modifications, we investigated how cell transcriptome was affected in ERMS cells by performing RNA-sequencing analysis of untreated and proscillaridin A-treated (5 nM, 48h) RD cells. After drug treatment, we measured a downregulation of 3,498 genes ($\log_2FC < 0.5$; P-value adjusted < 0.05) and an upregulation of 1,079 genes ($\log_2FC > 1$; P-value adjusted < 0.05 ; Supplementary figure S2). Metascape gene ontology (GO) analysis revealed that upregulated GO-terms were involved notably in negative regulation of proliferation and epithelial cell differentiation (Figure 3A). Interestingly, downregulated GO-terms were associated with muscle processes, muscle organ development, skeletal system development, suggesting the gene silencing in muscle cell division by proscillaridin A in RD cells (Figure 3B). Next, we interrogated the expression changes in key pathways implicated in RMS after proscillaridin A treatment by performing Gene Set Enrichment Analysis (GSEA). Interestingly, gene sets involved in myogenesis and KRAS signaling pathways were significantly downregulated by proscillaridin A in RD cells with enrichment scores of 0.43 and 0.39, respectively (Figures 4A-D). Although MYC pathway was not identified by GSEA as differentially expressed, we noted that common MYC target genes were downregulated. This led us to compile MYC target genes from other MYC datasets of The Broad institute

(BENPORATH_MYC_MAX, containing 552 genes; DANG_MYC_TARGETS_UP, containing 143 genes; COLLER_MYC_TARGETS_DN, containing 9 genes; HALLMARK_MYC_TARGETS_V1, containing 143 genes; and HALLMARK_MYC_TARGETS_V2, containing 58 genes) to constitute a MYC dataset with 133 genes (after removal of gene duplicates). Gene names and expression levels are listed in Supplemental Table 1. Among those MYC target genes, 79% of them were significantly downregulated by proscillaridin A treatment (Figure 4E-F). Not surprisingly, Metascape analysis of downregulated genes belonging to MYC pathway revealed that these genes were associated with cell cycle regulation, protein localization and stability while upregulated genes were mostly involved in senescence-associated secretory phenotype (Supplementary figures S3A and S3B). These results highlight that proscillaridin A inhibits simultaneously several key oncogenic transcriptional pathways in ERMS cells.

H3K27ac peaks in gene promoters of untreated RD cells are silenced by proscillaridin A

Since H3K27ac is globally decreased by proscillaridin A treatment (Figures 2C and 2D) and chromatin immunoprecipitation sequencing data of this mark are available in RD cells (GEO: GSM2214095, [20]), we asked if promoters marked by H3K27ac are silenced by proscillaridin A. RD cells contained 6,478 genes marked by H3K27ac in their promoter regions (-500 to +500 bp from TSS). Among those, 1,519 genes were differentially expressed after proscillaridin A treatment (Figure 5A). In this group, 81% (1,231 genes) were downregulated, which is in agreement with the global loss this active transcription mark after treatment. Gene ontology analyses revealed that downregulated genes are involved in DNA replication, DNA repair, cell

cycle regulation and muscle development programs (Figures 5B; Supplementary figure S4A). In contrast, gene ontology analyses of genes upregulated by proscillaridin A treatment and marked by H3K27ac in untreated RD cells were associated with pathways involved in negative regulation of growth and regulation of epithelial cell differentiation (Supplementary figure S4B).

Among the genes marked by H3K27ac in untreated RD cells and differentially expressed after proscillaridin A treatment, 6% (100 genes) played key roles in oncogenic pathways (Supplementary figure S4C). Among those, the vast majority (80%) belonged to MYC pathway, while 18% were involved in KRAS pathway, respectively (Figure 5C). Interestingly, the H3K27ac mark in promoters was predominantly found in MYC pathway genes (60% of them), as compared KRAS pathway (27 % of them; and Supplementary figures S4D and S4E). Global reduction of H3K27ac induced by proscillaridin A resulted in the downregulation of the vast majority of the genes involved the MYC and KRAS oncogenic pathways (Figures 5C and 5D). Altogether, these results suggest that H3K27ac is an abundant marker of gene promoters of MYC pathway in RD cells and that proscillaridin A-induced loss of H3K27ac induces their transcriptional silencing.

Combination of proscillaridin A and decitabine is synergistic in RD cells

The combination of proscillaridin A, at high doses (50 nM) and the DNA demethylating drug decitabine has been reported to synergistically reactivate silenced tumor suppressor genes in a KRAS-driven colon cancer cell line [18]. Here, we asked whether decitabine could enhance proscillaridin A anticancer activity in RD cells at doses of clinical relevance (Figure 6A). We first determined IC₅₀ values for cell viability after decitabine treatment alone (48 or 72h) followed by

a 48h-rest period without drug exposure (Figure 6B). Indeed, decitabine has a delayed cytotoxic effect, which requires several cell division cycles to produce an impact on cancer cell growth [21]. After 48h and 72h of treatment followed by a 48h-rest period, IC₅₀ values were at 83 nM and 66 nM, respectively (Figure 6B). Next, we tested the effect of decitabine in simultaneous and sequential combinations with proscillaridin A on RD cells (Figures 6C - 6F; Supplementary figure S5). First, we tested simultaneous combinations with decitabine exposure (72h) and found that combinations with 48h of proscillaridin A produced a more robust decrease of RD cell viability than the two drugs alone (Supplementary figures S5A-S5C). Interestingly, these results were validated by clonogenic assays where simultaneous treatment of decitabine (100 nM) and proscillaridin A (5 nM) during 48h reduced RD clonogenic potential by more than 80%, whereas decitabine and proscillaridin A reduced colony formation only by 25% and 40%, respectively (Figure 6C). HSA synergy scores demonstrated synergistic interaction with the simultaneous combination of decitabine (≥ 100 nM ; 72h) with proscillaridin A at concentrations less than 10 nM (Figures S5C). Secondly, we tested the effect of sequential combinations of 48h of decitabine followed by 48h of proscillaridin A. This combination resulted in a slight increase of viability inhibition compared to the two drugs alone at similar concentrations (Supplemental figure S5D). However, HSA scores did not score for synergistic activity between the two drugs in these conditions (Supplemental figures S5E). Finally, we tested sequential combinations with longer decitabine exposure (72h) followed by 48h of proscillaridin A. In this experimental condition, we measured stronger cell viability inhibition as compared to the two drugs alone at specific concentrations, resulting in synergistic HSA scores with 10 nM to 1 μ M of decitabine in sequential combination with 1 nM to 100 nM of proscillaridin A (Figures 6D - 6F). These results

Da Costa et al.

demonstrate a synergistic activity between decitabine and proscillaridin A at concentrations that are clinically relevant.

Discussion

Here, we demonstrated that the cardiac glycoside proscillaridin A exhibits anticancer properties within clinically reachable concentrations against the MYC-driven ERMS cell line RD. The observed anticancer effects are bi-phasic, composed of a rapid cytotoxic phase along with a block of the cell cycle in G2/M, and followed by a long-term reprogramming with RD cells losing their self-renewal capacity. The latter effect may be associated with proscillaridin A epigenetic effects causing loss of histone acetylation in MYC target genes [19]. In the context of MYC-driven ERMS, proscillaridin A blocks oncogenic transcriptional programs associated with KRAS and MYC pathways. Importantly, proscillaridin A silences about 80% of genes involved in MYC oncogenic pathway. Many of those are marked by H3K27ac in untreated cells, suggesting the broad impact of proscillaridin A on the regulation of ERMS cells. As previously described by others and us in leukemia cells, proscillaridin A is a potent inhibitor of MYC oncogene activity [19, 22]. In the context of ERMS cells, with high MYC expression, MYC protein level was affected by 48h-proscillaridin A treatment while its mRNA level was unchanged after treatment. This finding leads us to speculate that proscillaridin A induced MYC protein downregulation through post-translational modification mechanism. Indeed, MYC protein stability is highly regulated by post-translational modifications such as phosphorylation, which results in its ubiquitination and then proteasome degradation, or by acetylation, which increases MYC stability [23-25]. In leukemia cells, we demonstrated a 50% reduction in MYC protein half-life after proscillaridin A treatment, which correlated with a loss of MYC acetylation level [19]. More studies will be necessary to characterize, which mechanisms are involved in MYC degradation induced by a proscillaridin A treatment in ERMS cells.

Lastly, we explored the potential of combining proscillaridin A with the DNA methylation inhibitor decitabine. We previously demonstrated that the sequential combination between decitabine and proscillaridin A produced synergistic tumor suppressor gene reactivation [18]. This synergistic effect was observed in a KRAS-driven colon cancer cell line that required a proscillaridin A concentration (50 nM), which is about 10 times higher than the maximum tolerated dose of cardiac glycosides in heart failure patients [26]. Since we demonstrated that MYC-driven cancer cells are more sensitive to proscillaridin A than KRAS-driven cancers [19], we investigated whether a synergistic anticancer effect with decitabine could be observed with proscillaridin A at clinically relevant concentrations. Interestingly, lowest concentrations of proscillaridin A (1 nM) and decitabine (10 nM) showed synergistic interactions, supporting the clinical relevance of this drug combination. Decitabine is administered in children with hematological malignancies and but its efficacy against solid tumors could be enhanced in the context of drug combination. Here, we showed that the combination of decitabine and proscillaridin A exhibits synergic anticancer effects in particular when tumors are overexpressing MYC oncogene. Therefore, proscillaridin A alone and in combination with decitabine may represent a novel therapeutic strategy for the treatment of MYC-driven ERMS relapsed patients.

Figure legends

Figure 1: Anticancer activity of proscillaridin A in RD cells. (A) Cell viability and half-maximal inhibitory concentration (IC₅₀) calculation after proscillaridin A treatments of 24h and 48h (ranging from 1 nM to 10 μM) on RD cells (n=3). (B) Cell cycle analysis after BrdU staining, measured by flow cytometry, in RD cell line exposed to proscillaridin A (5 nM, 48h; * indicates P<0.05; Two-way ANOVA; n=3). (C) Clonogenic assay of RD cells in response to 48h-proscillaridin A treatment at the doses indicated in the graph (* indicates P<0.05; One-way ANOVA; n=3). (D and E) Colony replating assay of remaining RD cells from colonies treated with proscillaridin A (5 nM; 48h) and after 12 days incubation. The remaining cells were counted every 2 days as represented by the scheme in (D). (E) Number of cells from colonies of untreated and proscillaridin A-treated cells are shown on the graph (E; * indicates P<0.05; One-way ANOVA; n=3). (F) Measurement by western blotting and quantification of MYC protein levels after a time-course of proscillaridin A treatment (5 nM, 8h to 96h) in RD cells (* indicates P<0.05; One-way ANOVA; n=3).

Figure 2: Downregulation of KAT protein levels and histone 3 acetylation after proscillaridin A treatment in RD cells. (A-B) Measurement of KAT expression levels after a time-course of proscillaridin A treatment (5 nM, 8h to 96h) in RD cells. (A) KAT2A (GCN5), KAT2B (PCAF), KAT3A (CBP), KAT3B (P300) and KAT5 (TIP60) expression levels were assessed by western blotting in RD cells (ACTIN was used as loading control). (B) KAT expression levels were quantified and expressed as a percentage of untreated cells (* indicates P<0.05; Two-way

ANOVA; n=3). (C-D) Measurement of histone 3 (H3) acetylation levels after a time-course of proscillaridin A treatment (5 nM, 8h to 96h) in RD cells. (C) Histone 3 acetylation levels were assessed using antibodies against H3K9ac, H3K14ac, H3K18ac, H3K27ac, and total H3 pan-acetylation (PanAc). H3 was used as a loading control. (D) H3 acetylation levels were quantified and expressed as a percentage of untreated cells (* indicates $P < 0.05$; Two-way ANOVA; n=3).

Figure 3: Metascape analysis of transcriptional changes induced by proscillaridin A in ERMS cells. RD cells were harvested before or after proscillaridin treatment (5 nM; 48h), in triplicate prior RNA-sequencing analyses. (A) Upregulated gene ontology (GO) pathways induced by a 48h proscillaridin A treatment (5 nM). (B) Downregulated gene ontology (GO) pathways induced by a 48h proscillaridin A treatment (5 nM).

Figure 4: Proscillaridin A downregulates several oncogenic signaling pathways in ERMS cells. Transcriptomic data sets of RD cells before and after proscillaridin A treatment (5 nM; 48h) were subjected to Gene Set Enrichment analysis. (A) Myogenesis pathway was downregulated after treatment (Enrichment score: 0.43 FDR q-value: 0.06). (B) Heat map showing RPKM values of genes in MYOGENESIS pathway in untreated and treated cells (n=3). (C) KRAS signaling pathway was downregulated after treatment (Enrichment score: 0.39 FDR q-value: 0.19). (D) Heat map showing RPKM values of genes in KRAS pathway in untreated and treated cells (n=3). (E) Pie chart shows percentage of genes that belonged to our combined MYC pathway gene list (see material and method section) that are upregulated (blue) and downregulated (grey)

after proscillaridin A treatment in RD cells. (F) Heat map showing RPKM values of genes in our combined MYC gene list pathway in untreated and treated cells (n=3).

Figure 5: Proscillaridin A induces downregulation of genes marked by H3K27ac and MYC in their promoter regions. (A) Pie chart representing 1,519 genes that are marked by H3K27ac in promoter regions (-500/+500 bp) using publicly available H3K27ac ChIP-sequencing data of untreated RD cells. Eighty one percent (1,231 genes) of those are downregulated ($FC < -0.5$; dark grey) and 19 percent (288 genes) are upregulated ($FC > 1$; grey light) after proscillaridin A treatment using our RNA-sequencing data set (n=3). (B) Metascape analysis showing the top 10 GO pathways for genes marked by H3K27ac whose expression is downregulated ($\text{Log}_2 FC < -0.5$) by proscillaridin A. (C) Up- or down-regulation of genes ($FC > 1$; $FC < -0.5$) belonging to the MYC and KRAS gene pathways after proscillaridin A treatment (5 nM; 48h) whose promoters are marked by H3K27ac in untreated RD cells. (D) Heat map showing RPKM values of genes in our combined MYC gene list pathway for those whose promoters are marked by H3K27ac in untreated cells and differentially expressed after proscillaridin A treatment by RNA-sequencing (n=3). Most differentially expressed genes are annotated in the heat map.

Figure 6: Combination of decitabine and proscillaridin A is synergistic at clinically relevant doses in ERMS. (A) Scheme depicting the drug combination sequence. (B) Cell viability and half-maximal inhibitory concentration (IC_{50}) calculation after 48h (grey circles) or 72h (blue circles) of decitabine treatment (ranging from 1 nM to 100 μM) followed by a 48h-rest period in RD cells (n=4). (C) Clonogenic assay in untreated RD cells (grey) and treated with decitabine

(100 nM; 48h), proscillaridin A (5 nM; 48h) and simultaneous combination of decitabine and proscillaridin A (* indicates $P < 0.05$; One-way ANOVA; $n=3$). (D) Cell viability dose-response curves of 72h treatment of decitabine (ranging from 1 nM to 1 μ M), in sequential combination with increasing doses of proscillaridin A (48h; doses from 0.1 nM to 1 μ M). (E) IC_{50} calculations (nM) of decitabine (72h treatment), proscillaridin A (5 nM) and their sequential combination. (F) HSA scores of RD cell viability after the sequential combination of decitabine and proscillaridin A. Doses and exposure times are indicated in the graph.

REFERENCES:

1. Dasgupta R, Fuchs J, Rodeberg D: **Rhabdomyosarcoma**. *Semin Pediatr Surg* 2016, **25**(5):276-283.
2. Jawad N, McHugh K: **The clinical and radiologic features of paediatric rhabdomyosarcoma**. *Pediatr Radiol* 2019, **49**(11):1516-1523.
3. HaDuong JH, Martin AA, Skapek SX, Mascarenhas L: **Sarcomas**. *Pediatr Clin North Am* 2015, **62**(1):179-200.
4. Williams RF, Fernandez-Pineda I, Gosain A: **Pediatric Sarcomas**. *Surg Clin North Am* 2016, **96**(5):1107-1125.
5. Martinelli S, McDowell HP, Vigne SD, Kokai G, Uccini S, Tartaglia M, Dominici C: **RAS signaling dysregulation in human embryonal Rhabdomyosarcoma**. *Genes Chromosomes Cancer* 2009, **48**(11):975-982.
6. Sun X, Guo W, Shen JK, Mankin HJ, Hornicek FJ, Duan Z: **Rhabdomyosarcoma: Advances in Molecular and Cellular Biology**. *Sarcoma* 2015, **2015**:232010.
7. Yohe ME, Gryder BE, Shern JF, Song YK, Chou HC, Sindiri S, Mendoza A, Patidar R, Zhang X, Guha R *et al*: **MEK inhibition induces MYOG and remodels super-enhancers in RAS-driven rhabdomyosarcoma**. *Sci Transl Med* 2018, **10**(448).
8. Dang CV: **MYC on the path to cancer**. *Cell* 2012, **149**(1):22-35.
9. Marampon F, Gravina GL, Di Rocco A, Bonfili P, Di Staso M, Fardella C, Polidoro L, Ciccarelli C, Festuccia C, Popov VM *et al*: **MEK/ERK inhibitor U0126 increases the**

- radiosensitivity of rhabdomyosarcoma cells in vitro and in vivo by downregulating growth and DNA repair signals.** *Mol Cancer Ther* 2011, **10**(1):159-168.
10. Gravina GL, Festuccia C, Popov VM, Di Rocco A, Colapietro A, Sanita P, Monache SD, Musio D, De Felice F, Di Cesare E *et al*: **c-Myc Sustains Transformed Phenotype and Promotes Radioresistance of Embryonal Rhabdomyosarcoma Cell Lines.** *Radiat Res* 2016, **185**(4):411-422.
 11. Filippakopoulos P, Qi J, Picaud S, Shen Y, Smith WB, Fedorov O, Morse EM, Keates T, Hickman TT, Felletar I *et al*: **Selective inhibition of BET bromodomains.** *Nature* 2010, **468**(7327):1067-1073.
 12. Delmore JE, Issa GC, Lemieux ME, Rahl PB, Shi J, Jacobs HM, Kastiris E, Gilpatrick T, Paranal RM, Qi J *et al*: **BET bromodomain inhibition as a therapeutic strategy to target c-Myc.** *Cell* 2011, **146**(6):904-917.
 13. Roe JS, Mercan F, Rivera K, Pappin DJ, Vakoc CR: **BET Bromodomain Inhibition Suppresses the Function of Hematopoietic Transcription Factors in Acute Myeloid Leukemia.** *Mol Cell* 2015, **58**(6):1028-1039.
 14. Fong CY, Gilan O, Lam EY, Rubin AF, Ftouni S, Tyler D, Stanley K, Sinha D, Yeh P, Morison J *et al*: **BET inhibitor resistance emerges from leukaemia stem cells.** *Nature* 2015, **525**(7570):538-542.
 15. Kurimchak AM, Shelton C, Duncan KE, Johnson KJ, Brown J, O'Brien S, Gabbasov R, Fink LS, Li Y, Lounsbury N *et al*: **Resistance to BET Bromodomain Inhibitors Is Mediated by Kinome Reprogramming in Ovarian Cancer.** *Cell Rep* 2016, **16**(5):1273-1286.

16. Cochran AG, Conery AR, Sims RJ, 3rd: **Bromodomains: a new target class for drug development.** *Nature reviews Drug discovery* 2019, **18**(8):609-628.
17. Raynal NJ, Lee JT, Wang Y, Beaudry A, Madireddi P, Garriga J, Malouf GG, Dumont S, Dettman EJ, Gharibyan V *et al*: **Targeting Calcium Signaling Induces Epigenetic Reactivation of Tumor Suppressor Genes in Cancer.** *Cancer research* 2016, **76**(6):1494-1505.
18. Raynal NJ, Da Costa EM, Lee JT, Gharibyan V, Ahmed S, Zhang H, Sato T, Malouf GG, Issa JJ: **Repositioning FDA-Approved Drugs in Combination with Epigenetic Drugs to Reprogram Colon Cancer Epigenome.** *Molecular cancer therapeutics* 2017, **16**(2):397-407.
19. Da Costa EM, Armaos G, McInnes G, Beaudry A, Moquin-Beaudry G, Bertrand-Lehouillier V, Caron M, Richer C, St-Onge P, Johnson JR *et al*: **Heart failure drug proscillaridin A targets MYC overexpressing leukemia through global loss of lysine acetylation.** *J Exp Clin Cancer Res* 2019, **38**(1):251.
20. Creighton MP, Cheng AW, Welstead GG, Kooistra T, Carey BW, Steine EJ, Hanna J, Lodato MA, Frampton GM, Sharp PA *et al*: **Histone H3K27ac separates active from poised enhancers and predicts developmental state.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010, **107**(50):21931-21936.
21. Momparler RL: **Pharmacology of 5-Aza-2'-deoxycytidine (decitabine).** *Semin Hematol* 2005, **42**(3 Suppl 2):S9-16.

22. Steinberger J, Robert F, Halle M, Williams DE, Cencic R, Sawhney N, Pelletier D, Williams P, Igarashi Y, Porco JA, Jr. *et al*: **Tracing MYC Expression for Small Molecule Discovery**. *Cell Chem Biol* 2019, **26**(5):699-710 e696.
23. Gregory MA, Hann SR: **c-Myc proteolysis by the ubiquitin-proteasome pathway: stabilization of c-Myc in Burkitt's lymphoma cells**. *Mol Cell Biol* 2000, **20**(7):2423-2435.
24. Patel JH, Du Y, Ard PG, Phillips C, Carella B, Chen CJ, Rakowski C, Chatterjee C, Lieberman PM, Lane WS *et al*: **The c-MYC oncoprotein is a substrate of the acetyltransferases hGCN5/PCAF and TIP60**. *Molecular and cellular biology* 2004, **24**(24):10826-10834.
25. Faiola F, Liu X, Lo S, Pan S, Zhang K, Lyman E, Farina A, Martinez E: **Dual regulation of c-Myc by p300 via acetylation-dependent control of Myc protein turnover and coactivation of Myc-induced transcription**. *Mol Cell Biol* 2005, **25**(23):10220-10234.
26. Currie GM, Wheat JM, Kiat H: **Pharmacokinetic considerations for digoxin in older people**. *Open Cardiovasc Med J* 2011, **5**:130-135.

Figure 1

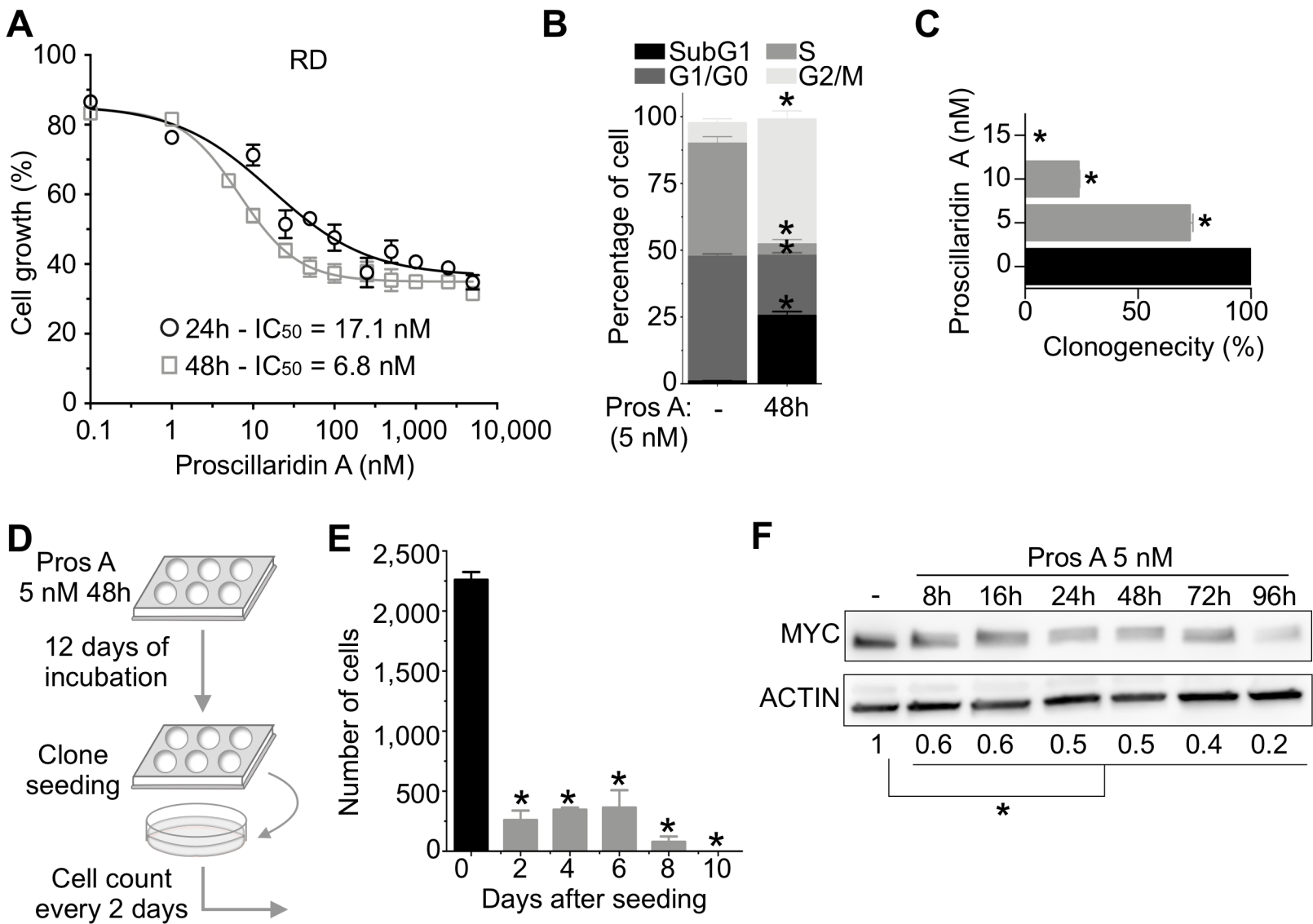


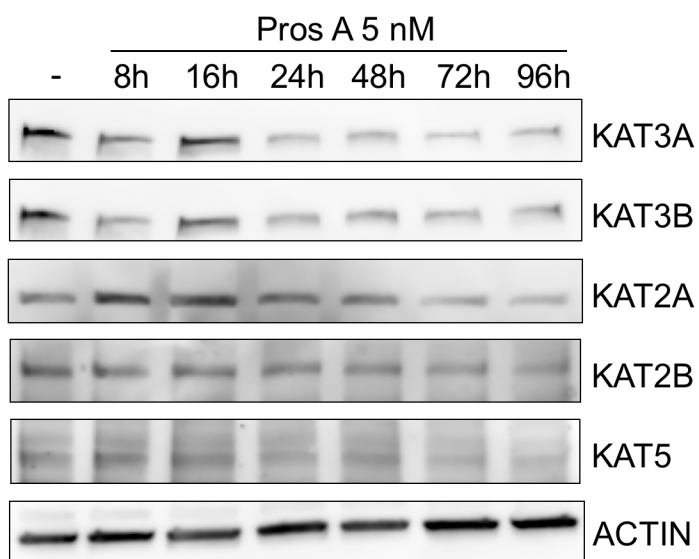
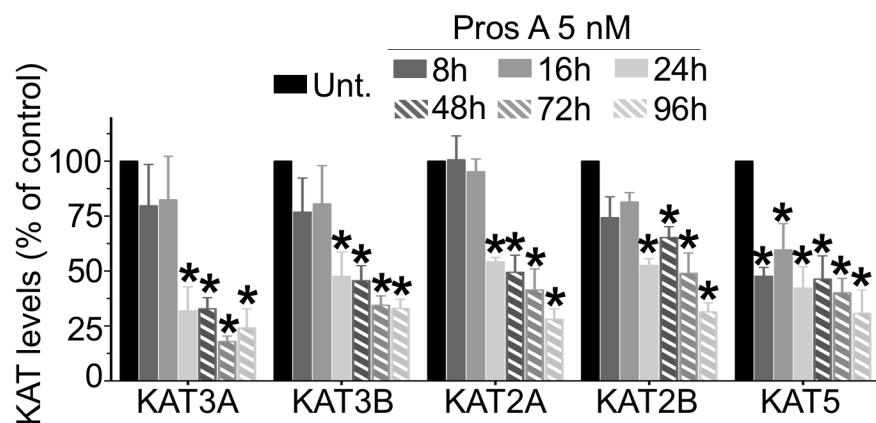
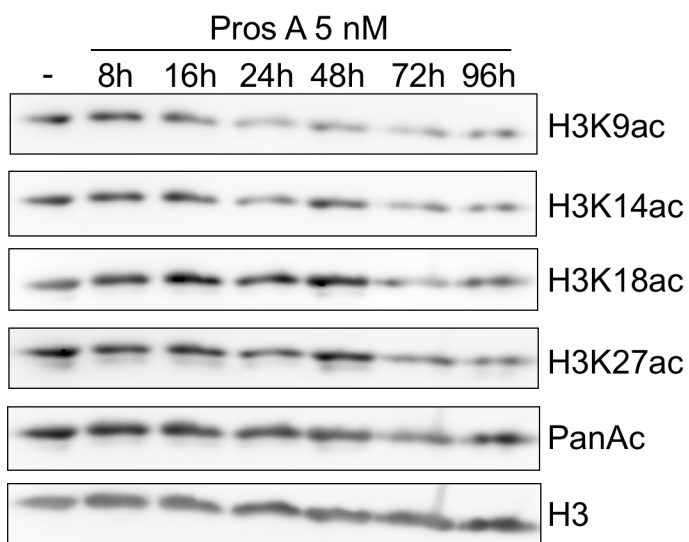
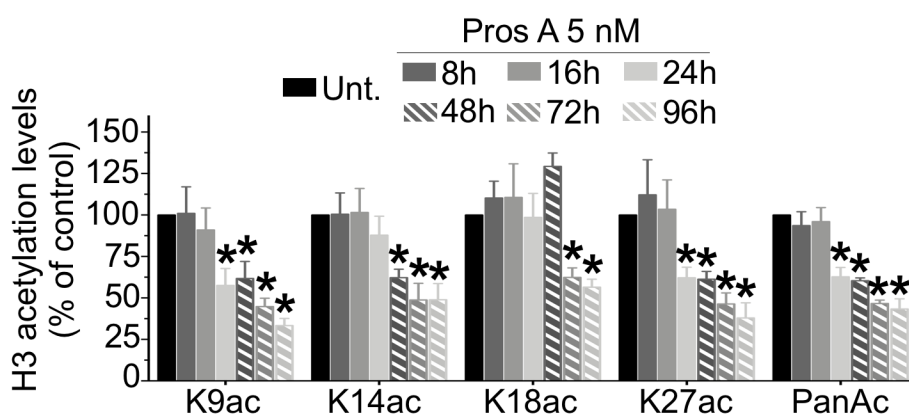
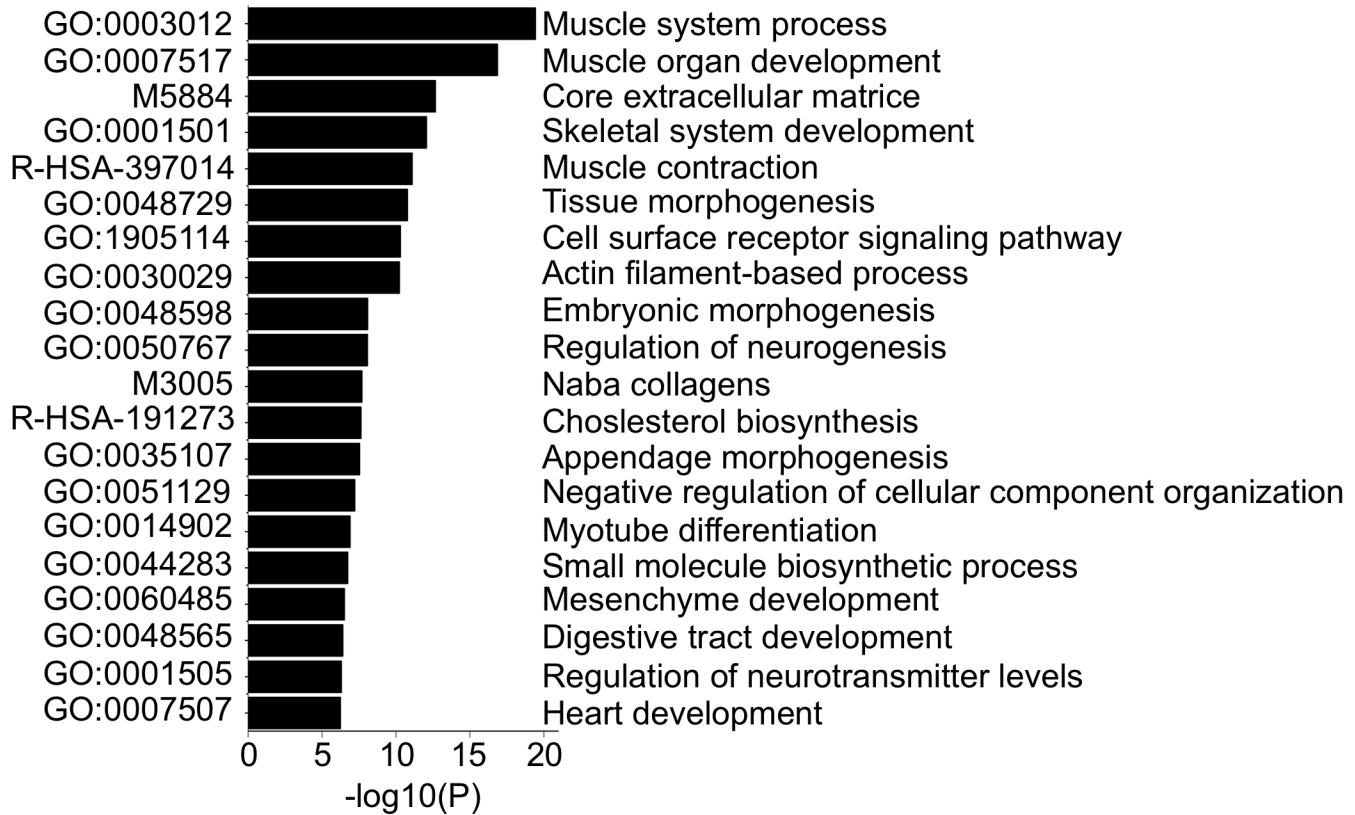
Figure 2**A****B****C****D**

Figure 3

A

Downregulated gene families (GO) after Pros A treatment (5 nM; 48h)



B

Upregulated gene families (GO) after Pros A treatment (5 nM; 48h)

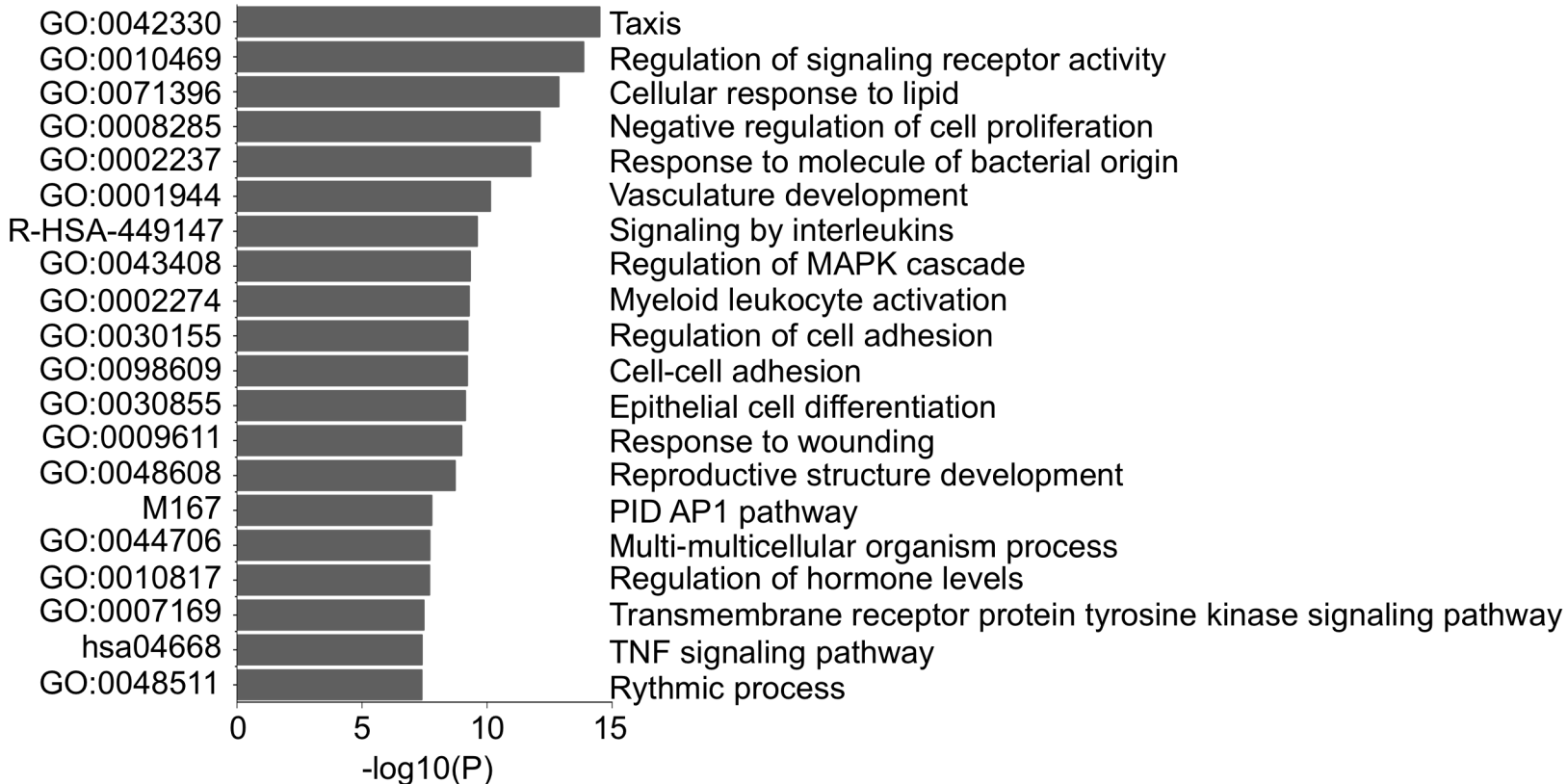


Figure 4

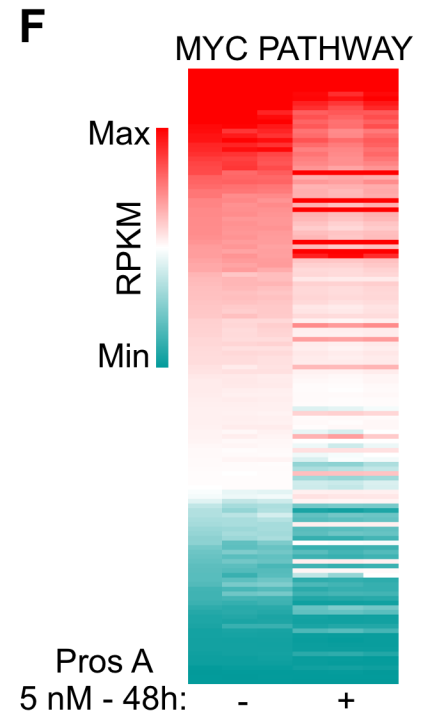
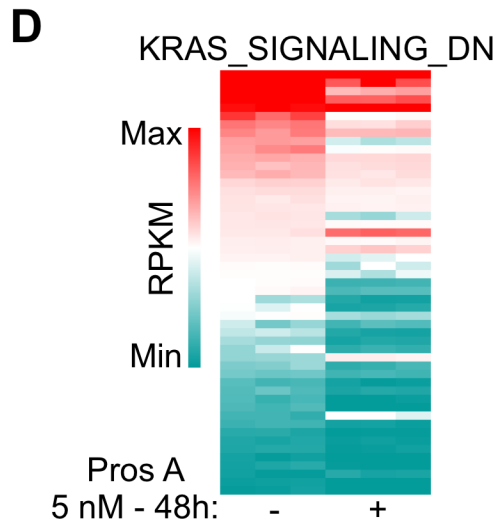
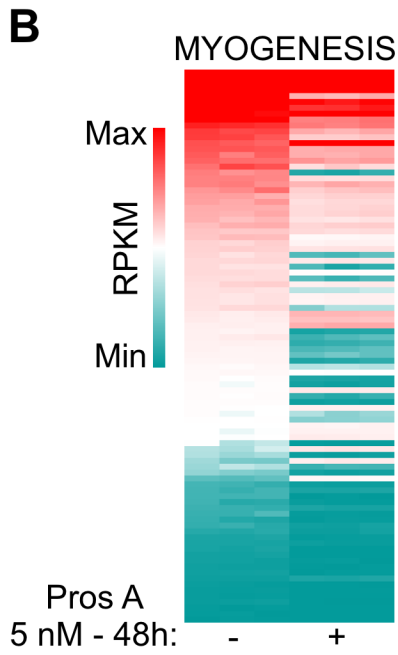
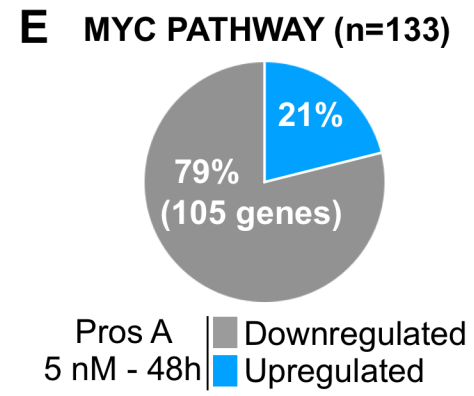
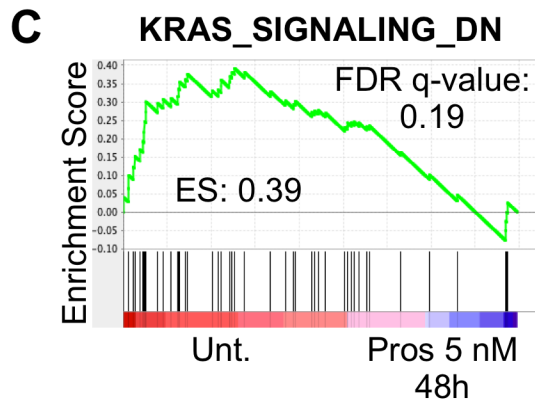
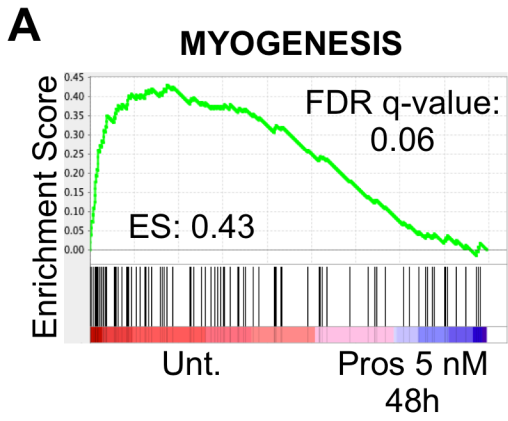


Figure 5

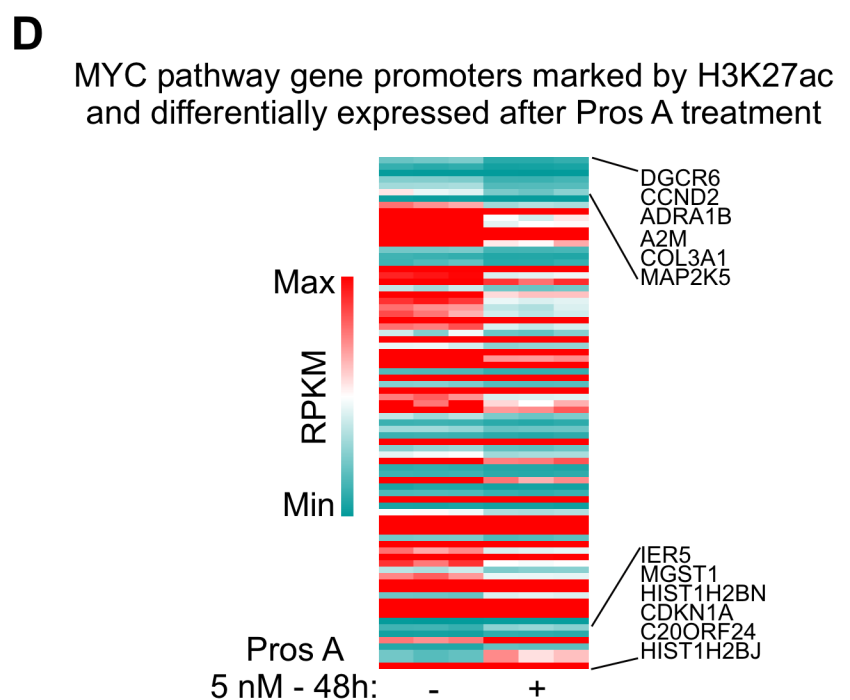
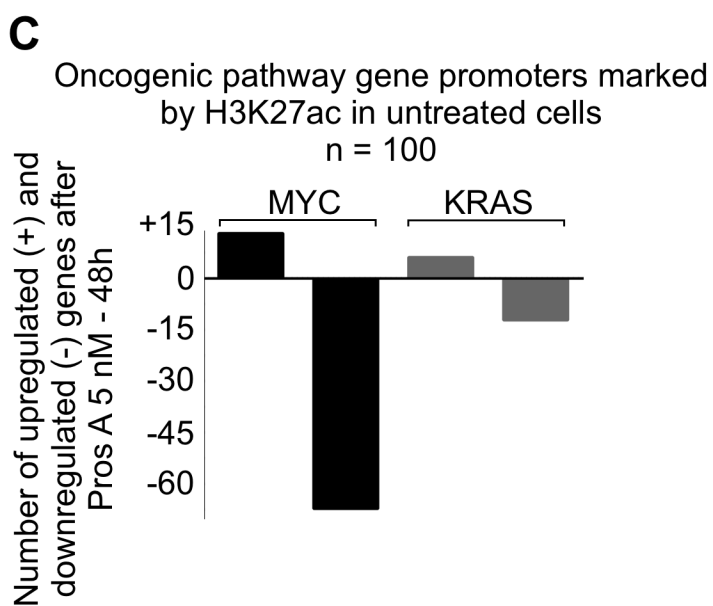
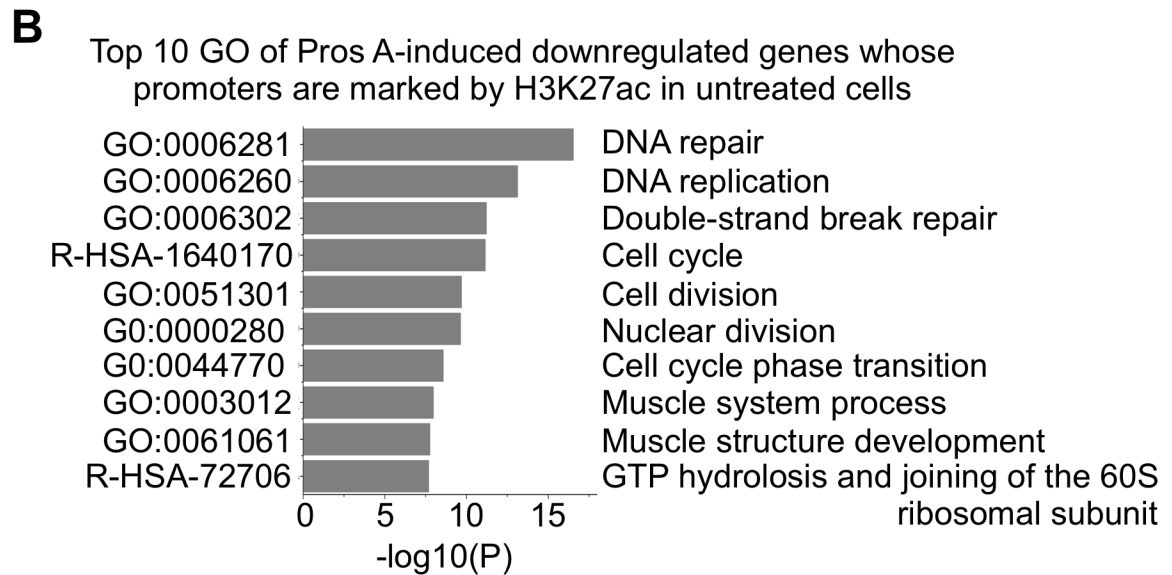
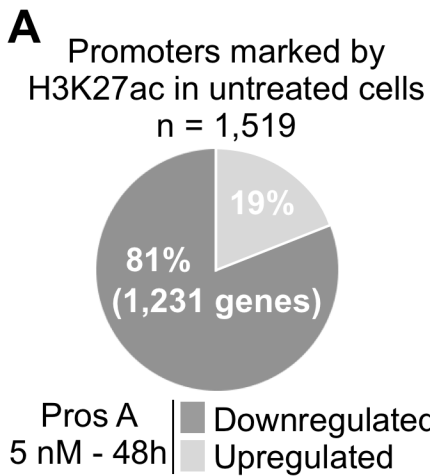
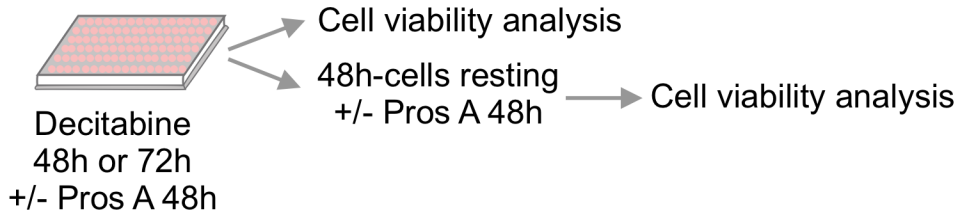
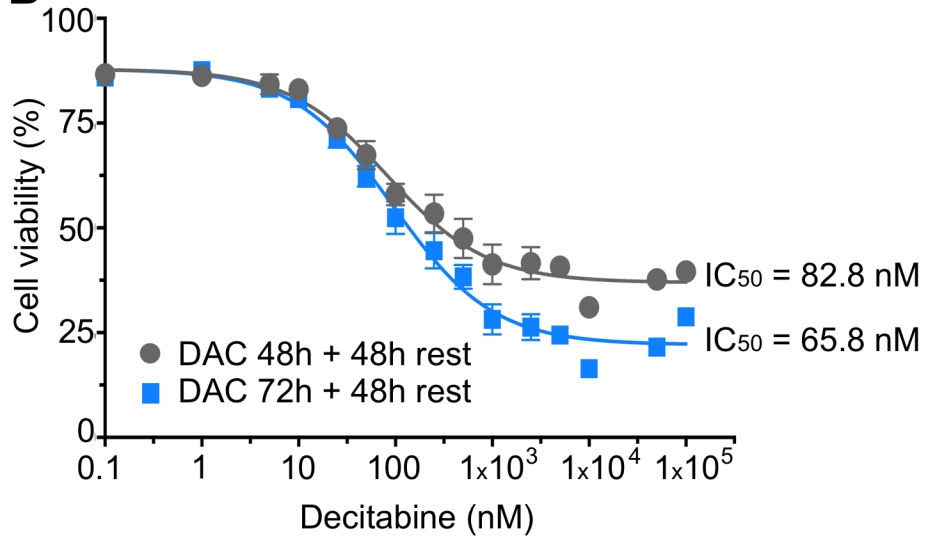
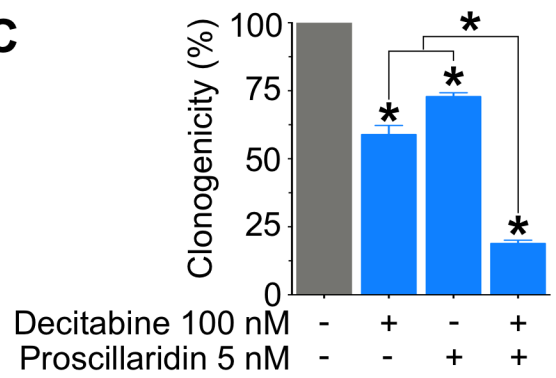
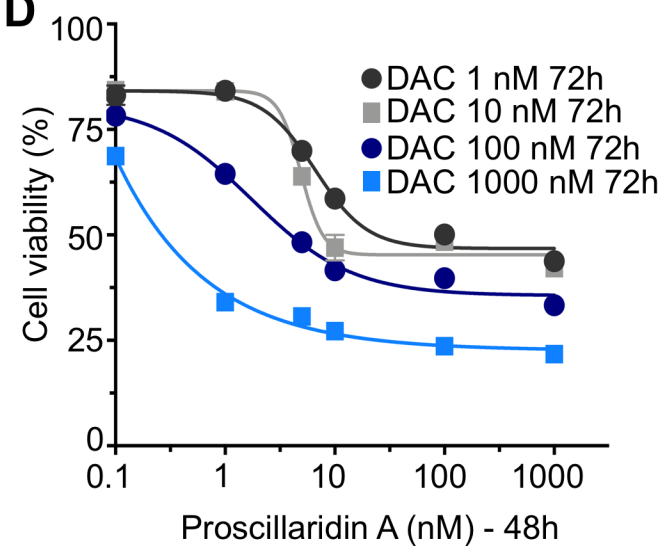
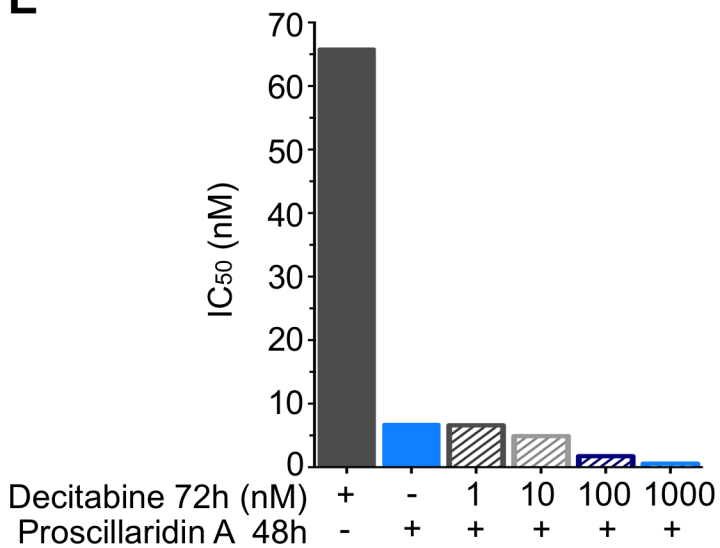
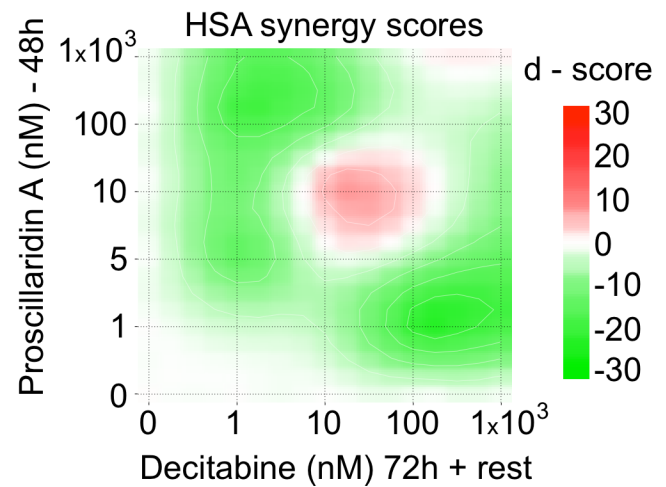


Figure 6**A****B****C****D****E****F**

Supplementary figure legends:

Supplementary figure S1: Stable levels of KAT6A (MOZ), KAT7 (HBO1) and histone 4 acetylation after proscillaridin A treatment in RD cells. (A-B) Measurement of KAT6A and KAT7 expression levels after a time-course of proscillaridin A treatment (5 nM, 8h to 96h) in RD cells. (A) KAT6A and KAT7 expression levels were assessed by western blotting in RD cells. ACTIN was used as loading control. (B) KAT6A and KAT7 expression levels were quantified and expressed as a percentage of untreated cells (Two-way ANOVA; n=3). (C-D) Measurement of histone 4 acetylation (H4) levels after a time-course proscillaridin A treatment (5 nM, 8h to 96h) in RD cells. (C) H4 acetylation levels were assessed using antibodies against H4K5ac, H4K8ac, H4K16ac, H4K20ac, and total H4 pan-acetylation (PanAc). H4 was used as loading control. (D) H4 acetylation levels were quantified and expressed as a percentage of untreated cells (Two-way ANOVA; n=3).

Supplementary figure S2: Transcriptomic analysis in RD cells treated with proscillaridin A (5 nM, 48h). Volcano plots of gene expression changes in RD cells in untreated versus treated samples. Black dots correspond to genes with P-value adjusted > 0.05 . Grey dots correspond to genes with P-value adjusted < 0.05 but without significant fold change expression difference between untreated and treated cells ($-0.5 < \log_2FC < 1$). Downregulated genes with P-value adjusted < 0.05 and $\log_2FC < -0.5$ are shown in green. Upregulated genes with P-value adjusted < 0.05 and $\log_2FC > 1$ are shown in red. Numbers of downregulated and upregulated genes are shown on the graphs.

Supplementary figure S3: (A and B) Metascape analysis of genes that belong to MYC pathway that are significantly (A) downregulated ($\log_2FC < -0.5$) and significantly (B) up-regulated ($\log_2FC > 1$) by proscillaridin A treatment (5 nM; 48h) in RD cells.

Supplementary figure S4: Differentially expressed genes after proscillaridin A treatment are marked by H3K27ac in untreated RD cells. (A and B) Metascape analysis of genes marked by H3K27ac in promoter regions (-500/+500 bp) in untreated RD cells that are downregulated (A; $\log_2 FC < -0.5$) and upregulated (B; $\log_2 FC > 1$) by proscillaridin A treatment. (C) Pie chart displaying percentage of downregulated genes ($FC < -0.5$; grey) and upregulated genes ($FC > 1$; blue) after proscillaridin A treatment from RNA-sequencing data including genes that belong to oncogenic pathway (hatched blue for upregulated and hatched grey for downregulated genes). Pie charts representing the number of genes belonging to (D) MYC and (E) KRAS pathways that are marked by H3K27ac in the promoter regions of untreated RD cells. Promoters marked by H3K27ac are shown in blue (+) while remaining gene promoters are shown in grey (-).

Supplementary figure S5: Simultaneous combination of decitabine and proscillaridin A. (A) Cell viability curves of 72h treatment of decitabine (doses from 1, 10, 100 and 1000 nM) in combination with proscillaridin A (48h, 0.1-1000 nM). (B) IC_{50} calculations (nM) of decitabine (72h treatment), proscillaridin A (48h) and their simultaneous combination. (C) HSA scores of RD cell viability after the simultaneous combination of decitabine (72h) and proscillaridin A (48h). Doses and exposure times are indicated in the graph. (D) Cell viability curves of 48h

treatment of decitabine (doses from 1, 10, 100 and 1000 nM) in combination with proscillaridin A (48h, 0.1-1000 nM). (E) HSA scores of the simultaneous combination of 48h-decitabine with 48h-proscillaridin A.

Supplemental table 1: List of 133 genes that belong to MYC pathway and whose expression are significantly altered ($\log_2FC < -0.5$ and $\log_2FC > 1$) by proscillaridin A treatment (5 nM; 48h) in RD cells. Log₂FC are indicated.

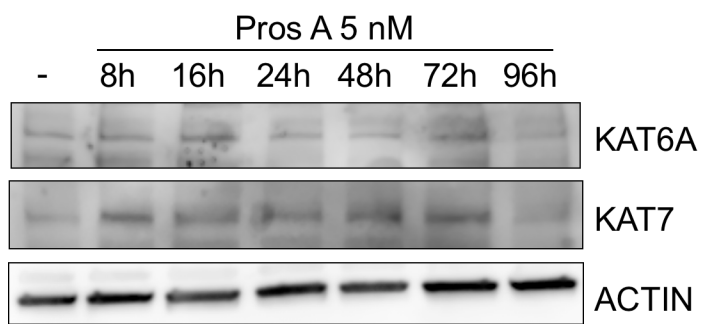
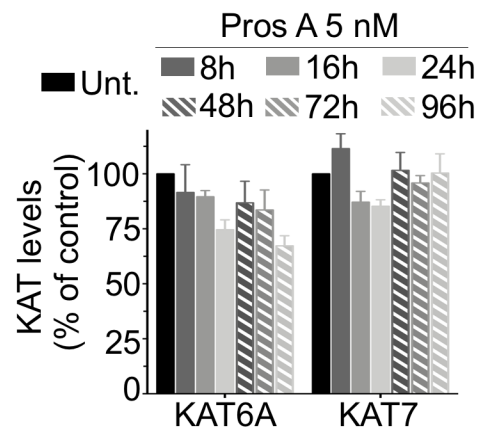
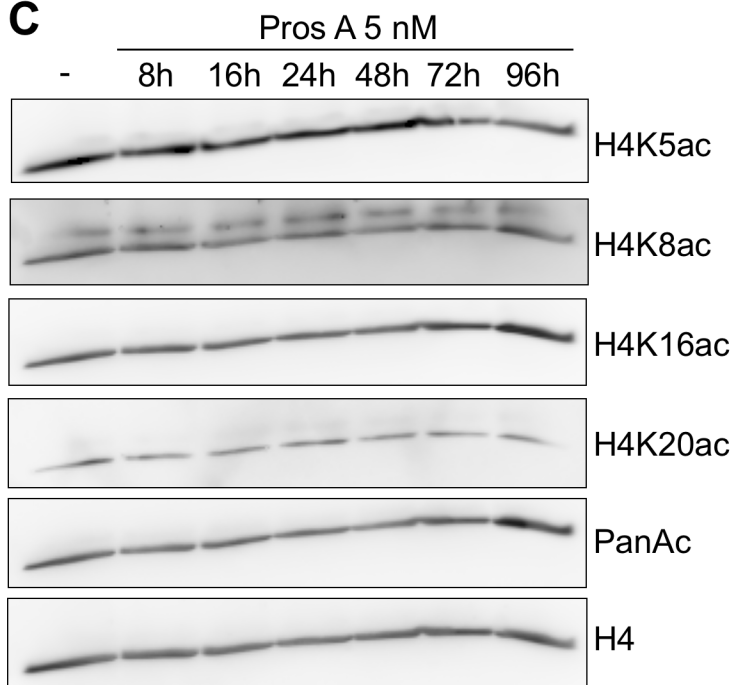
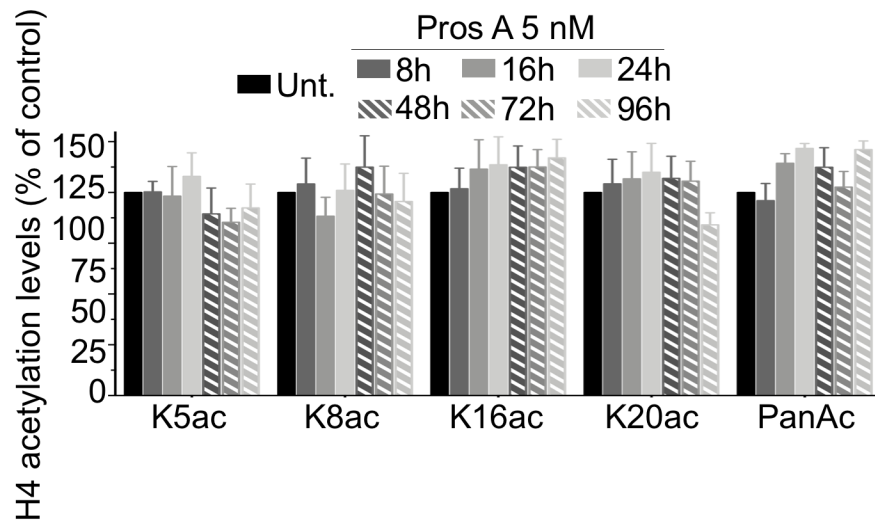
Figure S1**A****B****C****D**

Figure S2

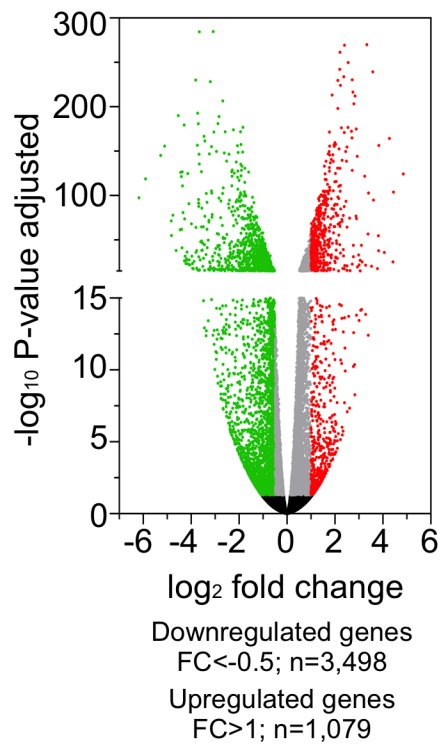
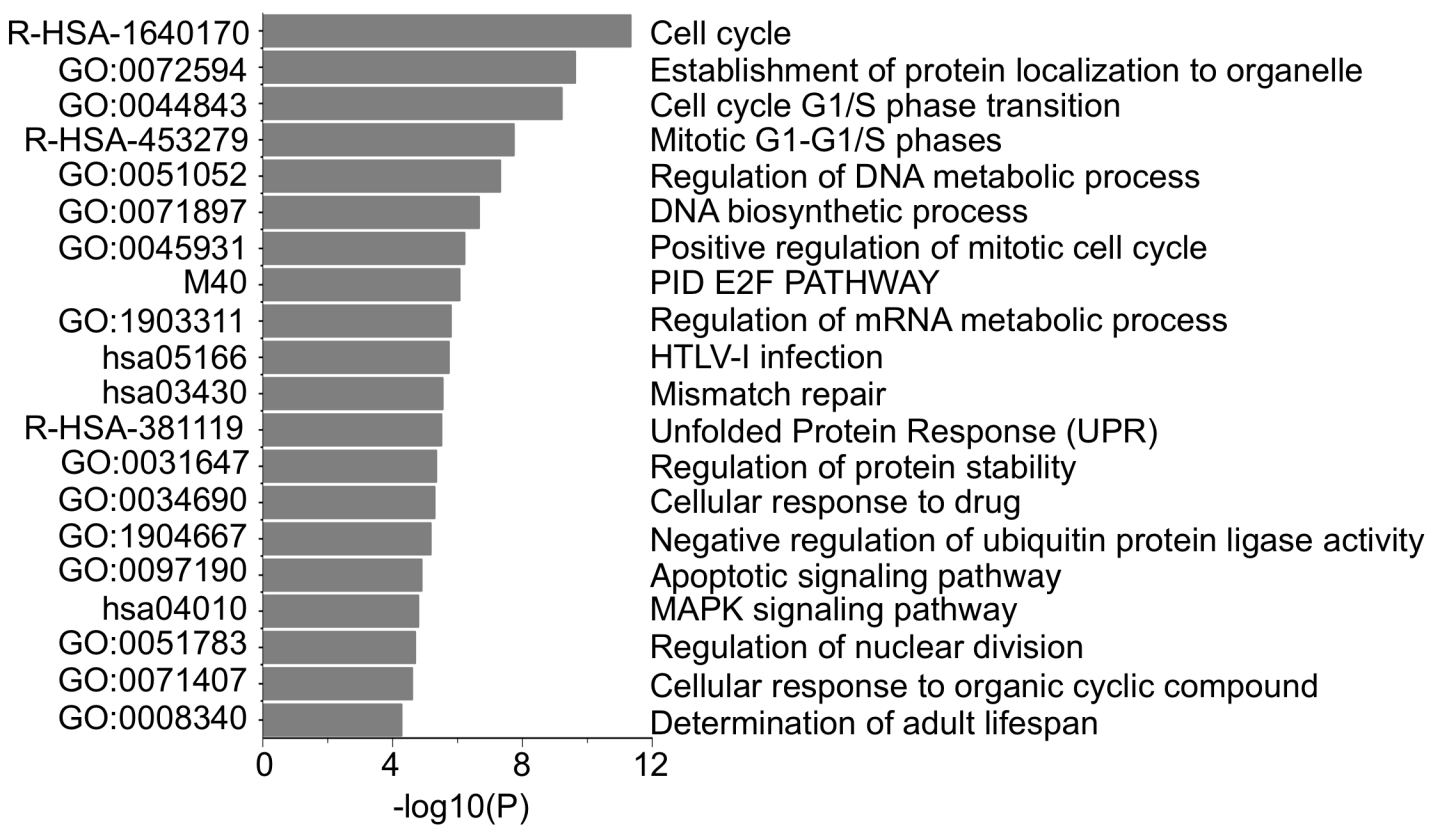


Figure S3

A

GO of downregulated MYC pathway genes after Pros A treatment (5 nM; 48h)



B

GO of upregulated MYC pathway genes after Pros A treatment (5 nM; 48h)

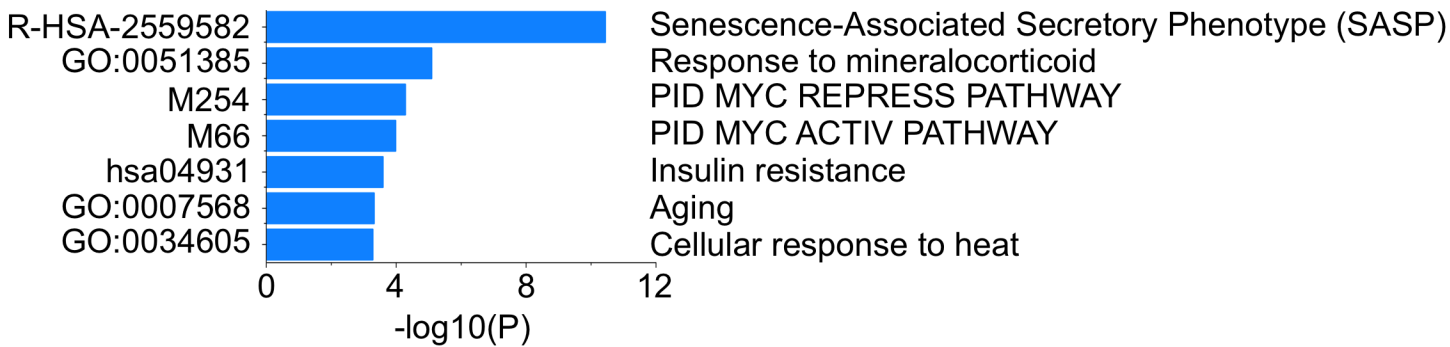
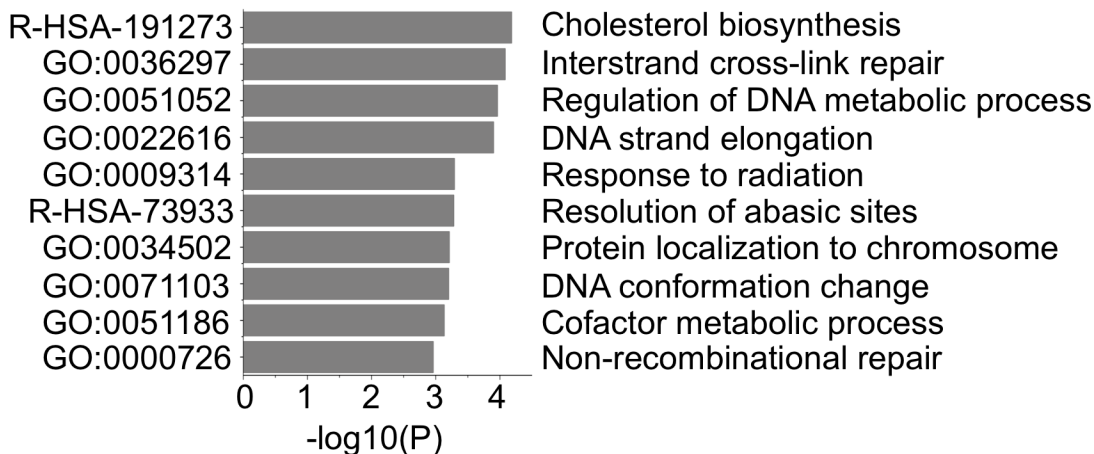


Figure S4

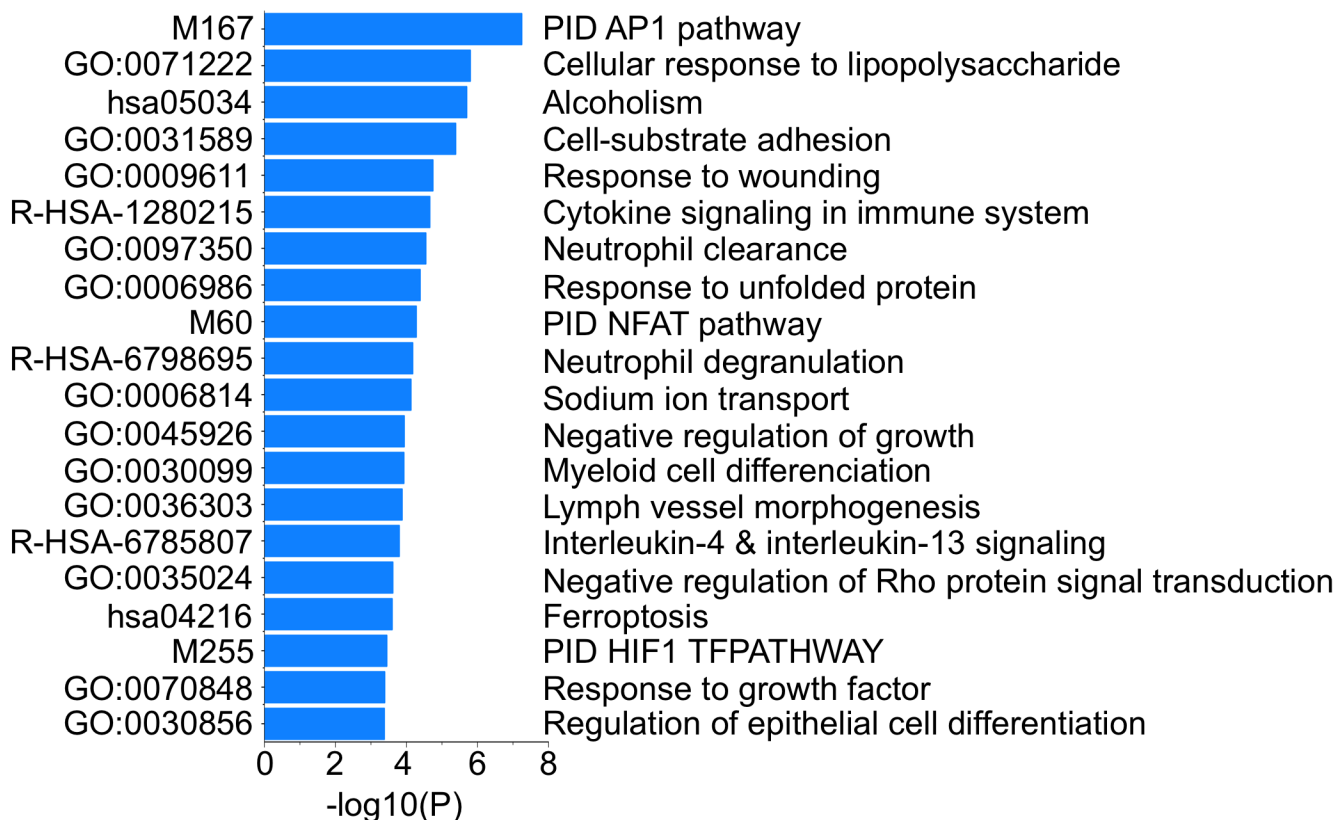
A

GO of Pros A-induced downregulated genes whose promoters are marked by H3K27ac in untreated cells



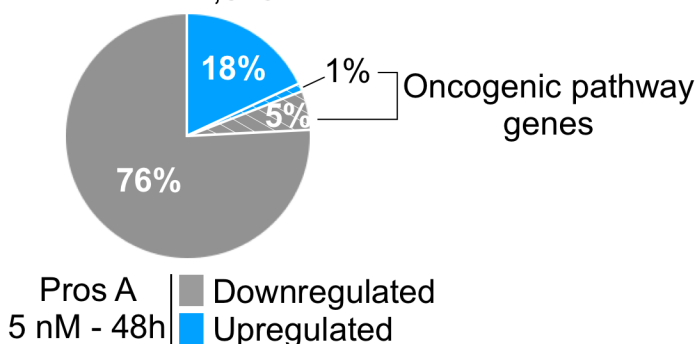
B

GO of Pros A-induced upregulated genes whose promoters are marked by H3K27ac in untreated cells



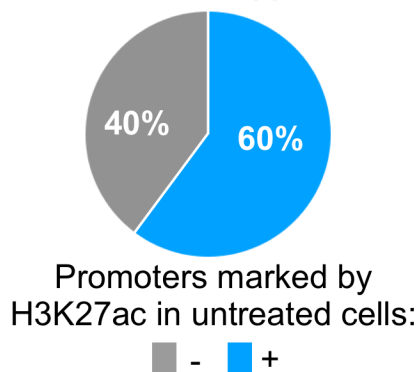
C

Promoters marked by H3K27ac in untreated cells
n = 1,519



D

MYC genes in RD cells
n = 133



E

KRAS genes in RD cells
n = 52

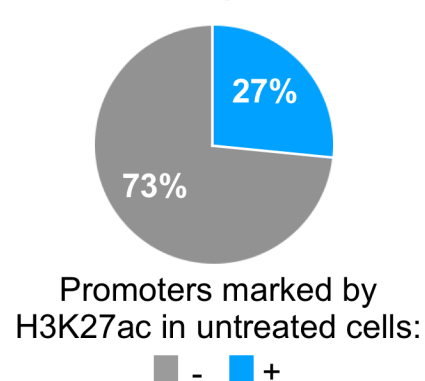
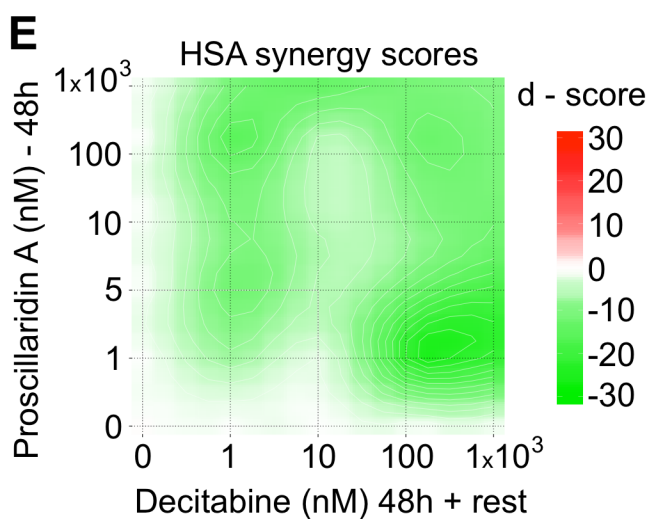
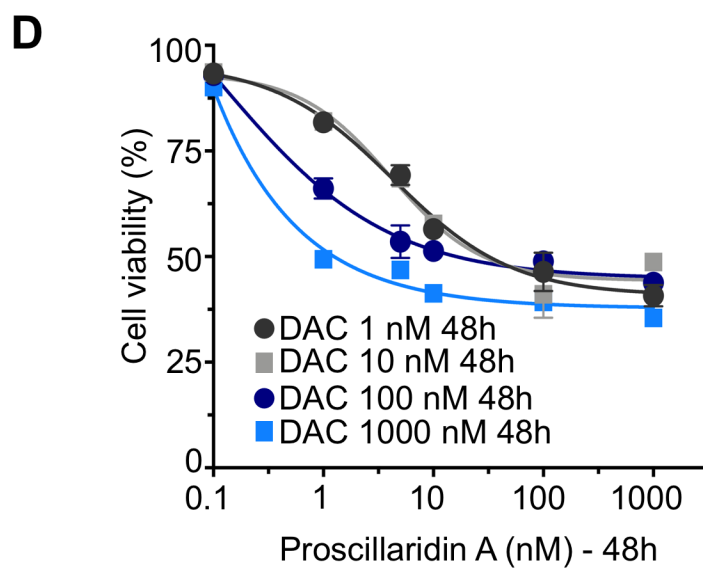
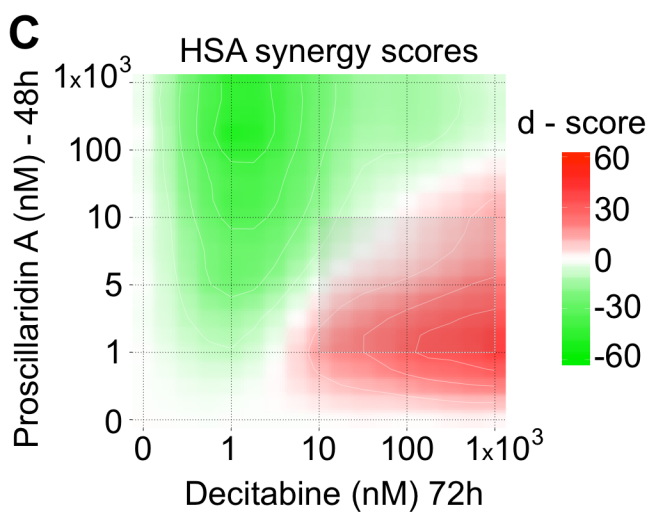
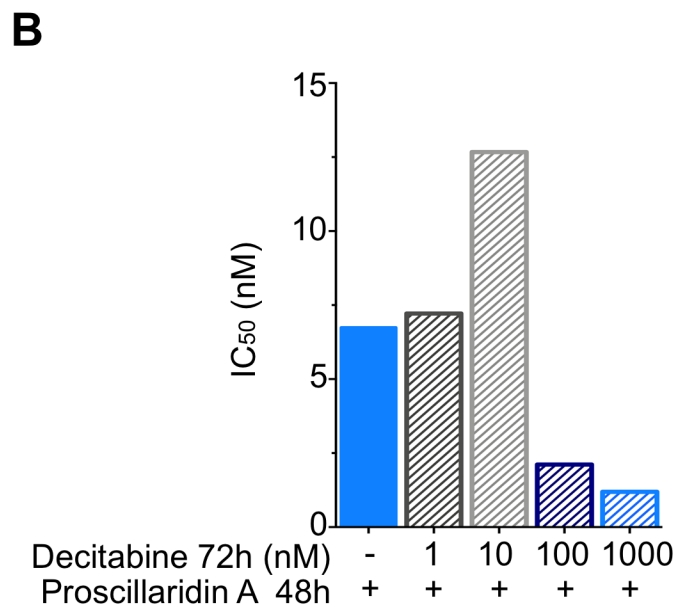
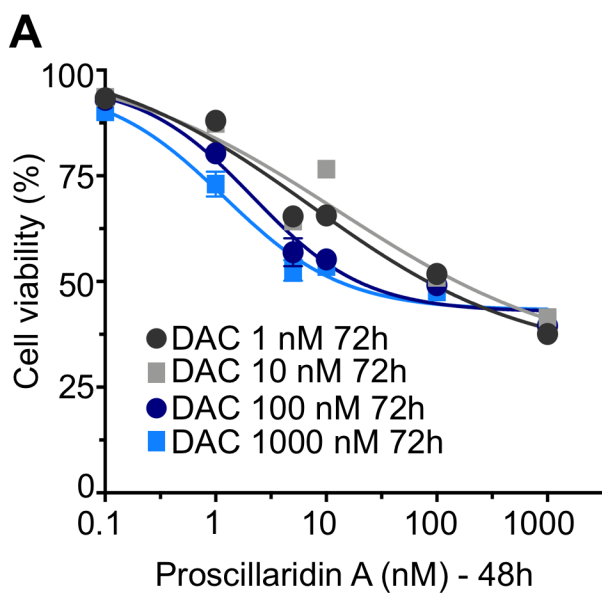


Figure S5

Supplemental Table 1

MYC pathway list (n=133)

Name	Log ₂ FC	Name	Log ₂ FC	Name	Log ₂ FC
1. LSP1	-2.77	52. GINS1	-0.69	103. TYMS	-0.50
2. TERT	-1.91	53. MSH2	-0.68	104. PSMC6	-0.50
3. DGCR6	-1.40	54. CDC25C	-0.65	105. IMPA2	-0.50
4. ABI3	-1.32	55. EIF2S2	-0.64	106. RPS6KA2	1.06
5. ARRB2	-1.26	56. NR6A1	-0.64	107. CTGF	1.07
6. CCND2	-1.19	57. EEF1B2	-0.63	108. AMD1	1.08
7. PRR3	-1.15	58. CBX5	-0.62	109. MGEA5	1.09
8. DNAI1	-1.15	59. JMJD7-PLA2GA4B	-0.61	110. MT2A	1.09
9. GPSM3	-1.14	60. PMS1	-0.60	111. IER2	1.10
10. ADRA1B	-1.10	61. HDAC6	-0.60	112. IER5	1.11
11. A2M	-1.08	62. RPL26	-0.59	113. MGST1	1.11
12. CACNB1	-1.04	63. U2AF1	-0.59	114. HSPA2	1.11
13. CCNA2	-1.02	64. SNRPA	-0.59	115. HIST1H2BN	1.21
14. GINS2	-1.02	65. RAD54L	-0.59	116. PINK1	1.24
15. MRPL23	-1.01	66. RANBP1	-0.58	117. CDKN1A	1.25
16. COL3A1	-0.99	67. FBXO5	-0.58	118. CD20orf24	1.25
17. MAP2K5	-0.99	68. AKR7A2	-0.58	119. HISTH2BJ	1.32
18. HSF2BP	-0.97	69. JARID2	-0.58	120. PTPRF	1.34
19. KIF15	-0.94	70. EXOSC5	-0.58	121. MYCT1	1.36
20. CDC45	-0.93	71. GLO1	-0.57	122. NR1D1	1.44
21. AP4M1	-0.92	72. KIF11	-0.57	123. HIST1H2AI	1.44
22. PEX26	-0.89	73. PHB2	-0.57	124. FTH1	1.48
23. MYCBP	-0.88	74. CACYBP	-0.57	125. EMP1	1.56
24. DBP	-0.88	75. MAPK7	-0.57	126. CTSC	1.63
25. TMEM97	-0.87	76. PLA2G6	-0.57	127. NFAT5	1.63
26. DAXX	-0.87	77. SRSF1	-0.56	128. ID2	1.63
27. GDAP1	-0.87	78. MAD2L1	-0.56	129. HIST1H2AC	1.70
28. HOOK2	-0.85	79. EIF3C	-0.56	130. HIST1H2BC	1.79
29. DEF6	-0.84	80. ABCB6	-0.56	131. MAFF	2.22
30. DBI	-0.83	81. RPS10	-0.55	132. FOSL1	2.27
31. RECQL5	-0.83	82. RPL5	-0.54	133. HIST2H2BE	2.45
32. POLD4	-0.83	83. PSMD1	-0.54		
33. PYCR1	-0.82	84. RRM1	-0.54		
34. DUT	-0.82	85. DEK	-0.54		
35. HSD17B7	-0.81	86. RFC2	-0.54		
36. FRY	-0.81	87. PSMG1	-0.54		
37. USP1	-0.79	88. ACOX3	-0.54		
38. ATF4	-0.79	89. FANCF	-0.54		
39. HNRNPA1	-0.78	90. CCT3	-0.52		
40. IPO4	-0.78	91. TRA2B	-0.52		
41. RPS6	-0.76	92. MCM6	-0.52		
42. PTOV1	-0.76	93. HNRNPL	-0.52		
43. DLEU2	-0.76	94. CLNS1A	-0.52		
44. KIF20A	-0.75	95. APPL1	-0.52		
45. E2F1	-0.75	96. HSP90B1	-0.51		
46. EXO1	-0.74	97. CALR	-0.51		
47. DCAF11	-0.74	98. NDUFV1	-0.51		
48. SRSF2	-0.73	99. ITGB3BP	-0.51		
49. TP53	-0.73	100. SORD	-0.51		
50. RPL14	-0.71	101. RPL9	-0.51		
51. CISH	-0.70	102. PTGES3	-0.50		

IV/ Discussion

Nos travaux ont démontré pour la première fois que l'activité anticancéreuse de la proscillaridine A corrèle positivement avec le niveau d'expression de l'oncogène MYC. De plus, nos études révèlent que la proscillaridine A est un dérégulateur puissant de l'expression et de l'activité de MYC dans les cancers surexprimant cet oncogène. Nous avons mesuré une inhibition de l'expression transcriptionnelle et protéique de MYC en réponse à la proscillaridine A, ainsi qu'une baisse des niveaux post-transcriptionnels de l'acétylation de cet oncogène. Les lysines acétyltransférases (KATs) forment une classe d'enzymes épigénétiques responsable du contrôle de la transcription des gènes et des niveaux d'acétylation post-traductionnels de certaines protéines non-histones dont MYC. En réponse à un traitement de proscillaridine A, nous mesurons une inhibition de l'expression de ces enzymes et nous suggérons qu'elles sont impliquées dans l'inhibition de MYC. Dernièrement, nous avons démontré le potentiel synergique de la proscillaridine A avec la décitabine, un médicament épigénétique. Globalement, ces études ont permis de définir le mécanisme épigénétique de la proscillaridine A dans les leucémies et les RMS-e exprimant un haut niveau de MYC et, de manière plus globale, de préciser ses mécanismes anticancéreux.

1. Proscillaridine A: un médicament anti-MYC dans les cancers surexprimant MYC

Le potentiel anticancéreux des glycosides cardiotoniques, dont la proscillaridine A, a été mis en évidence il y a plus de 50 ans (274). Depuis cette découverte, de nombreux groupes de recherche ont investigué les mécanismes sous-jacents à cette activité anticancéreuse. Plusieurs mécanismes ont été décrits dans différents sous-types cancéreux tels que les carcinomes, les glioblastomes et les cancers du sein, par exemple, et des essais cliniques ont été initiés (Tableau 4) (283, 289, 300). Toutefois, malgré ces nombreuses recherches, les glycosides cardiotoniques ne sont toujours pas approuvés comme traitements anticancéreux.

Une des découvertes majeures de ce travail doctoral est la relation de cause à effet entre les niveaux d'expression de l'oncogène MYC dans les cancers et l'activité anticancéreuse de la proscillaridine A. Effectivement, plus les niveaux d'expression de MYC sont élevés dans les cellules cancéreuses, plus la proscillaridine A exerce une forte activité anticancéreuse (319). Cependant, malgré le fait que l'analyse de régression linéaire suggère une corrélation négative entre les valeurs d'IC50 de la proscillaridine A et les niveaux relatifs d'expression de MYC, il est à noter qu'une analyse de corrélation avec le coefficient de Pearson nous donne une valeur de r égale à $-0,42$ avec une valeur de p non significative (319). Nous suggérons que le nombre de lignées cellulaires étudiées est insuffisant pour effectuer une

étude de corrélation de Pearson. Des études sur l'activité anticancéreuse de la proscillaridine A en fonction des niveaux d'expression de MYC devraient être effectuées sur davantage de lignées cellulaires cancéreuses pour conclure une réelle corrélation.

De plus, il serait intéressant de valider que l'inhibition de la prolifération cellulaire obtenue dans les cancers surexprimants MYC en réponse à un traitement de proscillaridine A est due à l'inhibition de MYC. Pour cela, nous pourrions réaliser une inhibition conditionnelle de MYC en utilisant des ARNs interférants par exemple, dans les cellules surexprimant MYC. Nous traiterions ces cellules à la proscillaridine A avec une concentration de 5 nM pendant 48h, puis le pourcentage de cellules viables sera mesuré. Si l'inhibition de la viabilité cellulaire n'est pas significative dans ce modèle, cela confirmerait que l'inhibition de la prolifération induite par la proscillaridine A dépend majoritairement de l'inhibition de MYC. Également, si nous supposons que cette expérience confirme le fait que l'inhibition de la prolifération cellulaire induite par la proscillaridine A est majoritairement due à l'inhibition de l'oncogène MYC, la question suivante se pose: quel mécanisme activé par la proscillaridine A est responsable de l'inhibition de MYC? Nous savons que MYC n'est pas une cible directe de la proscillaridine A car il est défini comme « *undruggable* », donc quelles sont les cibles possibles? Plusieurs hypothèses sur les voies de signalisations activées par l'inhibition des pompes Na⁺/K⁺ induite par la proscillaridine A et qui seraient responsables de l'inhibition de la prolifération observée dans les cancers surexprimants MYC sont émises dans la suite de cette discussion. Toutefois, une expérience d'étiquetage de la proscillaridine A et d'affinité nous permettrait d'évaluer si la proscillaridine A détient d'autre cible que les pompes Na⁺/K⁺ dans les cancers surexprimant MYC. Également, nous pourrions mesurer la viabilité des cellules surexprimants MYC ayant subi une inhibition conditionnelle des pompes Na⁺/K⁺, par des ARNs interférants par exemple, en réponse à un traitement à la proscillaridine A avec une concentration de 5 nM pendant 48h. Cela nous permettrait d'identifier si l'action anti-proliférative de la proscillaridine A est un effet secondaire de l'inhibition des pompes Na⁺/K⁺.

Également, nous avons investigué d'autres glycosides cardiotoniques en plus de la proscillaridine A afin d'étudier si ces derniers démontraient des activités anticancéreuses plus élevées dans les cancers exprimant un haut niveau de MYC (Annexe 2). Aucune corrélation significative entre l'activité anticancéreuse de la digitoxine et les niveaux d'expression protéique de MYC n'est mesurée dans un panel de 12 lignées cellulaires ayant reçu un traitement de 24h de digitoxine (Annexe 2). Néanmoins, comme la proscillaridine A, la digitoxine tend à inhiber la viabilité cellulaire avec des plus faibles concentrations dans les lignées cancéreuses exprimant un haut niveau de MYC (Annexe 2). L'augmentation du nombre de lignées cellulaires permettrait de préciser cette analyse. Il serait également intéressant de tester si d'autres glycosides cardiotoniques que la proscillaridine A et la

digitoxine exercent une plus forte activité anticancéreuse en fonction des niveaux d'expression de MYC.

Pour la première fois, nous démontrons une rationnelle quant au choix de l'utilisation de la proscillaridine A comme traitement anticancéreux. En étudiant rétrospectivement les précédentes études utilisant les glycosides cardiotoniques comme agents anticancéreux, nous pouvons remarquer qu'aucune rationnelle n'a été énoncée pour préciser l'utilisation des glycosides cardiotoniques dans le traitement du cancer. De plus, nous pouvons observer que certaines études utilisent des lignées cancéreuses exprimant un faible niveau de MYC et, par conséquent, les doses nécessaires pour exercer un effet anticancéreux se situent à des concentrations supra-physiologiques (292, 294, 296). Dans ce travail doctoral, nous proposons donc de repositionner la proscillaridine A pour le traitement des cancers exprimant une forte expression de MYC, plus particulièrement des cancers hématopoïétiques, fortement dérégulés pour l'expression de cet oncogène (61). Afin d'envisager le repositionnement de la proscillaridine A comme traitement anticancéreux dans les cancers surexprimants MYC et de pouvoir démarrer les études cliniques, l'activité anticancéreuse de la proscillaridine A et l'inhibition de MYC doivent être confirmées *in vivo*. Par exemple, des études de l'activité anticancéreuse de la proscillaridine A et de l'inhibition de MYC réalisées chez des souris immunodéficientes inoculées avec des lignées cellulaires dérivées de LLAs surexprimants MYC permettraient de valider les activités démontrées de la proscillaridine A dans ce travail doctoral. Les souris devraient recevoir soit un traitement à la proscillaridine A avec une concentration de 5 nM pendant 48h, soit un traitement avec une solution ne contenant pas de proscillaridine A. L'inhibition de la prolifération des cellules leucémiques ainsi que l'inhibition de l'expression de MYC en réponse aux deux traitements devraient être mesurées afin de valider l'activité anticancéreuse de la proscillaridine A contre les lignées leucémiques surexprimants MYC ainsi que l'activité inhibitrice de la proscillaridine A contre MYC. Lorsque l'activité anticancéreuse de la proscillaridine A et l'inhibition de MYC sont confirmées *in vivo*, des essais cliniques pourront être envisagés. L'ensemble des évidences obtenues lors des études de preuves de concepts et des études cliniques serviront pour l'éventuelle approbation par Santé Canada pour repositionner la proscillaridine A comme traitement anticancéreux et épigénétique dans les cancers surexprimants MYC.

De plus, parmi les cancers solides exprimants un haut niveau d'expression de MYC, mais plus faible par rapport aux niveaux exprimés dans les cancers hématopoïétiques, des traitements plus longs permettent d'atteindre de fortes activités anticancéreuses avec des concentrations physiologiques de proscillaridine A (article numéro 3 et Annexe 6) (319). Des études complémentaires devraient être effectuées pour déterminer les différentes méthodes de traitements avec la proscillaridine A en fonction des niveaux d'expression de MYC présents

dans les différents sous-types de cancers. Par exemple, des traitements d'une durée supérieure à 24h devraient être envisagés dans les cancers solides. Également, nous avons démontré qu'en réponse à un traitement de 48h de proscillaridine A suivi d'une période de repos (sans traitement) de 48h, les cellules leucémiques surexprimant MYC se différencient, suggérant un effet à long terme de la proscillaridine A (319). Nous pourrions donc envisager d'inclure des périodes de repos après les traitements de proscillaridine A dans les cancers solides puis de comparer les IC50 de la proscillaridine A dans les différents cancers solides exprimants des niveaux différentiels de MYC.

Une deuxième découverte importante dans l'activité anticancéreuse de la proscillaridine A est l'inhibition de l'oncogène MYC spécifiquement dans les cancers exprimant un haut niveau de MYC (319) (article numéro 3). L'oncogène MYC exerce un rôle clef dans les processus pro-tumoraux de nombreux cancers, et la découverte de stratégies thérapeutiques inhibitrices de MYC dans les cancers fait l'objet d'intenses recherches (41). L'inhibition indirecte de MYC via différentes stratégies a été proposée telle que l'inhibition de voies de signalisation en amont (inhibition de mTOR, PI3K/AKT) ou bien encore l'inhibition du recrutement de MYC sur les promoteurs de ses gènes cibles (inhibition des bromodomaines) (41). Cependant, des résistances associées à une déprogrammation du kinome des cellules cancéreuses apparaissent en réponse à ces différents traitements, suggérant la nécessité de trouver des solutions thérapeutiques ciblant plusieurs voies de signalisation impliquées dans l'activité de MYC (78, 79). La proscillaridine A apparaît dans nos études comme un inhibiteur de MYC au niveau protéique, transcriptomique (uniquement dans les leucémies) et de la transcription des gènes cibles de MYC (article numéro 3) (319). Également, une récente étude réalisée par le groupe du Dr. Pelletier consistant à développer un modèle de criblage pour identifier des inhibiteurs de MYC dans les lignées leucémiques, a décrit le potentiel inhibiteur des glycosides cardiotoniques, dont la proscillaridine A (320). Enfin, l'inhibition de MYC par la proscillaridine A dans les cancers exprimants une forte expression de MYC démontre une corrélation positive entre l'activité anticancéreuse de la proscillaridine A et les niveaux d'expression de cet oncogène. Des études étendues sur une plus longue période de temps sont nécessaires afin d'identifier si les cellules cancéreuses traitées avec la proscillaridine A développent des résistances. Plusieurs données pourraient être mesurées afin d'établir si la proscillaridine A induit des résistances: la viabilité cellulaire, le potentiel clonogénique, le niveau d'expression de MYC et son activité transcriptionnelle (via la mesure de l'expression de ces gènes cibles par réaction en chaîne par polymérase quantitative et / ou de sa présence sur la chromatine par immunoprécipitation de la chromatine). Ces données seraient relevées en réponse à un traitement de plusieurs semaines de proscillaridine A (à condition que le traitement n'induit pas de mort cellulaire trop élevée) ainsi qu'après plusieurs jours suivant un

traitement de 48h de proscillaridine A. Dans la lignées de rhabdomyosarcome de l'article 3 et la lignée d'ostéosarcome de l'annexe 6 (6D et 6E), nous avons mesuré le potentiel prolifératoire des clones restant après un traitement de 48h de proscillaridine A et d'une période d'incubation de 12 jours. Les clones restants de lignée cellulaire de rhabdomyosarcome ne sont plus capables de proliférer suggérant qu'aucune résistance concernant les mécanismes de prolifération n'a été développée par cette lignée en réponse à un traitement de 48h de proscillaridine A. Les mécanismes sous-jacents à cet arrêt prolifératif n'ont pas été investigués. Des expériences préliminaires pour mesurer la sénescence dans les cellules de rhabdomyosarcome nous indiquent qu'une semaine après avoir reçu un traitement de proscillaridine A à 5 nM pendant 48h, ces cellules ne sont pas sénescents. Nous supposons qu'un arrêt du cycle cellulaire se produit ainsi qu'une baisse des voies cellulaires associées à la prolifération (dont MYC). Toutefois, nous ne l'avons pas démontré expérimentalement. À l'inverse, les clones restants de la lignée cellulaire d'ostéosarcome détiennent toujours la capacité à proliférer démontrant que certaines cellules sont résistantes à traitement de 48h de proscillaridine A.

2. Mécanisme d'action de l'inhibition de MYC induite par la proscillaridine A: une inhibition simultanée des KATs

Dans nos travaux, nous avons démontré que la proscillaridine A induit une inhibition de l'expression protéique de plusieurs classes d'enzymes épigénétiques appartenant à la famille des lysines acétyltransférases, les KATs (Article numéro 3) (319). Ces enzymes sont responsables d'ajouter l'acétyl-coA sur les histones et sur certaines protéines autres que les histones. Deux de leurs fonctions sont premièrement, de neutraliser la charge positive des lysines ce qui conduit une décondensation de la chromatine généralement associée à une augmentation de la transcription des gènes, et deuxièmement, d'entrer en compétition avec d'autres MPTs dont l'ubiquitination ce qui augmentent la stabilité des protéines non-histones acétylées (115, 151, 321). Cette inhibition est responsable de plusieurs phénomènes. Le premier, mesuré dans les LLA et dans les RMS-e, est la baisse globale d'acétylation sur différents résidus lysine de l'histone 3. Cette baisse est associée avec un changement transcriptionnel de milliers de gènes, dont une baisse de l'expression de gènes associés à la prolifération et à des voies de signalisation oncogénique, et une augmentation de la transcription de gènes associés aux voies de différenciation cellulaire. De manière intéressante, l'acétylation sur différents résidus lysine de l'histone 4 est inchangée en réponse à la proscillaridine A dans les LLAs et les RMS-e. KAT7 est caractérisée pour être l'enzyme majoritairement responsable de l'acétylation des résidus lysines de l'histone 4, et nous

pouvons mesurer que l'expression de cette protéine n'est pas affectée par le traitement. Nous n'avons pas de données suggérant que l'activité enzymatique de KAT7 n'est pas affectée par le traitement de proscillaridine A. Cependant, les niveaux stables de l'expression de KAT7 associée à la mesure des lysines cibles acétylées de KAT7 suggèrent que KAT7 n'est pas affectée par le traitement de proscillaridine A. Également, les KATs ne sont pas les seules enzymes régulant les niveaux d'acétylation des histones et d'autres enzymes épigénétiques que KAT7 pourraient compenser la perte d'expression des KATs, résultant en un niveau stable d'acétylation de l'histone 4. Par exemple, une baisse des niveaux d'expression des sirtuines et des KDACs pourraient compenser la perte des KATs (156, 157). Des études protéomiques d'immunobuvardage de type Western ou de spectrométrie de masse pourraient répondre à cette question.

La deuxième, seulement mesurée dans les LLAs, est la baisse d'acétylation mesurée sur 28 protéines autres que les histones (319). De manière intéressante, la proscillaridine A induit une baisse d'acétylation sur des protéines impliquées dans la régulation de l'acétylation des histones ainsi que des protéines appartenant aux voies de signalisation régulées par MYC, comprenant MYC elle-même. La baisse d'acétylation de MYC associée avec la baisse du transcrite de MYC expliquent en partie la baisse de l'expression protéique de cet oncogène. Effectivement, nous mesurons que la baisse d'expression protéique des KATs ainsi que la baisse transcriptionnelle de MYC est significative au plus tôt après 16h de traitement à la proscillaridine A. Cependant, la baisse d'expression protéique de MYC est significative après seulement 8h de traitement. Deux hypothèses s'énoncent: la première est que la proscillaridine A interfère en premier lieu avec l'activité des KATs puis en second lieu avec leur expression; la deuxième est que d'autres mécanismes sont impliqués dans la dégradation de MYC. Nous avons premièrement pensé à la machinerie de dégradation du protéasome et nous avons testé cette hypothèse en utilisant un traitement au MG132 (Annexe 3) (322). Toutefois, malgré plusieurs tentatives avec différentes concentrations et temps de traitement au MG132, l'expression de MYC n'est pas restaurée en réponse à un traitement au MG132 suivi d'un traitement à la proscillaridine A (Annexe 3). On remarque que le traitement de MG132 seul induit une inhibition protéique de MYC dans notre modèle ce qui compromet l'analyse de l'inhibition de l'activité du protéasome sur la dégradation de MYC. Des expériences avec des inhibiteurs de l'UPS différents du MG132, tels que le bortézomib ou l'époxomycine par exemple, permettraient de mieux caractériser le rôle de la dégradation protéasomique induite par un traitement à la proscillaridine A dans les LLAs (323, 324). Toutefois, il est à noter que l'inhibition de MYC en réponse à un traitement au bortézomib a été mesurée par un autre groupe dans des lignées de lymphomes (325). Il est donc envisageable que le bortézomib induise une dégradation de MYC dans les LLAs. De plus, la dégradation de MYC est régulée

par plusieurs mécanismes (326). L'analyse par immunobuvardage de type Western des niveaux d'expressions des différentes protéines impliquées dans la dégradation de MYC, telles que certaines ubiquitines ligases par exemple, permettrait de définir les mécanismes de dégradations protéiques activés en réponse à un traitement de proscillaridine A (326). Également, des analyses de spectrométrie de masse nous permettraient d'étudier l'ensemble des modifications post-traductionnelles présentes sur MYC traitement à la proscillaridine A. Par exemple, la phosphorylation et l'ubiquitination de MYC sur certains résidus sont associées à sa dégradation par le protéasome (326).

Également, la proscillaridine A induit l'augmentation de l'acétylation de 15 protéines non-histones (Annexe 4). Les mécanismes sous-jacents à cette augmentation n'ont pas été investigués lors de cette étude. Toutefois, il est intéressant de noter que l'acétylome des cellules leucémiques est globalement modifié en réponse à un traitement de proscillaridine A avec une baisse d'acétylation des protéines impliquées dans la régulation de l'acétylation des histones et une augmentation de l'acétylation de protéines impliquées dans la voie de signalisation JAK-STAT et la synthèse d'ATP (Annexe 4A et 4B). De plus, la proscillaridine A induit une augmentation de l'acétylation de la tubuline dans différentes lignées cellulaires cancéreuses exprimant un haut niveau d'expression protéique de MYC (Annexe 4C). Cela démontre que malgré la perte conséquente d'expression des KATs, des mécanismes sous-jacents activent la stabilisation de protéines impliquées dans l'induction de l'apoptose. par exemple (Annexe 4A).

L'effet singulier de la proscillaridine A dans les cancers exprimant un haut niveau de MYC est d'induire une inhibition générale de l'expression des KATs et nous supposons de leurs activités, tel que démontré par la baisse des niveaux d'acétylation sur l'histone 3 et sur certaines protéines non-histones. Les KATs sont caractérisées pour leurs activités redondantes et l'inhibition d'une KAT ou d'une famille de KAT résulte généralement en une compensation par une autre KAT ou famille de KAT. Dans ces travaux, nous suggérons que cette inhibition générale de l'expression des KATs est majoritairement responsable de la déstabilisation protéique puis transcriptionnelle de MYC. Plus globalement, cette inhibition générale de l'expression des KATs est responsable de la reprogrammation transcriptionnelle des cellules cancéreuses exprimant un haut niveau de MYC induite par la proscillaridine A. De nombreuses recherches étudient le potentiel anticancéreux des inhibiteurs spécifiques d'une KAT ou d'une famille de KAT (124). Toutefois, nos travaux démontrent que dans des contextes spécifiques pathologiques, l'inhibition d'un ensemble de KAT se révèle être une stratégie efficace. Il est important de rappeler que la proscillaridine A n'induit pas d'inhibition de l'expression des KATs dans des cellules de fibroblastes humains immortalisées, suggérant que dans des contextes non-pathologiques l'expression des KATs n'est pas altérée par un traitement de proscillaridine

A. Cependant, nous pouvons également émettre l'hypothèse que dans l'inhibition générale de l'expression des KATs induite par la proscillaridine A, seulement une ou plusieurs KATs seraient responsables de l'effet global et que cette régulation spécifique serait noyée par l'inhibition protéique globale des KATs. Néanmoins, nous avons mesuré que plus les cellules cancéreuses expriment un haut niveau de MYC, plus le nombre de KATs inhibées augmente, suggérant le fait que c'est bien l'inhibition globale des KATs qui est responsable de l'activité anticancéreuse de la proscillaridine A (319). Cette théorie pourrait être plus profondément étudiée expérimentalement de plusieurs façons. Par exemple, l'une d'entre-elles serait de traiter pharmacologiquement les LLAs avec différents inhibiteurs de KATs et de mesurer la viabilité cellulaire en réponse à ces traitements. Les différents inhibiteurs de KATs qui pourraient être utilisés sont le A-485, inhibiteur de KAT3A et KAT3B, le NU9056, inhibiteur de KAT5, et le H3-CoA-20, inhibiteur de KAT2B (124, 234, 327). Une limite majeure de cette expérience est le fait que les inhibiteurs des KATs ne sont pas spécifiques et présentent des effets *off-target*. Pour limiter ce biais, des ARNs interférents pourraient être transfectés dans les cellules pour inhiber les KATs.

Également, seulement l'expression protéique des KATs, à l'exception de KAT2A dans les LLAs, est diminuée de manière significative par le traitement de proscillaridine A, suggérant que ce glycoside cardiotonique active un mécanisme responsable de la dégradation protéique de ces enzymes. Comme pour l'oncogène MYC, nous avons émis l'hypothèse que le mécanisme de dégradation régulé par le protéasome était impliqué dans ces dégradations. Toutefois, les niveaux d'expression protéique des KATs ne sont pas restaurés en réponse à un traitement d'MG132 suivi d'un traitement de proscillaridine A (Annexe 3). Nous avons donc conclu que la proscillaridine A n'induit pas la dégradation des KATs via la machinerie du protéasome.

3. Régulation calcique de l'oncogène MYC et des KATs dans les LLAs

Dans le but d'identifier quel(s) autre(s) mécanisme(s) induit(s) par la proscillaridine A régule(nt) les dégradations protéiques de MYC et des KATs, nous nous sommes intéressés au mécanisme premier de la proscillaridine A qui est d'inhiber les pompes Na⁺/K⁺ (264). Cette inhibition entraîne une augmentation calcique intracellulaire ce qui est responsable de l'effet ionotrope positif des glycosides cardiotoniques (264). Le calcium se lie à de nombreuses protéines, et in fine, régule de nombreuses voies de signalisation (328). De ce fait, une augmentation de la concentration intracellulaire calcique entraîne une multitude d'effets. Dans une étude précédente, le Dr. Raynal a démontré que les activités épigénétiques de la proscillaridine A dépendent de l'activité d'une kinase activée par le calcium, la calmoduline

kinase II, dans des cellules de cancers du côlon (311). Nous avons donc reproduit cette expérience dans les cellules leucémiques qui consiste à traiter les cellules avec un inhibiteur de cette enzyme (KN93). Nous n'avons pas observé de changement significatif de l'expression protéique de MYC et de certaines KATs en réponse à un traitement de KN93 combiné avec la proscillaridine A (données non montrées). La calmoduline kinase II est caractérisée pour activer des kinases responsables de la dégradation protéasomale (329). Les expériences avec le MG132 ainsi qu'avec le KN93 soutiennent l'hypothèse que la machinerie du protéasome n'est pas impliquée dans les dégradations protéiques induites par la proscillaridine A dans les cancers surexprimant MYC ([Annexe 3](#)). La deuxième voie principale de protéolyse après le protéasome implique les lysosomes qui sont des organelles constitués de plusieurs enzymes digestives et protéases (330). La voie principale par laquelle les lysosomes absorbent les protéines est appelée autophagie (330). Des précédents travaux ont révélé que la protéine d'ancrage AMBRA1 impliquée dans le processus d'autophagie, régule la déphosphorylation et la dégradation de MYC en augmentant son interaction avec la phosphatase PP2A lorsque mTOR est inhibée (331). Également, un récent article décrit que la voie de signalisation de l'autophagie et de la protéolyse lysosomale est inhibée dans des cellules souches cancéreuses surexprimants MYC (332). L'analyse des expressions protéiques par immunobuvardage de type Western de AMBRA1, PP2A et mTOR ainsi que l'étude de la phosphorylation de la serine 62 de MYC permettraient d'évaluer si cette voie de signalisation est activée en réponse à un traitement de proscillaridine A. Également, des traitements avec des inhibiteurs pharmacologiques de l'autophagie précédés par un traitement de proscillaridine A, puis la mesure des niveaux protéiques de MYC permettraient d'estimer si la protéolyse lysosomale est impliquée ou non dans la dégradation de MYC activée par proscillaridine A.

Néanmoins, nous nous sommes tout de même intéressés à comprendre si le calcium intracellulaire pouvait influencer les niveaux d'expressions de MYC et des KATs dans les cellules de LLAs surexprimant MYC ([Annexe 5](#)). En utilisant un ionophore pour induire une augmentation de la concentration calcique intracellulaire dans les cellules MOLT-4, nous remarquons tout d'abord que la viabilité de ces cellules diminue de 20% ([Annexe 5A](#)). De plus, en étudiant les niveaux d'expression protéique de MYC et des KATs, on mesure que 16h après l'induction d'une augmentation de la concentration calcique intracellulaire, les niveaux d'expression de MYC, KAT3B et KAT5 sont diminués ([Annexe 5B](#)). Une augmentation de la concentration calcique intracellulaire active donc des mécanismes de dégradation protéiques dans des cellules de LLAs. En vu de ses résultats et du fait que la proscillaridine A est caractérisée pour induire une augmentation de la concentration calcique via son mécanisme d'inhibition de la pompe Na^+/K^+ et que nos travaux démontrent que ce composé détient des propriétés anti-prolifératives, dont l'inhibition de MYC dans les cancers surexprimants MYC,

nous émettons l'hypothèse suivante. La proscillaridine A activerait des mécanismes de dégradations protéiques via une augmentation du calcium intracellulaire, dont de l'oncogène MYC et cela conduirait à une inhibition des programmes de prolifération cellulaire. La régulation de MYC par une protéine dont l'activité dépend de la présence de calcium a déjà été démontrée dans la littérature. Plus précisément, le groupe du Dr. Murphy a décrit la régulation de MYC par NUAK1, une protéine régulée par des kinases dépendantes du calcium, dans les cellules cancéreuses surexprimant MYC (333, 334). Dans ces cellules, NUAK1 maintient l'homéostasie énergétique en activant l'AMPK et en ralentissant la traduction des protéines lors d'un stress métabolique (333). En présence de calcium, NUAK1 est régulée par la protéine kinase Ca et la présence de ces deux protéines contribue à maintenir la viabilité des cellules cancéreuses surexprimant MYC (334). Il est à noter que ces études ont été réalisées en partie sur des cellules d'ostéosarcomes (U2OS), pour lesquelles la proscillaridine A n'induit pas d'inhibition globale de l'expression des KATs dans nos travaux, ni de baisse d'acétylation des histones, et induit une baisse d'expression de MYC plus tardive (72h) que dans les LLAs et les RMS-e (Annexe 6, résultats discutés dans le point 4). Également, une étude réalisée sur des cellules de cancer de côlon (SW48) et des cellules rénales embryonnaires (HEK293) démontrent une interaction directe entre MYC et la calmoduline, une protéine qui lie le calcium intracellulaire et agit comme second messenger dans la signalisation calcique (335). Ces études démontrent que la protéine MYC peut-être régulée par des protéines dont les activités dépendent du calcium. De plus, plusieurs mécanismes peuvent être impliqués dans les dégradations protéiques de MYC et des KATs induites par la proscillaridine A. L'étude des niveaux de phosphorylation des protéines en réponse à un traitement de proscillaridine A et de l'augmentation de la concentration intracellulaire en calcium pourrait nous éclairer sur l'identité des protéines activées en réponse à ces stimuli. Une fois les protéines / kinases identifiées, des *knock-down* de ces protéines permettraient de prouver leur implication dans la régulation de l'expression protéique de MYC et des KATs.

De plus, nous avons également étudié l'effet d'une réduction de la concentration calcique dans les cellules leucémiques MOLT-4 en utilisant un chélateur de calcium, le BAPTA-AM (Annexe 5C et 5D). Plus la diminution de la concentration intracellulaire en calcium est forte et longue, plus la viabilité cellulaire des cellules MOLT-4 est altérée (Annexe 5C). Au niveau protéique, une diminution de 24h de la concentration calcique induit une augmentation des niveaux d'expression de MYC, KAT3A, KAT3B, KAT2A et KAT6A (Annexe 5D). L'ensemble de ces expériences soutient l'hypothèse que le calcium intracellulaire module l'expression protéique de l'oncogène MYC et des KATs dans les cellules de LLAs surexprimant MYC. Il serait intéressant de mesurer le flux calcique induit par la proscillaridine A en utilisant le Fura-2

par exemple, un colorant fluorescent se liant au calcium intracellulaire, et de le comparer avec le flux induit par l'ionophore calcique.

4. Effet de la proscillaridine A dans les sarcomes pédiatriques

Dans notre panel de 14 lignées cancéreuses, les lignées cellulaires de sarcomes pédiatriques sont représentées par la lignée de RMS-e (RD) et la lignée d'ostéosarcome (U2OS). La lignée cellulaire de RMS-e représente un des cancers solides de notre panel qui exprime le plus l'oncogène MYC. Cependant, en comparaison avec la lignée de LLAs MOLT-4, les RD expriment 2 fois moins cet oncogène, expliquant le fait que l'IC₅₀ de la proscillaridine A à 24h est 10 fois plus grand dans les RD que dans les MOLT-4 (319). Toutefois, les études réalisées sur les RMS-e démontrent que lorsque la proscillaridine A est utilisée sur une plus longue période (48h), les IC₅₀ des RD et des LLAs sont du même ordre de grandeur (Article numéro 3) (319). L'efficacité anticancéreuse de la proscillaridine A est donc comparable dans les cancers surexprimant MYC, qu'ils soient solides ou d'origines hématopoïétiques. De plus, les études réalisées dans les RD révèlent que, comme dans les LLAs, la proscillaridine A induit une d'inhibition globale de l'expression des KATs, responsable de la baisse d'acétylation de plusieurs résidus lysines de l'histone 3 et d'un changement transcriptionnel de gènes impliqués dans la transformation oncogénique des RMS-e (Article numéro 3). Particulièrement, tout comme dans les LLAs, l'expression protéique de MYC est rapidement inhibée après un traitement de proscillaridine A dans les RMS-e (Article numéro 3). Toutefois, comparativement aux LLAs, le transcrit n'est pas affecté par un traitement de 48h, suggérant que la proscillaridine A affecte seulement l'expression protéique de MYC dans les RMS-e (Article numéro 3). De plus, tout comme dans les LLAs, des expériences supplémentaires seraient nécessaires pour identifier le mécanisme de dégradation de MYC et des KATs dans ces cellules. Cependant, l'ensemble des expériences réalisées sur la lignée cellulaire de RMS-e indique que la proscillaridine A exerce ses activités anticancéreuses et épigénétiques de manière similaire que dans les LLAs, suggérant que la proscillaridine A fonctionne via le même mécanisme d'action dans ces deux lignées cancéreuses surexprimant MYC.

Par la suite, nous nous sommes demandés quelles seraient les activités anticancéreuses et épigénétiques de la proscillaridine A dans une deuxième lignée de sarcomes U2OS exprimant 1,8 fois moins l'oncogène MYC que les RD (Annexe 6) (319). Surprenamment, un traitement plus long de proscillaridine A (48h) démontre une forte efficacité anticancéreuse avec un IC₅₀ de 2.3 nM (Annexe 6A). De plus, tout comme dans les LLAs et les RMS-e, un traitement de 48h de proscillaridine A (5 nM) des cellules de U2OS induit un arrêt du cycle cellulaire en G2/M et une inhibition du potentiel clonogénique (Annexe 6B et 6C).

Toutefois, contrairement aux RMS-e, les clones restants en réponse à un traitement de proscillaridine (5 nM; 48h) suivi de 12 jours d'incubation, sont capables de proliférer à nouveau (Annexe 6D et 6E). Cela démontre que la proscillaridine A (5 nM; 48h) n'induit pas de reprogrammation complète des cellules U2OS. De plus, la proscillaridine A (5 nM) inhibe également l'expression de l'oncogène MYC dans les cellules U2OS (Annexe 6F). Toutefois, cette inhibition est significative après 72h de traitement tandis que l'inhibition de l'oncogène MYC en réponse à la proscillaridine A est 9 à 4,5 fois plus rapide dans les LLAs et les RMS-e, respectivement. Ces résultats suggèrent plusieurs hypothèses: soit que la proscillaridine A nécessite des temps de traitement plus long dans les U2OS, soit que différents mécanismes d'action sont activés par la proscillaridine A dans les U2OS. Pour vérifier ces hypothèses, nous nous sommes intéressés au potentiel inhibiteur de la proscillaridine A sur l'expression protéique des KATs dans les U2OS. Contrairement aux LLAs et aux RMS-e, la proscillaridine A n'induit pas d'inhibition globale de l'expression des KATs même après 96h de traitement, suggérant que différents mécanismes d'action sont activés par la proscillaridine A dans les U2OS (Annexe 6G et 6H). Cette absence de changement d'expression des KATs se traduit par un niveau d'acétylation stable sur les histones 3 et 4 (Annexe 6I, 6J, 6K et 6L). Des analyses de séquençage de l'ARN sur ces cellules permettraient de connaître si cette absence de changement des niveaux d'acétylation prévient ou non un changement d'expression transcriptionnel de milliers de gènes tel qu'observé dans les LLAs et les RMS-e. Le fait que les activités anticancéreuses de la proscillaridine A dans les lignées d'ostéosarcomes nécessitent de faibles concentrations et des temps relativement courts de traitement indique que le potentiel anticancéreux de la proscillaridine A est similaire dans les lignées de LLAs et de RMS-e. Par contre, les potentielles activités épigénétiques de la proscillaridine A sur l'acétylation de l'histones 3 et la modulation de l'expression des KATs dans les ostéosarcomes n'ont pas été détectées. Cela suggère que si la proscillaridine A exerce des activités épigénétiques dans les lignées cellulaires d'ostéosarcomes, différents mécanismes d'action que l'inhibition de l'expression des KATs et la déprogrammation cellulaire de l'acétylome entrent en jeu. Les autres mécanismes épigénétiques possiblement activés par la proscillaridine A pourraient être la régulation de la méthylation des histones et de la méthylation de l'ADN par exemple. De plus, en réponse à un traitement de proscillaridine A, les U2OS présentent une inhibition tardive de l'expression protéique de MYC et une expression stable des KATs, à l'exception de KAT5 après 96h de traitement. Cela soutient notre hypothèse qui suggère l'implication des KATs dans la dégradation rapide de MYC dans les LLAs et les RMS-e.

Pour conclure, nous pouvons affirmer que la proscillaridine A exerce des effets anticancéreux dans les sarcomes de manière similaire que dans les cellules cancéreuses

hématopoïétiques. La proscillaridine A est également un inhibiteur protéique de MYC dans les sarcomes, mais les mécanismes de dégradation mis en place restent à être évalués. Selon les lignées cancéreuses, la proscillaridine A n'exerce pas les mêmes activités épigénétiques: l'inhibition de l'expression des KATs et la reprogrammation de l'acétylome n'est pas observée dans les sarcomes exprimant un faible niveau de MYC. L'activité épigénétique de la proscillaridine A dépend donc du contexte cellulaire, certainement du niveau d'expression de MYC et d'autres analyses mécanistiques sont nécessaires pour évaluer ces différences. Pour finir, à l'inverse des cellules de RMS-e, certains clones d'ostéosarcomes après un traitement de proscillaridine A (5 nM; 48h) et une période d'incubation de 12 jours présentent la capacité à proliférer de nouveau, suggérant qu'une sous-population de ces cellules sont résistantes au traitement. Il serait intéressant de réaliser des analyses de séquençage de l'ARN sur cellules uniques chez des cellules de U2OS en réponse à un traitement de proscillaridine A (5nM; 48h) afin de différencier les profils d'expressions des cellules sensibles des cellules résistantes et éventuellement identifier des voies de signalisation impliquées dans cette résistance au traitement. Des traitements combinatoires de la proscillaridine A soit avec un inhibiteur d'une voie de signalisation impliquée dans la résistance des U2OS à ce glycoside cardiotonique, soit avec un médicament au potentiel synergique anticancéreux avec la proscillaridine A tel que la décitabine, seraient peut-être plus efficaces pour totalement inhiber la capacité de ces cellules à proliférer et pour induire leur différenciation.

5. Effet de la proscillaridine A dans les cancers solides ne surexprimant pas l'oncogène MYC

Dans ce travail doctoral, nous avons déterminé que la proscillaridine A exerce des effets anticancéreux plus forts dans les cancers exprimant un haut niveau d'expression protéique de l'oncogène MYC (319). Dans notre panel de lignées cancéreuses, les lignées de cancers du poumon (A549) et les lignées de cancers de côlon (SW48) représentent les lignées cancéreuses les plus résistantes à un traitement à la proscillaridine A avec une faible expression de l'oncogène MYC (319). Les IC_{50} de la proscillaridine A dans ces lignées sont 100 à 1000 fois plus élevées que les IC_{50} dans les lignées de sarcomes et de leucémies et les niveaux d'expression de MYC sont plus de 2 fois plus faibles que dans les LLAs (319). Nous avons donc investigué si la proscillaridine A agissait également comme un inhibiteur de la protéine MYC dans les lignées ne surexprimant pas MYC. Après 48h de traitement avec 5 nM de proscillaridine A, aucun changement significatif de l'expression de MYC n'est mesuré dans les lignées cellulaires A549 et SW48 (319). Également, ce même traitement n'induit pas de changement significatif de l'expression des KATs dans ces cellules, à l'exception de KAT6A,

dont le niveau d'expression est significativement inhibé dans les A549 en réponse à la proscillaridine A (319). Nous remarquons que comme dans la lignée cellulaire d'ostéosarcome précédemment décrite, la proscillaridine A (5 nM, 48h) n'induit pas de changements d'expression de MYC et des KATs dans les cellules de A549 et de SW48 exprimants un plus faible niveau de MYC (Annexe 6) (319). Ces données nous permettent d'affirmer une nouvelle fois que la proscillaridine A inhibe spécifiquement l'expression protéique de MYC et des KATs dans les cancers surexprimant MYC.

De plus, nous avons mesuré les niveaux d'acétylation de différentes lysines sur l'histone 3 dans les cellules de A549 et de SW48 en réponse à un traitement à la proscillaridine A. En absence de changement global de l'expression des KATs induit par le traitement à la proscillaridine A dans ces cellules, nous nous attendions à mesurer des niveaux stables d'acétylation. Dans les SW48, aucun changement significatif de l'acétylation de l'histone 3 n'a été mesuré en réponse à un traitement de proscillaridine A (5 nM, 48h), confirmant des résultats mesurés dans une étude précédente réalisée par le Dr. Raynal (311, 319). Par contre, en réponse à un traitement de proscillaridine A (5 nM, 48h), les niveaux d'acétylation sur l'ensemble des lysines mesurées de l'histone 3 sont significativement diminués dans les cellules de A549 (319). Ces résultats s'expliquent de trois manières: la première est que l'activité des KDACs est augmentée, la deuxième est que l'activité des KATs est inhibée par la proscillaridine A mais leur expression demeure intacte à l'exception de KAT6A, et la troisième est que la baisse d'expression de KAT6A est responsable de la baisse d'acétylation mesurée sur l'histone 3. Il est possible que la proscillaridine A soit un inhibiteur général de l'expression des KATs. Toutefois, le contexte cellulaire définirait les KATs qui sont inhibées par le traitement et parfois, l'inhibition de seulement l'une d'entre elles est suffisante pour induire un effet sur l'acétylation des histones. Il est également possible que la proscillaridine A soit un inhibiteur général de l'activité des KATs. Selon le contexte cellulaire, des mécanismes de dégradation seraient activés et l'expression des KATs diminuée, ou bien alors, l'expression des KATs serait conservée et d'autres enzymes compenseraient ou non la perte d'activité des KATs, reflétée par les niveaux d'acétylation sur l'histone 3. Il est également possible que la proscillaridine A soit un inhibiteur de l'activité des KATs seulement dans certains contextes cellulaires précis, dont l'un est constitué par la surexpression de MYC.

Pour conclure, en plus d'exercer une activité anticancéreuse plus faible, la proscillaridine A n'induit pas d'inhibition protéique de MYC et des KATs dans les cancers ne surexprimant pas MYC. Des études comparatives des modifications post-traductionnelles de MYC dans des lignées sous-exprimants et surexprimants MYC en absence et en réponse à un traitement de proscillaridine A permettraient d'identifier les différences régulationnelles de MYC dans ces différents contextes cellulaires. Également, cette expérience permettrait de préciser

le mécanisme d'action de la proscillaridine A. De plus, des études avec des traitements plus longs et en combinaison avec d'autres médicaments seraient pertinentes afin d'évaluer si l'activité anticancéreuse de la proscillaridine A peut être amplifiée dans les cellules ne surexprimant pas MYC.

6. La combinaison de proscillaridine A et de décitabine induit des activités épigénétiques synergiques dans les cancers du côlon

Le traitement du cancer est multimodal et différentes voies de signalisations doivent être ciblées pour éviter l'apparition de résistance aux traitements (336). La recherche de nouvelles stratégies combinatoires comme traitements anticancéreux est donc essentielle pour répondre au besoin clinique. Dans l'étude réalisée par le Dr, Raynal et dont je suis deuxième auteure, un criblage du potentiel épigénétique de la décitabine en combinaison avec les différents médicaments appartenant à une librairie de milliers de médicaments approuvés par la FDA des États-Unis d'Amérique a été réalisé (317). Dans cette étude, la combinaison séquentielle de la décitabine avec la proscillaridine A est la combinaison qui potentialise le plus la capacité des cellules à exprimer la GFP, c'est à dire qui potentialise le plus les activités épigénétiques des deux médicaments (317). L'un des points importants soulevés par cette étude est le fait que les combinaisons qui induisent un effet trop toxique sur la viabilité cellulaire, soit une forte mort cellulaire, n'induisent pas l'expression de la GFP (317). Lorsque les combinaisons de traitements sont fortement cytotoxiques et induisent une mort cellulaire rapide, les processus transcriptionnels sont arrêtés et les membranes détériorées. La GFP est alors libérées des cellules. Cela implique que la modulation de l'épigénome des cellules cancéreuses de côlon est possible seulement dans les cellules ayant reçu des traitements faiblement cytotoxiques. De plus, la synergie de l'activité épigénétique entre la décitabine et la proscillaridine A est d'autant plus soutenue par l'induction de la ré-expression spécifique de gènes impliqués dans la signalisation calcique en réponse à cette combinaison de médicaments dont le récepteur à la chimiokine 4 CXCR4, le précurseur du glucagon GCG, et le récepteur à la calcitonine RAMP3 (317). Une étude précédente réalisée par le Dr. Raynal démontre que l'activité épigénétique de la proscillaridine A est régulée par une kinase activée par les signaux calcique (311). Si l'on ajoute à cela le fait que l'expression protéique de MYC et des KATs est modulée de manière similaire en réponse à un traitement à la proscillaridine A et un influx calcique, ces données suggèrent que la modulation de la signalisation calcique induite par la proscillaridine A est impliquée dans les activités épigénétiques de ce médicament (Annexe 5). Le fait que la combinaison séquentielle de décitabine et de proscillaridine A induise l'expression transcriptionnelle de gènes spécifiquement impliqués dans la signalisation

calcique en comparaison aux monothérapies de décitabine et de procillaridine A, démontre une potentialisation de l'activité épigénétique de ces médicaments. De plus, la combinaison séquentielle de décitabine et de procillaridine A inhibe spécifiquement la transcription de gènes pro-tumoraux impliqués dans le cancer du côlon, démontrant ainsi la potentialisation de l'activité anticancéreuse de ces deux médicaments (317).

Pour conclure, la combinaison séquentielle de décitabine avec la procillaridine A induit des activités épigénétiques synergiques dans les cellules du cancer de côlon ne surexprimant pas MYC. Cela soutient l'hypothèse que les cancers plus résistants à la procillaridine A peuvent être sensibiliser à ce médicament par un pré-traitement avec un autre médicament épigénétique.

7. La combinaison de procillaridine A et de décitabine induit des activités anticancéreuses synergiques dans les RMS-e

Dans la perspective d'identifier de nouvelles stratégies combinatoires pour le traitement des RMS-e, nous avons étudié le potentiel synergique de la décitabine en combinaison avec la procillaridine A. Pour cela, nous avons tout d'abord mesuré l'activité anticancéreuse de la décitabine en monothérapie dans les RMS-e et nous avons identifié une IC_{50} située entre 83 et 65 nM en réponse à des traitements respectifs de 48h ou 72h suivis d'une période de repos de 48h (Article 3). Il est également important de noter que la décitabine nécessite plusieurs cycles cellulaires pour inhiber la méthylation des doubles brins de l'ADN et exercer pleinement son effet anticancéreux (337). Dans les cellules de RMS-e RD, un minimum de 96h après le premier traitement de décitabine semble nécessaire pour pouvoir mesurer un effet anti-prolifératif significatif (Article 3).

Par la suite, nous avons étudié l'effet anticancéreux de combinaison simultanée et séquentielle de la décitabine avec la procillaridine A (Article 3). Plusieurs résultats sont observés:

- Tout d'abord, les combinaisons simultanées et séquentielles impliquant un traitement de 48h à la décitabine avec un traitement de 48h à la procillaridine A ne produisent pas d'effets antiprolifératifs synergiques immédiats après les traitements. Pour certaines concentrations de procillaridine A (de 1 à 10 nM), on mesure un effet additif des activités anticancéreuses des deux médicaments (Figure supplémentaire S5). Toutefois, on mesure principalement que l'effet antiprolifératif de ces combinaisons est similaire à l'effet antiprolifératif de la procillaridine A seule. Ces résultats confirment le fait qu'à court terme, l'action antiproliférative de la décitabine est quasi nulle (337). On peut donc suggérer que les mécanismes antiprolifératif activés en réponse à cette combinaison de médicaments sont

similaires à ceux activés par la proscillaridine A. Cependant, les essais clonogéniques réalisés avec 48h de traitement de décitabine et de proscillaridine A démontrent que sur le long terme, cette combinaison de médicaments détient un potentiel synergique pour reprogrammer les cellules RD et inhiber la formation de clones (Figure 5C). Nous pouvons donc conclure qu'à court terme, un traitement combinatoire de décitabine (48h) et de proscillaridine A (48h) ne produit pas d'effet antiprolifératif synergique (Figure supplémentaire S5). Par contre, à long terme, ces deux médicaments potentialisent leurs effets anticancéreux (Figure 5C). Les essais clonogéniques seraient donc une meilleure technique d'analyse pour étudier le potentiel synergique anticancéreux de ces deux médicaments.

- Par la suite, les combinaisons simultanées et séquentielles impliquant un traitement de 72h à la décitabine avec un traitement de 48h à la proscillaridine A produisent des activités anticancéreuses synergiques pour certaines concentrations des deux médicaments (Figure 5D à 5H). Le traitement séquentiel de décitabine en combinaison avec la proscillaridine A démontre un potentiel synergique de l'inhibition de la viabilité cellulaire plus prononcé qu'un traitement combinatoire simultané de ces deux médicaments. Ces résultats suggèrent que la décitabine nécessite davantage de cycles cellulaires pour activer ces mécanismes anticancéreux et pour pouvoir induire un effet antiprolifératif et aussi potentialiser l'activité anticancéreuse de la proscillaridine A dans les cellules RD. Il aurait été intéressant de valider cette expérience en étudiant la capacité des cellules RD à former des clones en réponse à une combinaison séquentielle de décitabine (72h) et de proscillaridine A (48h).

On distingue donc des activités anticancéreuses différentielles de ces deux médicaments dans les cellules de RMS-e: la décitabine détient des effets anticancéreux à de plus fortes concentrations et avec des traitements plus longs tandis que la proscillaridine A inhibe la viabilité cellulaire de manière rapide avec des concentrations plus faibles. Néanmoins, en privilégiant les combinaisons séquentielles qui permettent à la décitabine d'exercer son activité anticancéreuse, la décitabine et la proscillaridine A détiennent des activités anticancéreuses synergiques.

8. Étude du mécanisme d'action de la combinaison séquentielle de décitabine et de proscillaridine A dans les RMS-e

La combinaison séquentielle de décitabine (72h) et de proscillaridine A (48h) démontre une plus grande synergie de l'inhibition de la viabilité cellulaire. Nous avons sélectionné la combinaison de 100 nM de décitabine et de 5 nM de proscillaridine A, qui détient un score HSA positif et une cytotoxicité à 50%, afin d'évaluer les mécanismes d'action impliqués dans

la synergie anticancéreuse de cette combinaison de médicaments (Article 3). La proscillaridine A étant un puissant inhibiteur de MYC et un régulateur du profil transcriptionnel oncogénique des RMS-e, nous avons mesuré le potentiel inhibiteur de la décitabine seule ou en combinaison séquentielle avec la proscillaridine sur l'expression protéique de MYC et d'oncogènes impliqués dans les RMS (Article 3 et Annexe 7A et 7B). En premier lieu, les niveaux d'expression protéique de plusieurs oncogènes impliqués dans les RMS (MYC, MYOD1, MYOG et MYOSIN-HC) sont inhibés à la fois par les mono-traitements à la décitabine et à la proscillaridine A, avec une inhibition plus prononcée induite par cette dernière en comparaison avec la décitabine (Annexe 7A et 7B). Cette expérience nous révèle qu'en plus d'inhiber MYC et le transcrit de MYOD1, la proscillaridine A inhibe l'expression protéique de MYOD1, MYOG et MYOSIN-HC mais elle n'inhibe pas celle de l'oncogène NRAS (Article 3 et Annexe 7A et 7B). De plus, malgré le potentiel inhibiteur de la décitabine sur l'expression de ces protéines, la combinaison séquentielle de décitabine et de proscillaridine A ne produit pas d'effet différentiel par rapport au mono-traitement de proscillaridine A (Annexe 7A et 7B). En conclusion, la combinaison séquentielle de décitabine et de proscillaridine A n'inhibe pas de manière synergique l'expression des oncogènes impliqués dans les cellules de RMS-e.

En deuxième lieu, nous nous sommes demandés si cette combinaison de médicaments pouvait potentialiser l'inhibition de l'expression des KATs induite par la monothérapie à la proscillaridine A (Article 3 et annexe 6C et 6D). Tout d'abord, une monothérapie à la décitabine induit une légère augmentation de l'expression de KAT2B et de KAT5. La décitabine exerce donc des effets très différents sur l'expression des KATs par rapport à la proscillaridine A dans les cellules de RMS-e (Annexe 7C et 7D). De plus, en réponse à la combinaison séquentielle de décitabine et de proscillaridine A, les expressions protéiques de KAT3A, KAT3B et KAT6A sont inhibées. KAT3A et KAT3B sont également inhibées en réponse à une monothérapie à la proscillaridine A (Annexe 7C et 7D). Cependant, la monothérapie de proscillaridine A induit aussi une baisse de l'expression de KAT2A et de KAT5 qui n'est pas observée avec la combinaison de médicaments (Annexe 7C et 7D).

Plusieurs conclusions et hypothèses peuvent être énoncées en regard de cette expérience: la première est que la combinaison séquentielle de décitabine et de proscillaridine A n'induit pas d'inhibition synergique des expressions protéiques des oncogènes et des KATs étudiés. De ce fait, la décitabine et la proscillaridine A détiennent certainement des mécanismes d'action distincts dans les cellules de RMS-e. La deuxième hypothèse est que KAT3A et KAT3B exercent un rôle critique pour l'activité anticancéreuse de la proscillaridine A car ce sont les deux seules KATs inhibées à la fois en réponse à une monothérapie à la proscillaridine A et en réponse à la combinaison de médicaments. L'inhibition de MYC, MYOD1, MYOG et MYOSIN-HC en réponse à la combinaison de médicaments est autant

prononcée qu'en réponse à un traitement à la proscillaridine A, suggérant que le complexe KAT3A/KAT3B est celui qui régule principalement l'inhibition protéique de ces oncogènes dans les RMS-e. La troisième hypothèse est que la baisse d'expression de KAT6A ajoutée à la baisse d'expression du complexe KAT3A/KAT3B induite par la combinaison de décitabine et de proscillaridine A induit la même inhibition des oncogènes que l'inhibition globale de l'expression des KATs induite par une monothérapie à la proscillaridine A. De ce fait, soit KAT3A/KAT3B sont les seules KATs responsables de la régulation de l'expression des oncogènes et KAT6A n'est pas impliquée dans l'inhibition des oncogènes, soit la baisse d'expression de KAT6A pourrait compenser les niveaux d'expression stables des autres KATs en réponse à la combinaison de médicaments. La quatrième hypothèse est que KAT6A joue un rôle dans l'activité synergique anticancéreuse de la combinaison séquentielle de décitabine et de proscillaridine A car c'est la seule KAT dont l'expression est spécifiquement inhibée par la combinaison. Enfin, la dernière hypothèse est qu'un autre mécanisme que la régulation des KATs et de l'acétylome des cellules est impliqué dans la régulation des programmes oncogéniques des RMS-e. La décitabine est caractérisée pour activer la reconnaissance immunitaire dans des patients atteints de RMS-e (338, 339). Dans notre étude sur les RMS-e, nous avons découvert que la proscillaridine A augmente l'expression des gènes impliqués dans le système immunitaire via la modulation de H3K27ac. Cela suggère une possible coopération de ces deux médicaments dans l'activation de la surveillance immunitaire via des mécanismes d'action épigénétiques distincts dans les RMS-e (Annexe 7).

Pour conclure, un pré-traitement de 72h de décitabine ne potentialise pas l'inhibition des KATs induite par la proscillaridine A, suggérant que ces deux médicaments détiennent des mécanismes d'action différents et que d'autres mécanismes anticancéreux sont activés pour induire une synergie anticancéreuse. Il serait intéressant d'investiguer si les mécanismes de reconnaissance par le système immunitaire sont responsables de la synergie anticancéreuse induite par cette combinaison de médicaments dans des modèles in vivo ou des modèles de co-cultures avec des cellules immunitaires.

V/ Perspectives et directions futures

Dans ce travail doctoral, nous avons démontré que la proscillaridine A exerce différents mécanismes d'action dans les cancers en fonction du niveau d'expression de l'oncogène MYC. Dans les cancers exprimant un haut niveau de cet oncogène, la proscillaridine A reprogramme l'acétyleme des cellules via une inhibition globale de l'expression des KATs, ce qui conduit à une inhibition de la prolifération cellulaire et à l'activation des voies de différenciation. Toutefois, nos travaux réalisés dans les RMS-e suggèrent la possibilité que certaines KATs soient spécifiquement responsables de cette reprogrammation oncogénique. Il serait intéressant d'étudier le rôle de chaque KAT ou famille de KATs dans les cancers surexprimant MYC pour valider ou non cette hypothèse. Également, une part de l'activité épigénétique et anticancéreuse de la proscillaridine A dans les cancers surexprimant MYC serait possiblement due à une augmentation de la concentration calcique intracellulaire, et par conséquent, à l'activation de kinases sensibles au changement de la concentration calcique. Il serait donc pertinent d'approfondir cette hypothèse en identifiant les protéines phosphorylées en réponse au traitement à la proscillaridine A. De plus, le fait que les cancers surexprimant MYC seraient effectivement sensibles à une augmentation du calcium intracellulaire révèle le fait que les cancers ne surexprimant pas MYC ne le seraient pas, ou du moins pas autant. Cela soulève différentes questions telles que: est ce que les cancers surexprimant MYC surexpriment aussi des kinases sensibles au changement calcique ou sont-ils plus sensibles à l'action de ses kinases? Ou bien encore: existe-t-il un rétrocontrôle négatif en réponse à une augmentation de calcium dans les cancers exprimant de plus faibles niveaux de MYC? De manière plus générale, qu'est-ce qui explique cette différence? La surexpression de MYC dans les cancers pourrait également inhiber les voies de signalisation activées / contrôlées par le calcium. Dans la littérature, quelques études se sont intéressées à la régulation de MYC par des kinases dépendantes du calcium. Par exemple, la kinase CAMKII γ a été caractérisée pour stabiliser la protéine MYC dans des cellules de lymphomes surexprimant cet oncogène (340). Également, dans des lignées de cancer du sein, la protéine ORAI3 stabilise l'expression et l'activité de MYC via la modulation de la voie de signalisation de la kinase MAP (341). Toutefois, un mécanisme précis entre l'expression et l'activité de MYC et la régulation calcique dans les cancers reste à être caractérisé. De nombreuses hypothèses sont possibles et caractériser l'influence du calcium intracellulaire dans les cancers exprimant des niveaux différentiels de MYC pourraient révéler de nouvelles stratégies thérapeutiques pour reprogrammer les cellules cancéreuses en cellules saines. Une autre avenue intéressante est la possible régulation de l'expression de certaines KATs par une augmentation de la concentration calcique. Si certains groupes de recherche ont démontré que le calcium, et

particulièrement la calmoduline kinase II, influence l'activité des KDACs 5 et 9, l'influence de la concentration calcique dans la régulation des KATs n'a jamais été démontrée (342, 343). L'hypothèse la plus probable est que l'augmentation du calcium intracellulaire active des mécanismes de dégradation protéique des KATs. Toutefois, si c'est le cas, cette influence calcique sur la dégradation des KATs dépendrait du contexte cellulaire.

Dans les cancers ne surexprimant pas MYC, la proscillaridine A n'induit pas d'inhibition globale de l'expression des KATs. Dépendamment des lignées cellulaires cancéreuses, une KAT différente est inhibée en réponse au traitement à la proscillaridine A, ce qui se traduit par une absence de modification de l'acétylation des histones dans 2 sur 3 des lignées cellulaires testées. Il serait intéressant d'étudier si la proscillaridine A produit d'autres modifications épigénétiques dans ces lignées cellulaires telles que des changements de la méthylation des histones par exemple. De plus, pour la lignée cellulaire dont l'acétylation est modifiée (A549, cancer du poumon), il serait pertinent d'étudier les niveaux d'expression des KDACs et des sirtuines qui pourraient révéler une nouvelle cible de la proscillaridine A dans un autre contexte cellulaire cancéreux. De plus, après 48h de traitement de proscillaridine A, les niveaux de MYC ne sont pas significativement modifiés. Pourtant, dans les ostéosarcomes, une forte activité anticancéreuse de la proscillaridine A est mesurée, produisant un arrêt du cycle cellulaire en G2/M. De manière indépendante au niveau d'expression de MYC, la proscillaridine A semble être un régulateur du cycle cellulaire et un activateur de ses mécanismes de contrôle. Il serait donc intéressant d'étudier si de plus longs traitements de proscillaridine A induisent les mêmes effets sur les cycles cellulaires des cellules les plus résistantes à ce traitement.

Pour finir, la combinaison de décitabine avec la proscillaridine A semble être une stratégie prometteuse pour traiter les cancers plus résistants à la proscillaridine A. Il serait pertinent de comprendre les mécanismes synergiques sous-jacents à cette combinaison. De plus, la proscillaridine A détient des mécanismes d'action différents selon le contexte cellulaire oncogénique, plus particulièrement selon les niveaux de MYC. Il serait donc pertinent d'étudier si la combinaison de décitabine avec la proscillaridine A détient des potentiels synergiques différents en fonction du niveau d'expression de MYC dans les cancers ainsi que des mécanismes d'action différents.

VI/ Conclusion

Dans ces travaux, nous démontrons pour la première fois que la proscillaridine A est un médicament anti-MYC dans les cancers surexprimant cet oncogène. Également, nous démontrons qu'en plus de détenir des activités anticancéreuses différentielles selon les niveaux d'expression de MYC des cellules cancéreuses, les mécanismes anticancéreux de la proscillaridine A diffèrent selon le contexte cellulaire oncogénique. Nous proposons donc de repositionner ce glycoside cardiotonique comme traitement anticancéreux dans les cancers surexprimant MYC, particulièrement dans les leucémies pédiatriques.

De plus, nous avons révélé le potentiel synergique de la proscillaridine A en combinaison avec la décitabine aussi bien dans les cancers surexprimant MYC que dans les cancers avec de plus bas niveaux d'expression de cet oncogène. Dans les cancers surexprimant MYC, la viabilité cellulaire et le potentiel clonogénique des cellules sont inhibés de manière synergique par la combinaison de médicaments, mais les mécanismes sous-jacents responsables de cet effet restent à être déterminés. Dans les cancers détenant de bas niveaux d'expression de MYC et plus résistants à la proscillaridine A, la combinaison de décitabine et de proscillaridine démontre des activités épigénétiques synergiques ainsi que l'inhibition de l'expression de gènes pro-tumoraux. L'étude de cette combinaison de médicaments dans davantage de lignées cancéreuses permettrait de déterminer si la synergie anticancéreuse et épigénétique de cette combinaison de médicaments dépend du contexte cellulaire oncogénique. En conclusion, la combinaison de décitabine et de proscillaridine A se présente comme une stratégie combinatoire anticancéreuse prometteuse.

VII/ Références bibliographiques

1. J. S. Bertram, The molecular biology of cancer. *Mol Aspects Med* **21**, 167-223 (2000).
2. J. O'Connell *et al.*, Altered mechanisms of apoptosis in colon cancer: Fas resistance and counterattack in the tumor-immune conflict. *Ann N Y Acad Sci* **910**, 178-192; discussion 193-175 (2000).
3. L. M. Coussens, Z. Werb, Inflammation and cancer. *Nature* **420**, 860-867 (2002).
4. C. GM, The Cell: A Molecular Approach. 2nd edition. *Sunderland (MA): Associates*, (2000).
5. B. N. Ames, L. S. Gold, W. C. Willett, The causes and prevention of cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 5258-5265 (1995).
6. R. Capper *et al.*, The nature of telomere fusion and a definition of the critical telomere length in human cells. *Genes Dev* **21**, 2495-2508 (2007).
7. T. Finkel, M. Serrano, M. A. Blasco, The common biology of cancer and ageing. *Nature* **448**, 767-774 (2007).
8. M. E. McLaughlin-Drubin, K. Munger, Viruses associated with human cancer. *Biochim Biophys Acta* **1782**, 127-150 (2008).
9. D. Hanahan, R. A. Weinberg, The hallmarks of cancer. *Cell* **100**, 57-70 (2000).
10. D. Hanahan, R. A. Weinberg, Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **144**, 646-674 (2011).
11. Y. A. Fouad, C. Aanei, Revisiting the hallmarks of cancer. *Am J Cancer Res* **7**, 1016-1036 (2017).
12. Z. Yu, T. G. Pestell, M. P. Lisanti, R. G. Pestell, Cancer stem cells. *Int J Biochem Cell Biol* **44**, 2144-2151 (2012).
13. T. Lapidot *et al.*, A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature* **367**, 645-648 (1994).
14. K. Eun, S. W. Ham, H. Kim, Cancer stem cell heterogeneity: origin and new perspectives on CSC targeting. *BMB Rep* **50**, 117-125 (2017).
15. C. C. S. A. Committee, Canadian Cancer Statistics 2019. (2019).
16. A. Urruticoechea *et al.*, Recent advances in cancer therapy: an overview. *Curr Pharm Des* **16**, 3-10 (2010).
17. R. Baskar, K. A. Lee, R. Yeo, K. W. Yeoh, Cancer and radiation therapy: current advances and future directions. *Int J Med Sci* **9**, 193-199 (2012).

18. D. S. Shewach, R. D. Kuchta, Introduction to cancer chemotherapeutics. *Chem Rev* **109**, 2859-2861 (2009).
19. K. Nurgali, R. T. Jagoe, R. Abalo, Editorial: Adverse Effects of Cancer Chemotherapy: Anything New to Improve Tolerance and Reduce Sequelae? *Front Pharmacol* **9**, 245 (2018).
20. C. C. S. s. A. C. o. C. Statistics, Canadian Cancer Statistics 2015. (2015).
21. M. Filbin, M. Monje, Developmental origins and emerging therapeutic opportunities for childhood cancer. *Nat Med* **25**, 367-376 (2019).
22. S. Canada, Table 13-10-0111-01 Number and rates of new cases of primary cancer, by cancer type, age group and sex. (2019).
23. S. L. Cooper, P. A. Brown, Treatment of pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Clin North Am* **62**, 61-73 (2015).
24. K. C. Pehlivan, B. B. Duncan, D. W. Lee, CAR-T Cell Therapy for Acute Lymphoblastic Leukemia: Transforming the Treatment of Relapsed and Refractory Disease. *Curr Hematol Malig Rep* **13**, 396-406 (2018).
25. J. D. de Rooij, C. M. Zwaan, M. van den Heuvel-Eibrink, Pediatric AML: From Biology to Clinical Management. *J Clin Med* **4**, 127-149 (2015).
26. N. Hijjiya, K. R. Schultz, M. Metzler, F. Millot, M. Suttorp, Pediatric chronic myeloid leukemia is a unique disease that requires a different approach. *Blood* **127**, 392-399 (2016).
27. H. J. Im, Current treatment for pediatric acute myeloid leukemia. *Blood Res* **53**, 1-2 (2018).
28. J. Davila, E. Slotkin, T. Renaud, Relapsed and refractory pediatric acute myeloid leukemia: current and emerging treatments. *Paediatr Drugs* **16**, 151-168 (2014).
29. F. R. Appelbaum, I. D. Bernstein, Gemtuzumab ozogamicin for acute myeloid leukemia. *Blood* **130**, 2373-2376 (2017).
30. M. F. Wedekind, N. L. Denton, C. Y. Chen, T. P. Cripe, Pediatric Cancer Immunotherapy: Opportunities and Challenges. *Paediatr Drugs* **20**, 395-408 (2018).
31. J. H. HaDuong, A. A. Martin, S. X. Skapek, L. Mascarenhas, Sarcomas. *Pediatr Clin North Am* **62**, 179-200 (2015).
32. K. M. Skubitz, D. R. D'Adamo, Sarcoma. *Mayo Clin Proc* **82**, 1409-1432 (2007).
33. Z. Burningham, M. Hashibe, L. Spector, J. D. Schiffman, The epidemiology of sarcoma. *Clin Sarcoma Res* **2**, 14 (2012).
34. R. F. Williams, I. Fernandez-Pineda, A. Gosain, Pediatric Sarcomas. *Surg Clin North Am* **96**, 1107-1125 (2016).

35. R. T. Chen *et al.*, The Brighton Collaboration Viral Vector Vaccines Safety Working Group (V3SWG). *Vaccine* **33**, 73-75 (2015).
36. in PDQ Cancer Information Summaries. (Bethesda (MD), 2002).
37. M. A. Arnold, F. G. Barr, Molecular diagnostics in the management of rhabdomyosarcoma. *Expert Rev Mol Diagn* **17**, 189-194 (2017).
38. D. Egas-Bejar, W. W. Huh, Rhabdomyosarcoma in adolescent and young adult patients: current perspectives. *Adolesc Health Med Ther* **5**, 115-125 (2014).
39. R. A. Durfee, M. Mohammed, H. H. Luu, Review of Osteosarcoma and Current Management. *Rheumatol Ther* **3**, 221-243 (2016).
40. C. V. Dang, MYC on the path to cancer. *Cell* **149**, 22-35 (2012).
41. H. Chen, H. Liu, G. Qing, Targeting oncogenic Myc as a strategy for cancer treatment. *Signal Transduct Target Ther* **3**, 5 (2018).
42. S. Jones, An overview of the basic helix-loop-helix proteins. *Genome Biol* **5**, 226 (2004).
43. P. A. Carroll, B. W. Freie, H. Mathsyaraja, R. N. Eisenman, The MYC transcription factor network: balancing metabolism, proliferation and oncogenesis. *Front Med* **12**, 412-425 (2018).
44. C. V. Dang *et al.*, The c-Myc target gene network. *Semin Cancer Biol* **16**, 253-264 (2006).
45. M. Sachdeva *et al.*, p53 represses c-Myc through induction of the tumor suppressor miR-145. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 3207-3212 (2009).
46. S. Yamamura *et al.*, MicroRNA-34a modulates c-Myc transcriptional complexes to suppress malignancy in human prostate cancer cells. *PLoS One* **7**, e29722 (2012).
47. L. R. Thomas, W. P. Tansey, Proteolytic control of the oncoprotein transcription factor Myc. *Adv Cancer Res* **110**, 77-106 (2011).
48. M. Welcker *et al.*, The Fbw7 tumor suppressor regulates glycogen synthase kinase 3 phosphorylation-dependent c-Myc protein degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 9085-9090 (2004).
49. M. Yada *et al.*, Phosphorylation-dependent degradation of c-Myc is mediated by the F-box protein Fbw7. *EMBO J* **23**, 2116-2125 (2004).
50. R. Sears *et al.*, Multiple Ras-dependent phosphorylation pathways regulate Myc protein stability. *Genes Dev* **14**, 2501-2514 (2000).
51. R. C. Sears, The life cycle of C-myc: from synthesis to degradation. *Cell Cycle* **3**, 1133-1137 (2004).
52. P. Hydbring *et al.*, Phosphorylation by Cdk2 is required for Myc to repress Ras-induced senescence in cotransformation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 58-63 (2010).

53. A. S. Farrell *et al.*, Pin1 regulates the dynamics of c-Myc DNA binding to facilitate target gene regulation and oncogenesis. *Mol Cell Biol* **33**, 2930-2949 (2013).
54. G. W. Small, T. Y. Chou, C. V. Dang, R. Z. Orlowski, Evidence for involvement of calpain in c-Myc proteolysis in vivo. *Arch Biochem Biophys* **400**, 151-161 (2002).
55. N. Murai, Y. Murakami, A. Tajima, S. Matsufuji, Novel ubiquitin-independent nucleolar c-Myc degradation pathway mediated by antizyme 2. *Sci Rep* **8**, 3005 (2018).
56. J. Vervoorts, J. Luscher-Firzlaff, B. Luscher, The ins and outs of MYC regulation by posttranslational mechanisms. *J Biol Chem* **281**, 34725-34729 (2006).
57. S. R. Hann, R. N. Eisenman, Proteins encoded by the human c-myc oncogene: differential expression in neoplastic cells. *Mol Cell Biol* **4**, 2486-2497 (1984).
58. R. Sears, G. Leone, J. DeGregori, J. R. Nevins, Ras enhances Myc protein stability. *Mol Cell* **3**, 169-179 (1999).
59. S. Malempati *et al.*, Aberrant stabilization of c-Myc protein in some lymphoblastic leukemias. *Leukemia* **20**, 1572-1581 (2006).
60. M. Kalkat *et al.*, MYC Deregulation in Primary Human Cancers. *Genes (Basel)* **8**, (2017).
61. M. D. Delgado, J. Leon, Myc roles in hematopoiesis and leukemia. *Genes Cancer* **1**, 605-616 (2010).
62. A. S. Bhagwat, B. Lu, C. R. Vakoc, Enhancer dysfunction in leukemia. *Blood* **131**, 1795-1804 (2018).
63. S. L. Edwards, J. Beesley, J. D. French, A. M. Dunning, Beyond GWASs: illuminating the dark road from association to function. *Am J Hum Genet* **93**, 779-797 (2013).
64. D. Herranz *et al.*, A NOTCH1-driven MYC enhancer promotes T cell development, transformation and acute lymphoblastic leukemia. *Nat Med* **20**, 1130-1137 (2014).
65. W. Luo *et al.*, c-Myc inhibits myoblast differentiation and promotes myoblast proliferation and muscle fibre hypertrophy by regulating the expression of its target genes, miRNAs and lincRNAs. *Cell Death Differ* **26**, 426-442 (2019).
66. S. B. Meroni *et al.*, Molecular Mechanisms and Signaling Pathways Involved in Sertoli Cell Proliferation. *Front Endocrinol (Lausanne)* **10**, 224 (2019).
67. B. Zhu, J. K. Davie, New insights into signalling-pathway alterations in rhabdomyosarcoma. *Br J Cancer* **112**, 227-231 (2015).
68. T. E. Crawford Parks *et al.*, Novel Roles for Stauf1 in Embryonal and Alveolar Rhabdomyosarcoma via c-myc-dependent and -independent events. *Sci Rep* **7**, 42342 (2017).
69. R. Battaglino *et al.*, c-myc is required for osteoclast differentiation. *J Bone Miner Res* **17**, 763-773 (2002).

70. E. Piek *et al.*, Osteo-transcriptomics of human mesenchymal stem cells: accelerated gene expression and osteoblast differentiation induced by vitamin D reveals c-MYC as an enhancer of BMP2-induced osteogenesis. *Bone* **46**, 613-627 (2010).
71. D. Chen *et al.*, Super enhancer inhibitors suppress MYC driven transcriptional amplification and tumor progression in osteosarcoma. *Bone Res* **6**, 11 (2018).
72. V. Thayanithy *et al.*, Perturbation of 14q32 miRNAs-cMYC gene network in osteosarcoma. *Bone* **50**, 171-181 (2012).
73. S. Li, T. Hu, T. Yuan, D. Cheng, Q. Yang, Nucleoside diphosphate kinase B promotes osteosarcoma proliferation through c-Myc. *Cancer Biol Ther* **19**, 565-572 (2018).
74. D. Horiuchi, B. Anderton, A. Goga, Taking on challenging targets: making MYC druggable. *Am Soc Clin Oncol Educ Book*, e497-502 (2014).
75. D. M. Clausen *et al.*, In vitro cytotoxicity and in vivo efficacy, pharmacokinetics, and metabolism of 10074-G5, a novel small-molecule inhibitor of c-Myc/Max dimerization. *J Pharmacol Exp Ther* **335**, 715-727 (2010).
76. P. Filippakopoulos *et al.*, Selective inhibition of BET bromodomains. *Nature* **468**, 1067-1073 (2010).
77. S. M. Nijman, Synthetic lethality: general principles, utility and detection using genetic screens in human cells. *FEBS Lett* **585**, 1-6 (2011).
78. C. Y. Fong *et al.*, BET inhibitor resistance emerges from leukaemia stem cells. *Nature* **525**, 538-542 (2015).
79. J. Xie, X. Wang, C. G. Proud, mTOR inhibitors in cancer therapy. *F1000Res* **5**, (2016).
80. P. Rathert *et al.*, Transcriptional plasticity promotes primary and acquired resistance to BET inhibition. *Nature* **525**, 543-547 (2015).
81. L. Soucek, S. Nasi, G. I. Evan, Omomyc expression in skin prevents Myc-induced papillomatosis. *Cell Death Differ* **11**, 1038-1045 (2004).
82. V. Muncan *et al.*, Rapid loss of intestinal crypts upon conditional deletion of the Wnt/Tcf-4 target gene c-Myc. *Mol Cell Biol* **26**, 8418-8426 (2006).
83. T. Oskarsson *et al.*, Skin epidermis lacking the c-Myc gene is resistant to Ras-driven tumorigenesis but can reacquire sensitivity upon additional loss of the p21Cip1 gene. *Genes Dev* **20**, 2024-2029 (2006).
84. C. H. Waddington, Towards a theoretical biology. *Nature* **218**, 525-527 (1968).
85. E. Jablonka, G. Raz, Transgenerational epigenetic inheritance: prevalence, mechanisms, and implications for the study of heredity and evolution. *Q Rev Biol* **84**, 131-176 (2009).
86. H. J. Kilvitis *et al.*, Ecological epigenetics. *Adv Exp Med Biol* **781**, 191-210 (2014).

87. D. E. Handy, R. Castro, J. Loscalzo, Epigenetic modifications: basic mechanisms and role in cardiovascular disease. *Circulation* **123**, 2145-2156 (2011).
88. J. D. Watson, F. H. Crick, Molecular structure of nucleic acids: a structure for deoxyribose nucleic acid. J.D. Watson and F.H.C. Crick. Published in Nature, number 4356 April 25, 1953. *Nature* **248**, 765 (1974).
89. A. R. Cutter, J. J. Hayes, A brief review of nucleosome structure. *FEBS Lett* **589**, 2914-2922 (2015).
90. G. Arents, E. N. Moudrianakis, The histone fold: a ubiquitous architectural motif utilized in DNA compaction and protein dimerization. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 11170-11174 (1995).
91. G. D. Bowman, M. G. Poirier, Post-translational modifications of histones that influence nucleosome dynamics. *Chem Rev* **115**, 2274-2295 (2015).
92. K. Luger, A. W. Mader, R. K. Richmond, D. F. Sargent, T. J. Richmond, Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* **389**, 251-260 (1997).
93. L. Marino-Ramirez, M. G. Kann, B. A. Shoemaker, D. Landsman, Histone structure and nucleosome stability. *Expert Rev Proteomics* **2**, 719-729 (2005).
94. C. Zheng, J. J. Hayes, Structures and interactions of the core histone tail domains. *Biopolymers* **68**, 539-546 (2003).
95. K. Luger, J. C. Hansen, Nucleosome and chromatin fiber dynamics. *Curr Opin Struct Biol* **15**, 188-196 (2005).
96. N. Saksouk, E. Simboeck, J. Dejardin, Constitutive heterochromatin formation and transcription in mammals. *Epigenetics Chromatin* **8**, 3 (2015).
97. P. Trojer, D. Reinberg, Facultative heterochromatin: is there a distinctive molecular signature? *Mol Cell* **28**, 1-13 (2007).
98. R. T. Kamakaka, J. O. Thomas, Chromatin structure of transcriptionally competent and repressed genes. *EMBO J* **9**, 3997-4006 (1990).
99. H. Boeger, J. Griesenbeck, R. D. Kornberg, Nucleosome retention and the stochastic nature of promoter chromatin remodeling for transcription. *Cell* **133**, 716-726 (2008).
100. J. K. Kim, M. Samaranayake, S. Pradhan, Epigenetic mechanisms in mammals. *Cell Mol Life Sci* **66**, 596-612 (2009).
101. S. Biswas, C. M. Rao, Epigenetic tools (The Writers, The Readers and The Erasers) and their implications in cancer therapy. *Eur J Pharmacol* **837**, 8-24 (2018).
102. L. D. Moore, T. Le, G. Fan, DNA methylation and its basic function. *Neuropsychopharmacology* **38**, 23-38 (2013).

103. A. Hermann, R. Goyal, A. Jeltsch, The Dnmt1 DNA-(cytosine-C5)-methyltransferase methylates DNA processively with high preference for hemimethylated target sites. *J Biol Chem* **279**, 48350-48359 (2004).
104. M. Okano, S. Xie, E. Li, Cloning and characterization of a family of novel mammalian DNA (cytosine-5) methyltransferases. *Nat Genet* **19**, 219-220 (1998).
105. M. Okano, D. W. Bell, D. A. Haber, E. Li, DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell* **99**, 247-257 (1999).
106. Y. F. He *et al.*, Tet-mediated formation of 5-carboxylcytosine and its excision by TDG in mammalian DNA. *Science* **333**, 1303-1307 (2011).
107. A. Maiti, A. C. Drohat, Thymine DNA glycosylase can rapidly excise 5-formylcytosine and 5-carboxylcytosine: potential implications for active demethylation of CpG sites. *J Biol Chem* **286**, 35334-35338 (2011).
108. O. S. Anderson, K. E. Sant, D. C. Dolinoy, Nutrition and epigenetics: an interplay of dietary methyl donors, one-carbon metabolism and DNA methylation. *J Nutr Biochem* **23**, 853-859 (2012).
109. Z. D. Smith, A. Meissner, DNA methylation: roles in mammalian development. *Nat Rev Genet* **14**, 204-220 (2013).
110. E. Thinon, A. Percher, H. C. Hang, Bioorthogonal Chemical Reporters for Monitoring Unsaturated Fatty-Acylated Proteins. *Chembiochem* **17**, 1800-1803 (2016).
111. C. Choudhary, B. T. Weinert, Y. Nishida, E. Verdin, M. Mann, The growing landscape of lysine acetylation links metabolism and cell signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* **15**, 536-550 (2014).
112. G. J. Gowans *et al.*, Recognition of Histone Crotonylation by Taf14 Links Metabolic State to Gene Expression. *Mol Cell* **76**, 909-921 e903 (2019).
113. S. Trefely, M. T. Doan, N. W. Snyder, Crosstalk between cellular metabolism and histone acetylation. *Methods Enzymol* **626**, 1-21 (2019).
114. B. R. Sabari *et al.*, Intracellular crotonyl-CoA stimulates transcription through p300-catalyzed histone crotonylation. *Mol Cell* **58**, 203-215 (2015).
115. A. J. Bannister, T. Kouzarides, Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Res* **21**, 381-395 (2011).
116. C. Dhalluin *et al.*, Structure and ligand of a histone acetyltransferase bromodomain. *Nature* **399**, 491-496 (1999).
117. S. Mujtaba, L. Zeng, M. M. Zhou, Structure and acetyl-lysine recognition of the bromodomain. *Oncogene* **26**, 5521-5527 (2007).

118. R. Sanchez, M. M. Zhou, The role of human bromodomains in chromatin biology and gene transcription. *Curr Opin Drug Discov Devel* **12**, 659-665 (2009).
119. J. M. Schulze, A. Y. Wang, M. S. Kobor, YEATS domain proteins: a diverse family with many links to chromatin modification and transcription. *Biochem Cell Biol* **87**, 65-75 (2009).
120. Y. Li *et al.*, AF9 YEATS domain links histone acetylation to DOT1L-mediated H3K79 methylation. *Cell* **159**, 558-571 (2014).
121. L. Wan *et al.*, ENL links histone acetylation to oncogenic gene expression in acute myeloid leukaemia. *Nature* **543**, 265-269 (2017).
122. E. Nicolas, C. Roumillac, D. Trouche, Balance between acetylation and methylation of histone H3 lysine 9 on the E2F-responsive dihydrofolate reductase promoter. *Mol Cell Biol* **23**, 1614-1622 (2003).
123. M. R. Parthun, J. Widom, D. E. Gottschling, The major cytoplasmic histone acetyltransferase in yeast: links to chromatin replication and histone metabolism. *Cell* **87**, 85-94 (1996).
124. F. Fiorentino, A. Mai, D. Rotili, Lysine acetyltransferase inhibitors: structure-activity relationships and potential therapeutic implications. *Future Med Chem* **10**, 1067-1091 (2018).
125. F. Dyda, D. C. Klein, A. B. Hickman, GCN5-related N-acetyltransferases: a structural overview. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **29**, 81-103 (2000).
126. R. Marmorstein, Protein modules that manipulate histone tails for chromatin regulation. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**, 422-432 (2001).
127. A. Kimura, K. Matsubara, M. Horikoshi, A decade of histone acetylation: marking eukaryotic chromosomes with specific codes. *J Biochem* **138**, 647-662 (2005).
128. F. Wang, C. B. Marshall, M. Ikura, Transcriptional/epigenetic regulator CBP/p300 in tumorigenesis: structural and functional versatility in target recognition. *Cell Mol Life Sci* **70**, 3989-4008 (2013).
129. B. M. Dancy, P. A. Cole, Protein lysine acetylation by p300/CBP. *Chem Rev* **115**, 2419-2452 (2015).
130. M. W. Vetting *et al.*, Structure and functions of the GNAT superfamily of acetyltransferases. *Arch Biochem Biophys* **433**, 212-226 (2005).
131. M. H. Kuo *et al.*, Transcription-linked acetylation by Gcn5p of histones H3 and H4 at specific lysines. *Nature* **383**, 269-272 (1996).
132. P. A. Grant *et al.*, Expanded lysine acetylation specificity of Gcn5 in native complexes. *J Biol Chem* **274**, 5895-5900 (1999).

133. Y. M. Kuo, A. J. Andrews, Quantitating the specificity and selectivity of Gcn5-mediated acetylation of histone H3. *PLoS One* **8**, e54896 (2013).
134. R. L. Schiltz *et al.*, Overlapping but distinct patterns of histone acetylation by the human coactivators p300 and PCAF within nucleosomal substrates. *J Biol Chem* **274**, 1189-1192 (1999).
135. L. Zeng, Q. Zhang, G. Gerona-Navarro, N. Moshkina, M. M. Zhou, Structural basis of site-specific histone recognition by the bromodomains of human coactivators PCAF and CBP/p300. *Structure* **16**, 643-652 (2008).
136. A. Kristjuhan, J. Q. Svejstrup, Evidence for distinct mechanisms facilitating transcript elongation through chromatin in vivo. *EMBO J* **23**, 4243-4252 (2004).
137. V. Sampath *et al.*, Biochemical characterization of Hpa2 and Hpa3, two small closely related acetyltransferases from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **288**, 21506-21513 (2013).
138. Y. Lorch, J. Beve, C. M. Gustafsson, L. C. Myers, R. D. Kornberg, Mediator-nucleosome interaction. *Mol Cell* **6**, 197-201 (2000).
139. C. Das, M. S. Lucia, K. C. Hansen, J. K. Tyler, CBP/p300-mediated acetylation of histone H3 on lysine 56. *Nature* **459**, 113-117 (2009).
140. R. A. Henry, Y. M. Kuo, A. J. Andrews, Differences in specificity and selectivity between CBP and p300 acetylation of histone H3 and H3/H4. *Biochemistry* **52**, 5746-5759 (2013).
141. F. Tie *et al.*, CBP-mediated acetylation of histone H3 lysine 27 antagonizes Drosophila Polycomb silencing. *Development* **136**, 3131-3141 (2009).
142. A. Kimura, M. Horikoshi, Tip60 acetylates six lysines of a specific class in core histones in vitro. *Genes Cells* **3**, 789-800 (1998).
143. M. Ullah *et al.*, Molecular architecture of quartet MOZ/MORF histone acetyltransferase complexes. *Mol Cell Biol* **28**, 6828-6843 (2008).
144. A. K. Voss, C. Collin, M. P. Dixon, T. Thomas, Moz and retinoic acid coordinately regulate H3K9 acetylation, Hox gene expression, and segment identity. *Dev Cell* **17**, 674-686 (2009).
145. Y. Doyon *et al.*, ING tumor suppressor proteins are critical regulators of chromatin acetylation required for genome expression and perpetuation. *Mol Cell* **21**, 51-64 (2006).
146. G. G. Sharma *et al.*, MOF and histone H4 acetylation at lysine 16 are critical for DNA damage response and double-strand break repair. *Mol Cell Biol* **30**, 3582-3595 (2010).
147. M. Doi, J. Hirayama, P. Sassone-Corsi, Circadian regulator CLOCK is a histone acetyltransferase. *Cell* **125**, 497-508 (2006).

148. H. Wapenaar, F. J. Dekker, Histone acetyltransferases: challenges in targeting bi-substrate enzymes. *Clin Epigenetics* **8**, 59 (2016).
149. M. R. Parthun, Hat1: the emerging cellular roles of a type B histone acetyltransferase. *Oncogene* **26**, 5319-5328 (2007).
150. X. Yang *et al.*, HAT4, a Golgi apparatus-anchored B-type histone acetyltransferase, acetylates free histone H4 and facilitates chromatin assembly. *Mol Cell* **44**, 39-50 (2011).
151. A. Imhof *et al.*, Acetylation of general transcription factors by histone acetyltransferases. *Curr Biol* **7**, 689-692 (1997).
152. P. E. Kougnassoukou Tchira, P. Filippakopoulos, J. P. Lambert, Emerging tools to investigate bromodomain functions. *Methods*, (2019).
153. S. C. Kim *et al.*, Substrate and functional diversity of lysine acetylation revealed by a proteomics survey. *Mol Cell* **23**, 607-618 (2006).
154. B. R. Sabari, D. Zhang, C. D. Allis, Y. Zhao, Metabolic regulation of gene expression through histone acylations. *Nat Rev Mol Cell Biol* **18**, 90-101 (2017).
155. G. R. Wagner, R. M. Payne, Widespread and enzyme-independent Nepsilon-acetylation and Nepsilon-succinylation of proteins in the chemical conditions of the mitochondrial matrix. *J Biol Chem* **288**, 29036-29045 (2013).
156. A. J. de Ruijter, A. H. van Gennip, H. N. Caron, S. Kemp, A. B. van Kuilenburg, Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family. *Biochem J* **370**, 737-749 (2003).
157. A. A. Sauve, C. Wolberger, V. L. Schramm, J. D. Boeke, The biochemistry of sirtuins. *Annu Rev Biochem* **75**, 435-465 (2006).
158. M. W. Van Dyke, Lysine deacetylase (KDAC) regulatory pathways: an alternative approach to selective modulation. *ChemMedChem* **9**, 511-522 (2014).
159. K. Murray, The Occurrence of Epsilon-N-Methyl Lysine in Histones. *Biochemistry* **3**, 10-15 (1964).
160. E. L. Greer *et al.*, A histone methylation network regulates transgenerational epigenetic memory in *C. elegans*. *Cell Rep* **7**, 113-126 (2014).
161. S. G. Clarke, Protein methylation at the surface and buried deep: thinking outside the histone box. *Trends Biochem Sci* **38**, 243-252 (2013).
162. Y. Zhang, D. Reinberg, Transcription regulation by histone methylation: interplay between different covalent modifications of the core histone tails. *Genes Dev* **15**, 2343-2360 (2001).

163. S. C. Dillon, X. Zhang, R. C. Trievel, X. Cheng, The SET-domain protein superfamily: protein lysine methyltransferases. *Genome Biol* **6**, 227 (2005).
164. P. O. Falnes, M. E. Jakobsson, E. Davydova, A. Ho, J. Malecki, Protein lysine methylation by seven-beta-strand methyltransferases. *Biochem J* **473**, 1995-2009 (2016).
165. R. S. Blanc, S. Richard, Arginine Methylation: The Coming of Age. *Mol Cell* **65**, 8-24 (2017).
166. P. A. Cloos, J. Christensen, K. Agger, K. Helin, Erasing the methyl mark: histone demethylases at the center of cellular differentiation and disease. *Genes Dev* **22**, 1115-1140 (2008).
167. P. A. Jones, S. B. Baylin, The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet* **3**, 415-428 (2002).
168. S. B. Baylin, P. A. Jones, Epigenetic Determinants of Cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **8**, (2016).
169. M. Ehrlich, DNA hypomethylation in cancer cells. *Epigenomics* **1**, 239-259 (2009).
170. P. A. Jones, The DNA methylation paradox. *Trends Genet* **15**, 34-37 (1999).
171. M. Toyota *et al.*, CpG island methylator phenotype in colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 8681-8686 (1999).
172. W. M. Rideout, 3rd, G. A. Coetzee, A. F. Olumi, P. A. Jones, 5-Methylcytosine as an endogenous mutagen in the human LDL receptor and p53 genes. *Science* **249**, 1288-1290 (1990).
173. J. H. Yoon *et al.*, Methylated CpG dinucleotides are the preferential targets for G-to-T transversion mutations induced by benzo[a]pyrene diol epoxide in mammalian cells: similarities with the p53 mutation spectrum in smoking-associated lung cancers. *Cancer Res* **61**, 7110-7117 (2001).
174. J. P. Issa, Aging, DNA methylation and cancer. *Crit Rev Oncol Hematol* **32**, 31-43 (1999).
175. M. F. Fraga *et al.*, Loss of acetylation at Lys16 and trimethylation at Lys20 of histone H4 is a common hallmark of human cancer. *Nat Genet* **37**, 391-400 (2005).
176. I. Sur, J. Taipale, The role of enhancers in cancer. *Nat Rev Cancer* **16**, 483-493 (2016).
177. A. Farria, W. Li, S. Y. Dent, KATs in cancer: functions and therapies. *Oncogene* **34**, 4901-4913 (2015).
178. B. O. Wittschleben, J. Fellows, W. Du, D. J. Stillman, J. Q. Svejstrup, Overlapping roles for the histone acetyltransferase activities of SAGA and elongator in vivo. *EMBO J* **19**, 3060-3068 (2000).

179. A. V. Krivtsov, S. A. Armstrong, MLL translocations, histone modifications and leukaemia stem-cell development. *Nat Rev Cancer* **7**, 823-833 (2007).
180. L. Wang *et al.*, The leukemogenicity of AML1-ETO is dependent on site-specific lysine acetylation. *Science* **333**, 765-769 (2011).
181. J. Vervoorts *et al.*, Stimulation of c-MYC transcriptional activity and acetylation by recruitment of the cofactor CBP. *EMBO Rep* **4**, 484-490 (2003).
182. J. H. Patel *et al.*, The c-MYC oncoprotein is a substrate of the acetyltransferases hGCN5/PCAF and TIP60. *Mol Cell Biol* **24**, 10826-10834 (2004).
183. N. Reichert, M. A. Choukrallah, P. Matthias, Multiple roles of class I HDACs in proliferation, differentiation, and development. *Cell Mol Life Sci* **69**, 2173-2187 (2012).
184. J. Loven *et al.*, Selective inhibition of tumor oncogenes by disruption of super-enhancers. *Cell* **153**, 320-334 (2013).
185. J. E. Delmore *et al.*, BET bromodomain inhibition as a therapeutic strategy to target c-Myc. *Cell* **146**, 904-917 (2011).
186. Y. Zhang, A. Chen, X. M. Yan, G. Huang, Disordered epigenetic regulation in MLL-related leukemia. *Int J Hematol* **96**, 428-437 (2012).
187. W. J. Harris *et al.*, The histone demethylase KDM1A sustains the oncogenic potential of MLL-AF9 leukemia stem cells. *Cancer Cell* **21**, 473-487 (2012).
188. K. H. Kim, C. W. Roberts, Targeting EZH2 in cancer. *Nat Med* **22**, 128-134 (2016).
189. C. Vardabasso *et al.*, Histone variants: emerging players in cancer biology. *Cell Mol Life Sci* **71**, 379-404 (2014).
190. S. Henikoff, M. M. Smith, Histone variants and epigenetics. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **7**, a019364 (2015).
191. D. K. Palmer, K. O'Day, R. L. Margolis, The centromere specific histone CENP-A is selectively retained in discrete foci in mammalian sperm nuclei. *Chromosoma* **100**, 32-36 (1990).
192. D. Filipescu, E. Szenker, G. Almouzni, Developmental roles of histone H3 variants and their chaperones. *Trends Genet* **29**, 630-640 (2013).
193. N. Dhillon, M. Oki, S. J. Szyjka, O. M. Aparicio, R. T. Kamakaka, H2A.Z functions to regulate progression through the cell cycle. *Mol Cell Biol* **26**, 489-501 (2006).
194. R. Domaschenz, S. Kurscheid, M. Nekrasov, S. Han, D. J. Tremethick, The Histone Variant H2A.Z Is a Master Regulator of the Epithelial-Mesenchymal Transition. *Cell Rep* **21**, 943-952 (2017).

195. T. Tomonaga *et al.*, Overexpression and mistargeting of centromere protein-A in human primary colorectal cancer. *Cancer Res* **63**, 3511-3516 (2003).
196. S. L. McGovern, Y. Qi, L. Pusztai, W. F. Symmans, T. A. Buchholz, Centromere protein-A, an essential centromere protein, is a prognostic marker for relapse in estrogen receptor-positive breast cancer. *Breast Cancer Res* **14**, R72 (2012).
197. Q. Wu *et al.*, Expression and prognostic significance of centromere protein A in human lung adenocarcinoma. *Lung Cancer* **77**, 407-414 (2012).
198. J. Schwartzenuber *et al.*, Driver mutations in histone H3.3 and chromatin remodelling genes in paediatric glioblastoma. *Nature* **482**, 226-231 (2012).
199. S. Behjati *et al.*, Distinct H3F3A and H3F3B driver mutations define chondroblastoma and giant cell tumor of bone. *Nat Genet* **45**, 1479-1482 (2013).
200. C. Lu *et al.*, Histone H3K36 mutations promote sarcomagenesis through altered histone methylation landscape. *Science* **352**, 844-849 (2016).
201. D. Fang *et al.*, The histone H3.3K36M mutation reprograms the epigenome of chondroblastomas. *Science* **352**, 1344-1348 (2016).
202. B. Lehnertz *et al.*, H3(K27M/I) mutations promote context-dependent transformation in acute myeloid leukemia with RUNX1 alterations. *Blood* **130**, 2204-2214 (2017).
203. D. C. Liang *et al.*, Cooperating gene mutations in childhood acute myeloid leukemia with special reference on mutations of ASXL1, TET2, IDH1, IDH2, and DNMT3A. *Blood* **121**, 2988-2995 (2013).
204. L. I. Shlush *et al.*, Identification of pre-leukaemic haematopoietic stem cells in acute leukaemia. *Nature* **506**, 328-333 (2014).
205. P. A. Ho *et al.*, Leukemic mutations in the methylation-associated genes DNMT3A and IDH2 are rare events in pediatric AML: a report from the Children's Oncology Group. *Pediatr Blood Cancer* **57**, 204-209 (2011).
206. F. Thol *et al.*, DNMT3A mutations are rare in childhood acute myeloid leukemia. *Haematologica* **96**, 1238-1240 (2011).
207. I. H. Hollink *et al.*, Low frequency of DNMT3A mutations in pediatric AML, and the identification of the OCI-AML3 cell line as an in vitro model. *Leukemia* **26**, 371-373 (2012).
208. S. J. Kim *et al.*, A DNMT3A mutation common in AML exhibits dominant-negative effects in murine ES cells. *Blood* **122**, 4086-4089 (2013).
209. M. E. Figueroa *et al.*, DNA methylation signatures identify biologically distinct subtypes in acute myeloid leukemia. *Cancer Cell* **17**, 13-27 (2010).

210. S. M. Greenblatt, S. D. Nimer, Chromatin modifiers and the promise of epigenetic therapy in acute leukemia. *Leukemia* **28**, 1396-1406 (2014).
211. C. G. Mullighan *et al.*, CREBBP mutations in relapsed acute lymphoblastic leukaemia. *Nature* **471**, 235-239 (2011).
212. P. Ntziachristos *et al.*, Genetic inactivation of the polycomb repressive complex 2 in T cell acute lymphoblastic leukemia. *Nat Med* **18**, 298-301 (2012).
213. V. Schafer *et al.*, EZH2 mutations and promoter hypermethylation in childhood acute lymphoblastic leukemia. *J Cancer Res Clin Oncol* **142**, 1641-1650 (2016).
214. R. Cao *et al.*, Role of histone H3 lysine 27 methylation in Polycomb-group silencing. *Science* **298**, 1039-1043 (2002).
215. A. Puda *et al.*, Frequent deletions of JARID2 in leukemic transformation of chronic myeloid malignancies. *Am J Hematol* **87**, 245-250 (2012).
216. S. E. Mahoney, Z. Yao, C. C. Keyes, S. J. Tapscott, S. J. Diede, Genome-wide DNA methylation studies suggest distinct DNA methylation patterns in pediatric embryonal and alveolar rhabdomyosarcomas. *Epigenetics* **7**, 400-408 (2012).
217. M. Seki *et al.*, Integrated genetic and epigenetic analysis defines novel molecular subgroups in rhabdomyosarcoma. *Nat Commun* **6**, 7557 (2015).
218. W. Sun *et al.*, Relationship of DNA methylation to mutational changes and transcriptional organization in fusion-positive and fusion-negative rhabdomyosarcoma. *Int J Cancer* **144**, 2707-2717 (2019).
219. R. Ciarapica *et al.*, Deregulated expression of miR-26a and Ezh2 in rhabdomyosarcoma. *Cell Cycle* **8**, 172-175 (2009).
220. I. M. Bennani-Baiti, I. Machado, A. Llombart-Bosch, H. Kovar, Lysine-specific demethylase 1 (LSD1/KDM1A/AOF2/BHC110) is expressed and is an epigenetic drug target in chondrosarcoma, Ewing's sarcoma, osteosarcoma, and rhabdomyosarcoma. *Hum Pathol* **43**, 1300-1307 (2012).
221. H. Wang *et al.*, NF-kappaB-YY1-miR-29 regulatory circuitry in skeletal myogenesis and rhabdomyosarcoma. *Cancer Cell* **14**, 369-381 (2008).
222. A. V. Bhat *et al.*, Epigenetic Regulation of the PTEN-AKT-RAC1 Axis by G9a Is Critical for Tumor Growth in Alveolar Rhabdomyosarcoma. *Cancer Res* **79**, 2232-2243 (2019).
223. J. W. Martin, J. A. Squire, M. Zielenska, The genetics of osteosarcoma. *Sarcoma* **2012**, 627254 (2012).
224. J. J. Morrow, C. Khanna, Osteosarcoma Genetics and Epigenetics: Emerging Biology and Candidate Therapies. *Crit Rev Oncog* **20**, 173-197 (2015).

225. J. Xu *et al.*, An integrative analysis of DNA methylation in osteosarcoma. *J Bone Oncol* **9**, 34-40 (2017).
226. J. M. Rosenblum *et al.*, Predictive properties of DNA methylation patterns in primary tumor samples for osteosarcoma relapse status. *Epigenetics* **10**, 31-39 (2015).
227. P. Chaiyawat *et al.*, Expression patterns of class I histone deacetylases in osteosarcoma: a novel prognostic marker with potential therapeutic implications. *Mod Pathol* **31**, 264-274 (2018).
228. S. Talluri, F. A. Dick, Regulation of transcription and chromatin structure by pRB: here, there and everywhere. *Cell Cycle* **11**, 3189-3198 (2012).
229. Y. Qi *et al.*, HEDD: the human epigenetic drug database. *Database (Oxford)* **2016**, (2016).
230. T. Eckschlager, J. Pich, M. Stiborova, J. Hrabeta, Histone Deacetylase Inhibitors as Anticancer Drugs. *Int J Mol Sci* **18**, (2017).
231. M. A. Salvador *et al.*, The histone deacetylase inhibitor abexinostat induces cancer stem cells differentiation in breast cancer with low Xist expression. *Clin Cancer Res* **19**, 6520-6531 (2013).
232. R. W. Robey *et al.*, Histone deacetylase inhibitors: emerging mechanisms of resistance. *Mol Pharm* **8**, 2021-2031 (2011).
233. J. L. Dahlin *et al.*, Assay interference and off-target liabilities of reported histone acetyltransferase inhibitors. *Nat Commun* **8**, 1527 (2017).
234. L. M. Lasko *et al.*, Discovery of a selective catalytic p300/CBP inhibitor that targets lineage-specific tumours. *Nature* **550**, 128-132 (2017).
235. P. Filippakopoulos *et al.*, Histone recognition and large-scale structural analysis of the human bromodomain family. *Cell* **149**, 214-231 (2012).
236. X. Li *et al.*, Structure-guided development of YEATS domain inhibitors by targeting pi-pi stacking. *Nat Chem Biol* **14**, 1140-1149 (2018).
237. C. Pivot-Pajot *et al.*, Acetylation-dependent chromatin reorganization by BRDT, a testis-specific bromodomain-containing protein. *Mol Cell Biol* **23**, 5354-5365 (2003).
238. E. Bourova-Flin, F. Chuffart, S. Rousseaux, S. Khochbin, The Role of Bromodomain Testis-Specific Factor, BRDT, in Cancer: A Biomarker and A Possible Therapeutic Target. *Cell J* **19**, 1-8 (2017).
239. J. P. Lambert *et al.*, Interactome Rewiring Following Pharmacological Targeting of BET Bromodomains. *Mol Cell* **73**, 621-638 e617 (2019).

240. E. Nicodeme *et al.*, Suppression of inflammation by a synthetic histone mimic. *Nature* **468**, 1119-1123 (2010).
241. M. Perez-Salvia, M. Esteller, Bromodomain inhibitors and cancer therapy: From structures to applications. *Epigenetics* **12**, 323-339 (2017).
242. A. M. Kurimchak *et al.*, Resistance to BET Bromodomain Inhibitors Is Mediated by Kinome Reprogramming in Ovarian Cancer. *Cell Rep* **16**, 1273-1286 (2016).
243. S. Sarkar, S. Goldgar, S. Byler, S. Rosenthal, S. Heerboth, Demethylation and re-expression of epigenetically silenced tumor suppressor genes: sensitization of cancer cells by combination therapy. *Epigenomics* **5**, 87-94 (2013).
244. G. Garcia-Manero *et al.*, Phase 1/2 study of the combination of 5-aza-2'-deoxycytidine with valproic acid in patients with leukemia. *Blood* **108**, 3271-3279 (2006).
245. S. D. Gore *et al.*, Combined DNA methyltransferase and histone deacetylase inhibition in the treatment of myeloid neoplasms. *Cancer Res* **66**, 6361-6369 (2006).
246. P. Maslak *et al.*, Pilot study of combination transcriptional modulation therapy with sodium phenylbutyrate and 5-azacytidine in patients with acute myeloid leukemia or myelodysplastic syndrome. *Leukemia* **20**, 212-217 (2006).
247. A. O. Soriano *et al.*, Safety and clinical activity of the combination of 5-azacytidine, valproic acid, and all-trans retinoic acid in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome. *Blood* **110**, 2302-2308 (2007).
248. M. T. Voso *et al.*, Valproic acid at therapeutic plasma levels may increase 5-azacytidine efficacy in higher risk myelodysplastic syndromes. *Clin Cancer Res* **15**, 5002-5007 (2009).
249. G. Garcia-Manero *et al.*, A phase 1b/2b multicenter study of oral panobinostat plus azacitidine in adults with MDS, CMML or AML with 30% blasts. *Leukemia* **31**, 2799-2806 (2017).
250. T. Prebet *et al.*, Prolonged administration of azacitidine with or without entinostat for myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia with myelodysplasia-related changes: results of the US Leukemia Intergroup trial E1905. *J Clin Oncol* **32**, 1242-1248 (2014).
251. S. L. Gaillard *et al.*, A phase 1 trial of the oral DNA methyltransferase inhibitor CC-486 and the histone deacetylase inhibitor romidepsin in advanced solid tumors. *Cancer* **125**, 2837-2845 (2019).
252. J. Lin *et al.*, A phase I dose-finding study of 5-azacytidine in combination with sodium phenylbutyrate in patients with refractory solid tumors. *Clin Cancer Res* **15**, 6241-6249 (2009).

253. A. N. Khan, C. J. Gregorie, T. B. Tomasi, Histone deacetylase inhibitors induce TAP, LMP, Tapasin genes and MHC class I antigen presentation by melanoma cells. *Cancer Immunol Immunother* **57**, 647-654 (2008).
254. E. Fratta *et al.*, The biology of cancer testis antigens: putative function, regulation and therapeutic potential. *Mol Oncol* **5**, 164-182 (2011).
255. B. Costantini *et al.*, The effects of 5-azacytidine on the function and number of regulatory T cells and T-effectors in myelodysplastic syndrome. *Haematologica* **98**, 1196-1205 (2013).
256. A. Pfeiffer, H. Shi, J. M. Tepperman, Y. Zhang, P. H. Quail, Combinatorial complexity in a transcriptionally centered signaling hub in Arabidopsis. *Mol Plant* **7**, 1598-1618 (2014).
257. H. Zheng *et al.*, HDAC Inhibitors Enhance T-Cell Chemokine Expression and Augment Response to PD-1 Immunotherapy in Lung Adenocarcinoma. *Clin Cancer Res* **22**, 4119-4132 (2016).
258. K. Kim *et al.*, Eradication of metastatic mouse cancers resistant to immune checkpoint blockade by suppression of myeloid-derived cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**, 11774-11779 (2014).
259. M. Shakibaei *et al.*, Curcumin enhances the effect of chemotherapy against colorectal cancer cells by inhibition of NF-kappaB and Src protein kinase signaling pathways. *PLoS One* **8**, e57218 (2013).
260. J. Li *et al.*, Epigenetic targeting drugs potentiate chemotherapeutic effects in solid tumor therapy. *Sci Rep* **7**, 4035 (2017).
261. G. Garcia-Manero *et al.*, Phase II trial of vorinostat with idarubicin and cytarabine for patients with newly diagnosed acute myelogenous leukemia or myelodysplastic syndrome. *J Clin Oncol* **30**, 2204-2210 (2012).
262. M. J. Burke *et al.*, A therapeutic trial of decitabine and vorinostat in combination with chemotherapy for relapsed/refractory acute lymphoblastic leukemia. *Am J Hematol* **89**, 889-895 (2014).
263. A. F. M. Botelho, F. Pierezan, B. Soto-Blanco, M. M. Melo, A review of cardiac glycosides: Structure, toxicokinetics, clinical signs, diagnosis and antineoplastic potential. *Toxicol* **158**, 63-68 (2019).
264. H. A. Fozzard, M. F. Sheets, Cellular mechanism of action of cardiac glycosides. *J Am Coll Cardiol* **5**, 10A-15A (1985).
265. Y. Pirahanchi, N. R. Aeddula, in *StatPearls*. (Treasure Island (FL), 2019).

266. S. Kanji, R. D. MacLean, Cardiac glycoside toxicity: more than 200 years and counting. *Crit Care Clin* **28**, 527-535 (2012).
267. G. M. Currie, J. M. Wheat, H. Kiat, Pharmacokinetic considerations for digoxin in older people. *Open Cardiovasc Med J* **5**, 130-135 (2011).
268. K. E. Andersson, A. Bertler, A. Redfors, On the pharmacokinetics of proscillaridin A in man. *Eur J Clin Pharmacol* **8**, 421-425 (1975).
269. R. I. Dmitrieva, P. A. Doris, Cardiotonic steroids: potential endogenous sodium pump ligands with diverse function. *Exp Biol Med (Maywood)* **227**, 561-569 (2002).
270. M. Komajda *et al.*, The EuroHeart Failure Survey programme--a survey on the quality of care among patients with heart failure in Europe. Part 2: treatment. *Eur Heart J* **24**, 464-474 (2003).
271. M. Schulz, A. Schmoldt, Therapeutic and toxic blood concentrations of more than 500 drugs. *Pharmazie* **52**, 895-911 (1997).
272. K. E. Andersson, B. Bergdah, A. Bertler, A. Redfors, On the absorption of proscillaridin A after single oral doses to normal and achlorhydric subjects. *Acta Pharmacol Toxicol (Copenh)* **40**, 153-160 (1977).
273. D. Perrier, M. Mayersohn, F. I. Marcus, Clinical pharmacokinetics of digitoxin. *Clin Pharmacokinet* **2**, 292-311 (1977).
274. O. Shiratori, Growth inhibitory effect of cardiac glycosides and aglycones on neoplastic cells: in vitro and in vivo studies. *Gan* **58**, 521-528 (1967).
275. I. Prassas, E. P. Diamandis, Novel therapeutic applications of cardiac glycosides. *Nat Rev Drug Discov* **7**, 926-935 (2008).
276. P. Kometiani, L. Liu, A. Askari, Digitalis-induced signaling by Na⁺/K⁺-ATPase in human breast cancer cells. *Mol Pharmacol* **67**, 929-936 (2005).
277. E. Denicolai *et al.*, Proscillaridin A is cytotoxic for glioblastoma cell lines and controls tumor xenograft growth in vivo. *Oncotarget* **5**, 10934-10948 (2014).
278. M. Tailler *et al.*, Antineoplastic activity of ouabain and pyrithione zinc in acute myeloid leukemia. *Oncogene* **31**, 3536-3546 (2012).
279. T. P. Ahern, T. L. Lash, H. T. Sorensen, L. Pedersen, Digoxin treatment is associated with an increased incidence of breast cancer: a population-based case-control study. *Breast Cancer Res* **10**, R102 (2008).
280. R. A. Karasneh, L. J. Murray, C. R. Cardwell, Cardiac glycosides and breast cancer risk: A systematic review and meta-analysis of observational studies. *Int J Cancer* **140**, 1035-1041 (2017).

281. M. H. Osman *et al.*, Cardiac glycosides use and the risk and mortality of cancer; systematic review and meta-analysis of observational studies. *PLoS One* **12**, e0178611 (2017).
282. J. Ye, S. Chen, T. Maniatis, Cardiac glycosides are potent inhibitors of interferon-beta gene expression. *Nat Chem Biol* **7**, 25-33 (2011).
283. L. Menger *et al.*, Cardiac glycosides exert anticancer effects by inducing immunogenic cell death. *Sci Transl Med* **4**, 143ra199 (2012).
284. B. Yuan *et al.*, Effects of active bufadienolide compounds on human cancer cells and CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells in mitogen-activated human peripheral blood mononuclear cells. *Oncol Rep* **36**, 1377-1384 (2016).
285. M. Ramirez-Ortega *et al.*, Proliferation and apoptosis of HeLa cells induced by in vitro stimulation with digitalis. *Eur J Pharmacol* **534**, 71-76 (2006).
286. T. Juncker *et al.*, UNBS1450, a steroid cardiac glycoside inducing apoptotic cell death in human leukemia cells. *Biochem Pharmacol* **81**, 13-23 (2011).
287. Y. He *et al.*, Proscillaridin A induces apoptosis, inhibits STAT3 activation and augments doxorubicin toxicity in prostate cancer cells. *Int J Med Sci* **15**, 832-839 (2018).
288. X. H. Kang *et al.*, Degradation of Mcl-1 through GSK-3beta Activation Regulates Apoptosis Induced by Bufalin in Non-Small Cell Lung Cancer H1975 Cells. *Cell Physiol Biochem* **41**, 2067-2076 (2017).
289. R. Berges *et al.*, Proscillaridin A exerts anti-tumor effects through GSK3beta activation and alteration of microtubule dynamics in glioblastoma. *Cell Death Dis* **9**, 984 (2018).
290. S. Frese *et al.*, Cardiac glycosides initiate Apo2L/TRAIL-induced apoptosis in non-small cell lung cancer cells by up-regulation of death receptors 4 and 5. *Cancer Res* **66**, 5867-5874 (2006).
291. P. B. Raghavendra, Y. Sreenivasan, S. K. Manna, Oleandrin induces apoptosis in human, but not in murine cells: dephosphorylation of Akt, expression of FasL, and alteration of membrane fluidity. *Mol Immunol* **44**, 2292-2302 (2007).
292. R. Z. Li *et al.*, Proscillaridin A induces apoptosis and suppresses non-small-cell lung cancer tumor growth via calcium-induced DR4 upregulation. *Cell Death Dis* **9**, 696 (2018).
293. R. A. Newman *et al.*, Autophagic cell death of human pancreatic tumor cells mediated by oleandrin, a lipid-soluble cardiac glycoside. *Integr Cancer Ther* **6**, 354-364 (2007).
294. Y. Wang *et al.*, Cardiac glycosides induce autophagy in human non-small cell lung cancer cells through regulation of dual signaling pathways. *Int J Biochem Cell Biol* **44**, 1813-1824 (2012).

295. A. Trenti *et al.*, Cardiac glycoside ouabain induces autophagic cell death in non-small cell lung cancer cells via a JNK-dependent decrease of Bcl-2. *Biochem Pharmacol* **89**, 197-209 (2014).
296. T. Mijatovic *et al.*, The alpha1 subunit of the sodium pump could represent a novel target to combat non-small cell lung cancers. *J Pathol* **212**, 170-179 (2007).
297. F. Radogna *et al.*, Cell type-dependent ROS and mitophagy response leads to apoptosis or necroptosis in neuroblastoma. *Oncogene* **35**, 3839-3853 (2016).
298. V. Pongrakhananon, P. Chunchacha, P. Chanvorachote, Ouabain suppresses the migratory behavior of lung cancer cells. *PLoS One* **8**, e68623 (2013).
299. N. F. Schneider *et al.*, Inhibition of cell proliferation, invasion and migration by the cardenolides digitoxigenin monodigitoxoside and convallatoxin in human lung cancer cell line. *Nat Prod Res* **30**, 1327-1331 (2016).
300. D. Wang, Z. Bi, Bufalin inhibited the growth of human osteosarcoma MG-63 cells via down-regulation of Bcl-2/Bax and triggering of the mitochondrial pathway. *Tumour Biol* **35**, 4885-4890 (2014).
301. X. Liu *et al.*, Bufalin inhibits pancreatic cancer by inducing cell cycle arrest via the c-Myc/NF-kappaB pathway. *J Ethnopharmacol* **193**, 538-545 (2016).
302. A. Y. Bagrov, J. I. Shapiro, O. V. Fedorova, Endogenous cardiogenic steroids: physiology, pharmacology, and novel therapeutic targets. *Pharmacol Rev* **61**, 9-38 (2009).
303. S. Y. Yang, N. H. Kim, Y. S. Cho, H. Lee, H. J. Kwon, Convallatoxin, a dual inducer of autophagy and apoptosis, inhibits angiogenesis in vitro and in vivo. *PLoS One* **9**, e91094 (2014).
304. N. Tang *et al.*, Gamabufotalin, a major derivative of bufadienolide, inhibits VEGF-induced angiogenesis by suppressing VEGFR-2 signaling pathway. *Oncotarget* **7**, 3533-3547 (2016).
305. D. H. Lee *et al.*, Cardiac glycosides suppress the maintenance of stemness and malignancy via inhibiting HIF-1alpha in human glioma stem cells. *Oncotarget* **8**, 40233-40245 (2017).
306. J. Felth *et al.*, Cytotoxic effects of cardiac glycosides in colon cancer cells, alone and in combination with standard chemotherapeutic drugs. *J Nat Prod* **72**, 1969-1974 (2009).
307. J. M. Calderon-Montano, E. Burgos-Moron, M. Lopez-Lazaro, The in vivo antitumor activity of cardiac glycosides in mice xenografted with human cancer cells is probably an experimental artifact. *Oncogene* **33**, 2947-2948 (2014).

308. H. Wang, C. Zhang, H. Chi, Z. Meng, Synergistic anti-hepatoma effect of bufalin combined with sorafenib via mediating the tumor vascular microenvironment by targeting mTOR/VEGF signaling. *Int J Oncol* **52**, 2051-2060 (2018).
309. K. Deng *et al.*, Sodium chloride (NaCl) potentiates digoxin-induced anti-tumor activity in small cell lung cancer. *Cancer Biol Ther* **20**, 52-64 (2019).
310. L. Han *et al.*, Cytocidal effects of arenobufagin and hellebrigenin, two active bufadienolide compounds, against human glioblastoma cell line U-87. *Int J Oncol* **53**, 2488-2502 (2018).
311. N. J. Raynal *et al.*, Targeting Calcium Signaling Induces Epigenetic Reactivation of Tumor Suppressor Genes in Cancer. *Cancer Res* **76**, 1494-1505 (2016).
312. S. B. Baylin, P. A. Jones, A decade of exploring the cancer epigenome - biological and translational implications. *Nat Rev Cancer* **11**, 726-734 (2011).
313. R. Taby, J. P. Issa, Cancer epigenetics. *CA Cancer J Clin* **60**, 376-392 (2010).
314. E. M. Da Costa, G. McInnes, A. Beaudry, N. J. Raynal, DNA Methylation-Targeted Drugs. *Cancer J* **23**, 270-276 (2017).
315. E. H. Estey, Epigenetics in clinical practice: the examples of azacitidine and decitabine in myelodysplasia and acute myeloid leukemia. *Leukemia* **27**, 1803-1812 (2013).
316. K. J. Falkenberg, R. W. Johnstone, Histone deacetylases and their inhibitors in cancer, neurological diseases and immune disorders. *Nat Rev Drug Discov* **13**, 673-691 (2014).
317. N. J. Raynal *et al.*, Repositioning FDA-Approved Drugs in Combination with Epigenetic Drugs to Reprogram Colon Cancer Epigenome. *Mol Cancer Ther* **16**, 397-407 (2017).
318. J. E. Bradner, D. Hnisz, R. A. Young, Transcriptional Addiction in Cancer. *Cell* **168**, 629-643 (2017).
319. E. M. Da Costa *et al.*, Heart failure drug proscillaridin A targets MYC overexpressing leukemia through global loss of lysine acetylation. *J Exp Clin Cancer Res* **38**, 251 (2019).
320. J. Steinberger *et al.*, Tracing MYC Expression for Small Molecule Discovery. *Cell Chem Biol* **26**, 699-710 e696 (2019).
321. A. Drazic, L. M. Myklebust, R. Ree, T. Arnesen, The world of protein acetylation. *Biochim Biophys Acta* **1864**, 1372-1401 (2016).
322. D. Chen, M. Frezza, S. Schmitt, J. Kanwar, Q. P. Dou, Bortezomib as the first proteasome inhibitor anticancer drug: current status and future perspectives. *Curr Cancer Drug Targets* **11**, 239-253 (2011).
323. L. Meng *et al.*, Epoxomicin, a potent and selective proteasome inhibitor, exhibits in vivo antiinflammatory activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 10403-10408 (1999).

324. R. Schwartz, T. Davidson, Pharmacology, pharmacokinetics, and practical applications of bortezomib. *Oncology (Williston Park)* **18**, 14-21 (2004).
325. F. M. Suk *et al.*, Bortezomib inhibits Burkitt's lymphoma cell proliferation by downregulating sumoylated hnRNP K and c-Myc expression. *Oncotarget* **6**, 25988-26001 (2015).
326. A. S. Farrell, R. C. Sears, MYC degradation. *Cold Spring Harb Perspect Med* **4**, (2014).
327. K. Coffey *et al.*, Characterisation of a Tip60 specific inhibitor, NU9056, in prostate cancer. *PLoS One* **7**, e45539 (2012).
328. A. C. Harmon, M. Gribskov, J. F. Harper, CDPKs - a kinase for every Ca²⁺ signal? *Trends Plant Sci* **5**, 154-159 (2000).
329. N. Li, C. Wang, Y. Wu, X. Liu, X. Cao, Ca⁽²⁺⁾/calmodulin-dependent protein kinase II promotes cell cycle progression by directly activating MEK1 and subsequently modulating p27 phosphorylation. *J Biol Chem* **284**, 3021-3027 (2009).
330. A. Ciechanover, Intracellular protein degradation: from a vague idea thru the lysosome and the ubiquitin-proteasome system and onto human diseases and drug targeting. *Cell Death Differ* **12**, 1178-1190 (2005).
331. V. Cianfanelli *et al.*, AMBRA1 links autophagy to cell proliferation and tumorigenesis by promoting c-Myc dephosphorylation and degradation. *Nat Cell Biol* **17**, 706 (2015).
332. I. Annunziata *et al.*, MYC competes with MiT/TFE in regulating lysosomal biogenesis and autophagy through an epigenetic rheostat. *Nat Commun* **10**, 3623 (2019).
333. L. Liu *et al.*, Deregulated MYC expression induces dependence upon AMPK-related kinase 5. *Nature* **483**, 608-612 (2012).
334. T. Monteverde *et al.*, Calcium signalling links MYC to NUA1. *Oncogene* **37**, 982-992 (2018).
335. P. Raffeiner *et al.*, Calcium-dependent binding of Myc to calmodulin. *Oncotarget* **8**, 3327-3343 (2017).
336. X. Y. Zhang, P. Y. Zhang, Combinations in multimodality treatments and clinical outcomes during cancer. *Oncol Lett* **12**, 4301-4304 (2016).
337. L. H. Li, E. J. Olin, T. J. Fraser, B. K. Bhuyan, Phase specificity of 5-azacytidine against mammalian cells in tissue culture. *Cancer Res* **30**, 2770-2775 (1970).
338. D. K. Krishnadas, L. Bao, F. Bai, S. C. Chencheri, K. Lucas, Decitabine facilitates immune recognition of sarcoma cells by upregulating CT antigens, MHC molecules, and ICAM-1. *Tumour Biol* **35**, 5753-5762 (2014).

339. D. K. Krishnadas *et al.*, A phase I trial combining decitabine/dendritic cell vaccine targeting MAGE-A1, MAGE-A3 and NY-ESO-1 for children with relapsed or therapy-refractory neuroblastoma and sarcoma. *Cancer Immunol Immunother* **64**, 1251-1260 (2015).
340. Y. Gu *et al.*, Stabilization of the c-Myc Protein by CAMKIIgamma Promotes T Cell Lymphoma. *Cancer Cell* **32**, 115-128 e117 (2017).
341. M. Faouzi *et al.*, ORAI3 silencing alters cell proliferation and cell cycle progression via c-myc pathway in breast cancer cells. *Biochim Biophys Acta* **1833**, 752-760 (2013).
342. J. Backs, E. N. Olson, Control of cardiac growth by histone acetylation/deacetylation. *Circ Res* **98**, 15-24 (2006).
343. J. Backs, K. Song, S. Bezprozvannaya, S. Chang, E. N. Olson, CaM kinase II selectively signals to histone deacetylase 4 during cardiomyocyte hypertrophy. *J Clin Invest* **116**, 1853-1864 (2006).

Annexes

1. Annexe 1: Revue de littérature « DNA methylation-targeted drugs ».

Description: Les thérapies épigénétiques incluant les médicaments déméthylants de l'ADN sont approuvées pour le traitement contre les cancers hématopoïétiques. Dans cette revue de littérature, nous détaillons les mécanismes d'action de ces médicaments déméthylants de l'ADN ainsi que les résistances associées. Nous décrivons le potentiel synergique de combiner ces médicaments avec des molécules ciblant la chromatine ou avec des traitements d'immunothérapie pour le traitement contre les cancers hématopoïétiques et les cancers solides. Dans ce projet, j'ai participé à l'élaboration du manuscrit et à la conception des figures.

DNA Methylation–Targeted Drugs

Elodie M. Da Costa, Gabrielle McInnes, Annie Beaudry, and Noël J.-M. Raynal, PhD

Abstract: Targeting DNA hypermethylation, using nucleoside analogs, is an efficient approach to reprogram cancer cell epigenome leading to reduced proliferation, increased differentiation, recognition by the immune system, and ultimately cancer cell death. DNA methyltransferase inhibitors have been approved for the treatment of myelodysplastic syndromes, chronic myelomonocytic leukemia, and acute myelogenous leukemia. To improve clinical efficacy and overcome mechanisms of drug resistance, a second generation of DNA methyltransferase inhibitors has been designed and is currently in clinical trials. Although efficient in monotherapy against hematologic malignancies, the potential of DNA methyltransferase inhibitors to synergize with small molecules targeting chromatin or immunotherapy will provide additional opportunities for their future clinical application against leukemia and solid tumors.

Key Words: azacitidine, decitabine, DNA methyltransferase inhibitors, drug resistance, epigenetic drug combination, guadecitabine

(*Cancer J* 2017;23: 270–276)

DISCOVERY OF DNA METHYLTRANSFERASE INHIBITORS

The first generation of DNA methylation inhibitors (DNMTIs), including 5-aza-cytidine (azacitidine) and 5-aza-2'-deoxycytidine (decitabine), was developed as classic antimetabolites for cancer chemotherapy in the 1960s at the Czechoslovak Academy of Science in Prague. Azacitidine and decitabine are, respectively, cytidine and 2'-deoxycytidine analogs, in which the carbon in the fifth position of the pyrimidine ring has been replaced by a nitrogen (Fig. 1). The antineoplastic activity of azacitidine and decitabine was demonstrated in preclinical models of leukemia.^{1,2} Although their mechanism of action was not entirely characterized, they were considered cytotoxic and S-phase specific because of their incorporation into DNA.^{3,4} Their potent *in vitro* and *in vivo* anti-leukemic activities justified the onset of clinical trials against acute lymphoblastic leukemia and acute myeloblastic leukemia (AML). The first clinical study with azacitidine was conducted in the 1970s, in children with relapsed acute leukemia, using what is considered nowadays high dosage (200 mg/m² per day for 5 days). Significant clinical activity and complete remissions, which lasted between 2 and 8 months, were observed. Interestingly, AML patients resistant to cytosine arabinoside responded to azacitidine, which suggested a potential treatment for refractory cases.^{5–7} Decitabine was tested in clinical trials in the early 1980s, against advanced leukemia in children and adult patients using high doses (1500–2250 mg/m²). Decitabine therapy produced complete remissions, which were of short duration but induced prolonged myelosuppression (4–6 weeks).^{8,9} Therefore, by using DNMTIs

at their maximal tolerated dose (like classic cytotoxic drugs), the first series of clinical trials lead to responses of short duration mainly in leukemia, while producing prolonged hematopoietic toxicity.¹⁰

In seminal studies published in the late 1970s to early 1980s, Constantinides et al.¹¹ and Taylor and Jones^{12,13} demonstrated that aza-nucleotides produced cellular differentiation by inducing DNA demethylation in normal cells. Interestingly, cell differentiation and DNA demethylation were more potent using lower doses than higher concentrations, which produced cytotoxicity.¹³ The effect of azacitidine and decitabine on DNA methylation against cancer cells was confirmed in preclinical studies and in clinical trials in children with advanced leukemia.^{14–17} Increased knowledge in DNA methylation alterations in cancer revealed the importance of gene silencing by DNA hypermethylation occurring in promoter regions on cytosine residues of CpG sites. The extent of tumor suppressor genes silenced by DNA hypermethylation was confirmed by epigenomic approaches demonstrating the importance of methylation gain in cancer cell proliferation, loss of differentiation, and escape from immune system surveillance.¹⁸ Because DNA hypermethylation is pharmacologically reversible by azacitidine and decitabine, it provided the rationale to further explore the role of these DNMTIs in cancer therapy.^{19,20}

Clinical trials were redesigned using low-dose regimens to favor drug-induced epigenetic effects (tumor suppressor gene reactivation, cancer cell differentiation, and demethylation) at low doses rather than cytotoxic effects associated with higher doses occurring both in cancer and normal cells.^{21,22} These low-dose epigenetic treatments with long exposures demonstrated more clinical efficacy than higher doses in patients with myelodysplastic syndrome (MDS) and AML, which validated the low-dose therapy rather than using the maximal tolerated dose.²³ After successful clinical trials, azacitidine and decitabine were approved by the US Food and Drug Administration (FDA) and the European Medicines Agency. The US FDA approved azacitidine and decitabine for the treatment of MDS in 2004 and 2006, respectively. In Europe, azacitidine was approved in 2008 for the treatment of MDS, AML, and chronic myelomonocytic leukemia. The European Medicines Agency also approved decitabine in 2012 for AML treatment.^{24,25} Unfortunately, the efficacy of DNMTI monotherapy is still limited to hematologic malignancies because no significant antitumor effect is reported against solid tumors.

MECHANISM OF ACTION OF DNA METHYLTRANSFERASE INHIBITORS

Decitabine is an analog of deoxycytidine, which uses equilibrative nucleoside transporters hENT1, hENT2, and hENT3 to cross cell membranes like deoxycytidine (Fig. 2). Prior to incorporation into DNA, decitabine has to be phosphorylated into a nucleotide triphosphate to become an active drug. Similar to deoxycytidine triphosphate, the active drug is incorporated by DNA polymerase into nascent DNA of dividing cells. Activation of the prodrug depends on 3 successive phosphorylation steps. First, deoxycytidine kinase (DCK) produces 5-aza-deoxycytidine-5'-monophosphate or 5-aza-dCMP. Subsequently, deoxycytidine-5'-monophosphate (dCMP) kinase and nucleoside

From the Département de Pharmacologie et de Physiologie, Université de Montréal and Sainte-Justine University Hospital Research Center, Montréal, Québec, Canada.

The authors have disclosed that they have no significant relationships with, or financial interest in, any commercial companies pertaining to this article. Reprints: Noël Raynal, PhD, Université de Montréal, 3175 Chemin de la Côte-Sainte-Catherine, Montréal, Québec, Canada H3T 1C5.

E-mail: noel.raynal@umontreal.ca.

Copyright © 2017 Wolters Kluwer Health, Inc. All rights reserved.

ISSN: 1528-9117

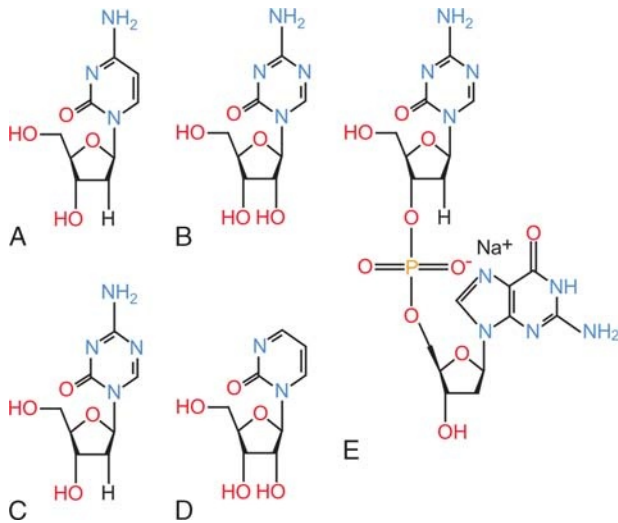


FIGURE 1. Chemical structure of (A) cytosine, (B) azacitidine, (C) decitabine, (D) zebularine, and (E) guadecitabine.

diphosphokinase generate 5-aza-deoxycytidine-5'-diphosphate (5-aza-dCDP) and 5-aza-deoxycytidine-5'-triphosphate (5-aza-dCTP), respectively.¹⁶ The 5-aza-dCTP is considered as the active drug, which is rapidly incorporated at the replicating fork with a similar affinity than the natural dCTP.^{17,26} Thus, decitabine is considered an S-phase-specific drug. In contrast to other S-phase-specific drugs such as cytarabine, decitabine does not immediately block cell cycle, and its effects occur after 2 or 3 cell divisions after treatment initiation.

In close vicinity to the DNA polymerase, DNA methyltransferase 1 (DNMT1) catalyzes the copy of DNA methylation patterns of parental DNA to the newly synthesized DNA strand. The presence of 5-aza-dCTP in replacement of dCTP, in CpG sites of the nascent DNA that mirrors methylated cytosine in the parental DNA, will form an irreversible covalent bond between the nitrogen of the modified pyrimidine and DNMT1 catalytic site.²⁷ DNA adducts between DNMT1 and decitabine result in the loss of DNA methylation in the newly synthesized DNA strand, which occurs at doses in the nanomolar range (50–250 nM).^{16,28} Adducts are removed, and DNMT1 is degraded by the proteasome.²⁸ In addition, decitabine also efficiently promotes proteasome-dependent degradation of free DNMT1 (unbound to the chromatin), which is the main source of DNMT for the replicating DNA. This prevents remethylation of hemimethylated sites created by trapping DNMT1 initially bound to the chromatin.²⁸ Thus, decitabine treatment produces hemimethylated daughter cells. Extensive DNA demethylation is achieved when treatment duration covers at least 2 cell cycles to fully demethylate the next generation of daughter cells.¹⁶ Therefore, treatment conditions with low doses and long exposures are ideal to produce significant DNA demethylation.

After several days of low-dose treatment, demethylated cancer cells exhibit gene reprogramming and a more differentiated phenotype. However, at higher doses (in the micromolar range), decitabine produces cancer cell death by cytotoxic effects caused by the accumulation of DNA adducts between decitabine and DNMT1. By rapidly blocking cancer cell division, high doses of decitabine also disallow DNA demethylation. Thus, decitabine has a dual mechanism of action, where low doses produce DNA demethylation and epigenetic effects, whereas higher doses are cytotoxic.¹⁸ Single-gene approaches and next-generation sequencing have demonstrated that low-dose decitabine induces

promoter demethylation, leading to the transcription of silenced tumor suppressor genes in cancer cells such as *TIMP3*, *p15*, *p16*, *e-cadherin*, and *RASSF*.^{18,29} It is noteworthy that decitabine induces DNA demethylation in all regions of the DNA including promoters, gene bodies, and intergenic regions. Interestingly, decitabine-induced DNA demethylation within gene bodies was shown to specifically down-regulate C-MYC target genes that are involved in oncogenic processes and metabolic activity.^{30,31} Therefore, by causing promoter and gene body demethylation, decitabine reverses 2 major epigenetic aberrations in cancer. It induces tumor suppressor gene reactivation and silences C-MYC-associated genes, both contributing to its anticancer effects.³²

Azacitidine is an analog of cytosine with a ribose moiety where the carbon in the fifth position of the pyrimidine ring is replaced by a nitrogen (Fig. 1). Azacitidine crosses the cytoplasmic membrane through human concentrative nucleoside transporter 1 and becomes phosphorylated prior to incorporation into RNA. The phosphorylation cascade involves uridine-cytidine kinase, uridine-monophosphate-cytosine-monophosphate kinase, and finally nucleoside diphosphate kinase to generate the 5-azacytidine-triphosphate (Fig. 2). Its triphosphate form is incorporated into RNA molecules where it disrupts RNA metabolism, RNA methylation, and protein synthesis, which can cause substantial cytotoxicity and adverse effects.^{2,33–35} In addition, azacitidine, as a 5-aza-CDP, can be converted into a deoxyribonucleotide by ribonucleotide reductase, which transforms the 5-aza-CDP into 5-aza-dCDP. The latter is phosphorylated into 5-aza-dCTP, which is the decitabine active form. Approximately 10% of azacitidine is incorporated into

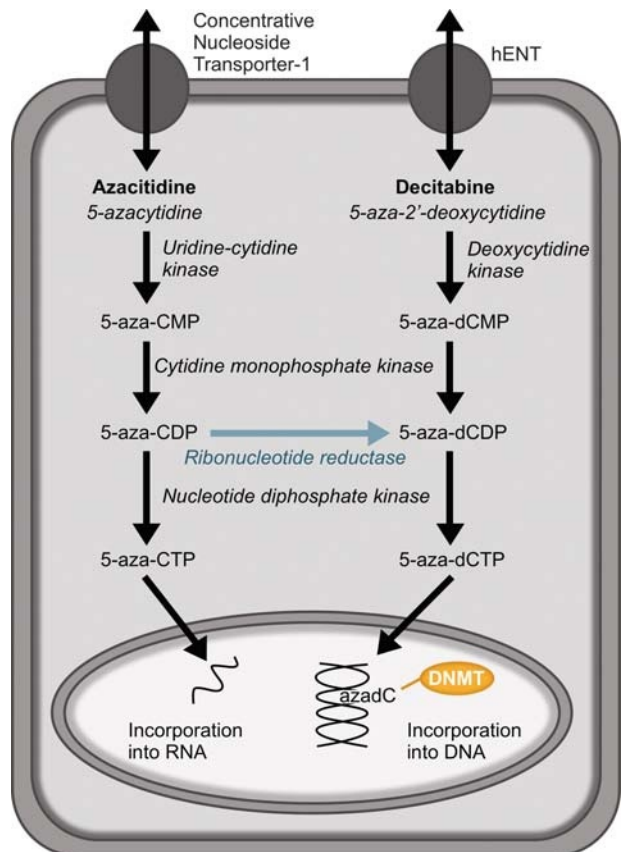


FIGURE 2. Molecular mechanisms of azacitidine and decitabine metabolism into active drugs.

DNA. Therefore, azacitidine is 10 times less potent at inducing DNA demethylation than decitabine because most azacitidine (80%–90%) is incorporated into RNA.¹⁷

Pharmacokinetic analyses revealed that azacitidine and decitabine have short half-lives in human plasma of approximately 25 to 15 minutes, respectively, because of cytidine deaminase (CDA) activity.^{8,36,37} These enzymes are highly expressed in liver and spleen cells and decompose not only pyrimidines but also azanucleoside prodrugs and their monophosphate, diphosphate, and triphosphate forms. However, DNMTs show extensive distribution in tissues and the ability to cross the blood-brain barrier.^{8,38}

RESISTANCE MECHANISMS TO DNA METHYLTRANSFERASE INHIBITORS

Clinical experience with DNMTs shows that half of the patients do not respond to treatment, and the majority of responders tend to have a relapse of their disease within 2 years despite continuation of therapy.^{18,23,39,40} Resistance mechanisms to DNMTs were identified at a pharmacological level and at an epigenetic level, where cancer cells develop tolerance mechanisms to survive with demethylated DNA.

At a pharmacological level, resistance was observed at the initial phosphorylation step of decitabine by DCK. Both reduction in DCK expression and genetic inactivation of DCK reduce decitabine incorporation into DNA and consequently DNA demethylation.^{41–45} Resistance to decitabine is also caused by increased CDA activity.^{16,46} Through deamination, CDA produces 5-aza-deoxyuridine, which reduces the amount of prodrug. Both azacitidine and decitabine are sensitive to CDA, which is overexpressed in several cancer cell lines and associated with DNMT1 resistance.⁴⁴ As mentioned previously, CDA is also highly expressed in the liver, making it a sanctuary organ for cancer cells during chemotherapy. Altogether, leukemia cells resistant to decitabine show a pattern of low expression of DCK and hENT and high expression of CDA, which reduces or blocks DNMT1 incorporation into the DNA.⁴⁴ In MDS patients treated with decitabine, gene expression ratio of CDA/DCK was 3-fold higher in nonresponders as compared with responders.⁴⁵

Deoxycytidine kinase-associated resistance to decitabine can be overcome by switching to azacitidine, which does not rely on DCK for pharmacological activation.^{5,25} An alternative strategy against DCK resistance is CTP synthetase inhibition by using 3-deazauridine (3-DU).⁴³ Cancer cells that are DCK deficient or mutated rely on CTP synthetase for the production of CTP and dCTP, which is required for DNA synthesis. The phosphorylated form of 3-DU inhibits CTP synthetase and reduces intracellular levels of both CTP and dCTP, which immediately blocks DNA replication. Preclinical and clinical proof of concept demonstrated 3-DU potential in cases of DCK-associated resistance.⁴³ In addition, blocking CTP synthetase also synergizes with decitabine by reducing intracellular dCTP, which increases decitabine incorporation into DNA.^{41,43}

Targeting CDA activity using pharmacological inhibitors such as tetrahydrouridine or zebularine demonstrated synergistic effects in combination with decitabine in preclinical models. Interestingly, combination of tetrahydrouridine with decitabine significantly reduced the presence of liver metastasis in a mouse model, suggesting efficacy against CDA expression in liver cells.^{47,48} The combination between decitabine and tetrahydrouridine is currently under clinical investigations in metastatic pancreatic adenocarcinoma and lymphomas.

Resistance to DNMTs also occurs independently of DNA demethylation due to cancer cells' adaptation to demethylated status.^{45,49} To support this observation, it has been shown that

genetically modified cancer cell lines lacking DNMT3b and hypomorphic for DNMT1 can survive with hypomethylated DNA.⁵⁰ In addition, it was shown in clinical investigations that DNA demethylation level in responders was similar to the level measured in refractory patients.^{45,51} Cancer cell tolerance to this demethylated status is not clearly understood, but may likely involve chromatin adjustment to repress tumor suppressor genes using chromatin silencing marks. Drug combinations that target chromatin silencing marks may reverse these compensatory mechanisms and improve the effects of DNMTs.

SECOND GENERATION OF DNMT INHIBITORS

To improve chemical stability and resistance to CDA, new DNMTs were designed.⁵² Zebularine, which was originally synthesized as a CDA inhibitor, demonstrated pharmacological inhibition of DNMT (Fig. 1).⁵² In contrast to decitabine and azacitidine, zebularine can be administered orally. It showed antitumor activity and synergized with decitabine.^{52,53} Unfortunately, zebularine induced toxicity in primates, which blocked its progression into clinical trials.⁵⁴

Dinucleotides containing decitabine were designed to protect decitabine from CDA degradation. After breakage of the phosphodiester bond, the release of decitabine produces DNA methylation inhibition. Guadecitabine (2'-deoxy-5-azacytidyl-yl-(3'→5')-2'-deoxyguanosine sodium salt) is a dinucleotide composed of a decitabine and a guanosine linked by a phosphodiester bond (Fig. 1). This chemical modification improves decitabine aqueous stability, resistance to CDA, and ultimately its plasmatic half-life.^{55–57} Guadecitabine was recently introduced in phase I clinical trials.²⁵ Subcutaneous administration of guadecitabine is well tolerated and is clinically and biologically active, producing DNA demethylation in MDS and AML patients.⁵⁸ Guadecitabine is currently tested in multiple clinical trials in monotherapy or in combination in various cancer indications.

COMBINATIONS OF DNMT INHIBITORS WITH OTHER EPIGENETIC DRUGS

Cancer cells use different epigenetic mechanisms to reprogram their epigenome, leading to tumor suppressor gene silencing, loss of differentiation, and increase in cell proliferation (Fig. 3). The cross-talk between DNA methylation and chromatin modifications, such as histone acetylation and methylation, provides the rationale to develop combinational approaches to reverse aberrant epigenetic signals occurring in cancer cells.^{18,59,60} In a landmark article, Si et al.⁶¹ demonstrated that although decitabine treatment induced demethylation *in vitro* in most of the cells, gene reactivation was achieved in a subset of cells where chromatin resetting from silencing marks to active marks occurred at the promoter region. However, in the majority of the cells, chromatin silencing marks (hypoacetylated and methylated histones) maintained tumor suppressor gene silencing, even though promoters were significantly demethylated.⁶¹ Therefore, the combination with drugs increasing chromatin active marks (such as histone acetylation) has been tested in combination with DNMTs. Increasing histone acetylation by blocking histone deacetylase (HDAC) activity has been shown to play a major role in tumor suppressor gene reactivation.^{62,63} Synergistic combination between DNMTs and HDAC inhibitors (HDACIs) results in significant tumor suppressor gene reactivation and synergistic anticancer effects. All DNMTs showed synergistic responses in combination to a variety of HDACIs in various preclinical models of leukemia or solid tumors.^{60,64–67} In clinical trials, the combination of decitabine and vorinostat against MDS and AML or the combination of azacitidine and entinostat against

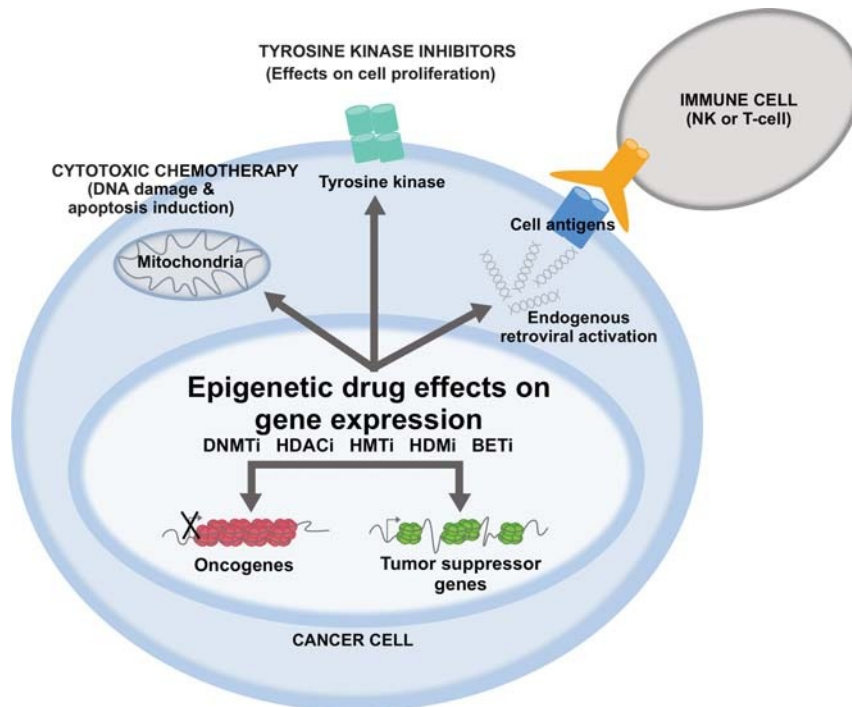


FIGURE 3. Drug combinations involving epigenetic drugs with other anticancer therapeutic strategies. The combination of several epigenetic drugs such as DNMTIs, HDACIs, HMTIs, HDM inhibitors, and bromodomain and extraterminal inhibitors played key roles in reprogramming cancer cell epigenome. Their efficacy at inducing tumor suppressor gene reactivation or reducing expression of cell proliferation genes can serve as a rationale for drug combination with cytotoxic chemotherapy, targeted treatment with specific tyrosine kinase inhibitors, or with immunotherapy.

MDS, AML, and lung cancer showed promising responses while being well tolerated.^{68–70}

Alterations of histone methylation, which is catalyzed by histone methyltransferases (HMT), play an important role in a number of hematologic malignancies and solid tumors. Histone methyltransferase inhibitors (HMTIs) particularly targeting EZH2 and DOT1L led to interesting epigenetic effects in cancers driven by HMT hyperactivity.⁷¹ Specific EZH2 inhibitors, such as GSK-126 and EPZ-6438, are currently tested in clinical trials as single agent in patients with non-Hodgkin lymphoma or rhabdoid tumors.⁷² Selective DOT1L inhibitor EPZ-5676 is also advancing into phase I clinical trials in *MLL*-rearranged leukemia.⁷³ There is a strong rationale to combine HMTIs with DNMTIs because these drugs induce reactivation of silenced tumor suppressors. Combination of DNMTIs with EZH2 inhibitor demonstrated synergistic effects in ovarian cancer cells, which were shown to stimulate immune response through T helper 1 cells.⁷⁴ In addition, EPZ-5676 synergized with azacitidine in leukemia cell lines MOLM-13 (*MLL-AF9*) and MV4-11 (*MLL-AF4*).⁷⁵

Targeting histone demethylases (HDM), which induce lysine or arginine demethylation in histone and nonhistone proteins, in combination with DNMTIs, is under investigation. The rationale is that HDM inhibitors such as LSD1 can demethylate DNMT1, resulting in protein destabilization and loss of global DNA methylation.⁷⁶ Treatment of colon cancer cells with LSD1 inhibitor PG-1114 in combination with azacitidine reactivated expression of *SFRP2*, a negative regulator of Wnt signaling resulting in significant anticancer effects in colon cancer cells.⁷⁷

Inhibition of epigenetic readers aims at blocking the signals from chromatin marks to oncogenic transcription factors. One therapeutic strategy is to block the interaction between histone acetylation readers called bromodomains and MYC oncogenes

using small molecules called bromodomain and extraterminal inhibitors such as JQ1, OTX015, or I-BET762.^{78,79} These drugs down-regulate C-MYC oncogenic signals, resulting in cancer cell reprogramming and anticancer effects.⁸⁰ This therapeutic strategy has been explored in MYC-dependent cancers such as neuroblastoma, NUT midline carcinoma, and in recurrent glioblastoma.⁸¹ Several studies have described enhancement or synergistic response using bromodomain inhibitors with DNMTIs. Sequential combinations with OTX015 and azacitidine or JQ1 with decitabine produced synergistic effects against leukemia or lymphoma cells, respectively.^{82,83}

COMBINATIONS OF DNMT INHIBITORS WITH CHEMOTHERAPEUTIC DRUGS

The potential of DNMTIs to synergize with chemotherapeutic drugs such as cisplatin, carboplatin, temozolomide, and epirubicin has been explored in preclinical settings (Fig. 3).^{84–86} Several clinical trials are investigating the combination of decitabine with carboplatin in AML, MDS, chronic myelomonocytic leukemia, and ovarian cancer. Combinations of DNMTIs and targeted therapies such as tyrosine kinase inhibitors demonstrated synergistic interactions in leukemia and colon and lung cancer models.^{87–89} For example, ongoing clinical trials are investigating the combination of DNMTIs with tyrosine kinase inhibitors, gilteritinib, pacritinib, and midostaurin.

COMBINATIONS OF DNMT INHIBITORS WITH IMMUNOTHERAPY

An interesting property of DNMTIs includes the ability to reactivate antigens and to induce viral response, which may increase immunologic effects (Fig. 3).^{90,91} Decitabine induces

expression of CTA and HLA class I antigens, which lasts several weeks after treatment.⁹² Azacitidine induces the expression of genes involved in innate and adaptive immunity in lung cancer cells. Up-regulation of programmed death ligand 1, a key ligand mediator of immune tolerance, has been used as a rationale to test the combination of azacitidine with programmed death 1 pathway blockade.⁹³ This new approach is being investigated in clinical trials with azacitidine and nivolumab in patients with recurrent metastatic lung cancer, MDS, and AML.

SUMMARY

Targeting DNA methylation in cancer has been a major breakthrough in cancer treatment. By allowing cancer cell epigenome reprogramming, DNMTs sensitize cancer cells to several other anticancer treatments and produce synergistic responses, reversal of drug resistance, and enhancement of immunotherapeutic responses. In addition, the potential of DNMTs to synergize with multiple therapeutic approaches has been recently demonstrated in a combinational drug screening between decitabine and FDA-approved drugs, which offers the possibility to rapidly start clinical trials with drugs whose safety and tolerability are well known.^{94,95} Future development of DNMTs includes the second generation of analogs and adjustment of dose schedule for solid tumors. The improvement of DNMT response rate, duration of response, and efficacy in leukemia and solid tumors will be achieved through combinational approaches addressing drug resistance mechanisms, cancer cell epigenetic tolerance, and epigenome alterations in specific cancers. The development of new combinational strategies will require a better understanding of cross-talk between DNA methylation and chromatin modifications in cancer and the interaction between DNMT-treated cancer cells and the immune system.

ACKNOWLEDGMENT

The authors acknowledge Fonds de recherche du Québec-Santé, the Cole Foundation, and the Cancer Research Society for funding this study.

REFERENCES

- Sorn F, Vesely J. Effect of 5-aza-2'-deoxycytidine against leukemic and hemopoietic tissues in AKR mice. *Neoplasma*. 1968;15:339–343.
- Sorn F, Piskala A, Cihák A, et al. 5-Azacitidine, a new, highly effective cancerostatic. *Experientia*. 1964;20:202–203.
- Li LH, Olin EJ, Buskirk HH, et al. Cytotoxicity and mode of action of 5-azacytidine on L1210 leukemia. *Cancer Res*. 1970;30:2760–2769.
- Li LH, Olin EJ, Fraser TJ, et al. Phase specificity of 5-azacytidine against mammalian cells in tissue culture. *Cancer Res*. 1970;30:2770–2775.
- Karon M, Sieger L, Leimbrock S, et al. 5-Azacitidine: a new active agent for the treatment of acute leukemia. *Blood*. 1973;42:359–365.
- Hrodek O, Vesely J. 5-azacytidine in childhood leukemia. *Neoplasma*. 1971;18:493–503.
- McCredie KB, Bodey GP, Burgess MA, et al. Treatment of acute leukemia with 5-azacytidine (NSC-102816). *Cancer Chemother Rep*. 1973;57:319–323.
- Rivard GE, Momparler RL, Demers J, et al. Phase I study on 5-aza-2'-deoxycytidine in children with acute leukemia. *Leuk Res*. 1981;5:453–462.
- Momparler RL, Rivard GE, Gyger M. Clinical trial on 5-aza-2'-deoxycytidine in patients with acute leukemia. *Pharmacol Ther*. 1985;30:277–286.
- Issa JP, Kantarjian HM. Targeting DNA methylation. *Clin Cancer Res*. 2009;15:3938–3946.
- Constantinides PG, Jones PA, Gevers W. Functional striated muscle cells from non-myoblast precursors following 5-azacytidine treatment. *Nature*. 1977;267:364–366.
- Taylor SM, Jones PA. Multiple new phenotypes induced in 10T1/2 and 3T3 cells treated with 5-azacytidine. *Cell*. 1979;17:771–779.
- Jones PA, Taylor SM. Cellular differentiation, cytidine analogs and DNA methylation. *Cell*. 1980;20:85–93.
- 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.
- Momparler R, Bouchard J, Onetto N, et al. 5-Aza-2'-deoxycytidine therapy in patients with acute leukemia inhibits DNA methylation. *Leuk Res*. 1984;8:181–185.
- Momparler RL. Pharmacology of 5-aza-2'-deoxycytidine (decitabine). *Semin Hematol*. 2005;42:S9–S16.
- Momparler RL. Cancer epigenetics. *Oncogene*. 2003;22:6479–6483.
- Taby R, Issa JP. Cancer epigenetics. *CA Cancer J Clin*. 2010;60:376–392.
- Jones PA. At the tipping point for epigenetic therapies in cancer. *J Clin Invest*. 2014;124:14–16.
- You JS, Jones PA. Cancer genetics and epigenetics: two sides of the same coin? *Cancer Cell*. 2012;22:9–20.
- Lemaire M, Chabot GG, Raynal NJ, et al. Importance of dose-schedule of 5-aza-2'-deoxycytidine for epigenetic therapy of cancer. *BMC Cancer*. 2008;8:128.
- Tsai HC, Li H, van Neste L, et al. Transient low doses of DNA-demethylating agents exert durable antitumor effects on hematological and epithelial tumor cells. *Cancer Cell*. 2012;21:430–446.
- Issa JP, Garcia-Manero G, Giles FJ, 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;103:1635–1640.
- Derissen EJ, Beijnen JH, Schellens JH. Concise drug review: azacitidine and decitabine. *Oncologist*. 2013;18:619–624.
- Estey EH. Epigenetics in clinical practice: the examples of azacitidine and decitabine in myelodysplasia and acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 2013;27:1803–1812.
- Bouchard J, Momparler RL. Incorporation of 5-aza-2'-deoxycytidine-5'-triphosphate into DNA. Interactions with mammalian DNA polymerase alpha and DNA methylase. *Mol Pharmacol*. 1983;24:109–114.
- Schermelleh L, Spada F, Easwaran HP, et al. Trapped in action: direct visualization of DNA methyltransferase activity in living cells. *Nat Methods*. 2005;2:751–756.
- Patel K, Dickson J, Din S, et al. Targeting of 5-aza-2'-deoxycytidine residues by chromatin-associated DNMT1 induces proteasomal degradation of the free enzyme. *Nucleic Acids Res*. 2010;38:4313–4324.
- Baylín SB, Jones PA. A decade of exploring the cancer epigenome—biological and translational implications. *Nat Rev Cancer*. 2011;11:726–734.
- Yang X, Han H, de Carvalho DD, et al. Gene body methylation can alter gene expression and is a therapeutic target in cancer. *Cancer Cell*. 2014;26:577–590.
- 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 Lett*. 1990;54:21–28.
- Kasinathan S, Henikoff S. 5-Aza-CdR delivers a gene body blow. *Cancer Cell*. 2014;26:449–451.
- Issa JP, Kantarjian H. Azacitidine. *Nat Rev Drug Discov*. 2005;(suppl):S6–S7.
- 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. *Leuk Res*. 1984;8:1043–1049.
- Jabbour E, Issa JP, Garcia-Manero G, et al. Evolution of decitabine development: accomplishments, ongoing investigations, and future strategies. *Cancer*. 2008;112:2341–2351.
- van Groeningen CJ, Leyva A, O'Brien AM, et al. Phase I and pharmacokinetic study of 5-aza-2'-deoxycytidine (NSC 127716) in cancer patients. *Cancer Res*. 1986;46:4831–4836.
- Cashen AF, Shah AK, Todt L, et al. Pharmacokinetics of decitabine administered as a 3-h infusion to patients with acute myeloid leukemia (AML) or myelodysplastic syndrome (MDS). *Cancer Chemother Pharmacol*. 2008;61:759–766.

38. Chabot GG, Rivard GE, Momparler RL. Plasma and cerebrospinal fluid pharmacokinetics of 5-aza-2'-deoxycytidine in rabbits and dogs. *Cancer Res.* 1983;43:592–597.
39. Kantarjian H, Issa JP, Rosenfeld CS, et al. Decitabine improves patient outcomes in myelodysplastic syndromes: results of a phase III randomized study. *Cancer.* 2006;106:1794–1803.
40. Fenaux P, Mufti GJ, Hellstrom-Lindberg E, et al. Efficacy of azacitidine compared with that of conventional care regimens in the treatment of higher-risk myelodysplastic syndromes: a randomised, open-label, phase III study. *Lancet Oncol.* 2009;10:223–232.
41. Momparler RL, Vesely J, Momparler LF, et al. Synergistic action of 5-aza-2'-deoxycytidine and 3-deazauridine on L1210 leukemic cells and EMT6 tumor cells. *Cancer Res.* 1979;39:3822–3827.
42. Momparler RL, Momparler LF. Chemotherapy of L1210 and L1210/ARA-C leukemia with 5-aza-2'-deoxycytidine and 3-deazauridine. *Cancer Chemother Pharmacol.* 1989;25:51–54.
43. Raynal NJ, Momparler LF, Rivard GE, et al. 3-Deazauridine enhances the antileukemic action of 5-aza-2'-deoxycytidine and targets drug-resistance due to deficiency in deoxycytidine kinase. *Leuk Res.* 2011;35:110–118.
44. Qin T, Jelinek J, Si J, et al. Mechanisms of resistance to 5-aza-2'-deoxycytidine in human cancer cell lines. *Blood.* 2009;113:659–667.
45. Qin T, Castoro R, El Ahdab S, et al. Mechanisms of resistance to decitabine in the myelodysplastic syndrome. *PLoS One.* 2011;6:e23372.
46. Eliopoulos N, Cournoyer D, Momparler RL. Drug resistance to 5-aza-2'-deoxycytidine, 2',2'-difluorodeoxycytidine, and cytosine arabinoside conferred by retroviral-mediated transfer of human cytidine deaminase cDNA into murine cells. *Cancer Chemother Pharmacol.* 1998;42:373–378.
47. Ebrahem Q, Mahfouz RZ, Ng KP, et al. High cytidine deaminase expression in the liver provides sanctuary for cancer cells from decitabine treatment effects. *Oncotarget.* 2012;3:1137–1145.
48. Lavelle D, Vaitkus K, Ling Y, et al. Effects of tetrahydrouridine on pharmacokinetics and pharmacodynamics of oral decitabine. *Blood.* 2012;119:1240–1247.
49. Issa JP, Gharibyan V, Cortes J, et al. Phase II study of low-dose decitabine in patients with chronic myelogenous leukemia resistant to imatinib mesylate. *J Clin Oncol.* 2005;23:3948–3956.
50. Paz MF, Wei S, Cigudosa JC, et al. Genetic unmasking of epigenetically silenced tumor suppressor genes in colon cancer cells deficient in DNA methyltransferases. *Hum Mol Genet.* 2003;12:2209–2219.
51. Issa JP. The myelodysplastic syndrome as a prototypical epigenetic disease. *Blood.* 2013;121:3811–3817.
52. Rius M, Lyko F. Epigenetic cancer therapy: rationales, targets and drugs. *Oncogene.* 2012;31:4257–4265.
53. Lemaire M, Momparler LF, Bernstein ML, et al. Enhancement of antineoplastic action of 5-aza-2'-deoxycytidine by zebularine on L1210 leukemia. *Anticancer Drugs.* 2005;16:301–308.
54. Johnson WD, Harder JB, Naylor J, et al. A pharmacokinetic/pharmacodynamic approach to evaluating the safety of zebularine in non-human primates. *Cancer Res.* 2006;66:309.
55. Yoo CB, Jeong S, Egger G, et al. Delivery of 5-aza-2'-deoxycytidine to cells using oligodeoxynucleotides. *Cancer Res.* 2007;67:6400–6408.
56. Chuang JC, Wamer SL, Vollmer D, et al. S110, a 5-aza-2'-deoxycytidine-containing dinucleotide, is an effective DNA methylation inhibitor in vivo and can reduce tumor growth. *Mol Cancer Ther.* 2010;9:1443–1450.
57. Srivastava P, Paluch BE, Matsuzaki J, et al. Immunomodulatory action of SGI-110, a hypomethylating agent, in acute myeloid leukemia cells and xenografts. *Leuk Res.* 2014;38:1332–1341.
58. Issa JP, Roboz G, Rizzieri D, et al. Safety and tolerability of guadecitabine (SGI-110) in patients with myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukaemia: a multicentre, randomised, dose-escalation phase 1 study. *Lancet Oncol.* 2015;16:1099–1110.
59. Kelly TK, de Carvalho DD, Jones PA. Epigenetic modifications as therapeutic targets. *Nat Biotechnol.* 2010;28:1069–1078.
60. Cameron EE, Bachman KE, Myohanen S, et al. Synergy of demethylation and histone deacetylase inhibition in the re-expression of genes silenced in cancer. *Nat Genet.* 1999;21:103–107.
61. Si J, Bumber YA, Shu J, et al. Chromatin remodeling is required for gene reactivation after decitabine-mediated DNA hypomethylation. *Cancer Res.* 2010;70:6968–6977.
62. Raynal NJ, Si J, Taby RF, et al. DNA methylation does not stably lock gene expression but instead serves as a molecular mark for gene silencing memory. *Cancer Res.* 2012;72:1170–1181.
63. Bots M, Johnstone RW. Rational combinations using HDAC inhibitors. *Clin Cancer Res.* 2009;15:3970–3977.
64. Belinsky SA, Grimes MJ, Picchi MA, et al. Combination therapy with vidaza and entinostat suppresses tumor growth and reprograms the epigenome in an orthotopic lung cancer model. *Cancer Res.* 2011;71:454–462.
65. Fiskus W, Buckley K, Rao R, et al. Panobinostat treatment depletes EZH2 and DNMT1 levels and enhances decitabine mediated de-repression of JunB and loss of survival of human acute leukemia cells. *Cancer Biol Ther.* 2009;8:939–950.
66. Kalac M, Scotto L, Marchi E, et al. HDAC inhibitors and decitabine are highly synergistic and associated with unique gene-expression and epigenetic profiles in models of DLBCL. *Blood.* 2011;118:5506–5516.
67. Tellez CS, Grimes MJ, Picchi MA, et al. SGI-110 and entinostat therapy reduces lung tumor burden and reprograms the epigenome. *Int J Cancer.* 2014;135:2223–2231.
68. Kirschbaum M, Gojo I, Goldberg SL, et al. A phase 1 clinical trial of vorinostat in combination with decitabine in patients with acute myeloid leukaemia or myelodysplastic syndrome. *Br J Haematol.* 2014;167:185–193.
69. Juergens RA, Wrangle J, Vendetti FP, et al. Combination epigenetic therapy has efficacy in patients with refractory advanced non-small cell lung cancer. *Cancer Discov.* 2011;1:598–607.
70. Fandy TE, Herman JG, Kerns P, et al. Early epigenetic changes and DNA damage do not predict clinical response in an overlapping schedule of 5-azacytidine and entinostat in patients with myeloid malignancies. *Blood.* 2009;114:2764–2773.
71. Arrowsmith CH, Bountra C, Fish PV, et al. Epigenetic protein families: a new frontier for drug discovery. *Nat Rev Drug Discov.* 2012;11:384–400.
72. Kim KH, Roberts CW. Targeting EZH2 in cancer. *Nat Med.* 2016;22:128–134.
73. Morera L, Lübbert M, Jung M. Targeting histone methyltransferases and demethylases in clinical trials for cancer therapy. *Clin Epigenetics.* 2016;8:57.
74. Peng D, Kryczek I, Nagarsheth N, et al. Epigenetic silencing of TH1-type chemokines shapes tumour immunity and immunotherapy. *Nature.* 2015;527:249–253.
75. Klaus CR, Iwanowicz D, Johnston D, et al. DOT1L inhibitor EPZ-5676 displays synergistic antiproliferative activity in combination with standard of care drugs and hypomethylating agents in MLL-rearranged leukemia cells. *J Pharmacol Exp Ther.* 2014;350:646–656.
76. Wang J, Hevi S, Kurash JK, et al. The lysine demethylase LSD1 (KDM1) is required for maintenance of global DNA methylation. *Nat Genet.* 2009;41:125–129.
77. Huang Y, Stewart TM, Wu Y, et al. Novel oligoamine analogues inhibit lysine-specific demethylase 1 and induce reexpression of epigenetically silenced genes. *Clin Cancer Res.* 2009;15:7217–7228.
78. Filippakopoulos P, Qi J, Picaud S, et al. Selective inhibition of BET bromodomains. *Nature.* 2010;468:1067–1073.
79. Dawson MA, Kouzarides T, Huntly BJ. Targeting epigenetic readers in cancer. *N Engl J Med.* 2012;367:647–657.
80. Delmore JE, Issa GC, Lemieux ME, et al. BET bromodomain inhibition as a therapeutic strategy to target C-MYC. *Cell.* 2011;146:904–917.
81. Filippakopoulos P, Knapp S. Targeting bromodomains: epigenetic readers of lysine acetylation. *Nat Rev Drug Discov.* 2014;13:337–356.
82. Coude MM, Braun T, Berrou J, et al. BET inhibitor OTX015 targets BRD2 and BRD4 and decreases c-MYC in acute leukemia cells. *Oncotarget.* 2015;6:17698–17712.
83. Swerev TM, Wirth T, Ushmorov A. Activation of oncogenic pathways in classical Hodgkin lymphoma by decitabine: a rationale for combination with small molecular weight inhibitors. *Int J Oncol.* 2017;50:555–566.

84. Qin T, Si J, Raynal NJ, et al. Epigenetic synergy between decitabine and platinum derivatives. *Clin Epigenetics*. 2015;7:97.
85. Plumb JA, Strathdee G, Sludden J, et al. Reversal of drug resistance in human tumor xenografts by 2'-deoxy-5-azacytidine-induced demethylation of the hMLH1 gene promoter. *Cancer Res*. 2000;60:6039–6044.
86. Strathdee G, MacKean MJ, Illand M, et al. A role for methylation of the hMLH1 promoter in loss of hMLH1 expression and drug resistance in ovarian cancer. *Oncogene*. 1999;18:2335–2341.
87. Lainey E, Wolfromm A, Marie N, et al. Azacytidine and erlotinib exert synergistic effects against acute myeloid leukemia. *Oncogene*. 2013;32:4331–4342.
88. Lou YF, Zou ZZ, Chen PJ, et al. Combination of gefitinib and DNA methylation inhibitor decitabine exerts synergistic anti-cancer activity in colon cancer cells. *PLoS One*. 2014;9:e97719.
89. Li XY, Wu JZ, Cao HX, et al. Blockade of DNA methylation enhances the therapeutic effect of gefitinib in non-small cell lung cancer cells. *Oncol Rep*. 2013;29:1975–1982.
90. Wargo JA, Robbins PF, Li Y, et al. Recognition of NY-ESO-1⁺ tumor cells by engineered lymphocytes is enhanced by improved vector design and epigenetic modulation of tumor antigen expression. *Cancer Immunol Immunother*. 2009;58:383–394.
91. Roulois D, Loo Yau H, Singhanian R, et al. DNA-demethylating agents target colorectal cancer cells by inducing viral mimicry by endogenous transcripts. *Cell*. 2015;162:961–973.
92. Sigalotti L, Fratta E, Coral S, et al. Epigenetic drugs as immunomodulators for combination therapies in solid tumors. *Pharmacol Ther*. 2014;142:339–350.
93. Wrangle J, Wang W, Koch A, et al. Alterations of immune response of non-small cell lung cancer with azacytidine. *Oncotarget*. 2013;4:2067–2079.
94. Raynal NJ, da Costa EM, Lee JT, et al. Repositioning FDA-approved drugs in combination with epigenetic drugs to reprogram colon cancer epigenome. *Mol Cancer Ther*. 2017;16:397–407.
95. Raynal NJ, Lee JT, Wang Y, et al. Targeting calcium signaling induces epigenetic reactivation of tumor suppressor genes in cancer. *Cancer Res*. 2016;76:1494–1505.

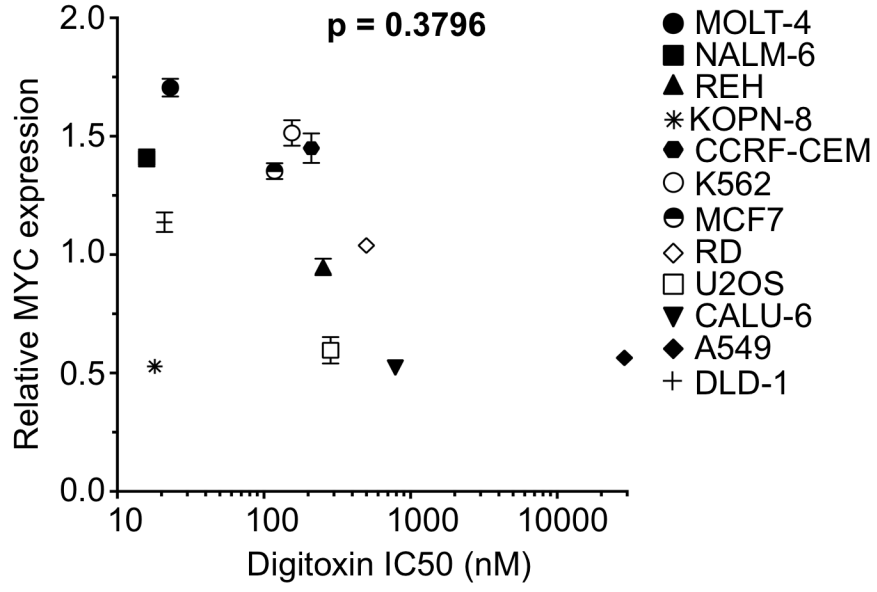
2. Annexe 2: La digitoxine tend à exercer une plus forte activité anticancéreuse dans les cancers exprimants un haut niveau de MYC.

Description: Afin d'évaluer si , comme la proscillaridine A, la digitoxine démontrait une activité anticancéreuse plus élevée dans les cancers sur-exprimants l'oncogène MYC, nous avons calculé les IC₅₀ à 24h de la digitoxine un panel de 12 lignées cellulaires composé de cancers hématopoïétiques et solides. L'activité anticancéreuse de la digitoxine ne corrèle pas de manière significative avec le niveau d'expression protéique de MYC. Une analyse de corrélation de Pearson révèle que le r est égal à -0,28 et la valeur de p est égale à 0,38.

Légende: Graphique représentant l'expression de MYC (relatif au marqueur de charge ACTINE) en comparaison avec l'IC₅₀ de la digitoxine (24h) dans 12 lignées cellulaires cancéreuses. Une régression linéaire a été effectuée et la valeur de P est indiquée dans le graphe (n=3).

Annexe 2

Cancer cells sensitivity to digitoxin
/ MYC expression



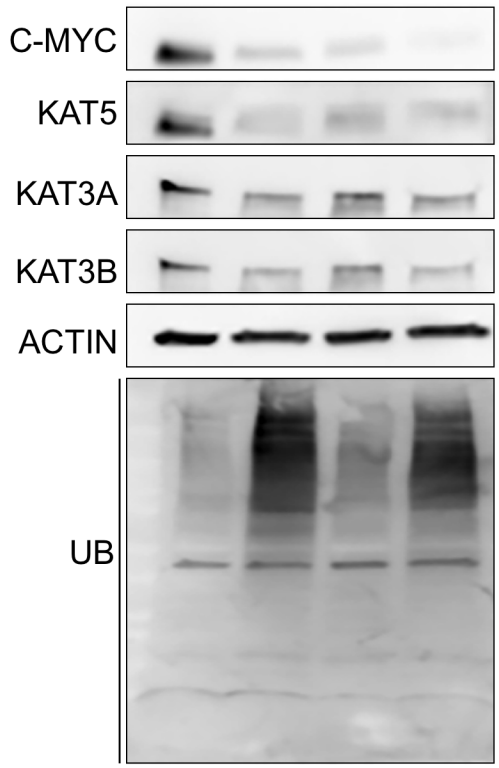
3. Annexe 3: La dégradation de MYC et des KATs est indépendante de la machinerie protéasomique.

Description: Afin d'évaluer si la proscillaridine A induit la dégradation de l'oncogène MYC et des KATs via la machinerie du protéasome, nous avons traité les cellules de LLAs MOLT-4 surexprimant MYC avec du bortézomib (MG132), un puissant inhibiteur du protéasome. Notre rationnelle était que si MYC et les KATs étaient effectivement dégradées via la machinerie du protéasome en réponse à un traitement de proscillaridine A, un traitement de MG132 empêcherait ces dégradations. Toutefois, malgré plusieurs essais avec différents temps de traitement et de concentrations, nous n'avons pas observé de phénomène de « rescue » en réponse à un traitement au MG132. Nous avons donc conclu que la proscillaridine A n'induit pas de dégradation protéique de MYC et des KATs via la machinerie du protéasome.

Légende: Le niveau d'expression protéique de MYC, KAT5, KAT3A et KAT3B a été mesuré par immunobuvardage de type Western en réponse à un traitement de 18h de bortézomib (MG132, 5 μ M), de 24h de proscillaridine A (5 nM) et de la combinaison de MG132 et de proscillaridine A dans les cellules de LLAs MOLT-4. L'ubiquitine a été mesurée comme contrôle positif de l'activité du MG132 et l'ACTINE a été utilisée comme contrôle de charge.

Annexe 3

MG132 5 μ M - 18h: - + - +
Pros A 5 nM - 24h: - - + +



4. Annexe 4: La proscillaridine A induit une augmentation de l'acétylation de protéines impliquées dans la voie de signalisation JAK-STAT et la synthèse d'ATP.

Description: La proscillaridine A induit une baisse d'expression de nombreuses KATs ce qui est responsable d'une baisse globale de l'acétylation sur l'histone 3 dans les cellules de LLAs et de RMS-e, ainsi que de protéines autres que les histones dans les LLAs. Toutefois, certaines protéines présentent une augmentation de l'acétylation en réponse à ce traitement. Dans les LLAs, des études de spectrométrie de masse ont révélé une augmentation significative de l'acétylation de 15 protéines (A-B). Ces protéines sont impliquées principalement dans la voie de signalisation JAK-STAT et de la synthèse d'ATP. Elles interagissent physiquement et sont co-exprimées (A-B). Egalement, dans les lignées cellulaires de LLAs et de RMS-e, l'augmentation de l'acétylation de la tubuline apparaît après 24h de traitement et augmente de manière dépendante au temps (C). L'augmentation de l'acétylation de la tubuline est également mesurée dans une lignée cellulaire d'ostéosarcome après 72h de traitement (C).

Légende: **(A-B)** L'acétylome des cellules MOLT-4 avec ou sans un traitement de 48h de proscillaridine A (5 nM) a été étudié par spectrométrie de masse. Une augmentation de l'acétylation de 15 protéines a été mesurée (n>4). **(A)** Analyse par gène ontologie (GO) des gènes codant pour les protéines dont l'acétylation a augmenté en réponse au traitement. **(B)** Carte représentant les protéines qui co-expriment (violet) et les protéines qui interagissent physiquement entre-elles (rouge). **(C)** Mesure de l'acétylation de la TUBULINE par immunobuvardage de type Western en réponse à un traitement de proscillaridine A (5 nM; 24 à 96h) dans les cellules de LLAs MOLT-4, de RMS-e RD et d'ostéosarcomes U2OS. La TUBULINE est utilisée comme contrôle de charge (n=1).

5. Annexe 5: Régulation calcique du niveau d'expression protéique de l'oncogène MYC et de certaines KATs dans les LLAs.

Description: La proscillaridine A est un inhibiteur des pompes Na^+/K^+ ce qui a pour conséquence d'augmenter la concentration intracellulaire calcique afin de produire un effet ionotrope positif sur le coeur. Dans cette expérience, nous évaluons le potentiel de la proscillaridine A à inhiber l'expression protéique de MYC et des KATs, et plus largement, nous évaluons si l'induction de son effet anticancéreux provient de sa capacité à augmenter la concentration en calcium intracellulaire. Pour cela, nous avons réalisé deux expériences. La première est d'induire une augmentation calcique dans des cellules leucémiques cultivées dans un milieu sans calcium. Pour cela, nous avons utilisé un ionophore calcique, la ionomycine. Nous pouvons remarquer qu'un traitement de ionomycine suivi d'un ajout de calcium inhibe la viabilité cellulaire de 20% environ dans les cellules MOLT-4 (Annexe 5A). Également, nous remarquons que ce traitement semble inhiber l'expression protéique de l'oncogène MYC, KAT3B et de KAT5 (Annexe 5B). L'augmentation calcique induit par la proscillaridine A, reproduite ici par la combinaison de ionomycine et de calcium, pourrait donc être impliquée dans l'inhibition de l'oncogène MYC, de KAT3B et de KAT5.

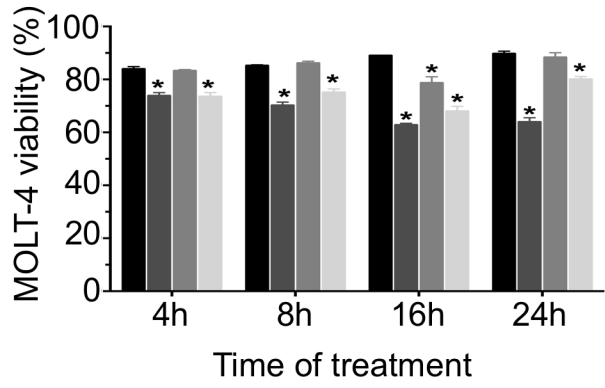
La deuxième expérience consiste à diminuer la concentration calcique intracellulaire dans les cellules leucémiques MOLT-4 en utilisant un chélateur calcique, le BAPTA-AM. Nous pouvons remarquer que le BAPTA-AM diminue la viabilité cellulaire des cellules MOLT-4 de manière dépendante au temps et à la concentration (Annexe 5C). Également, nous remarquons que ce traitement n'affecte pas le niveau d'expression de MYC et augmente le niveau d'expression de KAT3A, KAT3B, KAT2A et KAT6A. La diminution de la concentration calcique dans les cellules MOLT-4 n'affecte donc pas l'oncogène MYC et augmente l'expression de certaines KATs. Ces expériences nous permettent d'émettre l'hypothèse que le calcium régule l'expression de l'oncogène MYC et de certaines KATs dans les LLAs.

Légende: **(A-B)** Induction d'une augmentation de concentration calcique dans les cellules de LLAs MOLT-4 cultivées pendant 24h dans un milieu sans calcium via à un traitement de ionomycine (2.5 μM) suivi par un ajout de calcium (1 mM). **(A)** Graphique représentant la viabilité cellulaire des MOLT-4 en réponse à une monothérapie de ionomycine, à une monothérapie de calcium et à une combinaison de ionomycine et de calcium après 4h, 8h, 16h ou 24h (n=4). **(B)** Mesure du niveau d'expression protéique par immunobuvardage de type Western de l'oncogène MYC et de KATA, KAT3B, KAT5, KAT2A, KAT2B et KAT6A en réponse à une monothérapie de 16h de ionomycine, à une monothérapie de 16h de calcium et à une combinaison de ionomycine et de calcium pendant 16h. L'ACTINE est utilisée comme contrôle

de charge (n=1). **(C-D)** Induction d'une baisse de la concentration calcique dans les cellules de LLAs MOLT-4 via à un traitement de BAPTA-AM. **(C)** Graphique représentant la viabilité cellulaire des MOLT-4 en réponse à un traitement de BAPTA-AM (2 μ M, 5 μ M ou 10 μ M) après 8h, 16h ou 24h (n=4). **(D)** Mesure du niveau d'expression protéique par immunobuvardage de type Western de l'oncogène MYC et de KATA, KAT3B, KAT5, KAT2A, KAT2B et KAT6A en réponse à un traitement de 24h de BAPTA-AM (5 μ M). L'ACTINE est utilisée comme contrôle de charge (n=2)

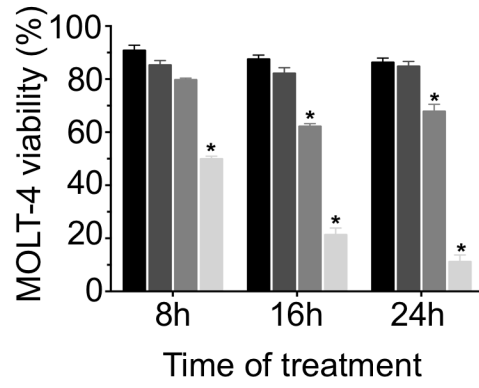
Annexe 5

A



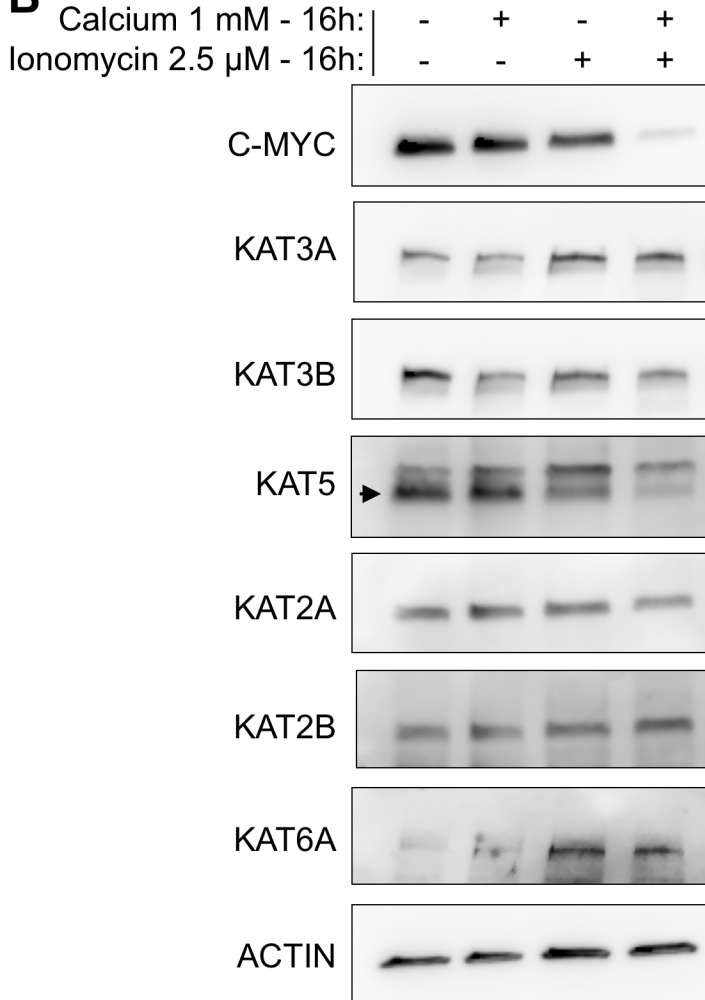
■ Unt.
 ■ Ionomycin 2.5 μ M
 ■ Calcium 1 mM
 ■ Ionomycin + Calcium

C

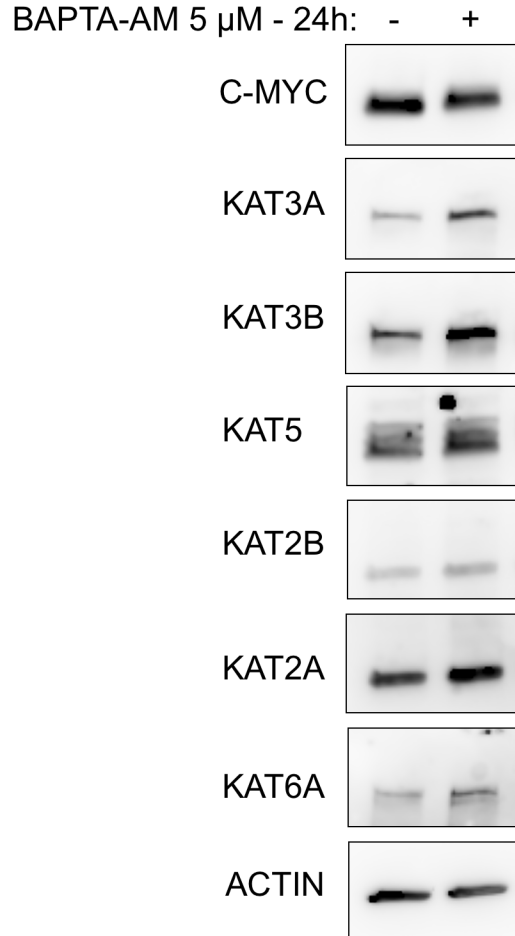


■ Unt.
 ■ BAPTA-AM 2 μ M
 ■ BAPTA-AM 5 μ M
 ■ BAPTA-AM 10 μ M

B



D



6. Annexe 6: Activités anticancéreuses de la proscillaridine A dans les ostéosarcomes pédiatriques.

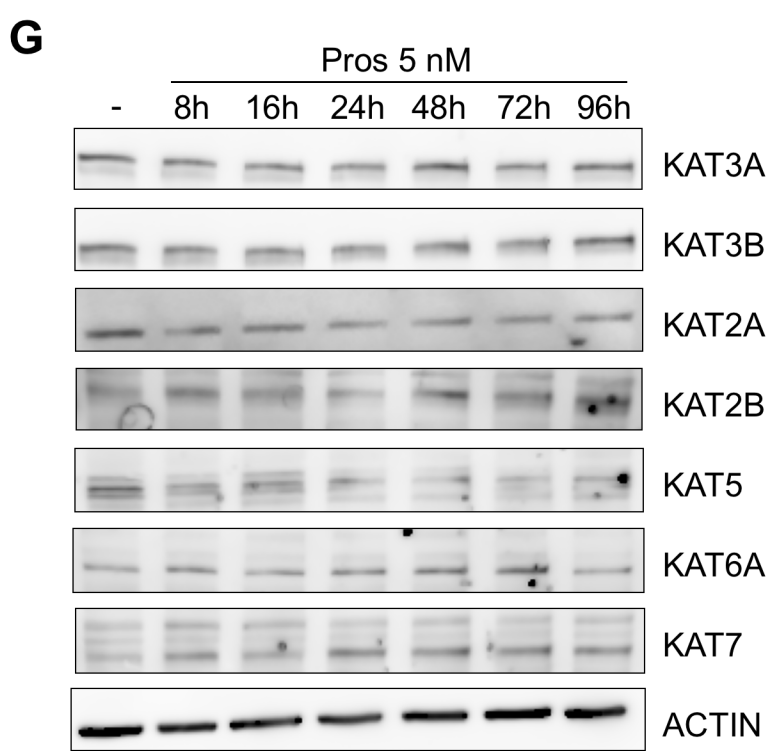
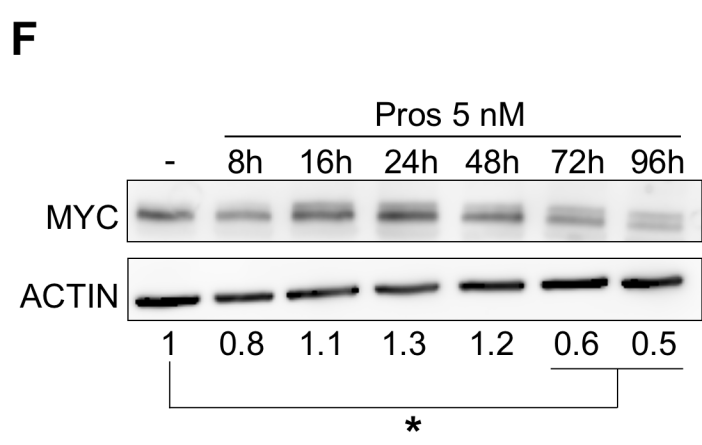
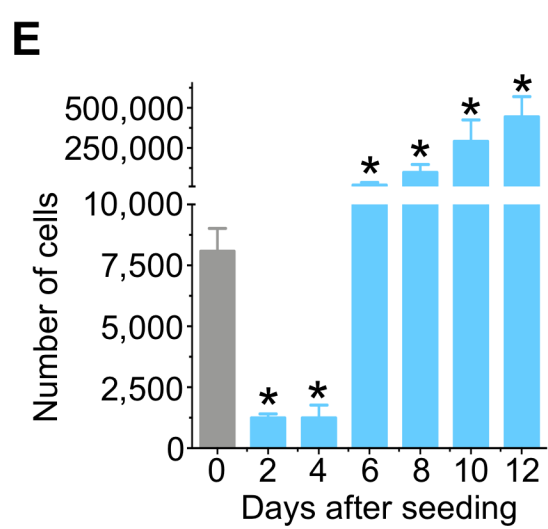
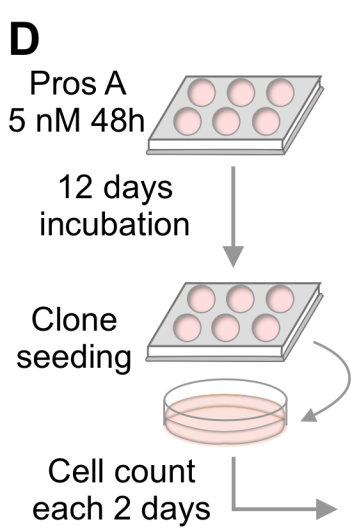
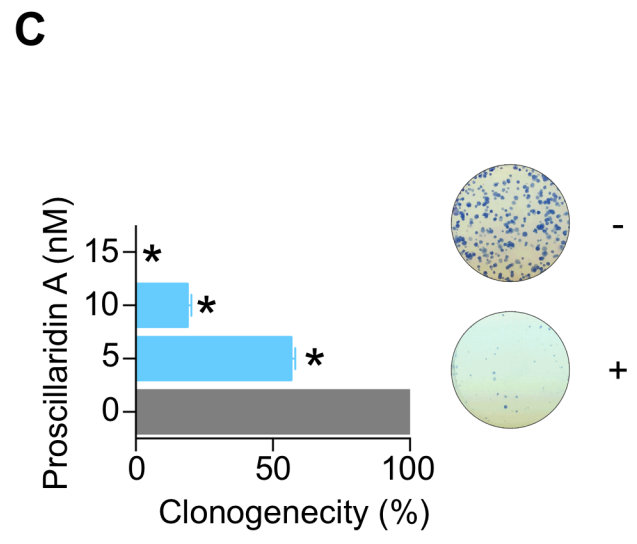
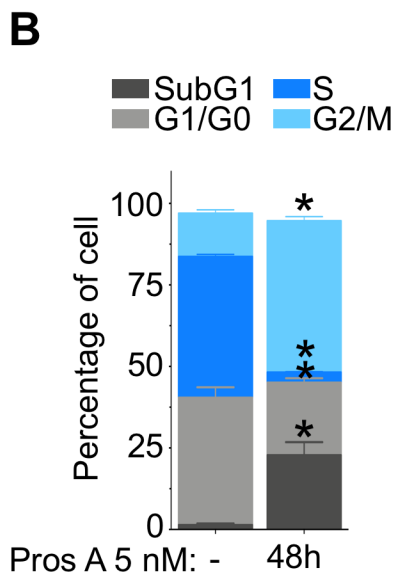
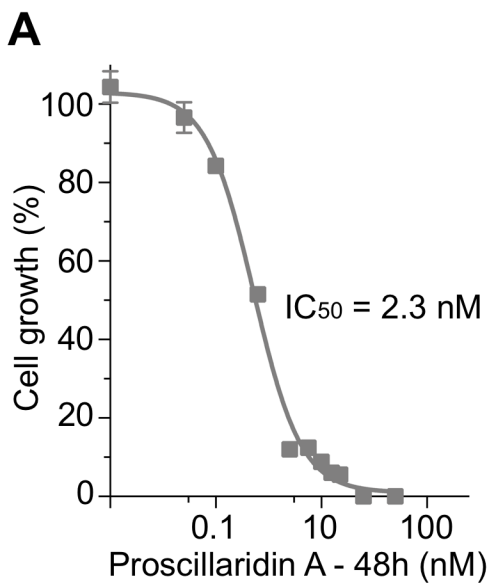
Description: Nous avons testé l'activité anticancéreuse de la proscillaridine A sur des cellules d'ostéosarcomes (U2OS) pendant une période de 48h (A). Nous mesurons que la proscillaridine A exerce une activité anticancéreuse avec un IC_{50} de 2.3 nM (A). Également, comme dans les LLAs et les RMS-e, la proscillaridine A induit un arrêt du cycle cellulaire en G2/M des cellules U2OS (B). De plus, un traitement de 48h de proscillaridine A inhibe la capacité des U2OS à former des clones de plus de 40% à 5 nM, de 70% à 10 nM et aucun clone ne se forme avec une concentration de 15 nM (C). Toutefois, différemment des RMS-e, les clones persistants après un traitement de 5 nM de proscillaridine A pendant 48h sont toujours capables de se diviser (D et E). Un traitement de proscillaridine A (5 nM; 48h) n'est donc pas suffisant pour induire une totale reprogrammation des cellules d'ostéosarcomes. De plus, un traitement de proscillaridine A (5 nM) inhibe l'expression de l'oncogène MYC de manière significative après 72h de traitement. Cette inhibition est tardive en comparaison aux LLAs et aux RMS-e, dont l'inhibition est significative après 8h et 16h de traitement, respectivement.

Par la suite, vu que nous avons caractérisé que la proscillaridine A induit des effets anticancéreux via une pan-inhibition des KATs dans les LLAs et les RMS-e, nous avons vérifié si le traitement de proscillaridine A induisait également cet effet dans les cellules de U2OS (G et H). À l'exception de KAT5 après 96h de traitement de proscillaridine A (5 nM), aucun changement significatif de l'expression des KATs n'est mesuré en réponse à la proscillaridine A dans les cellules U2OS (G et H). Également, aucune baisse significative de l'acétylation des histones 3 et 4 n'est mesurée en réponse au traitement de proscillaridine A, résultant certainement de l'expression stable des KATs (I, J, K et L). De plus, nous pouvons mesurer une augmentation de l'acétylation des lysines K9 et K14 après 72h de traitement, dont les niveaux redeviennent stables après 96h de traitement. Ces résultats démontrent que dans les ostéosarcomes, la proscillaridine A induit un effet anticancéreux à court terme avec une baisse de la viabilité cellulaire, une baisse du potentiel clonogénique et un arrêt du cycle cellulaire. Toutefois, un traitement plus long (72h) est nécessaire pour induire l'inhibition de MYC en comparaison aux cellules de LLAs et de RMS-e, et l'inhibition de l'expression protéique des KATs n'est pas induite, résultant à des niveaux d'acétylation stables des histones 3 et 4.

Légende: **(A)** Courbe représentant la concentration inhibitrice à 50% (IC_{50}) de la proscillaridine A après 48h de traitement dans la lignée cellulaire d'ostéosarcome U2OS (n=3). **(B)** Histogrammes représentant le pourcentage de cellules U2OS dans les différentes phases du

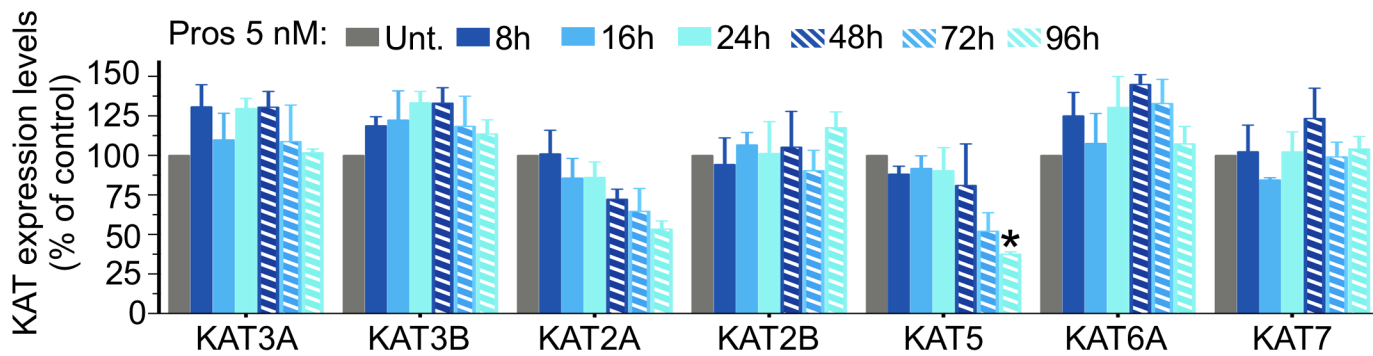
cycles cellulaires sans traitement ou en réponse à un traitement de 48h de proscillaridine A (5 nM; * représente une valeur de $P \geq 0.05$, $n=3$). **(C)** Pourcentage de clones formés par les cellules U2OS en réponse à un traitement de 48h de proscillaridine A (5 nM, 10 nM et 15 nM) par rapport aux cellules non traitées (* représente une valeur de $P \geq 0.05$, $n=3$). **(D)** Schéma décrivant le repiquage des clones formés par les U2OS après avoir reçu 5 nM de proscillaridine A pendant 48h et être incubés pendant 12 jours. Les clones restant ont été tripsinisés puis réensemencés dans des plaques 6 puits. Le compte cellulaire a été effectué tout les deux jours pendant 12 jours. **(E)** Histogrammes représentant le nombre de cellules U2OS après le repiquage des clones (* représente une valeur de $P \geq 0.05$, $n=3$). **(F)** Mesure de l'expression de l'oncogène MYC par immunobuvardage de type Western en réponse à un traitement de 5 nM de proscillaridine A pendant 8h, 16h, 24h, 48h, 72h et 96h. L'ACTINE est utilisée comme contrôle de charge (* représente une valeur de $P \geq 0.05$, $n=3$). **(G-H)** Mesure et quantification de l'expression des KATs par immunobuvardage de type Western en réponse à un traitement de 5 nM de proscillaridine A pendant 8h, 16h, 24h, 48h, 72h et 96h dans les cellules U2OS. **(G)** Images représentatives des analyses par immunobuvardage. L'ACTINE est utilisée comme contrôle de charge. **(H)** Histogrammes représentant le pourcentage de l'expression des KATs par rapport aux cellules non traitées (* représente une valeur de $P \geq 0.05$, $n=3$). **(I à L)** Mesure et quantification des marques d'acétylation présentes sur l'histone 3 et 4 par immunobuvardage de type Western en réponse à un traitement de 5 nM de proscillaridine A pendant 8h, 16h, 24h, 48h, 72h et 96h dans les cellules U2OS. **(I)** Images représentatives des analyses par immunobuvardage de l'acétylation sur les lysines K9, K14, K18, K27 et de l'acétylation totale présente sur l'histone 3 (H3). H3 est utilisée comme contrôle de charge. **(J)** Histogrammes représentant le pourcentage d'acétylation des différentes lysines sur H3 par rapport aux cellules non traitées (* représente une valeur de $P \geq 0.05$, $n=3$). **(K)** Images représentatives des analyses par immunobuvardage de l'acétylation sur les lysines K5, K8, K16, K20 et de l'acétylation totale présente sur l'histone 4 (H4). H4 est utilisée comme contrôle de charge. **(L)** Histogrammes représentant le pourcentage d'acétylation des différentes lysines sur H4 par rapport aux cellules non traitées (* représente une valeur de $P \geq 0.05$, $n=3$).

Annexe 6

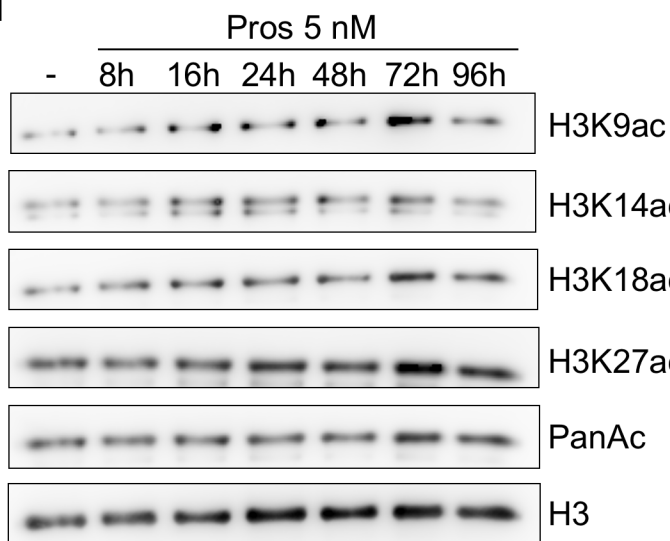


Annexe 6 - suite

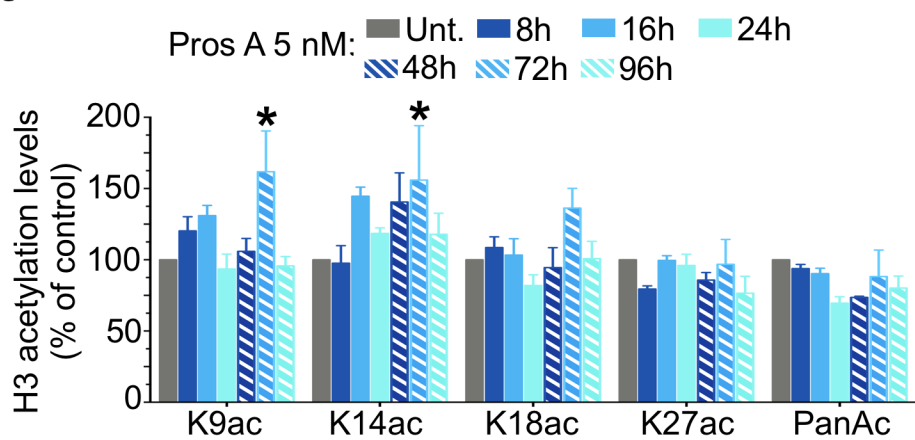
H



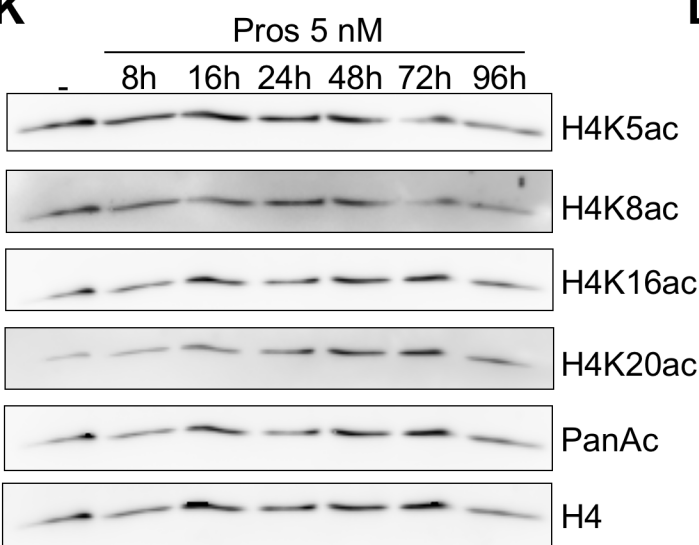
I



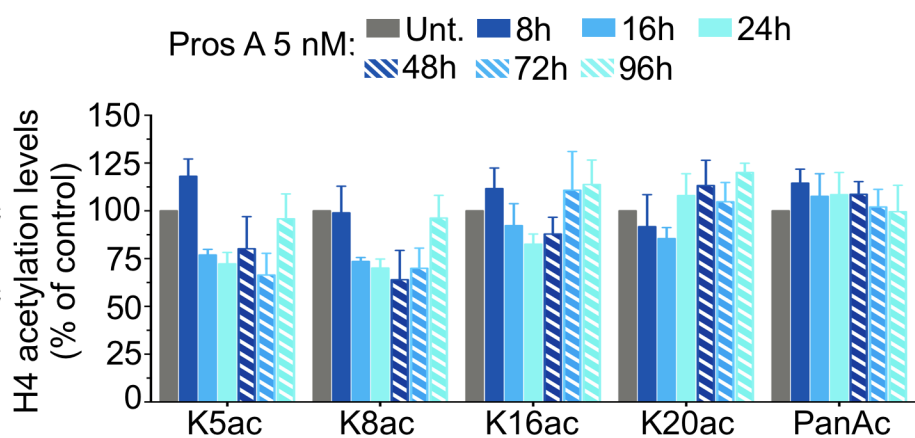
J



K



L



7. Annexe 7: Modification de l'expression de certains oncogènes et des KATs en réponse à une monothérapie de décitabine, à une monothérapie de proscillaridine A et à une combinaison de décitabine et de proscillaridine A dans les rhabdomyosarcomes embryonnaires.

Description: Afin de mieux évaluer le mécanisme d'action impliqué dans la synergie anticancéreuse de la combinaison de décitabine avec la proscillaridine A, nous avons tout d'abord mesuré le niveau d'expression protéique de plusieurs oncogènes impliqués dans les RMS et de la protéine pro-tumorales MYOSIN-Heavy Chain (MYOSIN-HC) en réponse à une monothérapie de proscillaridine A (5 nM; 48h), à une monothérapie de décitabine (100 nM; 72h + 48h sans traitement) et à une combinaison séquentielle de ces deux médicaments (72h de decitabine à 100 nM suivi de 48h proscillaridine A à 5 nM) dans les cellules RD (7A et 7B). La baisse d'expression de MYC, MYOD1, MYOG et MYOSIN-HC est observée en réponse aux deux monothérapies. Cependant, la monothérapie de proscillaridine A induit une inhibition plus prononcée de ces protéines que la monothérapie de décitabine, en particulier l'inhibition complète de MYOD1 et MYOG (Annexe 7A et 7B). De plus, nous observons que l'expression protéique de NRAS n'est affecté par aucun des traitements (7A et 7B).

Par la suite, nous nous sommes demandés si cette combinaison de traitement pouvait modifier l'inhibition de l'expression des KATs observée avec la monothérapie de proscillaridine A. En premier lieu, nous observons que la monothérapie de décitabine n'affecte pas le niveau d'expression des KATs en comparaison aux cellules RD non-traitées, à l'exception de KAT2B et KAT5, pour lesquelles une faible augmentation est mesurée (7C et 7D). En deuxième lieu, en comparaison avec la monothérapie de proscillaridine A, la combinaison séquentielle de decitabine et de proscillaridine A neutralise la baisse d'expression de KAT2A et de KAT5 sans affecter la baisse d'expression de KAT3A et KAT3B (7C et 7D). En dernier lieu, la combinaison séquentielle inhibe spécifiquement l'expression de KAT6A qui n'était pas observée avec les monothérapies de décitabine et de proscillaridine A (7C et 7D).

Légende: **(A-B)** Mesure du niveau d'expression protéique d'oncogènes spécifiques au RMS en réponse à à une monothérapie de 48h de proscillaridine A (5 nM), à une monothérapie de 72h de decitabine (100 nM) suivie par une période de repos de 48h et à une combinaison séquentielle de 72h de decitabine (100 nM) suivi de 48h de proscillaridine A (5 nM) dans les cellules RD. **(A)** Le niveau d'expression protéique de MYC, MYOD1, MYOGENIN (MYOG), MYOSIN- Heavy Chain (MYOS-HC) et NRAS a été mesuré par immunobuvardage de type western dans les cellules RD (L'ACTINE est utilisée comme contrôle de charge). **(B)** Le niveau d'expression protéique des oncogènes et des protéines pro-tumorales a été quantifié et est exprimé en pourcentage par rapport aux cellules RD non traitées (n=2). **(C-D)** Mesure du niveau

d'expression protéique des KATs en réponse à une monothérapie de 48h de proscillaridine A (5 nM), à une monothérapie de 72h de decitabine (100 nM) suivie par une période de repos de 48h et d'une combinaison séquentielle de 72h de decitabine (100 nM) suivi de 48h de proscillaridine A (5 nM) dans les cellules RD. **(C)** Le niveau d'expression protéique de KAT2A, KAT2B, KAT3A, KAT3B, KAT5, KAT6A et KAT7 a été mesuré par immunobuvardage de type western dans les cellules RD (L'ACTINE est utilisée comme contrôle de charge). **(D)** Le niveau d'expression protéique des KATs a été quantifié et est exprimé en pourcentage par rapport aux cellules RD non traitées (n=2).

Annexe 7

