

INRS-Institut Armand-Frappier

**Augmentation de l'effet anticancéreux
de la 5-aza-2'-désoxycytidine par la génistéine**

Par

Noël J.-M. RAYNAL, M.Sc.

**Thèse présentée
pour l'obtention du grade de Philosophiae doctor (Ph.D.)
en biologie**

Jury d'évaluation

Président du jury et examinateur interne	Professeur Yves Saint-Pierre, INRS-Institut Armand-Frappier
Examineur externe	Professeur Pierre Haddad, Université de Montréal
Examineur externe	Professeur Bertrand J. Jean-Claude, Université McGill
Directeur de recherche	Professeur Michel Charbonneau, INRS-Institut Armand-Frappier
Codirecteur de recherche	Professeur Richard L. Momparler, Université de Montréal

Droit réservé de Noël J.-M. Raynal, 2008

Résumé

Ces dernières années ont connu une explosion des connaissances sur les modifications épigénétiques apparaissant dans les cellules cancéreuses. L'importance de ces mécanismes dans le cancer a encouragé l'utilisation clinique d'un inhibiteur de la méthylation de l'ADN nommé la 5-aza-2'-désoxycytidine (5-AZA-CdR). Ce médicament a un nouveau mécanisme d'action qui permet de réactiver les gènes suppresseurs de tumeurs inhibés dans les cellules cancéreuses. Cet agent suscite beaucoup d'espoir pour le traitement chimiothérapeutique du cancer et son utilisation en clinique a été autorisée pour le traitement des syndromes myélodysplasiques.

Les agents anticancéreux peuvent être utilisés en combinaison afin d'augmenter l'efficacité de la chimiothérapie et de détruire les cellules cancéreuses résistantes à un agent donné, sans augmenter la toxicité chez le patient. Cette dernière est généralement très élevée et elle représente un facteur limitant dans l'efficacité des médicaments.

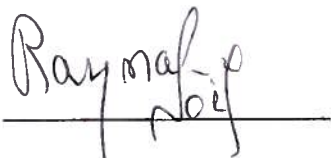
La recherche effectuée dans le cadre de ce doctorat a pour objectif d'augmenter l'efficacité anticancéreuse de la 5-AZA-CdR en combinaison avec la génistéine. Plusieurs caractéristiques de la génistéine nous ont amenés à émettre l'hypothèse que la combinaison avec la 5-AZA-CdR pourrait présenter des avantages intéressants pour le traitement du cancer. Tout d'abord, la génistéine est une isoflavone retrouvée dans le soja qui présente une activité chimiopréventive. La génistéine est une molécule non toxique utilisée depuis des siècles par la médecine traditionnelle. Au niveau moléculaire, elle possède une action pléiotropique sur les mécanismes cellulaires. Comme cette molécule agit sur plusieurs voies cellulaires en même temps, elle réduit la probabilité du développement de la résistance des cellules cancéreuses par rapport à l'utilisation d'un agent spécifique à une seule voie cellulaire.

Tout d'abord, nous avons évalué l'activité antileucémique *in vitro* et *in vivo* de la génistéine utilisée seule. Elle produit une activité antinéoplasique contre des lignées

cellulaires de leucémies myéloïde et lymphoïde. De plus, le traitement de la génistéine sur des cellules leucémiques réactive des gènes suppresseurs de tumeurs. Chez des souris leucémiques, une diète enrichie en génistéine produit un effet antileucémique modéré, mais significatif.

Dans un deuxième temps, nous avons étudié l'effet de la combinaison de la génistéine avec la 5-AZA-CdR. La combinaison produit un effet anticancéreux synergique sur des lignées cellulaires humaines de leucémies myéloïde et lymphoïde. La génistéine induit aussi une activité antileucémique contre des cellules résistantes à la 5-AZA-CdR. Cet effet est augmenté quand la génistéine était utilisée en combinaison avec la 5-AZA-CdR. *In vivo*, cette combinaison prolonge le temps de survie des souris leucémiques, sans augmenter la toxicité de la 5-AZA-CdR. Ces résultats démontrent que la génistéine a le potentiel d'augmenter l'efficacité clinique de la 5-AZA-CdR pour le traitement des leucémies.

Cette combinaison possède aussi un potentiel anticancéreux contre des cellules du cancer du poumon, du sein et du colon. Ceci suggère que cette activité anticancéreuse pourrait être appliquée à d'autres types de cancer. Les résultats précliniques démontrent que la combinaison de la génistéine et de la 5-AZA-CdR possède des caractéristiques intéressantes pour la chimiothérapie anticancéreuse. Une telle combinaison pourrait avoir un impact significatif en clinique, notamment pour des patients âgés qui ne peuvent pas supporter la trop grande toxicité des traitements anticancéreux.



Noël J-M Raynal



Michel Charbonneau

Remerciements

Tout d'abord, mes remerciements vont aux professeurs Michel Charbonneau et Richard L. Momparler pour leur excellent encadrement, leur enseignement et leurs efforts pour m'apprendre toutes les facettes du métier de chercheur.

P^r Charbonneau, je garderais longtemps en mémoire votre optimisme et ces longues soirées au téléphone à travailler ensemble sur des projets. Ces années passées sous votre direction ont été riches en enseignement. Je vous remercie pour votre confiance et votre appui dans les moments plus difficiles. Les démarches que vous avez initiées pour la demande de brevet et auprès des compagnies, m'ont fait découvrir d'autres perspectives de la recherche. Mes années d'études doctorales ont été très stimulantes, riches en apprentissages et passionantes.

P^r Momparler, je vous remercie, tout d'abord, de m'avoir apporté votre aide précieuse en acceptant de co-superviser mon doctorat. Ces deux années et demie passées dans votre laboratoire ont été pour moi extrêmement enrichissantes sur le plan scientifique et personnel. Je vous remercie pour toute l'énergie pour que vous avez mise dans mon encadrement scientifique. Sur le plan personnel, vous m'aurez appris la responsabilité que le chercheur a envers les patients et l'urgence avec laquelle il doit améliorer les thérapies.

Louise, il est évident que je dois te remercier pour toutes les techniques que tu m'as apprises. Toutes ces heures passées avec toi à travailler sous la hotte et à l'animalerie ont été un pur bonheur. D'ailleurs, je ne les ai pas vu passées, sans doute parce qu'on parlait sans arrêt de choses et d'autres. Merci pour ton aide, ton support et surtout ta grande amitié.

Guylaine, les deux années passées à tes côtés dans le laboratoire à Pointe-Claire ont été sous le signe d'une grande amitié, de bons moments et d'éclats de rire, nécessaires à mon moral. ¡Muchas gracias!

Évidemment, ces longues années d'études, ces heures au laboratoire et ces moments passés à rédiger n'auront été possibles sans le soutien inconditionnel et la patience de Véronique, mon épouse. Merci de m'avoir secoué les neurones quand il le fallait et d'avoir pris le temps de relire ma thèse ! Ce doctorat est aussi un peu le tien. Je remercie aussi mes parents, mon frère et ma sœur pour leurs encouragements et leur venue à Montréal pour des vacances et pour notre mariage. Merci au reste de ma famille pour leur soutien et à ma grand-mère de m'avoir demandé si souvent : «quand est-ce que tu finis ?». Merci à la famille de Véronique pour son appui et les bons repas de mes beaux-parents, qui ont nourri un étudiant en pleine croissance !

Enfin, il est indispensable d'avoir le soutien de ses amis dans cette longue épreuve psychologique qu'est le doctorat. Merci de m'avoir fait oublier mes expériences quand il le fallait ou au contraire, me donner la motivation de continuer mes recherches. Merci à vous tous : Ben, Joanna, Éric, Hélène, Marine, Lorenza, Jérôme, Marie-Élaine, Martin, Caro, Véro Ouellet, Roly, Rafael, Alexia, Amal, Maryse, Annie, Patrice, Benoît, Lauriane et Nicolas....

Je remercie également la Fondation Armand-Frappier et le centre de recherche de l'Hôpital Ste-Justine pour les bourses doctorales et le support financier aux étudiants que ces institutions m'ont respectivement accordés.

Liste des figures

Figure 1 : La transformation d'une cellule normale en cellule cancéreuse se fait en plusieurs étapes : l'initiation, la promotion, la progression et les métastases.....	7
Figure 2 : Les changements génétiques (mutations et délétions chromosomiques) et épigénétiques dans le cancer (adaptation d'Herman & Baylin 2003).....	8
Figure 3 : La méthylation de l'ADN (Worm et Guldberg, 2002).	10
Figure 4 : La méthylation de l'ADN est un mécanisme de contrôle de la transcription.11	
Figure 5 : Modifications épigénétiques impliquées et la structure de la chromatine (Worm et Guldberg, 2002).	14
Figure 6 : La cinétique de Gompertzian de croissance des cellules cancéreuses.	22
Figure 7 : La chimiothérapie et les cellules souches cancéreuses (CSC ; adaptation de Kvinlaug et Huntly, 2007).	24
Figure 8 : Autorenouvellement et différenciation des cellules souches normales et leucémiques (adapté de Huntly et Gilliland, 2005).	25
Figure 9 : Incidence des leucémies aiguës lymphoïdes (LAL) et des leucémies aiguës myéloïdes (LAM) aux États-Unis en fonction de l'âge (adapté de De Vita, Hellman et Rosenberg, 2005).	29

Figure 10 : Taux de survie (A) chez des patients traités pour des leucémies aiguës myéloïdes ou (B) des leucémies aiguës lymphoïdes (adapté de De Vita, Hellman et Rosenberg, 2005).	30
Figure 11 : La structure chimique de la 5-aza-2'-désoxycytidine (5-AZA-CdR).....	37
Figure 12 : Le métabolisme de la 5-aza-2'-désoxycytidine.	38
Figure 13 : Le mécanisme moléculaire d'action de la 5-AZA-2'-désoxycytidine (5-AZA-CdR ; adapté de Momparler, 2005).	39
Figure 14: La génistéine (4',5,7-trihydroxyisoflavone).	47
Figure 15 : Proposition du mécanisme d'action de la génistéine via l'effet de son métabolite la tétrahydroxyisoflavone dans les cellules T47D (adapté de Nguyen et al., 2006).	51

Liste des tableaux

Tableau 1 : Évolution du taux de survie (%) à cinq ans après le diagnostic d'un cancer dans les années 1970 et 2000.	1
Tableau 2 : Les modifications épigénétiques de la chromatine et l'effet sur l'expression des gènes.	16
Tableau 3 : Liste de gènes dont les CpG sont hyperméthylés et inhibés dans le cancer.	19
Tableau 4 : La durée du cycle cellulaire des cellules leucémiques, des lymphocytes et des myélocytes.	26
Tableau 5 : Les mécanismes moléculaires de l'effet anticancéreux de la génistéine. ..	55

Liste des abréviations

5-AZA-CdR : 5-aza-2'-désoxycytidine

5^mC : 5-méthyle-cytosine

A : adénine

ADN : acide désoxyribonucléique

ARA-C : cytosine arabinoside

ARN : acide ribonucléique

C : cytidine

CdR kinase : kinase de désoxycytidine

CSC : cellule souche cancéreuse

CSL : cellule souche leucémique

dCMP désaminase : désaminase de désoxycytidine-5'-monophosphate

dCMP kinase : kinase de désoxycytidine-5'-monophosphate

dCTP : désoxycytosine triphosphate

DNMT : pour «DNA methyltransferase» soit méthyltransférase à ADN

G : guanine

h : heure

H : histone

HAT : histone acétyltransférase

HDAC : histone désacétylase

i.v. : intra-veineux

K : lysine

LAL : leucémie aiguë lymphoblastique

LAM : leucémie aiguë myéloïde

MAP : pour «mitogen-activated kinase» soit une kinase activée par des signaux mitogènes

MLL : pour «myeloid/lymphoid or mixed lineage leukemia» soit un gène de leucémie myéloblastique ou lymphoblastique

MTT : solution de bromure de 3-(4,5-diméthyle-2-thiazolyl)-2,5-diphényl-2H-tétrazolium

RC : rémission complète

SAM : S-adénosylméthionine

SMD : syndromes myélodysplasiques

T : thymidine

TSG : pour «tumor suppressor gene» soit gène suppresseur de tumeur

x

Table des matières

RÉSUMÉ	I
REMERCIEMENTS	III
LISTE DES FIGURES	V
LISTE DES TABLEAUX.....	VII
LISTE DES ABRÉVIATIONS	VIII
INTRODUCTION.....	1
PREMIÈRE PARTIE : LA REVUE DE LA LITTÉRATURE.....	4
CHAPITRE 1 : LE CANCER.....	5
1.1 Définition des cellules cancéreuses :	5
1.2 Les facteurs génétiques et épigénétiques dans le déclenchement du cancer :	6
1.3 Les deux principales modifications épigénétiques, la méthylation de l'ADN et la modification des histones :	9
1.3.1 La méthylation de l'ADN :	9
1.3.2 Le contrôle épigénétique de l'expression des gènes :	13
1.3.3 Les modifications des facteurs épigénétiques dans le cancer :	17
1.5 Les bases théoriques de la chimiothérapie anticancéreuse :	19
1.6 La leucémie et les approches thérapeutiques :	24
1.6.1 Définition :	24
1.6.2 Les cellules souches leucémiques :	28
1.6.3 Les statistiques sur la leucémie :	28
1.6.4 Les traitements :	30
1.7 Le cancer du poumon et les approches thérapeutiques :	32
1.8 Les méthodes de calcul des interactions pharmacologiques :	34
CHAPITRE 2 : LA 5-AZA-2'-DÉSOXYCYTIDINE	37
2.1 Le mécanisme d'action de la 5-aza-2'-désoxycytidine (5-AZA-CdR) :	37

2.1.1 L'activation de la 5-AZA-CdR de sa forme précurseur à sa forme active :	37
2.1.2 L'effet épigénétique de la 5-AZA-CdR :	39
2.2 Le 5-aza-2'-désoxycytidine en clinique :	42
2.2.1 La pharmacologie de la 5-AZA-CdR :	42
2.2.2 Les résultats cliniques de la 5-AZA-CdR :	43
CHAPITRE 3 : LA GÉNISTÉINE	47
3.1 Généralités :	47
3.2 La génistéine et son rôle dans la chimioprévention :	49
3.3 La biodisponibilité de la génistéine chez l'humain :	49
3.4 Le métabolisme de la génistéine :	50
3.4 Les mécanismes moléculaires responsables de l'action anticancéreuse de la génistéine :	52
3.5 La génistéine, un adjuvant dans la chimiothérapie :	56
DEUXIÈME PARTIE : LES RÉSULTATS DE LA RECHERCHE	58
CHAPITRE 1 : L'ACTIVITÉ ANTILEUCÉMIQUE DE LA GÉNISTÉINE, UNE ISOFLAVONE PRÉSENTE DANS LES PRODUITS DU SOJA	59
1.1 Traduction du résumé de l'article :	59
1.2 Contribution de l'étudiant :	59
1.3 Antileukemic Activity of Genistein, a Major Isoflavone Present in Soy Products :	60
CHAPITRE 2 : EFFET SYNERGIQUE DE LA COMBINAISON DE LA 5-AZA-2'-DÉSOXYCYTIDINE ET DE LA GÉNISTÉINE CONTRE LA LEUCÉMIE	80
2.1 Traduction du résumé de l'article :	80
2.2 Contribution de l'étudiant :	80
2.3 Synergistic effect of 5-aza-2'-deoxycytidine and genistein in combination against leukaemia :	81
CHAPITRE 3 : AUGMENTATION DE L'EFFET ANTITUMORAL DE LA 5-AZA-2'-DÉSOXYCYTIDINE PAR LA GÉNISTÉINE SUR DES LIGNÉES HUMAINES DE CANCER DU POU MON	102
3.1 Traduction du résumé de l'article :	102
3.2 Contribution de l'étudiant :	103

3.3 Enhancement of the antitumoral effect of 5-aza-2'-deoxycytidine by genistein on human lung carcinoma cells:	104
TROISIÈME PARTIE : DISCUSSION ET CONCLUSIONS.....	124
DISCUSSION	125
CONCLUSIONS	143
CONTRIBUTION À L'AVANCEMENT DES CONNAISSANCES	144
RÉFÉRENCES.....	145
 APPENDICE A : OPTIMISATION DE LA THÉRAPIE DE LA LEUCÉMIE AIGÜE.	 159
A.1 Contribution de l'étudiant :	160
A.2 Optimization of Therapy of Acute Leukemia :	160
 APPENDICE B : IMPORTANCE DE LA POSOLOGIE DE LA 5-AZA-2'-DÉSOXYCYTIDINE POUR LA THÉRAPIE ÉPIGÉNÉTIQUE DU CANCER. ...	 169
B.1 Traduction du résumé de l'article :	170
B.2 Contribution de l'étudiant :	171
B.3 Importance of dose-schedule of 5-aza-2'-deoxycytidine for epigenetic therapy of cancer :	172
 APPENDICE C : TABLEAU DES GÈNES TESTÉS POUR DES CHANGEMENTS D'EXPRESSION INDUITS PAR LA GÉNISTÉINE.	 176
 APPENDICE D : ANALYSES HISTOPATHOLOGIQUES DE CELLULES TUMORALES EXPOSÉES À LA 5-AZA-CDR ET À LA GÉNISTÉINE.....	 178
 APPENDICE E : EFFET DE LA 5-AZA-CDR ET DE LA GÉNISTÉINE SUR LE POTENTIEL CLONOGENIQUE ET LA MORPHOLOGIE DE LA LIGNÉE DE CANCER DU SEIN MDA-MB-231.....	 180

APPENDICE F : EFFET DE LA 5-AZA-CDR ET DE LA GÉNISTÉINE SUR LE POTENTIEL CLONOGÉNIQUE ET LA MORPHOLOGIE DE LA LIGNÉE DE CANCER DU COLON DLD-1.....	182
---	------------

APPENDICE G : TEST DE LA RÉSISTANCE À L'EXPOSITION À LA 5-AZA- CDR DE LA LIGNÉE CELLULAIRE L1210/ARA-C.	185
---	------------

APPENDICE H : COURBE DE DOSE-RÉPONSE DE L'EFFET D'UNE INFUSION DE LA 5-AZA-CDR SUR LE TEMPS DE SURVIE DES SOURIS.	187
---	------------

Introduction

Depuis les années 1970, le temps de survie des patients atteints d'un cancer est en augmentation grâce à un diagnostic précoce, une amélioration des traitements, un meilleur suivi des patients et une baisse de la consommation de cigarettes. Le tableau 1 présente l'augmentation du taux de survie à cinq ans pour différents cancers chez des patients diagnostiqués de 1974 à 1976 (DeVita *et al.*, 2005) et de 2001 à 2003 (Société canadienne du cancer, voir <http://cancer.ca>). Pour tous les cancers, l'augmentation du taux de survie à 5 ans est passée de 50 à 62 %. Les cancers les plus diagnostiqués, classés par ordre de mortalité décroissante, sont chez l'homme, les cancers du poumon, du colon et de la prostate et chez la femme, les cancers du poumon, du sein et du colon.

Tableau 1 : Évolution du taux de survie (%) à cinq ans après le diagnostic d'un cancer dans les années 1970 et 2000.

Types de cancer	1974–1976	2001–2003
	Taux de survie à 5 ans (%)	
Tous les cancers	50	62
Leucémie	34	50
Cancer du poumon	13	15
Cancer du colon	50	62
Cancer du sein	75	87
Cancer de la prostate	67	94

Le cancer est la première cause de mortalité au Canada et dans de nombreux pays industrialisés. Le nombre de nouveaux cas de patients atteints du cancer est en augmentation, principalement attribuable à la croissance démographique et surtout au vieillissement de la population. En effet, 44 % des nouveaux cas et 60 % des décès causés par le cancer surviennent chez des personnes de 70 ans et plus. Les statistiques de la Société canadienne du cancer (<http://cancer.ca>) prévoient en 2008 l'apparition de 166 400 nouveaux cas et 73 800 décès. Au Canada, le taux d'incidence actuel est tel que 40 % des femmes et 45 % des hommes seront atteints d'un cancer au cours de leur vie et environ un Canadien sur quatre mourra de cette maladie.

La recherche s'est d'abord concentrée sur les mutations génétiques qui étaient perçues comme la principale cause du cancer. D'autres travaux ont ensuite démontré que le cancer était causé par un ensemble d'aberrations génétiques et épigénétiques. Le terme épigénétique décrit la transmission de l'état de l'expression des gènes qui n'est pas causée par des changements de la séquence de l'ADN (Yoo et Jones, 2006). Les processus épigénétiques sont présents dans tous les aspects de la biologie. Les changements épigénétiques jouent un rôle très important dans la carcinogenèse, des stades néoplasiques jusqu'aux métastases, car ils sont transmis lors des divisions cellulaires (Jones et Baylin, 2007). Ces modifications sont maintenant perçues comme l'élément causal de la maladie. Le phénomène épigénétique le plus étudié est la méthylation de l'ADN (Yoo et Jones, 2006). Contrairement aux mutations qui sont irréversibles, les aberrations épigénétiques sont réversibles. Cette découverte a ouvert la voie à des recherches sur l'étude des mécanismes moléculaires responsables de ces changements réversibles. D'un point de vue pharmacologique, la découverte des mécanismes épigénétiques a aussi mis en lumière de nombreuses cibles moléculaires dont la modification a pour but d'éradiquer l'ensemble des cellules malignes. Cette thérapie épigénétique du cancer a permis le développement de nombreux médicaments qui ciblent les enzymes impliquées dans la régulation épigénétique de l'expression des gènes (Yoo et Jones, 2006).

Nos travaux de recherche en thérapie épigénétique du cancer portent sur un inhibiteur irréversible de la méthylation de l'ADN de la classe des analogues de nucléosides, la 5-aza-2'-désoxycytidine (5-AZA-CdR). Ce médicament épigénétique a été approuvé en mai 2006 par la FDA («Food and Drug Administration») aux États-Unis sous le nom commercial de décitabine ou dacogen® pour le traitement des syndromes myélodysplasiques. Notre recherche s'est tournée vers des molécules à combiner avec la 5-AZA-CdR pour augmenter son efficacité et lutter contre les cellules qui lui sont résistantes, sans augmenter sa toxicité. Dans le cadre de ce doctorat en biologie, les recherches effectuées porteront sur l'étude de la combinaison de la 5-AZA-CdR avec une molécule de la classe des isoflavones, la génistéine.

Après cette brève introduction, la thèse sera divisée en trois parties. Tout d'abord, la revue de la littérature qui sera subdivisée en trois sections portant successivement sur le cancer, la 5-AZA-CdR et la génistéine. Dans une deuxième partie, nous présenterons les résultats de notre recherche. Ils seront présentés en trois sections sous forme d'articles scientifiques. Enfin, dans la troisième partie, les résultats seront discutés, tout comme leur contribution à l'avancement des connaissances dans le domaine de la thérapie épigénétique contre le cancer.

PREMIÈRE PARTIE : LA REVUE DE LA LITTÉRATURE

Chapitre 1 : Le cancer

1.1 Définition des cellules cancéreuses :

Déjà décrit en Égypte 3500 ans av. J.-C., le cancer a d'abord été défini par Hippocrate (-460 à -370 ans av. J.-C.) comme : «un gonflement dur, non inflammatoire, ayant tendance à récidiver et se généraliser jusqu'à la mort». Pendant plusieurs siècles de recherche, le cancer est considéré comme une maladie des tissus. Grâce à l'emploi du microscope, il est ensuite perçu comme une maladie de la cellule. Aujourd'hui, le cancer est défini comme une maladie causée par une prolifération cellulaire anarchique, incontrôlée et incessante au sein d'un tissu normal.

La carcinogenèse est un processus qui se fait en plusieurs étapes parmi lesquelles on distingue les phases d'initiation, de promotion, de transformation et de métastase (Figure 1). L'initiation est produite par une altération génétique ou épigénétique de l'ADN qui donne à la cellule un avantage de croissance (Hanahan et Weinberg, 2000). D'autres modifications, notamment sur le contrôle de la croissance cellulaire, vont permettre l'émergence de clones transformés, c'est la phase de promotion. Ensuite, on observe l'expansion des clones cancéreux dans la phase de progression. L'accumulation des altérations donne la capacité aux cellules cancéreuses de former des métastases (Macdonald *et al.*, 2004). De façon générale, les cellules cancéreuses sont caractérisées par l'indépendance vis-à-vis des signaux de croissance cellulaire, la perte de l'apoptose, l'insensibilité aux signaux d'inhibition de la croissance, l'invasion tissulaire, les métastases, l'angiogenèse et la réplication illimitée (Hanahan et Weinberg, 2000).

Récemment, des recherches ont démontré que les tumeurs étaient composées d'une population hétérogène de cellules cancéreuses. Parmi celles-ci, une minorité est responsable de la croissance et de la propagation de la tumeur. Ces cellules sont appelées

les cellules souches cancéreuses (CSC). À l'image des cellules souches normales¹, elles peuvent s'autorenouveler, former des clones (grâce à leur potentiel clonogénique) et générer des cellules progénitrices différenciées². À l'opposé, la majorité des cellules cancéreuses n'ont pas la capacité de former des clones et ont perdu les caractéristiques des CSC (Kvinlaug et Huntly, 2007). L'hétérogénéité des cellules cancéreuses est causée par la différenciation des CSC résultant d'un ensemble de modifications génétiques et épigénétiques. Ces CSC sont très importantes pour la thérapie anticancéreuse, car elles sont résistantes à la plupart des traitements et sont responsables de la rechute des patients (Oakley et Van Zant, 2007).

En raison de leur longue durée de vie, les cellules souches sont des cibles privilégiées pour l'accumulation de modifications menant à leur transformation en CSC. Or, ces aberrations produisent un phénotype cancéreux qui a un caractère réversible, ce qui démontre l'origine épigénétique, et non génétique du cancer. Par exemple, des expériences de clonage ont montré que le noyau d'une cellule cancéreuse de mélanome de souris peut générer une souris normale. Cette expérience démontre le côté réversible du contrôle épigénétique de l'expression des gènes pouvant passer d'un phénotype cancéreux à un phénotype normal (Feinberg *et al.*, 2006).

1.2 Les facteurs génétiques et épigénétiques dans le déclenchement du cancer :

Le déclenchement du cancer se produit en trois étapes : (1) une dérégulation épigénétique des cellules souches, (2) une mutation ou un réarrangement chromosomique et (3) des modifications génétiques et épigénétiques ultérieures (Feinberg *et al.*, 2006).

¹ Une cellule souche est une cellule ayant une longue durée de vie qui est responsable de la formation et du maintien d'un tissu. Elle peut se diviser de façon symétrique en donnant soit deux cellules souches ou deux cellules progénitrices. Elle peut aussi se diviser de façon asymétrique en donnant une cellule souche et une cellule progénitrice Oakley, E. J., et Van Zant, G. (2007). Unraveling the complex regulation of stem cells: implications for aging and cancer. *Leukemia* 21, 612-621.

² Les cellules progénitrices différenciées perdent les caractéristiques des cellules souches, notamment la capacité de s'autorenouveler.

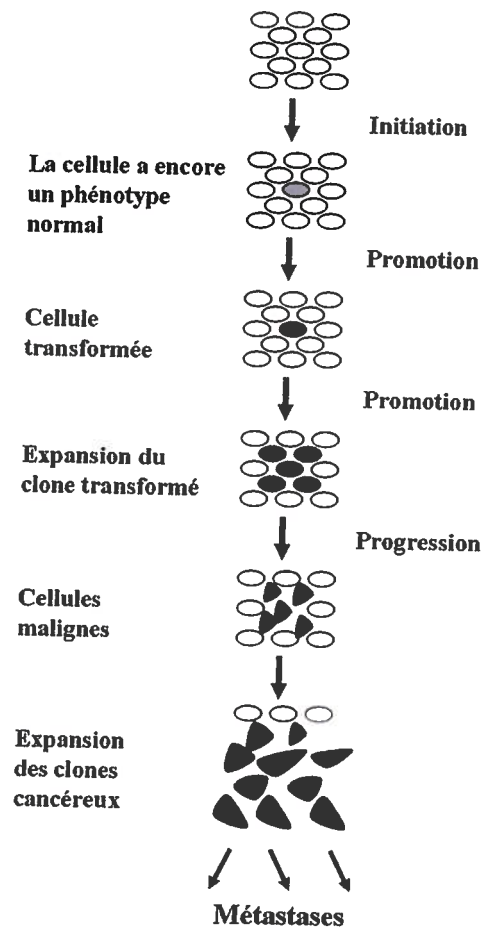


Figure 1 : La transformation d'une cellule normale en cellule cancéreuse se fait en plusieurs étapes : l'initiation, la promotion, la progression et les métastases.

L'initiation épigénétique est causée, par exemple, par une modification de la méthylation de l'ADN dans la région promotrice de gènes cibles. D'autres mutations génétiques se produisent par la suite. Elles peuvent induire l'augmentation de l'expression de certains gènes, appelés oncogènes. Ces derniers codent pour des protéines, contrôlant la prolifération cellulaire, la différenciation, le contrôle du cycle cellulaire et l'apoptose. Des mutations de ces gènes stimulent la croissance cellulaire. En outre, des mutations peuvent induire la perte de l'expression des gènes suppresseurs de tumeurs (TSG) dont la fonction est d'inhiber la progression du cycle cellulaire. Leur inactivation augmente la prolifération cellulaire. D'autres modifications génétiques peuvent se produire sous forme de

translocations chromosomiques. Elles se produisent souvent sur des séquences de l'ADN codant pour des protéines impliquées dans le contrôle épigénétique de l'expression des gènes. Par exemple, une translocation chromosomique au niveau du gène *MLL* (pour «myeloid/lymphoid or mixed lineage leukemia») inhibe sa fonction de méthyltransférase de lysine 4 des histones et favorise la transformation des cellules hématopoïétiques en CSL (Krivtsov et Armstrong, 2007).

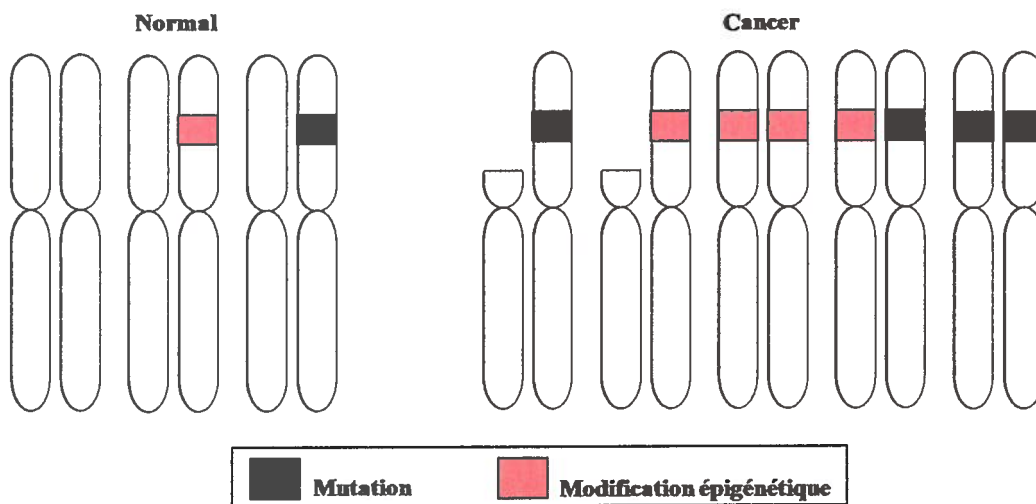


Figure 2 : Les changements génétiques (mutations et délétions chromosomiques) et épigénétiques dans le cancer (adaptation d'Herman & Baylin 2003).

Pour altérer la fonction d'un TSG, il faut que les deux copies du gène soient modifiées au niveau génétique et/ou épigénétique, pour passer d'un phénotype normal à un phénotype cancéreux. On parle d'un mécanisme à deux coups (Knudson, 1971). Ces coups peuvent être composés de deux mutations, de modifications épigénétiques ou d'une mutation et d'une modification épigénétique (Figure 2). Les délétions chromosomiques peuvent aussi affecter une des deux copies du gène. Il est rare que les deux copies d'un gène soient inactivées par des mutations de l'ADN. Cependant, des modifications épigénétiques, telle l'hyperméthylation de l'ADN, sont fréquemment impliquées dans l'inactivation des deux copies d'un TSG. Ces altérations génétiques et épigénétiques coopèrent pour transformer

les cellules normales en cellules néoplasiques qui vont acquérir la capacité d'aller former des métastases (Herman et Baylin, 2003).

1.3 Les deux principales modifications épigénétiques, la méthylation de l'ADN et la modification des histones :

1.3.1 La méthylation de l'ADN :

L'ajout d'un groupement méthyle en position 5 de la C de l'ADN post-répliqué produit une cinquième base, la 5-méthyle-cytosine (5^mC ; Figure 3A). Cette réaction est catalysée par les méthyltransférases de l'ADN (DNMT pour «DNA methyltransferase»; Figure 3B), dont le donneur de méthyle est le S-adénosylméthionine (SAM ; Goll and Bestor 2005).

Les C sont méthylées sur les deux brins de l'ADN (l'ADN méthylé sur un seul brin est dit hémi-méthylé). Trois à cinq pour cent des C de l'ADN sont méthylées (Esteller, 2007a) et environ 70 à 80% des 5^mC précèdent une guanine (G) formant un dinucléotide CpG (Bird, 1986). On nomme, «îlot CpG», toute séquence d'ADN de 40 à 300 paires de bases où la proportion en CpG est supérieure à 60 %. On retrouve des îlots CpG dans 76 % des gènes, incluant les gènes d'entretien et les gènes spécifiques aux tissus (Goll et Bestor, 2005). La méthylation des C de l'ADN est un mécanisme de contrôle de l'expression des gènes. Les C des îlots CpG présentes dans le promoteur et le premier exon d'un gène sont généralement non-méthylées et associées à l'expression du gène (Figure 4A). À l'opposé, l'hyperméthylation de ces C (Figure 4B) est associée à l'inhibition de l'expression des gènes. L'hyperméthylation des promoteurs se retrouve notamment sur le chromosome X inactif et sur les chromosomes soumis à l'empreinte génomique¹ (Robertson, 2001).

¹ Chaque gène possède un allèle d'origine paternelle et un allèle d'origine maternelle. On parle d'empreinte génomique quand un des deux allèles s'exprime en fonction de son origine parentale.

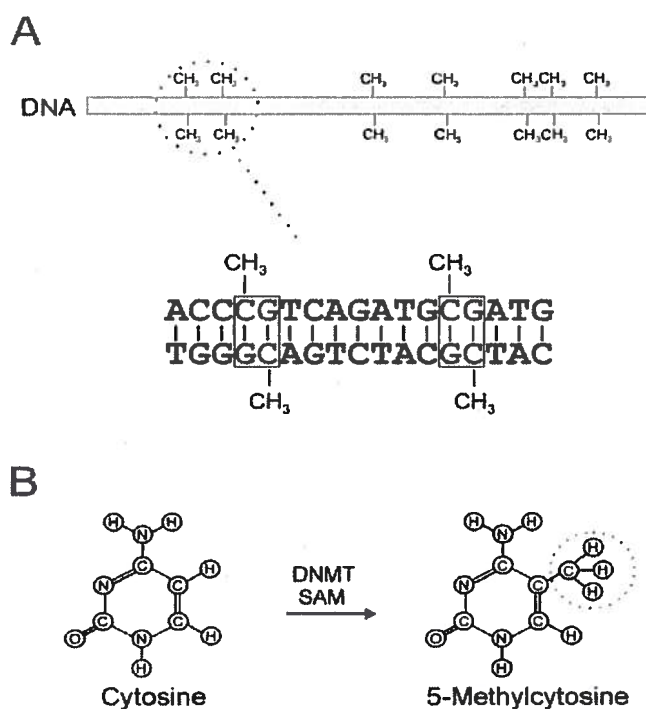


Figure 3 : La méthylation de l'ADN (Worm et Guldberg, 2002).

L'inhibition de la transcription est stabilisée par la propagation de la méthylation de l'ADN en amont et en aval des sites de fixation des facteurs de transcription (Turker, 2002). La liaison des facteurs de transcription empêche, quant à elle, la propagation de la méthylation. Les îlots CpG qui contrôlent l'expression des gènes, peuvent parfois se trouver à plusieurs kilobases avant le début du gène (Brena *et al.*, 2006). Cependant, des C méthylées peuvent aussi contrôler la transcription dans un promoteur dépourvu d'îlot CpG (Toyota et Issa, 1999).

La majorité des 5^mC se trouve dans les éléments répétés¹ de l'ADN. L'hyperméthylation des C de ces séquences sert à empêcher l'expression de ces éléments mobiles pour éviter

¹ Les éléments répétés (transposons, rétrotransposons autonomes et non-autonomes) sont des éléments mobiles de l'ADN qui constituent 45% du génome humain Kazazian, H. H., Jr. (2004). Mobile elements: drivers of genome evolution. *Science (New York, N.Y)* **303**, 1626-1632.

leur duplication et leur insertion dans l'ADN responsable de mutations et de la déstabilisation de l'ensemble du génome (Deininger *et al.*, 2003; Kazazian, 2004; Goll et Bestor, 2005).

Les 5^mC ou les C sont sujettes à une transition en thymine (T) par une réaction de désamination. Mais cette transition se produit à une plus grande fréquence pour les 5^mC que pour les C. Cette modification, si elle n'est pas réparée, est responsable de mutations qui jouent un rôle très important en mutagenèse. En effet, les transitions de C à T des CpG sont les mutations les plus fréquentes dans le cancer et les maladies génétiques humaines (Morgan *et al.*, 2004).

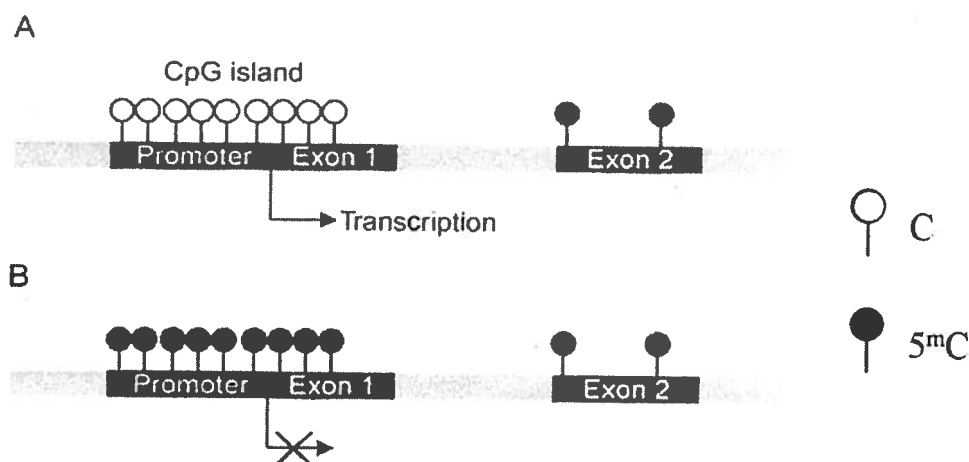


Figure 4 : La méthylation de l'ADN est un mécanisme de contrôle de la transcription.

Les principales DNMT (DNMT1, 2, 3A, 3B et 3L) sont respectivement cartographiées sur les chromosomes 19p, 10p, 2p et 20p. La DNMT1 est l'enzyme du maintien de la méthylation, car elle a une affinité 5 à 30 fois plus grande pour l'ADN hémi-méthylé que pour l'ADN non-méthylé (Bestor, 2000). Son domaine catalytique, en position C-terminale, catalyse le transfert d'un groupement méthyle du SAM à une C d'un CpG. Le domaine de régulation en N-terminale possède la séquence d'importation au noyau qui positionne la DNMT1 sur la fourche de réplication de l'ADN. Ainsi placée, l'enzyme peut

recopier les patrons de méthylation sur le brin d'ADN nouvellement synthétisé (Bestor, 2000). La DNMT1 méthyle la majorité de l'ADN pendant la phase S et 10 à 20 % de la méthylation survient après la réplication (Liang *et al.*, 2002). Cette enzyme s'exprime fortement dans les cellules en division (Goll et Bestor, 2005). Sa délétion induit une baisse considérable de la méthylation de l'ADN dans les éléments répétés et dans les gènes soumis à l'empreinte génomique (Li *et al.*, 1993). Cette délétion est également létale dès le développement embryonnaire chez des animaux dont les deux allèles ont été mutés (Li *et al.*, 1992).

Les DNMT2, 3A, 3B et 3L sont, quant à elles, considérées comme des méthyltransférases de l'ADN *de novo*, car elles ont la même affinité pour l'ADN hémi-méthylé et non-méthylé. La méthylation *de novo* se produit principalement dans le développement embryonnaire, la gamétogenèse et dans les cellules cancéreuses et faiblement dans les cellules somatiques différenciées (Lei *et al.*, 1996). Les DNMT3A et 3B agissent principalement au moment de la réplication (Liang *et al.*, 2002). La DNMT3A méthyle des CpG, des CpA et des CpT de façon distributive alors que la DNMT3B est une enzyme processive impliquée dans la méthylation des CpG des séquences répétées et du chromosome X inactif (Okano *et al.*, 1999). L'inactivation de la DNMT3B cause le syndrome ICF¹ (Bestor, 2000). La DNMT3L ne possède pas d'activité enzymatique, mais elle joue un rôle important dans l'établissement de nombreux patrons de méthylation des lignées germinales (Goll et Bestor, 2005). La DNMT2 a un patron d'expression très similaire à celui de la DNMT1 (Yoder et Bestor, 1998) et possède une faible activité *in vivo* spécifique aux séquences de type ttnCGga(g/a), ce qui lui confère un rôle plus spécialisé que les autres DNMTs (Dong *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2003; Tang *et al.*, 2003).

Toutefois, la différence entre les DNMT de maintenance et les DNMT *de novo* n'est pas si marquée, car les DNMT1, les DNMT3A et les DNMT3B ont la capacité à méthyliser

¹ Le syndrome ICF (pour Immunodeficiency, Centromeric instability, and Facial abnormalities) est caractérisé par une hypométhylation des régions satellites centromériques II et III et péri-centromériques des chromosomes 1, 9 et 16.

l'ADN, qu'il soit non-méthylé ou hémi-méthylé (Jair *et al.*, 2006; Esteller, 2007b). De plus, ces enzymes sont associées physiquement *in vivo* et coopèrent pour établir les patrons de méthylation (Goll et Bestor, 2005). Les DNMT3A et 3B compensent d'ailleurs l'inefficacité de la DNMT1 dans l'établissement de la méthylation de l'ADN des séquences répétées (Liang *et al.*, 2002).

1.3.2 Le contrôle épigénétique de l'expression des gènes :

Les 5^mC servent de point d'ancrage aux protéines de liaison des 5^mCpG (MeCP1, MeCP2¹ et MBD1 à MBD4). Ces protéines fixées sur les 5^mCpG produisent un encombrement stérique sur le promoteur et empêchent la fixation des facteurs de transcription, contribuant ainsi à l'inhibition des gènes (Goll et Bestor, 2005). Les protéines de liaison des 5^mCpG recrutent aussi des enzymes de modification des histones (histones désacétylases, méthyltransférases...) qui jouent un rôle important dans le contrôle épigénétique de l'expression des gènes et dans la structure de la chromatine². Cette dernière se retrouve sous deux formes ; l'hétérochromatine qui est compactée et associée aux régions du génome où les gènes sont inhibés et l'euchromatine qui est décondensée, permettant l'accès des facteurs de transcription, est associée à l'expression des gènes (Figure 5).

L'unité fondamentale de la chromatine est le nucléosome qui est composé de 146 paires de bases d'ADN, enroulées autour d'un octamère d'histones (H). Celui-ci est composé de deux copies de chaque histone H2A, H2B, H3 et H4 et dans certains cas, on y retrouve des histones modifiées H3.1, H3.3 et HTZ.1 (Hake *et al.*, 2004). Les nucléosomes sont présents sur les promoteurs méthylés, où ils compactent la chromatine et réduisent l'accès

¹ Elle est présente sur de nombreux promoteurs méthylés. Quand elle est mutée, elle cause un retard neurodéveloppemental appelé le syndrome de Rett.

² La chromatine est définie comme un complexe nucléoprotéique composé de l'ADN et de protéines histones.

aux facteurs de transcription. Les promoteurs déméthylés sont à l'inverse, dépourvus de nucléosome (Lin *et al.*, 2007). Les histones sont modifiées de façon covalente sur les acides aminés présents sur leur extrémité N-terminale (Tableau 2). Parmi toutes ces modifications, on note l'acétylation des lysines, la méthylation des lysines et des arginines, la phosphorylation des sérines et des thréonines, l'ADP-ribosylation, l'ubiquitination, la sumoylation... (Hake *et al.*, 2004; Moggs *et al.*, 2004).

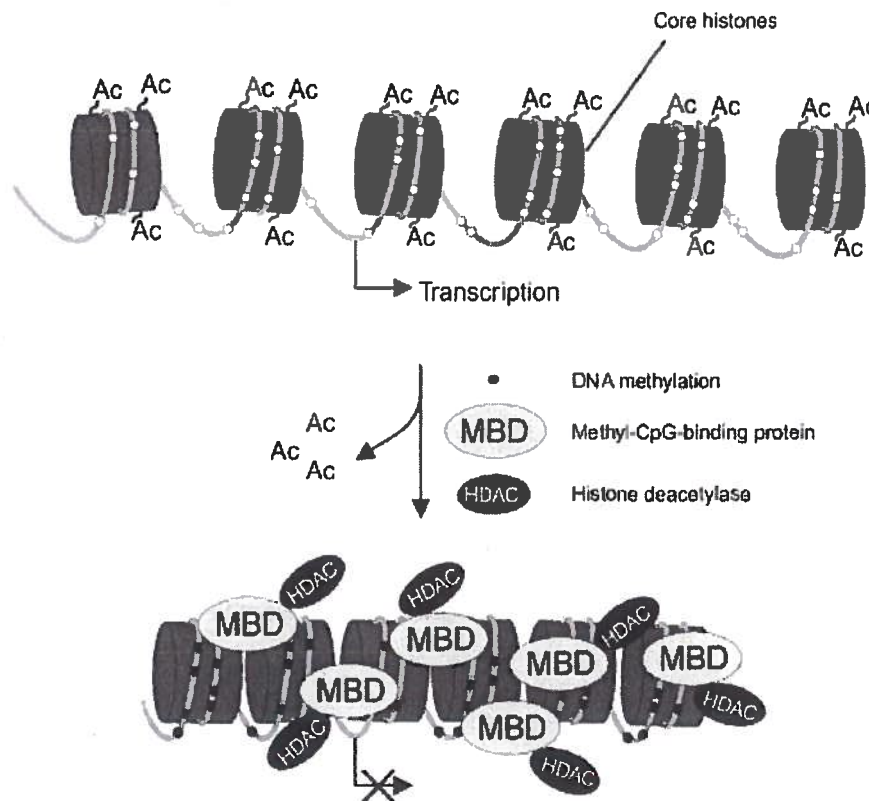


Figure 5 : Modifications épigénétiques impliquées et la structure de la chromatine
(Worm et Guldberg, 2002).

Les premiers travaux sur l'acétylation et la méthylation des histones ont démontré qu'il existe un lien entre ces modifications et l'expression des gènes (Allfrey *et al.*, 1964). L'acétylation des histones est contrôlée par les histones acétyltransférases (HAT) qui ajoutent des groupements acétyles, alors que les histones désacétylases (HDAC) les enlèvent. La désacétylation libère la charge positive de la fonction amine en position

terminale de la lysine (K) d'une histone. L'attraction électrostatique entre l'histone désacétylée et les charges négatives des phosphates de l'ADN conduit à la compaction de l'ADN, limite l'accès aux facteurs de transcription et ainsi, inhibe la transcription. Le processus inverse est réalisé par les HATs qui neutralisent la charge positive des histones, réduisent leur affinité pour l'ADN et génèrent une configuration ouverte de la chromatine associée à la transcription (Figure 5). En général, l'hyperacétylation des histones est observée dans les régions décondensées de l'euchromatine alors que l'hypoacétylation des histones est une caractéristique des régions condensées de l'hétérochromatine (Hake *et al.*, 2004).

La méthylation des histones est catalysée par des histones méthyltransférases (HMT) et produit des lysines mono-, di-, ou triméthylées et des arginines mono- ou diméthylées (Hake *et al.*, 2004). Les différents types de méthylation des histones peuvent activer ou inhiber l'expression des gènes (Tableau 2). Les modifications des histones sont perçues comme étant une conséquence aux modifications de la méthylation des C de l'ADN, laquelle serait la seule modification épigénétique transmise aux générations cellulaires suivantes (Goll et Bestor, 2005).

Les mécanismes moléculaires épigénétiques sont basés sur l'action complexe et coordonnée des DNMTs, des HDACs, des HATs, des HMTs, des protéines de liaison aux 5^mCpG et d'autres protéines de modifications de la chromatine. Il a été démontré que les DNMT coopèrent avec une HMT du groupe Polycomb nommée EZH2 (Enhancer of Zeste homolog 2) pour inhiber l'expression des gènes soumis à l'empreinte génomique et ceux du chromosome X inactif. EZH2 catalyse la méthylation de l'H3K27 et sert de point d'ancrage à d'autres protéines du groupe Polycomb et aux DNMT (1, 3A et 3B) pour condenser la chromatine et méthyler les promoteurs des gènes cibles (Vire *et al.*, 2006; Esteller, 2007b).

Tableau 2 : Les modifications épigénétiques de la chromatine et l'effet sur l'expression des gènes.

Modifications épigénétiques	Sites de modification	Effet sur la transcription
Acétylation des lysines des histones	H3 (K 9, 14, 18, 56) H4 (K 5, 8, 13, 16)	Activation
Méthylation des lysines	H3 (K 4, 36, 79)	Activation
Ubiquitination des lysines	H2B (K 120)	Activation
Méthylation des arginines	H3 (R 17, 23) H4 (R 3)	Activation
Méthylation des lysines	H3 (K 9, 27) H4 (K 20)	Répression
Ubiquitination des lysines	H2A (K 119)	Répression
Sumoylation des lysines	H2B (R 6/7) H2A (R 126)	Répression

Dans l'ensemble, les modifications épigénétiques des histones ont conduit à l'hypothèse du «code des histones» dans lequel des modifications spécifiques régulent l'expression des gènes entre leur état actif et inactif (Jenuwein et Allis, 2001). Or, cette classification binaire du code des histones est une simplification d'une réalité plus complexe. En effet, certaines modifications, comme la méthylation de l'H3K4, sont associées à l'augmentation et aussi à la diminution de l'expression des gènes. Les modifications épigénétiques des histones ne sont plus considérées comme un simple code, mais plutôt comme un langage sophistiqué dans lesquels différentes combinaisons des modifications des histones produisent une réponse dynamique et spécifique sur l'expression des gènes (Berger, 2007).

1.3.3 Les modifications des facteurs épigénétiques dans le cancer :

Les cellules cancéreuses présentent une altération des patrons de l'expression des gènes (Jones et Baylin, 2007). Elles sont surtout modifiées au niveau épigénétique où l'on compte, dans une tumeur donnée, 100 à 400 îlots CpG hyperméthylés pour une moyenne de 11 mutations. Les principales modifications épigénétiques dans les cellules cancéreuses sont une hyperméthylation des îlots CpG des promoteurs des TSG, une perte globale de la méthylation de l'ADN et une perte globale de la monoacétylation et de la triméthylation des K de l'histone H4 (Esteller, 2007a).

L'hyperméthylation locale des CpG des régions promotrices est la cause de l'inhibition de l'expression de nombreux gènes normalement actifs, comme les TSG qui contrôlent la croissance cellulaire et la formation des métastases (Tableau 3). L'hyperméthylation des promoteurs des TSG est un événement important dans le développement du cancer (Momparler, 2003). L'hyperméthylation de l'ADN conduit à la formation de l'hétérochromatine, condensée et résistante aux nucléases, grâce à l'action coordonnée des protéines de liaison des 5^mCpG, des HDACs et des HMTs. Les principaux mécanismes inhibés sont les mécanismes de la réparation de l'ADN, la régulation du cycle cellulaire, l'apoptose, le métabolisme des carcinogènes et l'adhérence cellulaire (Esteller, 2007a). La méthylation des tissus normaux augmente avec l'âge ce qui produit la perte de fonction des TSG (Issa, 2004). En excluant l'influence de l'âge, certains changements de la méthylation sont spécifiques aux cancers et impliquent souvent un même groupe de gènes, menant à l'hypothèse de l'existence d'un phénotype spécifique de méthylation des îlots CpG dans le cancer (Toyota *et al.*, 1999). La présence d'un phénotype particulier d'hyperméthylation a été observée, notamment pour les gènes du groupe Polycomb (Widschwendter *et al.*, 2007), dans de nombreux types de cancers solides (colorectal, estomac, foie, œsophage et ovaires) et des leucémies (Issa, 2004). De plus, ces anomalies de la méthylation de l'ADN augmentent des stades bénins jusqu'aux métastases (Momparler, 2003). L'hyperméthylation de TSG peut servir d'outil de détection des cancers. En effet, des chercheurs ont pu mesurer des anomalies épigénétiques avant

l'apparition des signes cliniques (Clark et Melki, 2002; Paz *et al.*, 2003). Par exemple, c'est le cas de l'hyperméthylation de l'ADN au niveau du promoteur de *p16* qui est détectée dans l'expectorat de 100 % des patients plusieurs années avant le diagnostic du cancer du poumon (Palmisano *et al.*, 2000).

Concernant l'ensemble de l'ADN génomique, les cellules cancéreuses perdent leur contenu en 5^mC, principalement dans les séquences répétées, dans les régions codantes et dans les introns. On parle alors d'hypométhylation globale. Il s'agit d'un événement précoce dans la carcinogenèse (Fraga *et al.*, 2004). Elle est responsable de l'activation de gènes normalement inhibés comme les oncogènes et de la réactivation des éléments répétés qui déstabilisent le génome. L'insertion des éléments répétés dans l'ADN est aussi responsable de mutations dans le gène *APC* dans le cancer du colon et de *c-MYC* dans le cancer du sein (Robertson, 2001). La perte globale de la méthylation de l'ADN est observée dans le cancer et durant le vieillissement. Elle serait causée notamment par l'inefficacité de la DNMT1 à maintenir l'hyperméthylation des éléments répétés de l'hétérochromatine (Liang *et al.*, 2002).

Dans les cellules cancéreuses, les principales caractéristiques de la modification des histones sont la désacétylation sur les H3 et H4K16, la perte de la triméthylation de l'H3K4, un gain de la méthylation de l'H3K9, un gain de triméthylation de l'H3K27 et enfin, la perte de la triméthylation de l'H4K20 (Fraga *et al.*, 2005; Esteller, 2007a). La perte de la monoacétylation de l'H4K16 et de triméthylation de H4K20 sont associées à l'hypométhylation des séquences répétées et apparaissent tôt durant la cancérogénèse (Fraga *et al.*, 2005).

Tableau 3 : Liste de gènes dont les CpG sont hyperméthylés et inhibés dans le cancer.

<i>Gènes</i>	<i>Fonctions</i>	<i>Type de tumeurs</i>	<i>Conséquences</i>
<i>BRCA1</i>	Réparation de l'ADN, transcription	Sein, ovaire	Cassure double-brin
<i>MGMT</i>	Réparation des O6-alkyl-guanines	Multiple	Mutations, chimio-sensibilité
<i>p14^{ARF}</i>	Inhibiteur de MDM2	Colon, estomac, rein	Dégradation de p53
<i>GSTP1</i>	Conjugaison au glutathion	Prostate, sein, rein	Accumulation d'adduits à l'ADN
<i>p16^{INK4a}</i>	Inhibiteur de kinases dépendantes des cyclines	Multiple	Progression du cycle cellulaire
<i>p15^{INK4b}</i>	Inhibiteur de kinases dépendantes des cyclines	Leucémies	Progression du cycle cellulaire
<i>p57^{KIP2}</i>	Inhibiteur de kinases dépendantes des cyclines	Leucémies et tumeurs solides	Progression du cycle cellulaire
<i>Rb</i>	Inhibiteur du cycle cellulaire	Rétinoblastome	Progression du cycle cellulaire
<i>ER</i>	Récepteur aux estrogènes	Sein	Insensibilité aux hormones
<i>AR</i>	Récepteur aux androgènes	Prostate	Insensibilité aux hormones
<i>RARβ2</i>	Récepteur à l'acide rétinolique	Colon, poumon, tête et cou	Insensibilité à l'acide rétinolique
<i>CDH1</i>	E cadhérine, adhésion cellulaire	Sein, estomac, leucémie	Dissémination
<i>APC</i>	Inhibiteur de β-caténine	Voie aérodigestive	Activation de la voie β-caténine
<i>GATA4 et 5</i>	Facteur de transcription	Colon, estomac	Inhibition de gènes cibles
<i>RIZ1</i>	Histone/protéine méthyltransférase	Sein, foie	Expression aberrante des gènes
<i>DAPK</i>	Pro-apoptotique	Lymphome, poumon, colon	Résistance à l'apoptose
<i>TMS1</i>	Pro-apoptotique	Sein	Résistance à l'apoptose
<i>IGFBP3</i>	Protéine de liaison aux facteurs de croissance	Poumon, peau	Résistance à l'apoptose
<i>Lamin A/C</i>	Positionnement des chromosomes	Leucémie	Perte de la différenciation

1.5 Les bases théoriques de la chimiothérapie anticancéreuse :

La chimiothérapie a pour objectif de réduire le nombre de cellules cancéreuses. Elle est utilisée lors de la phase d'induction du traitement des stades avancés et comme adjuvant à la chirurgie et/ou à la radiothérapie. La chimiothérapie de la leucémie est divisée en deux parties. Tout d'abord, l'induction sert à réduire le nombre de cellules cancéreuses et vise à produire une rémission complète (RC). Puis, la chimiothérapie de post-rémission sert à éradiquer les cellules cancéreuses résiduelles mais non-détectables (Skeel, 1999). Les bases de la chimiothérapie moderne ont été définies par des études sur un modèle de souris

qui reçoivent une injection i.v. de cellules leucémiques L1210 murines (Skipper *et al.*, 1970; Skipper, 1971). Ce modèle présente l'avantage d'avoir une distribution des cellules leucémiques qui ressemble à celle observée dans les leucémies humaines (croissance dans le système circulatoire et formation de tumeurs dans le foie et la rate). En outre, le temps de survie des souris leucémiques est reproductible et il est sujet à peu de variation, car toutes les cellules L1210 progressent activement dans le cycle cellulaire. La différence majeure entre ce modèle et la leucémie humaine est la vitesse de croissance plus rapide des cellules L1210 par rapport aux cellules leucémiques humaines. En effet, les cellules L1210 ont un temps de doublement de 12 heures chez les souris alors que les cellules leucémiques humaines ont un temps de doublement qui varie de 48 à 72 heures. Toutefois, il y a une très bonne corrélation entre l'effet des médicaments anticancéreux sur le temps de survie de ces souris et la réponse obtenue en clinique (Momparker *et al.*, 1984; Mayer *et al.*, 1994).

La vitesse de prolifération des cellules cancéreuses est un point important à considérer pour l'utilisation des agents anticancéreux, notamment ceux qui sont spécifiques aux phases du cycle cellulaire. Dans l'ensemble, la croissance de la population tumorale n'est pas décrite par une courbe logarithmique, mais plutôt par une cinétique spécifique dite de Gompertzian où la vitesse de croissance varie en fonction du nombre de cellules cancéreuses (Figure 6). Pour les petites tumeurs, la vitesse de croissance est faible. Cette dernière accélère et devient maximale quand la tumeur a une taille intermédiaire ($<10^9$ cellules). La tumeur commence à être détectable en clinique quand elle forme un nodule de 1 cm de diamètre (1 g de tissu) composé de 10^9 cellules (Page, 1999). Par la suite, la vitesse de croissance ralentit quand le nombre de cellules atteint 10^{12} à 10^{13} cellules cancéreuses. Cette quantité de cellules cancéreuses représente la charge tumorale qui conduit au décès du patient (Casciato, 2004). La cinétique de croissance des cellules cancéreuses est bien différente de celles des cellules normales. En effet, la population des cellules cancéreuses a une croissance exponentielle et une capacité à se diviser de façon illimitée. La population et la croissance des cellules normales sont générées par la division des cellules souches normales qui produisent des cellules plus différenciées ou bien s'autorenouvellent pour que le nombre de cellules souches reste constant. Ainsi, le nombre

des cellules normales est limité au besoin tissulaire notamment car la division cellulaire est réduite par l'inhibition de contact. Ainsi, il n'est pas possible de comparer les cinétiques des cellules normales et des cellules cancéreuses. La cinétique de prolifération est un aspect déterminant pour l'efficacité de la chimiothérapie qui dépend de la vitesse de croissance des cellules cancéreuses, mais aussi des modifications de cette cinétique provoquées par le traitement (DeVita *et al.*, 2005). Au moment du diagnostic, un patient possède entre 10^9 à 10^{12} cellules cancéreuses. La RC est atteinte quand on ne détecte plus de cellules cancéreuses (Skeel, 1999). La guérison nécessite l'éradication des CSC. Si on tient compte que la population de CSC est de 0,1 à 1 % des cellules cancéreuses (Reya *et al.*, 2001), le traitement anticancéreux devrait éradiquer entre 10^5 à 10^{10} cellules cancéreuses.

Nous allons nous intéresser en particulier aux agents chimiothérapeutiques qui agissent spécifiquement sur les cellules cancéreuses en phase S. Ces agents sont plus efficaces quand le taux de division des cellules cancéreuses est élevé. En effet, une vitesse de croissance rapide permet à ce genre de médicament d'atteindre un plus grand nombre de cellules en phase S au moment où le patient est traité (DeVita *et al.*, 2005). Ces agents anticancéreux tuent toujours une fraction constante de cellules, c'est-à-dire la même proportion qui se trouve dans la phase vulnérable du cycle cellulaire (Skeel, 1999). L'obtention de la guérison avec de tels agents est possible avec des modèles expérimentaux, quand les animaux sont traités à des doses très élevées mais non létales. Mais, les régimes d'intensification de la dose ont été établis de façon empirique et la posologie n'est pas optimale (Skeel, 1999). Leur supériorité par rapport aux doses standards doit être démontrée et comparée dans des essais randomisés (Casciato, 2004). De telles doses produisent une granulocytopenie sévère, menaçant la survie du patient, nécessitant des transfusions et des traitements d'antibiotiques... Les patients âgés de plus de 65 ans n'ont généralement pas un état de santé qui permet de supporter de tels traitements (Casciato, 2004).

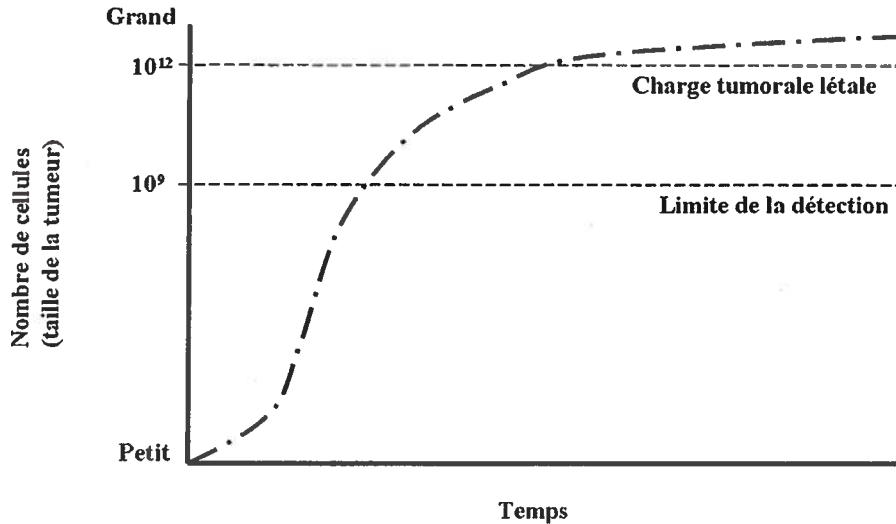


Figure 6 : La cinétique de Gompertzian de croissance des cellules cancéreuses.

Généralement, un traitement chimiothérapeutique produit la destruction de la majorité des cellules cancéreuses et induit la rémission partielle ou complète. Les traitements successifs combinés à l'hétérogénéité des tumeurs (changements génétiques et épigénétiques) peuvent cependant sélectionner des clones résistants qui deviendront dominants et seront responsables de la rechute puis du décès du patient (Skeel, 1999). De plus, le taux de mutation des cellules cancéreuses donne une probabilité d'avoir une cellule résistante à un traitement donné quand la population de cellules cancéreuses atteint un million de cellules, soit une taille bien inférieure à une tumeur détectable en clinique. Ainsi, un patient dont la tumeur est détectable contiendrait en théorie au moins un clone résistant à un traitement donné. La prolifération de ce clone résistant est une cause de la rechute de la maladie (Goldie et Coldman, 1979).

Le traitement avec un seul médicament conduit rarement à des guérisons, car les cellules deviennent facilement résistantes à un médicament donné. La recherche s'est donc tournée vers des combinaisons d'agents anticancéreux. Elles permettent de tuer un plus grand nombre de cellules cancéreuses et d'éviter l'acquisition de la résistance à un agent donné grâce à l'action combinée sur différentes cibles moléculaires. Elles ont conduit à des

progrès significatifs particulièrement dans le traitement des leucémies aiguës. Pour que des médicaments soient utilisés en combinaison, ils doivent être efficaces lorsqu'ils sont utilisés seuls, posséder des mécanismes d'action biochimique différents et ne pas présenter de toxicité croisée (Page, 1999).

Malgré les progrès de la recherche, les thérapies ont encore un effet limité sur la guérison des cancers. Cet échec est causé par un faible index thérapeutique des agents anticancéreux et une faible pénétration des médicaments dans les tumeurs (Tannock *et al.*, 2002). Les causes des rechutes et de la résistance aux médicaments sont aussi liées à l'inefficacité des traitements à éradiquer toutes les CSC (Kvinlaug et Huntly, 2007). Les thérapies conventionnelles produisent une réduction du nombre de cellules tumorales en tuant principalement les cellules cancéreuses ayant un potentiel prolifératif limité. Elles ne tuent pas les CSC qui ont un potentiel clonogénique illimité (Figure 7). Les thérapies ont ainsi des effets transitoires à cause de la persistance des CSC après le traitement. Ces dernières produiront de nouveau une tumeur et induiront la rechute. Par contre, si les thérapies pouvaient cibler les CSC, les tumeurs perdraient leur capacité à se développer (Krivtsov et Armstrong, 2007) et elles se transformeraient en tumeurs bénignes et finiraient par être éliminées par un programme de sénescence (Reya *et al.*, 2001). Il y a un besoin urgent d'améliorer les traitements du cancer, car à l'exception de certains cancers, il y a eu peu de progrès dans les taux de survie à 5 ans pour les stades avancés de cancers lorsque l'on compare les résultats actuels avec ceux obtenus il y a une vingtaine d'années (Casciato, 2004).

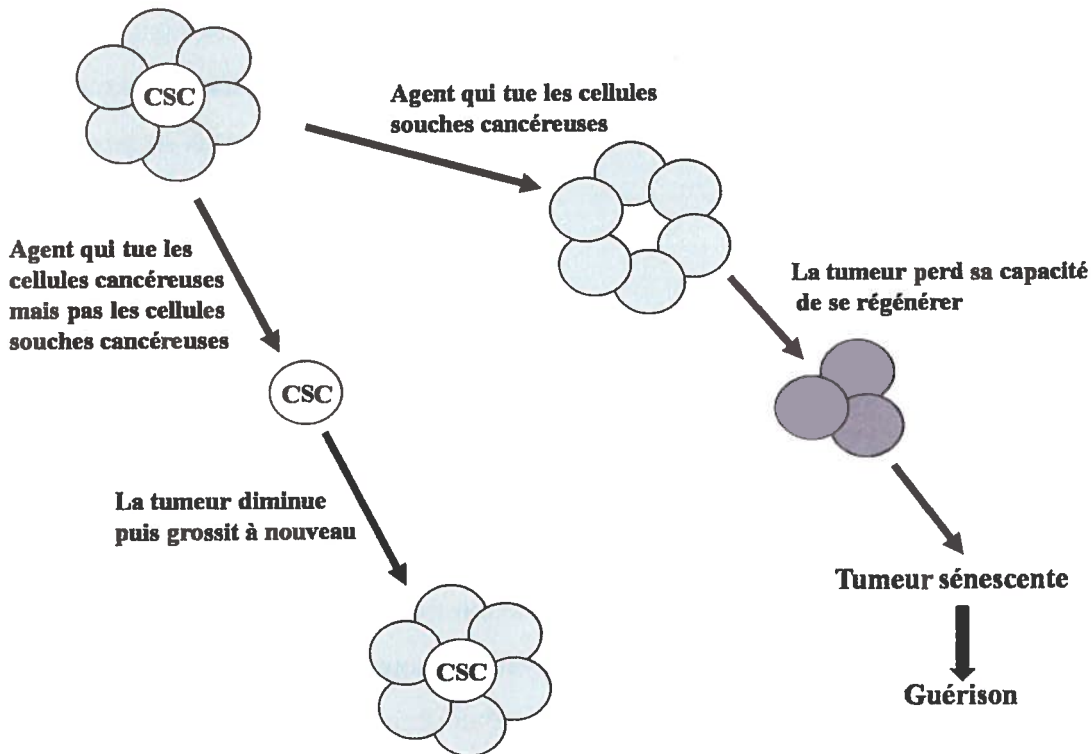


Figure 7 : La chimiothérapie et les cellules souches cancéreuses (CSC ; adaptation de Kvinlaug et Huntly, 2007).

1.6 La leucémie et les approches thérapeutiques :

1.6.1 Définition :

Les leucémies sont des cancers du sang causées par un dérèglement de la prolifération d'une cellule souche du tissu hématopoïétique. Normalement, les cellules souches hématopoïétiques produisent les cellules progénitrices (Figure 8), qui vont se différencier soit vers la lignée lymphoïde ou vers la lignée myéloïde (Oakley et Van Zant, 2007; Rice *et al.*, 2007). La lignée lymphoïde donne naissance aux lymphocytes T et B. La lignée myéloïde produit les granulocytes, les monocytes-macrophages (Iwasaki et Akashi, 2007). Une prolifération anarchique d'une de ces lignées donne soit la leucémie myéloïde ou la

leucémie lymphoïde. Pour chacune de ces leucémies, il existe les leucémies chroniques, où on observe la prolifération de cellules différenciées et les leucémies aiguës, où on observe la prolifération de cellules non-différenciées à cause d'un blocage de leur maturation. De façon générale, les cellules leucémiques se répliquent souvent moins vite que les cellules normales (Tableau 4, extrait de De Vita *et al.*, 2005).

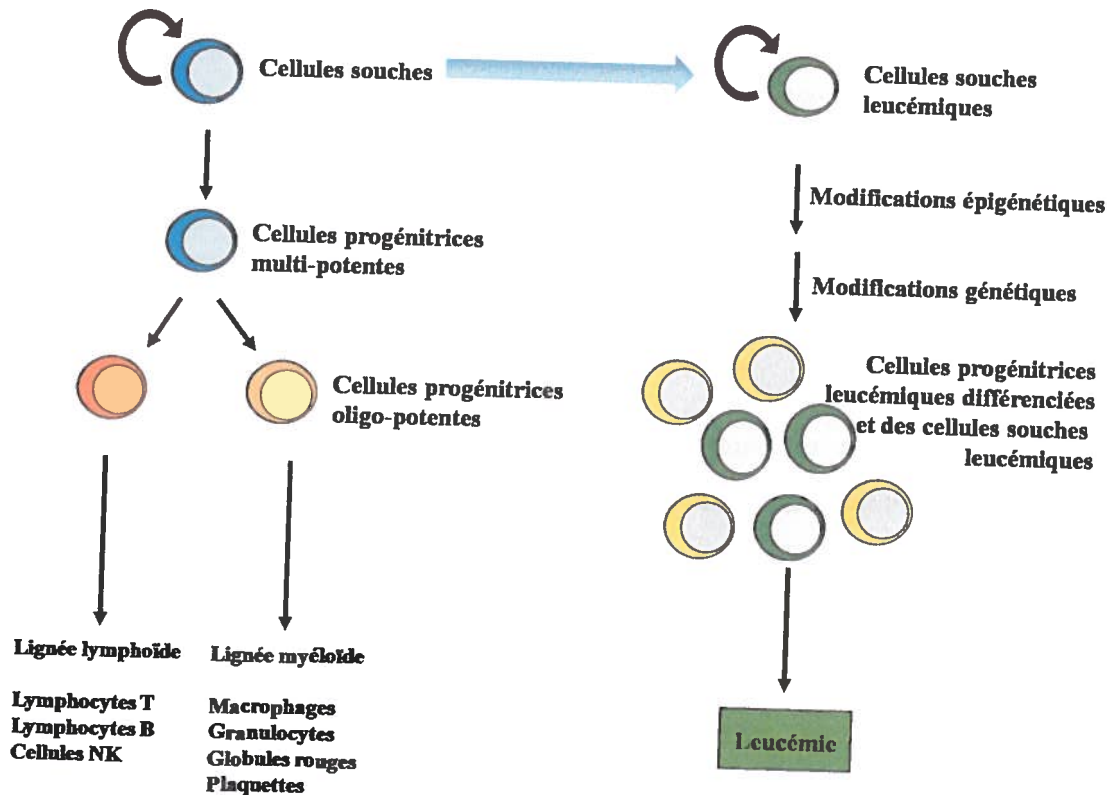


Figure 8 : Autorenewement et différenciation des cellules souches normales et leucémiques (adapté de Huntly et Gilliland, 2005).

Cette donnée est très importante pour la thérapie puisque le traitement par des agents spécifiques du cycle cellulaire requiert une longue infusion pour s'attaquer à la phase sensible de la majorité des cellules cancéreuses. Toutefois, de longues infusions génèrent une cytotoxicité importante pour les cellules normales du système hématopoïétique (Page, 1999).

Tableau 4 : La durée du cycle cellulaire des cellules leucémiques, des lymphocytes et des myélocytes.

	Durée du cycle
Leucémie aiguë	48-72 h
Leucémie myéloïde chronique	48-72 h
Leucémie lymphoïde chronique	48-72 h
Lymphocytes normaux	16-24 h
Myélocytes normaux	16-24 h

Les cellules leucémiques s'accumulent dans la moelle osseuse, se propagent dans la circulation sanguine et infiltrent différents organes dont elles perturbent le fonctionnement (rate, ganglions lymphatiques et système nerveux). La prolifération des cellules leucémiques empêche la croissance des cellules hématopoïétiques normales, produisant une carence en éléments fonctionnels du sang. La baisse du nombre de globules rouges et de plaquettes provoque une anémie et des hémorragies (saignement des gencives et ecchymoses). La diminution des granulocytes produit l'apparition d'infections graves qui causent le décès du patient (Casciato, 2004). Les leucémies chroniques lymphoïdes et myéloïdes sont responsables de plus de 50 % des leucémies. Dans la leucémie lymphoïde chronique, on observe un excès de cellules lymphoïdes différenciées. Elle est souvent induite par une perte de l'apoptose de ces cellules, due à une surexpression de Bcl-2 dont le promoteur devient hypométhylé. La leucémie myéloïde chronique est caractérisée par un excès de cellules myéloïdes partiellement différenciées (principalement des granulocytes). Elle est souvent le résultat d'une translocation chromosomique qui produit un gène chimérique *BRC-ABL*. Elle est caractérisée par une phase chronique de trois à quatre ans durant laquelle la plupart des patients vivent normalement. Après quatre à six ans, la maladie évolue dans la phase d'accélération où 25 % des patients succombent, puis

une phase blastique qui cause le décès de 25 % des patients. La maladie évolue ensuite en leucémie aiguë myéloïde (67 % des patients) ou en leucémie aiguë lymphoïde (33 % des patients; Casciato, 2004).

Les leucémies aiguës sont composées de la leucémie aiguë myéloïde (LAM) et de la leucémie aiguë lymphoïde (LAL). Parmi les LAM, on distingue les LAM *de novo*, de celles qui font suite aux syndromes myélodysplasiques. La LAL est divisée en LAL de type B ou de type T selon le type de cellules leucémiques retrouvées dans la moelle et le sang (Skeel, 1999).

Les syndromes myélodysplasiques (SMD) sont des maladies diagnostiquées chez des personnes âgées entre 60 et 70 ans. Les SMD sont considérés comme des pré-leucémies répondant faiblement à la thérapie. Ils sont caractérisés par un problème de différenciation qui aboutit à une production insuffisante de une, deux ou des trois sortes de cellules (globules rouges, globules blancs et plaquettes) de la lignée myéloïde (Skeel, 1999). On peut noter la différence entre les SMD et les syndromes myéloprolifératifs. Ces derniers sont caractérisés par une surproduction en éléments matures de la lignée myéloïde : les granulocytes, les érythrocytes et les plaquettes. La dysplasie des SMD est causée par une accélération de l'apoptose combinée à un excès de la prolifération cellulaire produisant une cytopénie dans le sang avec une moelle hypercellulaire. Cette hémopathie est mortelle à cause de complications (infections, saignements) induites par l'insuffisance de la fonction médullaire. Le taux de survie est de 2 à 4 ans (Skeel, 1999). De plus, les SMD ont tendance à évoluer en LAM chez la plupart des patients (Casciato, 2004).

Même si la cause de la leucémie est inconnue, on sait que les radiations, certains produits chimiques (le benzène et le toluène) et la fumée de cigarette sont impliqués dans le déclenchement de la maladie (Klaasen, 2001). De plus, le traitement par des anticancéreux mutagènes (agents alkylants, inhibiteurs de topoisomérases II...) est associé à des leucémies aiguës secondaires (Casciato, 2004). Par exemple, 10-15 % des LAM sont causées par le traitement chimiothérapeutique (avec des médicaments génotoxiques) d'une

tumeur solide. Ces leucémies secondaires apparaissent entre deux à neuf ans après la chimiothérapie et sont très difficiles à traiter (DeVita *et al.*, 2005; Estey et Dohner, 2006; Krivtsov et Armstrong, 2007).

1.6.2 Les cellules souches leucémiques :

La leucémie est une maladie causée par la prolifération de cellules souches leucémiques (CSL). La grande ressemblance entre les cellules souches normales et les CSL conduit à la formation d'une population hétérogène de cellules leucémiques (Figure 8), composées d'une faible proportion de CSL (ayant un potentiel clonogénique et la capacité de s'autorenouveler) et de cellules leucémiques progénitrices plus différenciées (Reya *et al.*, 2001; Huntly et Gilliland, 2005).

La résistance aux agents anticancéreux spécifiques du cycle cellulaire est due au fait que ces CSL ne sont pas détruites par la thérapie (Ravandi et Estrov, 2006). Même si la majorité des malades vont en rémission, la rémission est souvent de courte durée ce qui montre que la thérapie classique (ARA-C et anthracycline ; voir chapitre 1.6.4) est moins efficace contre les CSL que pour les autres cellules leucémiques. Des progrès doivent être réalisés pour que la chimiothérapie cible spécifiquement les caractéristiques des CSL, notamment la réduction de leur potentiel clonogénique (Jordan, 2005).

1.6.3 Les statistiques sur la leucémie :

Selon la Société canadienne du cancer en 2008, le nombre de nouveaux cas de leucémie sera d'environ 4500 cas et le nombre de décès sera d'environ 2400. Chez l'enfant, la leucémie est la forme la plus commune de cancer avec environ 1600 nouveaux cas chaque année au Canada, comptant à 75 % de LAL et à 20 % de LAM (Figure 9). À l'inverse, chez l'adulte, on observe une majorité de LAM dont l'incidence croît tout au long de la

vie. L'âge moyen du diagnostic des LAL est de 11 ans alors qu'il est de 66 ans pour les LAM (DeVita *et al.*, 2005).

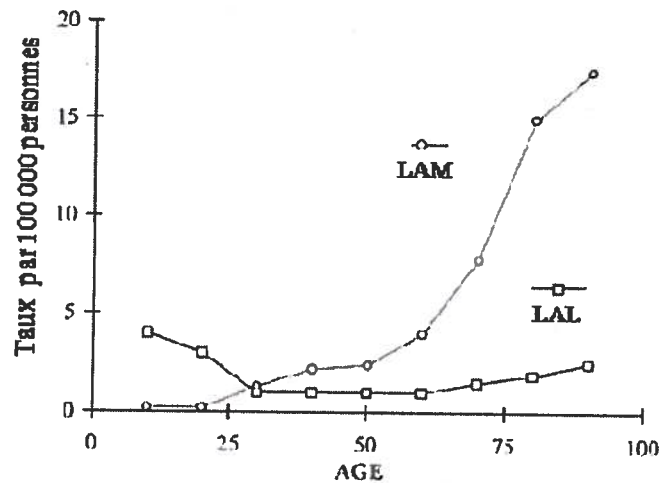


Figure 9 : Incidence des leucémies aiguës lymphoïdes (LAL) et des leucémies aiguës myéloïdes (LAM) aux États-Unis en fonction de l'âge (adapté de De Vita, Hellman et Rosenberg, 2005).

La chimiothérapie a fait de grandes avancées dans le traitement de la LAL chez l'enfant. Celui-ci conduit à des guérisons dans environ 70 % à 80 % des cas. Chez l'adulte, la chimiothérapie produit une diminution des symptômes et des rémissions complètes dans 65 % à 90 % des cas. Le taux de survie pour la LAM et la LAL est meilleur chez les patients de moins de 60 ans (Figure 10). Dans la majorité des cas, les patients rechutent et finissent par succomber des conséquences de la maladie (infections, hémorragies). La leucémie reste pour la plupart des patients adultes une maladie sévère et incurable. Des progrès doivent être réalisés pour améliorer l'efficacité de la chimiothérapie (DeVita *et al.*, 2005).

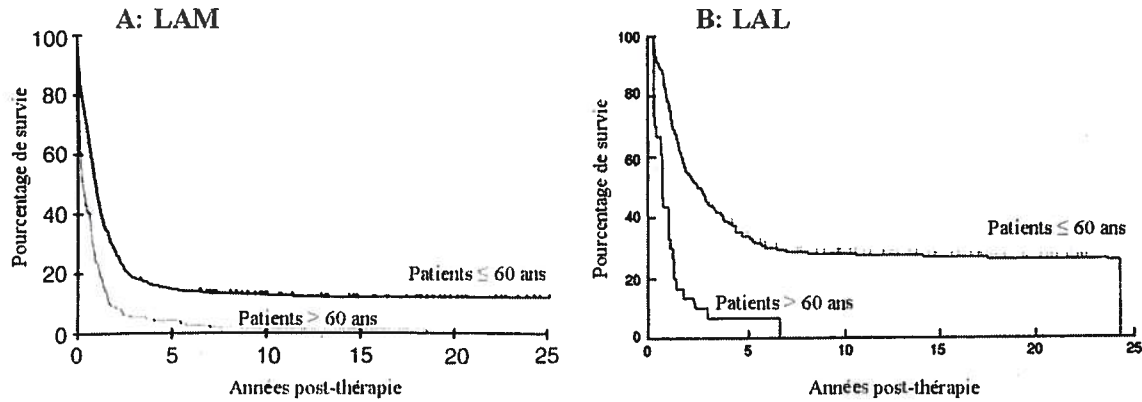


Figure 10 : Taux de survie (A) chez des patients traités pour des leucémies aiguës myéloïdes ou (B) des leucémies aiguës lymphoïdes (adapté de De Vita, Hellman et Rosenberg, 2005).

1.6.4 Les traitements :

Les leucémies nécessitent une prise en charge rapide et un traitement immédiat. L'objectif principal de la thérapie est l'éradication complète des clones leucémiques. Le traitement dépend de l'âge du patient et du type de leucémie. Le traitement des formes aiguës de leucémie repose sur une chimiothérapie intensive d'induction qui produit une aplasie de la moelle (destruction des cellules leucémiques et des cellules hématopoïétiques) nécessaire pour atteindre la rémission (DeVita *et al.*, 2005). Le patient, dont la fonction médullaire est affectée, est sujet aux infections, aux hémorragies et à l'anémie à cause d'un déficit en polynucléaires, en plaquettes et en globules rouges. Cela nécessite souvent l'utilisation de transfusions et d'antibiotiques pendant la période d'aplasie médullaire. Les facteurs de croissance (G-CSF et GM-CSF) peuvent réduire la période de neutropénie ainsi que la morbidité associée aux traitements (Casciato, 2004). La réduction de la dose en cas de cytopénie n'est pas envisageable car de faibles doses sont peu efficaces et produisent toujours des effets toxiques (Skeel, 1999). Une fois la moelle débarrassée des blastes leucémiques, les cellules normales hématopoïétiques peuvent proliférer, recoloniser la moelle et rétablir l'hématopoïèse. Ce retour à un état normal est temporaire s'il reste des

clones leucémiques. Ainsi, un traitement chimiothérapeutique de post-rémission ou consolidation, est toujours administré pour prolonger la période de la rémission (DeVita *et al.*, 2005). Une thérapie qui n'est plus efficace est suivie par le décès du patient en moins de six mois. La mort est généralement causée par des infections et des hémorragies (Casciato, 2004). Bien que de grandes avancées ont été réalisées en chimiothérapie, une grande proportion des patients meurent car la posologie des agents anticancéreux n'est pas encore optimale (Skeel, 1999).

La thérapie de la LAL est composée de stéroïdes, d'antimétabolites, d'inhibiteurs de topoisomérases, d'antimitotiques et d'anthracyclines. Dans le cas des LAL, la chimiothérapie d'induction est composée de stéroïdes, d'anthracycline¹, de L-asparaginase, de vincristine et d'ARA-C². Pour la thérapie de maintien, les patients reçoivent de la 6-mercaptopurine. Le méthotrexate ou l'ARA-C sont aussi utilisés en injection intrathécale pour prévenir les leucémies méningées. Dans le cas des LAM, le traitement est composé d'ARA-C à une dose conventionnelle, d'anthracycline et d'inhibiteur de topoisomérase. La chimiothérapie de consolidation est basée sur une intensification de la dose à de l'ARA-C (dose intermédiaire ou haute) tel que décrit plus-bas. La néoplasie sévère de la moelle se produit une douzaine de jours après le début du traitement (DeVita *et al.*, 2005). Dans le cas des LAM, la RC des patients de moins de 60 ans, est atteinte dans 60-75% des cas après un mois de traitement et dans 95% des cas après deux cycles d'induction. De 15 à 50 % des patients en RC survivent 5 ans et ces derniers ont une grande probabilité d'être guéris (Casciato, 2004; Estey et Dohner, 2006). La LAM est un sérieux problème pour les patients de plus de 60 ans à cause des comorbidités associées à leur âge et du fait qu'ils sont plus sensibles à la toxicité des traitements que les patients plus jeunes. La rechute, associée à la résistance aux traitements, est inévitable dans la grande majorité des patients. Les LAM dites secondaires

¹ Ce sont des antibiotiques antitumoraux qui s'intercalent dans l'ADN et forment des radicaux libres.

² L'ARA-C (1-β-D-arabinofuranosylcytosine), un analogue de nucléoside, est l'un des agents les plus importants pour la thérapie standard d'induction de LAM, de LAL, de la leucémie chronique myéloïde et des lymphomes.

(6 % des patients) ou consécutives à un SMD (8 % des patients) sont plus résistantes aux traitements que la LAM *de novo* (Estey et Dohner, 2006).

Le régime optimal de chimiothérapie de consolidation n'est pas encore déterminé. La majorité des protocoles utilisent la combinaison des anthracyclines et de l'ARA-C. Une étude a montré que l'intensification de la dose de l'ARA-C ($\geq 1 \text{ g/m}^2/\text{dose}$) comparée à une dose normale en chimiothérapie de consolidation chez l'adulte de moins de 60 ans est associée à un pourcentage plus grand des patients en rémission. L'intensification de la dose produisait un nombre de patient en rémission similaire à celui des patients subissant une greffe de moelle allogénique (Mayer *et al.*, 1994). Toutefois, il existe trois options pour le traitement de consolidation des leucémies pour des patients de moins de 60 ans : (1) une chimiothérapie intensive avec l'ARA-C ; (2) une transplantation autologue de cellules souches hématopoïétiques (celle-ci induit des rechutes à cause de la contamination du transplant par des cellules leucémiques du patient) et (3) la transplantation allogénique de cellules souches hématopoïétiques. Cette dernière produit des guérisons chez les patients aptes à recevoir une telle thérapie mais le rejet de la greffe cause 20 à 35 % de mortalité (Skeel, 1999). Une thérapie dont la cible serait spécifiquement les CSL serait appropriée pour des patients en rémission où la plupart des cellules cancéreuses ont été détruites et où il reste seulement des CSL (Jordan, 2005).

1.7 Le cancer du poumon et les approches thérapeutiques :

Selon la Société canadienne du cancer en 2008, le nombre de nouveaux cas du cancer du poumon sera de 23900 et le nombre de décès sera de 20200 personnes. Le cancer du poumon est le cancer le plus commun (1/3 de tous les cancers) et le plus meurtrier chez l'homme et la femme. La principale cause est la consommation de cigarettes (90 % des cas), la fumée passive et l'exposition à l'asbestos. Généralement, les métastases se retrouvent dans les os, le système nerveux, le foie et l'intestin. Parmi tous les cancers du

poumon, on distingue celui à grandes cellules (85 % des cas) et celui à petites cellules (15 % des cas).

Pour le cancer du poumon à grandes cellules, la chirurgie est le traitement de choix pour les tumeurs de stade I et II (tumeurs localisées). Les tumeurs avancées de stade III et IV (qui sont métastatiques) sont traitées par la chimiothérapie. La chimiothérapie est basée sur des dérivées du platine en combinaison avec d'autres agents. Elle n'a que très faiblement améliorée la survie des patients (quelques mois). La raison de cet échec est la mauvaise posologie et une faible pénétration des médicaments dans les tumeurs (Tannock *et al.*, 2002; Minchinton et Tannock, 2006). Pour les cancers du poumon de stade IV, l'espérance de survie est de quatre mois sans aucun traitement. Mais, la chimiothérapie basée sur des dérivés du platine (le cisplatine¹ seul ou en combinaison avec la vinblastine² ou l'étoposide³), produit une espérance de survie de 10 à 12 mois (Casciato, 2004).

Pour le cancer du poumon à petites cellules, le diagnostic est souvent établi quand le cancer s'est propagé et l'état du patient se détériore ensuite rapidement. Des métastases se retrouvent dans le cerveau, la moelle et le foie. La chimiothérapie la plus utilisée est la combinaison de cisplatine et d'étoposide qui mène à une survie moyenne de 23 mois. Vingt-cinq pour cent des patients atteints aux stades I, II et III survivent cinq ans alors que 25 % des patients atteints, aux stades plus avancés, survivent deux ans à la maladie (Casciato, 2004).

¹ Le cisplatine est un agent alkylant de l'ADN composé de platine.

² La vinblastine est un médicament extrait de la pervenche (*Vinca rosea*) qui est utilisée dans le traitement du cancer du poumon, du cancer du sein et des lymphomes. C'est un agent antimicrotubulaire qui, en se fixant à la sous-unité B des microtubules, bloque le fuseau mitotique.

³ L'étoposide est une molécule qui inhibe la topoisomérase II.

1.8 Les méthodes de calcul des interactions pharmacologiques :

Différentes méthodes de calcul d'interaction des médicaments ont été décrites dans la littérature. La méthode de Chou et Talalay (Chou et Talalay, 1984) est l'une des méthodes des plus utilisées. L'équation de Chou et Talalay permet de calculer l'index de combinaison qui donne une évaluation de l'interaction entre les médicaments. Dans cette méthode, lorsque l'index de combinaison est inférieur à 1, il décrit une interaction synergique entre deux médicaments. Lorsque celui-ci est égal à 1, il décrit une interaction additive. Et enfin, quant il est supérieur à 1, il décrit une interaction antagoniste. L'analyse de l'interaction selon la méthode de Chou et Talalay nécessite l'obtention de résultats de l'effet anticancéreux pour différentes concentrations de chacun des médicaments utilisés seuls, puis pour différentes concentrations des deux médicaments utilisés en combinaison. Ensuite, on calcule l'index de combinaison en intégrant dans l'équation de Chou et Talalay les concentrations des médicaments seuls et celles de la combinaison des deux médicaments produisant le même pourcentage d'effet (appelé «fraction affectée») sur les cellules cancéreuses. On peut aussi représenter l'index de combinaison pour chaque valeur de la fraction affectée et évaluer qu'elles sont les concentrations des médicaments utilisées en combinaison qui produisent une réponse synergique, additive ou antagoniste. Ainsi, ce test requiert l'obtention de nombreuses données. L'inhibition de la croissance des cellules cancéreuses est souvent le paramètre mesuré expérimentalement car ces méthodes permettent l'acquisition rapide de ces résultats.

Une autre méthode de calcul de l'interaction entre des agents anticancéreux est celle décrite par Valeriote et Lin (Valeriote et Lin, 1975). C'est une méthode de choix pour évaluer l'interaction des médicaments anticancéreux au niveau cellulaire, notamment pour analyser l'effet des traitements sur le potentiel clonogénique des cellules cancéreuses. Ainsi, pour qualifier le type d'interaction obtenue, on mesure la fraction de survie cellulaire. Une interaction synergique est obtenue lorsque le nombre de cellules qui survivent au traitement de la combinaison des médicaments est plus petit que la somme du nombre de cellules qui survivent suite au traitement de chacun des deux agents utilisés

seuls à des concentrations spécifiques. L'interaction additive, quant à elle, est obtenue lorsque le nombre de cellules qui survivent au traitement de la combinaison des médicaments est égal à la somme du nombre de cellules qui survivent suite au traitement de chacun de ces deux agents utilisés seuls. L'interaction antagoniste est obtenue lorsque le nombre de cellules qui survivent au traitement de la combinaison des médicaments est plus grand que la somme du nombre de cellules qui survivent suite au traitement de chacun de ces deux agents utilisés seuls.

La différence entre les méthodes de Valeriote et Lin et celle de Chou et Talalay est que la première mesure l'interaction des médicaments en additionnant les effets des médicaments alors que la deuxième se base sur l'addition des concentrations produisant un même effet. Le calcul de l'interaction par la méthode de Chou et Talalay nécessite l'obtention de nombreuses valeurs expérimentales. Il faut générer suffisamment de résultats pour établir, une courbe dose-réponse pour chacun des médicaments et une courbe dose-réponse pour plusieurs concentrations des médicaments utilisés en combinaison. Cette méthode de calcul est ainsi bien adaptée pour des expériences d'inhibition de la croissance comme le test MTT. En effet, le test de MTT permet l'obtention rapide des résultats et c'est d'ailleurs une méthode de choix, utilisée par l'industrie pharmaceutique pour évaluer l'effet des nombreux médicaments et de leurs combinaisons respectives lors du processus de sélection de nouvelles molécules. La méthode de Chou et Talalay est ainsi la méthode de choix pour évaluer l'interaction de combinaison de médicaments visant à réduire la croissance des cellules cancéreuses. Par contre, lorsqu'on a sélectionné des agents anticancéreux et que l'on souhaite étudier plus en profondeur leur interaction, il faut étudier leur effet de concentration pertinente au niveau thérapeutique sur la réduction du potentiel clonogénique des cellules cancéreuses ce qui présente un objectif différent de celui du criblage. Les expériences de perte clonogénicité sont aussi techniquement plus difficiles à réaliser que les expériences de criblage par les tests de MTT. Ainsi, pour valider l'hypothèse selon laquelle l'interaction entre deux agents anticancéreux produit une réponse synergique donnée par le test de MTT, quelques concentrations spécifiques sont choisies pour faire une étude en mesurant l'inhibition du potentiel clonogénique. Dans ce cas de figure, l'évaluation de l'interaction entre les médicaments se fait en

utilisant la méthode de Valeriote et Lin en analysant l'effet de certaines concentrations choisies.

Lors des expériences *in vivo*, les résultats sont souvent présentés sous forme de courbes de Kaplan-Meier. Ces courbes sont utilisées pour présenter des résultats des études cliniques de survie (à 3 ou 5 voir 10 ans) à un traitement donné et dont l'analyse est encore en cours. Ces courbes offrent une meilleure représentation graphique pour ce genre d'expériences que des histogrammes ce qui facilite la compréhension des résultats. L'intervalle de confiance de la survie (à 95 %) des courbes Kaplan-Meier est généralement calculé selon la méthode normalisée de Greenwood. D'autres méthodes, comme les tests de «log rank» ou les tests de Cox peuvent aussi être utilisées. Toutefois, la problématique est différente dans le cas des études précliniques. En effet, le résultat de la mesure de l'effet du médicament est analysé après le décès de l'ensemble des animaux, alors que dans les études cliniques, la mesure de la survie se fait pour une expérience encore en cours dont un certain nombre d'individus est encore en vie lors de l'analyse des résultats. Ainsi dans les expériences précliniques, les résultats sont présentés sous la forme de courbes de Kaplan-Meier et ils sont analysés au niveau statistique en utilisant les tests de t ou d'ANOVA suivi d'un test de Tukey. De plus, l'interaction entre les médicaments sera évaluée selon la méthode de Valeriote et Lin (Valeriote et Lin, 1975).

Chapitre 2 : La 5-aza-2'-désoxycytidine

2.1 Le mécanisme d'action de la 5-aza-2'-désoxycytidine (5-AZA-CdR) :

2.1.1 L'activation de la 5-AZA-CdR de sa forme précurseure à sa forme active :

La 5-AZA-CdR et son activité antinéoplasique ont été découvertes dans les années soixante (Pliml et Sorm, 1964; Sorm et Vesely, 1968). Cette molécule (S-triazin-2(1H)-1,4-amino-1-β-désoxyribofuranosyle) est un analogue de la 2'-désoxycytidine dans laquelle le carbone en position 5 de la pyrimidine a été remplacé par un atome d'azote (Figure 11). Son masse moléculaire est 228,2 g/mol. Elle est chimiquement instable avec une demi-vie de 12 heures à 37 °C et à pH 7. Elle se décompose par un clivage du noyau triazine entre les positions 1 et 6 (Momparker, 2005b).

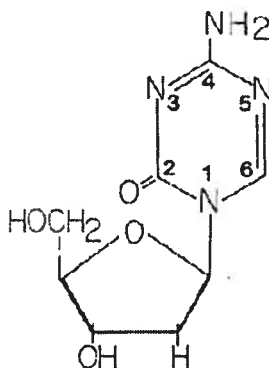


Figure 11 : La structure chimique de la 5-aza-2'-désoxycytidine (5-AZA-CdR).

La 5-AZA-CdR entre rapidement dans la cellule par un mécanisme de transport spécifique aux nucléosides. La 5-AZA-CdR est un pro-médicament qui requiert une série de transformations pour devenir une substance active (Figure 12). Elle est phosphorylée

successivement par la désoxycytidine kinase, la dCMP kinase et la diphosphokinase de nucléoside qui la convertissent en sa forme active de triphosphate, soit la 5-AZA-dCTP. Cette dernière est incorporée rapidement dans les cellules en division par la polymérase à ADN à la place de la dCTP. Comme l'action antinéoplasique de la 5-AZA-CdR est dépendante de son incorporation dans l'ADN, elle est considérée comme un agent spécifique de la phase S (Momparler, 2005b).

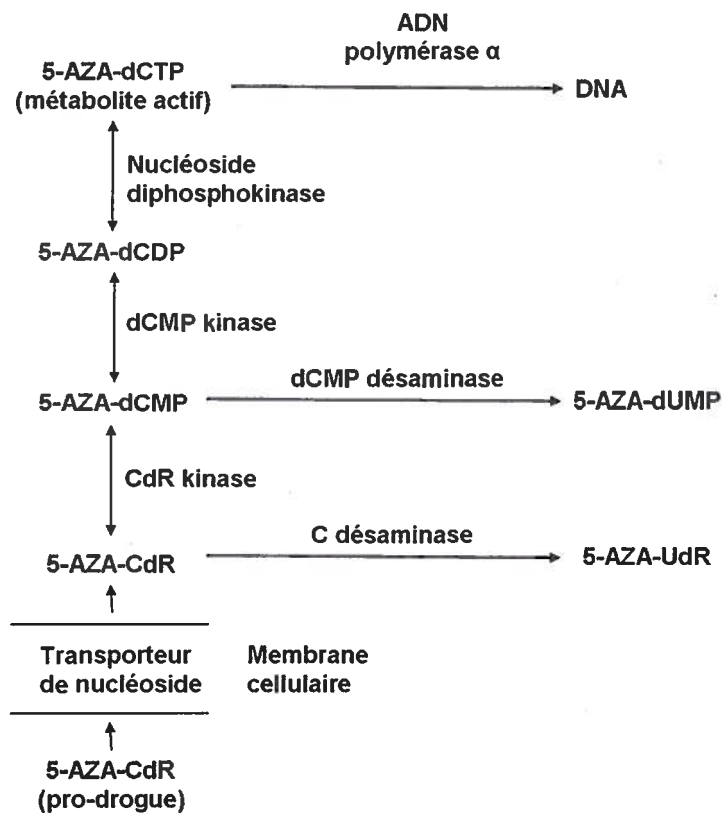


Figure 12 : Le métabolisme de la 5-aza-2'-désoxycytidine.

Les mécanismes responsables de l'acquisition de la résistance des cellules cancéreuses à la 5-AZA-CdR incluent une diminution du transport de nucléosides dans les cellules, une diminution de l'activité de la désoxycytidine kinase, une augmentation de la concentration intracellulaire en dCTP, un mécanisme spécifique de la réparation de l'ADN, une modification de l'activité des DNMT et une augmentation de la désamination de la 5-

AZA-CdR. Cette dernière représente la principale voie de dégradation de la 5-AZA-CdR. Avant son incorporation dans l'ADN, la concentration de cet analogue de nucléoside peut être réduite par l'activité enzymatique de la cytidine (C) désaminase et de la dCMP désaminase causant ainsi une réduction de son incorporation et donc, de son activité antinéoplasique (Momparler, 2005b).

2.1.2 L'effet épigénétique de la 5-AZA-CdR :

La 5-AZA-CdR, une fois incorporée dans l'ADN, va former une liaison covalente avec la DNMT1 lorsque celle-ci va méthyler l'azote en position 5 de la 5-azacytosine. Cette liaison covalente va empêcher la progression de la DNMT1 et inhiber la copie du patron de méthylation sur le brin d'ADN nouvellement synthétisé (Momparler, 2005b). La 5-AZA-CdR est donc un inhibiteur irréversible de la méthylation de l'ADN (Jones et Taylor, 1980).

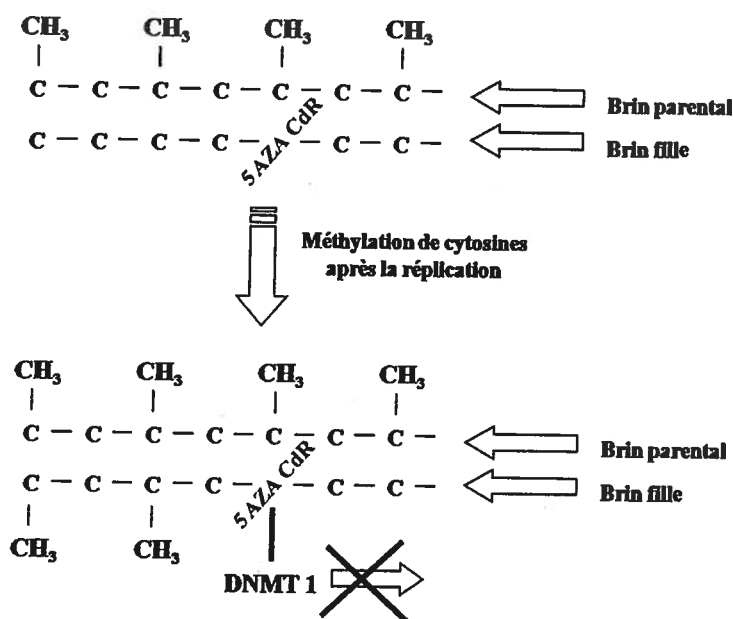


Figure 13 : Le mécanisme moléculaire d'action de la 5-AZA-2'-désoxycytidine (5-AZA-CdR ; adapté de Momparler, 2005).

Cette capacité à déméthylater l'ADN et renverser ainsi l'inhibition de l'expression des gènes confère à la 5-AZA-CdR une activité épigénétique importante. Celle-ci a suscité beaucoup d'espoir pour le traitement du cancer, car contrairement aux mutations et aux délétions qui sont irréversibles, les changements épigénétiques sont réversibles et peuvent être modifiés grâce à cet analogue de nucléoside (Oki *et al.*, 2007). Étant donné l'importance de l'hyperméthylation de l'ADN des promoteurs des gènes dans les cellules cancéreuses, l'inhibition pharmacologique de ce processus devrait avoir un impact important dans la thérapie anticancéreuse (Mompalmer et Bovenzi, 2000). Par exemple, dans les cellules leucémiques, les gènes des kinases dépendantes des cyclines¹, inhibés par une hyperméthylation du promoteur, conduisent à un dérèglement du cycle cellulaire (Farinha *et al.*, 2004; Bueso-Ramos *et al.*, 2005; Chim *et al.*, 2005). Cette hyperméthylation est associée à un pronostic défavorable² et un taux élevé de rechute (Shen *et al.*, 2003; Agrawal *et al.*, 2007). La 5-AZA-CdR produit une déméthylation de ces promoteurs et produit la réexpression de nombreux TSG (Kikuchi *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2002; Farinha *et al.*, 2004). De plus, la 5-AZA-CdR libère les régions promotrices des gènes déméthylés de leurs nucléosomes, ce qui facilite l'accès des facteurs de transcription et de la machinerie transcriptionnelle pour stimuler la réactivation des gènes (Lin *et al.*, 2007).

Dans les années 1980, certains chercheurs ont proposé qu'une diminution de la méthylation de l'ADN par des agents pharmacologiques pouvait induire le cancer (Feinberg et Vogelstein, 1983). Leur hypothèse était que la 5-AZA-CdR en produisant une hypométhylation de l'ADN favorise l'expression d'oncogènes, des éléments répétés de l'ADN qui déstabiliseraient le génome et déclencheraient ainsi le cancer. Or, plusieurs études sur des modèles animaux où la 5-AZA-CdR était administrée de façon répétée pendant de longues périodes ont démontré que la 5-AZA-CdR agit comme un agent

¹ Ces protéines de la famille INK4 (*p15*, *p16*, *p18* et *p19*) et CIP/KIP (*p21^{CIP}*, *p27^{KIP1}*, *p57^{KIP2}*) servent normalement à inhiber la progression du cycle cellulaire.

² L'hyperméthylation aberrante de ces gènes est commandée dans certains cas par une protéine de fusion PML-RARA (pour «promyelocytic leukemia-retinoic acid receptor- α ») qui recrute les DNMT et les HDAC pour inhiber des gènes spécifiques. Esteller, M. (2007a). Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps. *Nat Rev Genet* 8, 286-298.

chimiopréventif et non un cancérigène. Des travaux sur des souris qui développent des polypes intestinaux (*Apc^{Min}*) ont démontré qu'une dose hebdomadaire de la 5-AZA-CdR pendant 3 mois a réduit le nombre moyen d'adénomes intestinaux de 113 pour les souris contrôles à 2 polypes pour les souris traitées (Laird *et al.*, 1995). De plus, une expérience de carcinogenèse du poumon induite par le 4-méthylnitrosamino-1-(3-pyridyle)-1-butanone (substance présente dans le tabac) a montré chez la souris que la 5-AZA-CdR administrée pendant 1 mois permet de réduire le nombre de lésions pulmonaires par rapport aux souris contrôles (Belinsky *et al.*, 2003). Ainsi, ces travaux ont démontré que les traitements répétés avec de la 5-AZA-CdR n'induisent pas le développement de cellules cancéreuses mais réduisent le nombre de tumeurs induites par une mutation génétique (cas des souris *Apc^{Min}*) ou par un contaminant cancérigène. Ainsi, la 5-AZA-CdR, même en produisant une hypométhylation globale de l'ADN, n'est pas une substance cancérigène (Momparler, 2005b).

La 5-AZA-CdR, en produisant la déméthylation de l'ADN et la réactivation des TSG, induit la différenciation, la sénescence, l'inhibition de la croissance ce qui produit la perte de la clonogénicité des cellules cancéreuses (Momparler, 2005b). L'exposition à cet analogue de nucléoside ne tue pas les cellules cancéreuses immédiatement. En effet, ces cellules se divisent encore deux ou trois fois avant de mourir. En effet, ces divisions successives sont le reflet de la différenciation induite par la 5-AZA-CdR, pouvant modifier le phénotype ou la morphologie des cellules (Jones et Taylor, 1980; Momparler, 2005b). Il a été démontré que la 5-AZA-CdR induit la différenciation terminale de cellules leucémiques humaines (Pinto *et al.*, 1984; Momparler *et al.*, 1985a). Ce processus de différenciation terminale rend l'évaluation de l'activité antinéoplasique de la 5-AZA-CdR difficile, particulièrement en clinique dans le cas de tumeurs solides où la régression de la masse tumorale se fait plus lentement que dans le cas d'autres médicaments (Momparler et Bovenzi, 2000). Les CSC réfractaires à la chimiothérapie standard pourraient ainsi être amenées à se différencier grâce à l'administration de médicaments épigénétiques comme la 5-AZA-CdR (Jones et Baylin, 2007).

2.2 Le 5-aza-2'-désoxycytidine en clinique :

2.2.1 La pharmacologie de la 5-AZA-CdR :

L'utilisation optimale de la 5-AZA-CdR en clinique dépend de ses caractéristiques pharmacologiques. Les résultats ont d'abord montré que l'infusion i.v. est la meilleure façon d'administrer cet agent spécifique de la phase S. L'augmentation de la dose est nécessaire pour obtenir un meilleur effet antinéoplasique. Dans le modèle de souris leucémiques, une thérapie curative¹ qui donnent des souris survivant à la maladie, est obtenue avec une infusion i.v. de 15 h à une dose de 21 mg/kg alors que des doses plus faibles de 5 mg/kg ne sont pas curatives mais produisent néanmoins une large augmentation du temps de survie de ces souris (Momparler, 2005b). De plus, il est intéressant de noter que dans ce modèle, la 5-AZA-CdR est plus efficace que l'ARA-C, un des agents anticancéreux des plus utilisés pour lutter contre la LAM (Momparler *et al.*, 1984)

Concernant la toxicité de la 5-AZA-CdR, les études chez les souris ont permis de comprendre que cet agent anticancéreux produit une leucopénie et une thrombopénie dont l'effet est réversible. Le traitement va pousser les cellules progénitrices en prolifération dans la moelle à se différencier. Ceci provoque une grande perte de ces cellules de la moelle menant à la myélosuppression. Comme la 5-AZA-CdR est un agent spécifique de la phase S, les cellules souches normales qui sont quiescentes, ne sont pas affectées. Après la thérapie, ces cellules sont recrutées dans le cycle cellulaire pour entrer en prolifération et générer l'hématopoïèse. Ces données justifient l'augmentation de la dose de la 5-AZA-CdR, car elle n'est pas cytotoxique envers les cellules souches au repos de la moelle, ce

¹ C'est-à-dire que l'ensemble des cellules cancéreuses ont été éliminées par la thérapie. Ces souris ne feront pas de rechute et ne mourront pas de la leucémie. On appelle aussi ces souris des survivantes à long-terme.

qui permet le rétablissement de l'hématopoïèse. Chez l'humain, à cause de cette myélosuppression, il faut espacer les cycles de traitements de cinq à six semaines afin de permettre le rétablissement de la fonction hématopoïétique. Il est possible que l'usage de facteurs de croissance accélère la récupération de l'hématopoïèse (Momparler, 2005b).

Suite aux nombreuses phases cliniques et aux études précliniques, les résultats ont montré que la résistance à cet analogue est causée par une déficience en désoxycytidine kinase et une augmentation de l'activité de cytidine désaminase. Cette dernière est responsable de la courte demi-vie de 15 à 25 minutes de la 5-AZA-CdR. L'ensemble de ces caractéristiques sous-entendent que son activité clinique sera d'autant plus grande que la concentration de la 5-AZA-CdR sera maintenue à son niveau optimal pendant toute la durée du cycle cellulaire des cellules cancéreuses (Momparler, 2005b).

2.2.2 Les résultats cliniques de la 5-AZA-CdR :

Le premier rapport clinique avec la 5-AZA-CdR a montré qu'elle induisait des RC chez des enfants atteints de leucémies aiguës en rechute et résistants à la thérapie conventionnelle (Rivard *et al.*, 1981). La 5-AZA-CdR produisait une réponse antileucémique chez l'ensemble de ces patients. Le traitement a produit 22 % de RC (Momparler *et al.*, 1985b). La posologie la plus efficace était une administration de 1080 à 2400 mg/m² (dose totale) lors d'une infusion de 36 à 44 h. À ces doses, l'incidence des vomissements et des nausées augmentait, mais la toxicité n'était pas sévère et était contrôlée facilement par la médication. Le nadir des plaquettes et des granulocytes commençait entre le 9^e et le 12^e jour après le traitement et la récupération débutait entre les 24^e et 42^e jours. Cette étude a montré que la 5-AZA-CdR traverse la barrière hémato-encéphalique. Chez deux patients, une concentration inhibitrice de la 5-AZA-CdR était détectée dans le liquide céphalorachidien et a produit la disparition des clones leucémiques dans les méninges (Rivard *et al.*, 1981). Pendant l'infusion, sa concentration dans le fluide cérébro-spinal était d'environ la moitié du niveau plasmatique. Ainsi, un

niveau d'infusion de 30 mg/m²/h produisait un effet antileucémique significatif, en donnant une concentration plasmatique à l'équilibre de l'ordre du micromolaire (Momparker *et al.*, 1985b). Chez des adultes atteints de LAM, la 5-AZA-CdR, administrée en infusion de 30 mg/m²/h à une dose totale de 1080 mg/m² (4 h d'infusion, 3 fois par jour pendant 3 jours) en cycles de 6 semaines, produisait environ 27 % de RC (Petti *et al.*, 1993).

Pour des patients âgés atteints de SMD, un traitement à faible dose de la 5-AZA-CdR à 2 mg/m²/h pendant 72 h toutes les six semaines a produit 27 % de RC (survie moyenne de 11 mois) (Wijermans *et al.*, 1997). Cette étude, où la 5-AZA-CdR était utilisée à faible dose, démontre sa grande efficacité et appuie le fait que la 5-AZA-CdR est plus efficace que l'ARA-C (Momparker *et al.*, 1984), car seulement 11 % des patients répondaient à l'ARA-C à faible dose (Miller *et al.*, 1992). Plus récemment, une autre étude avec des patients atteints de SMD, traités à 20 mg/m² en infusion d'1 h, 5 fois par jour, présentait un taux de 35 % de RC avec une survie moyenne de 22 mois. La 5-AZA-CdR à cette posologie n'augmente pas la durée de survie moyenne mais elle produit moins de mortalité que la chimiothérapie standard intensive du traitement de SMD (Kantarjian *et al.*, 2007). Pour le traitement de la leucémie myélomonocytaire chronique (récemment classée dans les syndromes myéloprolifératifs/dysplasiques), la 5-AZA-CdR produit un taux de RC de 58 % à 100 mg/m² par cycle, répétés toutes les quatre semaines. Par contre, ces patients survivaient en moyenne 19 mois ce qui ne représente pas d'amélioration par rapport à la survie des patients traités avec la chimiothérapie standard qui est 18 à 20 mois (Aribi *et al.*, 2007).

Comme une hyperméthylation anormale de l'ADN des TSG est détectée dans tous les types de cancers, la 5-AZA-CdR a le potentiel d'être efficace contre toutes les néoplasies. Des études cliniques sur le traitement des tumeurs solides ont testé l'efficacité de la 5-AZA-CdR. Une étude pilote avec des patients (n = 6) atteints du cancer du poumon à grandes cellules à un stade avancé (stade IV) a montré que la 5-AZA-CdR produisait une prolongation de la survie qui était significative par rapport au temps de survie des patients

recevant la chimiothérapie conventionnelle. Ces patients ont reçu deux cycles et plus de la 5-AZA-CdR à 200-660 mg/m² (dose totale) en 8 h d'infusion par cycle. Une patiente qui a reçu cinq cycles à des doses comprises entre 495 et 660 mg/m² a survécu 81 mois et deux patients qui ont reçu trois et quatre cycles de 5-AZA-CdR (200-660 mg/m²) ont survécu 16 et 15,3 mois (Momparler *et al.*, 1997; Momparler et Ayoub, 2001). La survie moyenne des patients atteints d'un cancer du poumon à grandes cellules au stade IV est de 12 mois avec la chimiothérapie classique (Casciato, 2004). D'autres travaux plus récents ont montré que la diminution de la dose de la 5-AZA-CdR n'était pas une approche convenable pour ce genre de pathologie. Une posologie de 60-90 mg/m² (dose totale) en infusion pendant 72 h n'a pas pu démontrer d'effet significatif sur la survie des patients atteints du cancer du poumon à grandes cellules (Schrump *et al.*, 2006). En effet dans cette étude, le niveau plasmatique était de 10 ng/ml alors que l'infusion de 660 mg/m²/8h produit un niveau plasmatique à l'équilibre 70 fois plus grand (Momparler *et al.*, 1997; Momparler et Ayoub, 2001). L'utilisation de doses plus élevées de la 5-AZA-CdR est appuyée par le fait que les médicaments ont généralement des difficultés à pénétrer à l'intérieur des tumeurs solides pour éliminer les cellules cancéreuses et notamment les CSC (Tannock *et al.*, 2002).

Après de nombreuses études cliniques, l'énigme sur la posologie optimale de la 5-AZA-CdR n'a pas encore été résolue. En ce qui a trait à la durée idéale de l'infusion, elle devrait être assez longue pour permettre à toutes les cellules néoplasiques d'entrer en phase S. Comme la durée de l'infusion de l'ARA-C de 168 h produit des RC de longue durée; cela suggère que durant cet intervalle la plupart des cellules néoplasiques entrent en phase S. Pour optimiser l'efficacité thérapeutique de la 5-AZA-CdR, les essais cliniques devraient prolonger la durée de l'infusion progressivement jusqu'à l'obtention de RC de longue durée, sans toutefois avoir une toxicité supérieure à celle de la thérapie standard (Appendice A). Dans un article soumis récemment (Appendice B), des résultats précliniques sur des modèles *in vivo* et *in vitro* du cancer du poumon et de leucémie montrent que l'activité antinéoplasique significative de la 5-AZA-CdR se produit quand son niveau plasmatique atteint l'ordre du micromolaire. L'utilisation d'un tel niveau plasmatique est justifiée par le fait qu'en-dessous d'un certain seuil, les cellules

cancéreuses peuvent reméthyler les TSG et ainsi, contrecarrer l'effet antinéoplasique de la 5-AZA-CdR (Egger *et al.*, 2007). De plus, pour le traitement des tumeurs solides, la faible pénétration des agents anticancéreux à l'intérieur des tumeurs appuie l'intensification de la dose d'anticancéreux (Tannock *et al.*, 2002; Minchinton et Tannock, 2006). Les doses maximales de la 5-AZA-CdR utilisées en clinique ont été administrées à des enfants atteints de leucémies en stade terminal et à des patients âgés atteints du cancer du poumon en stade IV (Rivard *et al.*, 1981; Momparler *et al.*, 1997). Ces posologies sont myélosuppressives mais cette toxicité est réversible. Comme la toxicité de la 5-AZA-CdR est similaire à celle de l'ARA-C, une thérapie d'une durée proche de celle de l'ARA-C devrait être réalisable, sans produire des toxicités inacceptables (Momparler, 2005b).

Ainsi, la posologie optimale pour le traitement des hémopathies malignes avec la 5-AZA-CdR devrait se trouver à l'intérieur d'une infusion de 48 à 120 h avec un taux d'infusion d'environ $30 \text{ mg/m}^2/\text{h}$ par cycle, répété toutes les six semaines (Appendice A). Les patients avec un statut hématologique faible sont des candidats seulement pour une thérapie à faible dose de la 5-AZA-CdR. Cependant, si ces patients répondent au traitement et que leur état hématologique s'améliore jusqu'à la RC, ils pourraient alors être traités avec une thérapie plus intense afin de prolonger la durée de leur RC (Momparler, 2005b). Concernant les tumeurs solides, il est important de réaliser que la cinétique de la division des cellules tumorales est plus longue que celle des cellules leucémiques. Ainsi, la durée de la thérapie de la 5-AZA-CdR doit par conséquent être très longue (> 5 jours). Mais, une telle durée d'infusion produirait une trop grande toxicité. Une approche qui mériterait une attention particulière serait l'utilisation de plusieurs cycles répétés de la thérapie intensive avec le 5-AZA-CdR pour des courtes périodes d'infusion de 12 à 24 h (Momparler, 2005b).

Notons qu'à l'heure actuelle, la 5-AZA-CdR est approuvée aux États-Unis depuis mai 2006, pour le traitement des SMD à une posologie de 15 mg/m^2 en infusion de 3 h, toutes les 8 h pendant 3 jours et dont le cycle est répété toutes les six semaines.

Chapitre 3 : La génistéine

3.1 Généralités :

La génistéine (4',5,7-trihydroxyisoflavone, Figure 14) est la principale isoflavone présente dans le soja. Sa structure moléculaire est semblable à celle de l'estradiol, ce qui lui confère une capacité de liaison aux récepteurs estrogéniques. C'est donc une phytoestrogène (Park et Surh, 2004).

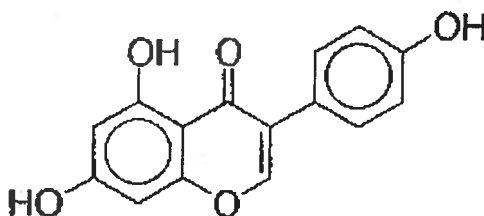


Figure 14: La génistéine (4',5,7-trihydroxyisoflavone).

Cette molécule naturelle est la plus active des isoflavones du soja et présente des caractéristiques intéressantes comme l'inhibition de l'angiogenèse, la différenciation cellulaire, la destruction des cellules tumorales, le traitement des symptômes de la ménopause et la prévention de l'ostéoporose. Parmi tous ces aspects, c'est son potentiel antinéoplasique qui sera au coeur de notre étude, grâce à son action sur de nombreux mécanismes moléculaires impliqués dans le cancer (Agarwal, 2000; Ravindranath *et al.*, 2004).

Des études toxicologiques sous-chroniques et chroniques chez le chien démontrent que pendant 4 à 52 semaines à haute dose (500 mg/kg/jour), la génistéine est bien tolérée et ne produit pas de toxicité systémique. Cette forte dose administrée quotidiennement pendant 52 semaines a produit, chez les femelles, une augmentation du poids de l'utérus et chez les mâles, une réduction de la taille des testicules, de l'épididyme et de la prostate, sans toutefois affecter la fonction reproductrice (McClain *et al.*, 2005). Des études *in vitro* ont semé la controverse quant à la toxicité de la génistéine. En effet, des chercheurs ont montré que cette isoflavone, à des concentrations de 50 μM , inhibe les topoisomérases II¹. Cet effet inhibiteur produit des clivages de l'ADN, notamment au niveau du gène MLL. De telles cassures sont fréquemment retrouvées chez l'enfant atteint d'une leucémie. Ces observations ont conduit ces chercheurs à considérer la génistéine dans l'étiologie de la leucémie (Abe, 1999; Strick *et al.*, 2000). D'autres résultats *in vitro* ont montré que la génistéine avait une activité clastogénique (qui induit des cassures de l'ADN) sur des cellules de lymphome de souris exposées à 222 μM pendant 3 h et à 18 μM pendant 24 h (McClain *et al.*, 2006). Or, cet effet cytotoxique observé *in vitro* n'a pas pu être confirmé *in vivo* chez la souris et le rat car les niveaux plasmatiques de génistéine sont plus faibles (McClain *et al.*, 2006). Chez l'humain, la génistéine administrée à haute dose (300 mg/jour pendant 28 jours ou 600 mg/jour pendant 56 jours) n'a pas causé de cassures de l'ADN, ni de clivage du gène MLL dans les lymphocytes périphériques (Miltyk *et al.*, 2003). Cette différence entre les résultats *in vitro* et *in vivo* provient du fait que les concentrations utilisées *in vitro* ne sont pas atteignables *in vivo* à cause de l'élimination rapide de la génistéine (Klein et King, 2007). Les conclusions de certains auteurs sur l'implication de la génistéine dans l'étiologie de la leucémie ont été invalidées car leurs résultats *in vitro* ne pouvaient être appliqués *in vivo*. La génistéine n'a pas présenté de signes de toxicité détectables lors de son administration à haute dose. Sa classification comme agent chimiopréventif n'a ainsi pas été remise en cause.

¹ Ces enzymes ont la fonction de relaxer les tensions des deux brins de l'ADN suite à la réplication et la transcription. Elles coupent les deux brins, défont le superenroulement de la double hélice puis relient les brins d'ADN relaxés. Un inhibiteur de topoisomérases empêche la relaxation et la ligation des brins d'ADN produisant des cassures et des aberrations chromosomiques.

3.2 La génistéine et son rôle dans la chimioprévention :

Plusieurs études épidémiologiques démontrent une association entre la consommation de soja et une réduction du risque de cancer. Les asiatiques, qui consomment 20 à 50 fois plus de soja que les occidentaux, ont un taux plus faible de cancer du sein et de la prostate (Park et Surh, 2004). Des études ont montré que la présence de la génistéine dans le plasma est associée à un risque moins élevé de contracter ces cancers (Kurahashi *et al.*, 2007; Wu *et al.*, 2008). La génistéine agit comme un agent naturel de chimioprévention (Sarkar *et al.*, 2006). Par exemple, la concentration plasmatique de génistéine obtenue chez des Japonais était d'environ 0,5 μM , alors qu'elle était de 0,03 μM chez des Britanniques (Morton *et al.*, 2002). Plusieurs études cliniques sont en cours afin d'examiner les effets anticancéreux et chimiopréventifs de la génistéine administrée chez des patients atteints de cancer de la prostate, de l'endomètre, du sein et de la vessie (voir <http://clinicaltrials.gov/>).

3.3 La biodisponibilité de la génistéine chez l'humain :

Dans le soja, la génistéine est présente sous forme d'un conjugué β -D-glycosylé, biologiquement inactif, nommé la génistine. Cette dernière, une fois ingérée, est transformée en génistéine (un composé aglycone) par les β -glycosidases, des enzymes produites par des bactéries symbiotiques de l'intestin (Murphy, 1982; Setchell *et al.*, 2002). La génistéine est absorbée plus rapidement et en plus grande quantité que ces formes β -D-glycosylées. Son absorption se fait par un mécanisme de diffusion passive à travers les cellules intestinales (Izumi *et al.*, 2000; Mathey *et al.*, 2006). La meilleure façon d'évaluer l'exposition à la génistéine est de mesurer son niveau plasmatique (Mathey *et al.*, 2006). Dans une étude de phase I sur des patients atteints de cancer, l'administration orale de génistéine à 2, 4 ou 8 mg/kg a produit une concentration plasmatique maximale d'environ 0,1 μM (Takimoto *et al.*, 2003). Selon différentes études, la demi-vie de la génistéine chez l'humain varie généralement entre 3 et 10 h

respectivement pour les formes libres et conjuguées (voir section 3.4) de la génistéine (Setchell *et al.*, 1998; Watanabe *et al.*, 1998; Bloedon *et al.*, 2002; Busby *et al.*, 2002). Le pic plasmatique de la génistéine se produit 6 à 8 h après l'ingestion de composés purifiés (Setchell *et al.*, 1998) ou de soja en poudre (Watanabe *et al.*, 1998). La génistéine, à une dose fortement supérieure à l'apport normal (1 à 16 mg/kg), administrée à des hommes en bonne santé, ne produisait pas de toxicité clinique et était rapidement excrétée. De plus, les données pharmacocinétiques démontrent que l'administration de la génistéine, toutes les 12 ou 24 h, ne peut pas mener à une accumulation plasmatique à cause de son élimination rapide (Bloedon *et al.*, 2002).

3.4 Le métabolisme de la génistéine :

La génistéine est métabolisée en composés glucurono- ou sulfo-conjugués dans l'intestin et dans le foie (Chen *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2005b). Le métabolisme de la génistéine serait plus important au niveau intestinal qu'au niveau hépatique, car il y a plus de glucuronides de génistéine excrétés par l'intestin que par la bile (Chen *et al.*, 2005b). Dans le plasma de souris, la génistéine est présente à 9 % sous forme libre (aglycone), 38 % conjuguée à des sulfates et 53 % conjuguée à des glucuronides (Allred *et al.*, 2005).

Au niveau intracellulaire, la génistéine est métabolisée en dihydrogénistéine et d'autres produits de dégradation qui perdent progressivement leur capacité de liaison aux récepteurs des estrogènes (Hwang *et al.*, 2006). Récemment, il a été démontré qu'un produit de dégradation de la génistéine, le 5,7,3',4'-tétrahydroxyisoflavone, produit par les cytochromes P450 (notamment les isoenzymes 1A2, 2C9, 2C19, 2D6 et 3A4) jouerait un rôle important dans l'effet anticancéreux de la génistéine à des concentrations nutritionnelles (Nguyen *et al.*, 2006). Le métabolite est impliqué dans la phosphorylation de la MAP (pour «mitogen-activated protein») kinase p38 et inhibe la cdc2 (gène qui contrôle la division cellulaire). Par le fait même, ce métabolite de la génistéine bloque le cycle cellulaire dans la phase G2/M (Figure 15). Ce métabolite est retrouvé dans la lignée

cancéreuse du sein (MCF-7) et non dans des cellules mammaires non cancéreuses (MCF-10). De plus, seules les cellules cancéreuses capables de produire ce métabolite sont sensibles à l'action de la génistéine. Ainsi, ces résultats démontrent que le métabolisme de la génistéine joue un rôle important dans son activité anticancéreuse (Nguyen *et al.*, 2006). Il est important de considérer qu'il existe des variations interindividuelles dans le métabolisme de la génistéine, notamment à cause du polymorphisme des cytochromes P450 (Boersma *et al.*, 2001; Mathey *et al.*, 2006). Toutefois, l'action anticancéreuse de la génistéine est pléiotropique et ne se limite pas à l'effet de l'un de ses métabolites.

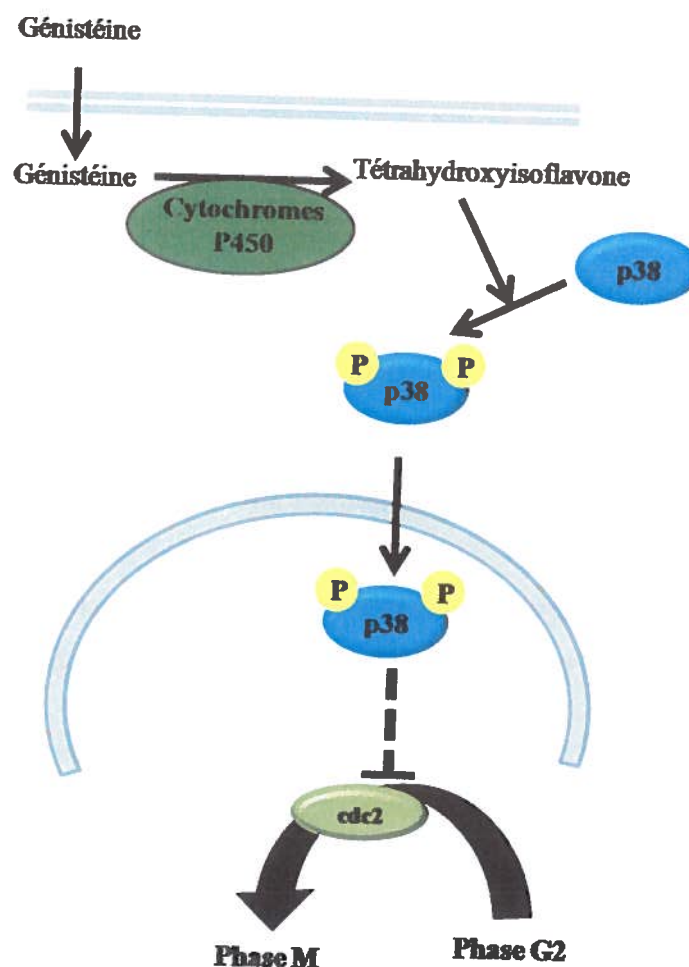


Figure 15 : Proposition du mécanisme d'action de la génistéine via l'effet de son métabolite la tétrahydroxyisoflavone dans les cellules T47D (adapté de Nguyen et al., 2006).

3.4 Les mécanismes moléculaires responsables de l'action anticancéreuse de la génistéine :

La génistéine exerce une action anticancéreuse pléiotropique dans différentes voies moléculaires impliquées dans la carcinogenèse (Park et Surh, 2004). Dans les cellules cancéreuses, elle agit sur l'expression des gènes du cycle cellulaire, l'apoptose, l'oncogenèse, la régulation de la transcription, la transduction du signal, l'invasion tissulaire et l'angiogenèse (Sarkar *et al.*, 2006).

La génistéine est un inhibiteur des protéines tyrosines kinases qui sont suractivées dans de nombreux cancers. L'inhibition de ces enzymes est une stratégie pour lutter contre les cellules cancéreuses. La génistéine, à hautes doses, produit un arrêt du cycle cellulaire en phase G2/M, grâce à la répression de l'activité de la Cdk1 (check-point kinase), de la cycline B1 et de la cdc2 dans des cellules de cancer du sein, de la prostate, de l'estomac, du poumon et de leucémie (Spinozzi *et al.*, 1994; Park et Surh, 2004; Nguyen *et al.*, 2006; Sarkar *et al.*, 2006). Cet arrêt du cycle cellulaire en phase G2/M se produit spécifiquement dans les cellules cancéreuses et non dans des cellules normales. Par exemple, elle produit un effet cytotoxique sur les cellules leucémiques pro-myélocyaires HL-60 alors que les lymphocytes normaux survivent à des concentrations de 740 μ M (Traganos *et al.*, 1992). Ainsi, cette isoflavone est cytotoxique pour les cellules cancéreuses et ne semble pas produire des effets toxiques pour les cellules normales (Nguyen *et al.*, 2006).

L'arrêt de la croissance induit par la génistéine est associé à l'apoptose. La génistéine induit l'activation des caspases-3, de Bax, de p21^{WAF1} et la baisse de l'activité de Bcl-2 et Bcl-X_L (Sarkar et Li, 2006). La génistéine induit donc la mort cellulaire et ce, indépendamment de la présence de p53, une protéine qui est mutée dans 50 % des cancers (Lian *et al.*, 1999; Ravindranath *et al.*, 2004). La génistéine est aussi un inhibiteur de l'activité chymotrypsine du protéasome. Le protéasome est une protéase qui dégrade les protéines ubiquitinylées grâce à des activités protéolytiques (semblables à celle de la chymotrypsine, de la trypsine et des caspases). L'activation du protéasome est requise

pour la survie des cellules cancéreuses. Son inhibition mène à un arrêt de la croissance en G1 et à l'apoptose des cellules cancéreuses et non des cellules normales. L'inhibition du protéasome est une cible du traitement du cancer. Des expériences avec la génistéine, sur des cellules leucémiques, du cancer de la prostate et du sein ont montré que cette inhibition produit une accumulation de protéines ubiquitinylées et mène à l'apoptose. Cet effet est aussi retrouvé exclusivement dans les cellules cancéreuses (Kazi *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2005a). Au niveau épigénétique, la génistéine (de 2 à 20 μM) induit la réexpression des TSG (*RAR β* , *p16^{INK4a}* et *MGMT*) inhibés par une hyperméthylation du promoteur dans des cellules cancéreuses de l'œsophage et de la prostate. La génistéine produit une faible inhibition de l'activité des DNMT et des HDAC. Cette inhibition pourrait expliquer la réactivation des TSG (Fang *et al.*, 2005; King-Batoon *et al.*, 2008). D'ailleurs, une diète enrichie en génistéine modifie la méthylation de l'ADN de la prostate des souris (Day *et al.*, 2002). D'autres mécanismes épigénétiques sont modifiés par la génistéine, notamment au niveau de la chromatine. Il a été démontré que la génistéine augmente l'acétylation des histones H3 et H4 au niveau des promoteurs des gènes *p21* et *p16^{INK4a}* ce qui facilite la transcription de ces deux TSG (Kikuno *et al.*, 2008; Majid *et al.*, 2008).

Les mécanismes d'action de la génistéine *in vivo* sont complexes à cause de son activité sur le système hormonal, particulièrement pour les cellules de la prostate et du sein. Une diète enrichie en génistéine (25, 250 et 1000 mg/kg) diminue l'expression des récepteurs aux androgènes dans la prostate chez le rat. Ces effets ont été observés chez le rat à des niveaux plasmatiques de génistéine comparables à ceux mesurés chez l'humain. Comme ces cellules ont besoin d'androgènes pour se développer, l'effet de la génistéine serait responsable de la plus faible incidence du cancer de la prostate observée chez les populations asiatiques (Fritz *et al.*, 2002). De plus, il a été démontré que la génistéine inhibe l'expression et la sécrétion de l'antigène spécifique de la prostate (PSA). La diminution du PSA dans le sérum des patients est observée quand les patients répondent au traitement. Ainsi, cet effet de la génistéine sur le PSA justifie son rôle dans la prévention du cancer de la prostate (Davis *et al.*, 2000).

Dans le tissu mammaire, la génistéine exerce un effet très intéressant sur les récepteurs aux estrogènes. Elle agit de deux façons différentes. C'est un antagoniste du récepteur de l'estrogène dans un environnement où la concentration en estradiol est élevée, comme avant la ménopause. C'est un agoniste de l'estrogène quand les doses d'estradiol sont plus faibles, comme pendant la ménopause (Hwang *et al.*, 2006). Cet effet antagoniste sur les récepteurs hormonaux pendant des décennies (durant la préménopause) pourrait réduire la prolifération du tissu mammaire et ainsi contribuer à son effet chimiopréventif (Ravindranath *et al.*, 2004). Par le fait même, la génistéine inhibe la croissance des cellules du cancer du sein positives aux récepteurs aux estrogènes. En outre, elle a aussi la capacité d'inhiber la croissance des cellules du cancer du sein négatives aux récepteurs aux estrogènes (Shao *et al.*, 1998a). De plus, la génistéine inhibe l'aromatase (CYP19), ce qui provoque une inhibition de la biosynthèse des estrogènes (Wood *et al.*, 2006). Ainsi, les effets antiestrogéniques de la génistéine, à des niveaux atteints dans le plasma de consommateurs de soja, sont suffisamment élevés pour réguler la prolifération des cellules mammaires épithéliales et par conséquent induire un effet chimiopréventif (Ravindranath *et al.*, 2004).

Des études *in vivo* ont montré que la génistéine administrée dans la diète réduit la formation de métastases pulmonaires et de mélanomes chez des souris C57BL/6. Le traitement à la génistéine augmentait aussi le temps de survie de ces souris (Menon *et al.*, 1998). La diminution du nombre de métastases pourrait être liée à l'effet de la génistéine sur l'invasion des cellules cancéreuses. Il a été démontré que la génistéine inhibe le détachement des cellules cancéreuses et leur potentiel invasif en induisant une diminution de deux MMP (pour Matrix Metalloprotéinase ; MMP-2 et MMP-9) et une activation d'un inhibiteur de métalloprotéinase (TIMP-1) dans des modèles de cancer de la prostate et du sein (Shao *et al.*, 1998b; Xu et Bergan, 2006).

Tableau 5 : Les mécanismes moléculaires de l'effet anticancéreux de la génistéine.

Effets anti-cancéreux de la génistéine	Commentaires	Références
Blocage du cycle cellulaire en G2/M	Inhibition de la cycline B1 et de la cdc2	Park et Surh, 2004
Activation de l'apoptose	Activation des caspases-3, Bax et inhibition des Bcl-2, Bcl-X _L	Sarkar et Li, 2006
Induction de l'apoptose indépendante de p53	Surexpression de p21 ^{WAF1} et Bax	Lian et al., 1999
Diminution de l'invasion tissulaire	Baisse de l'expression des MMP-2	Xu et Bergan, 2006
Effets hormonaux	Baisse des PSA et de l'expression des androgènes Baisse de la prolifération des cellules mammaires	Davis et al., 2000; Fritz et al., 2002 Ravindranath et al., 2004
Augmentation de l'acétylation des histones	Activation épigénétique de p21 et p 16	Majid et al., 2008
Inhibition des DNMTs et HDACs	Réactivation de p16, RAR β et MGMT	Fang et al., 2005
Déméthylation du promoteur de GSTP1	Effet faible	King-Batoon et al., 2008

Les mécanismes moléculaires impliqués dans la chimioprévention sont aussi reliés à l'effet de la génistéine sur les enzymes de détoxification responsables du métabolisme des substances cancérogènes. Elle inhibe l'activité des cytochromes P450, ce qui diminue la conversion des molécules procarcinogènes en carcinogènes actifs. De plus, elle active les enzymes de détoxification de phase II comme l'UDP-glucuronyl transférase, la glutathione S-transférase et la réductase de quinone. La génistéine augmente de cette façon la détoxification des carcinogènes. Des expériences chez le rat ont montré que la génistéine réduit l'incidence et le nombre d'adénocarcinomes mammaires induits par la diméthylbenzanthracène (Lamartiniere *et al.*, 1995) et le nombre de tumeurs de la prostate induites par la méthylnitrosourée (Lambert *et al.*, 2005).

En conclusion, la génistéine possède une faible activité sur une multitude de voies moléculaires spécifiques aux cellules cancéreuses. L'ensemble de ces effets produit une action chimiopréventive en causant une baisse de la prolifération des cellules de la prostate et du sein chez les personnes qui consomment régulièrement du soja. L'action de

la génistéine, à des niveaux atteints dans le plasma de consommateurs de soja, inhibe aussi la croissance des cellules cancéreuses en agissant sur plusieurs cibles moléculaires. Ceci empêche le développement de la résistance. Ces qualités, combinées au fait que c'est une molécule non toxique, représentent un grand avantage dans l'optique de son utilisation en chimiothérapie.

3.5 La génistéine, un adjuvant dans la chimiothérapie :

Comme nous l'avons vu dans le chapitre 1.5, l'utilisation de combinaisons d'anticancéreux est la seule approche pouvant conduire à un plus haut taux de réponse aux traitements. Compte tenu des caractéristiques de la génistéine, de nombreuses études tant précliniques que cliniques se sont penchées sur son potentiel chimiothérapeutique. Au niveau préclinique, la génistéine produit des effets très intéressants en combinaison avec la chimiothérapie et la radiothérapie (Sarkar *et al.*, 2006). *In vitro*, en combinaison avec le tamoxifène, la cisplatine, le docétaxel, la doxorubicine, le dexaméthasone, la daunorubicine, le 5-fluorouracile et la gemcitabine, elle augmente l'inhibition de la croissance et l'apoptose des cellules cancéreuses de prostate, de sein, de pancréas et de poumons (Hwang *et al.*, 2005; Sarkar et Li, 2006). Contre les métastases osseuses, la génistéine augmente l'effet du docétaxel en augmentant ses effets antitumoraux, contre l'invasion et les métastases, dans un modèle murin de métastases osseuses du cancer de la prostate. Cette combinaison produit une baisse de la résorption de l'os (inhibition des ostéoclastes) et une baisse de l'activité d'une métalloprotéinase (MMP-9). Ceci a pour effet de réduire la formation des métastases dans l'os (Li *et al.*, 2006). *In vitro* et *in vivo*, la génistéine sensibilise les cellules de lymphomes au traitement basé sur la combinaison de cyclophosphamide, de doxorubicine, de vincristine et de prednisone (Mohammad *et al.*, 2003). La génistéine augmente aussi l'efficacité de la radiothérapie sur des cellules du cancer du sein et de la prostate (Ravindranath *et al.*, 2004). Une telle combinaison induit un effet inhibiteur sur la synthèse de l'ADN, la croissance cellulaire et la formation de colonies sur des cellules du cancer de la prostate (Sarkar et Li, 2006).

Des études ont prouvé que l'utilisation de la génistéine, en combinaison avec des thérapies utilisées en clinique, a un effet anticancéreux même sur les cellules résistantes. La résistance des cellules cancéreuses aux chimiothérapies est souvent causée par l'activation de gènes de résistance aux drogues (comme des pompes qui stimulent l'efflux des médicaments), de l'activation de NF- κ B et de la voie de l'Akt (Sarkar et Li, 2006). En effet, de nombreux traitements (le cisplatine, la docetaxel et la gemcitabine) induisent la stimulation de NF- κ B, mais cette induction peut être supprimée par un prétraitement des cellules cancéreuses (de prostate, du sein, du poumon et du pancréas) par la génistéine. En outre, la génistéine inhibe la voie de l'Akt et augmente l'inhibition de la croissance induite par l'adriamycine, la gemcitabine dans des cellules cancéreuses du pancréas et de l'œsophage (Sarkar et Li, 2006). L'ensemble de ces résultats en laboratoire démontrent que la génistéine augmente l'activité antitumorale des thérapies utilisées en clinique (Sarkar et Li, 2006).

Les mécanismes moléculaires responsables de l'effet anticancéreux additif ou synergique de la génistéine avec des agents chimiothérapeutiques n'ont pas été complètement élucidés et seront difficiles à déterminer en raison de l'effet pléiotropique de la génistéine (Sarkar et Li, 2006). L'intérêt porté sur la génistéine est tel, qu'à ce jour, on dénombre six phases cliniques (quatre, en combinaison avec des agents chimiothérapeutiques et deux, en combinaison avec la radiothérapie) dans lesquelles la génistéine est utilisée contre différents types de cancers (sein, prostate, rein, mélanome et pancréas ; voir <http://clinicaltrials.gov/>).

DEUXIÈME PARTIE : LES RÉSULTATS DE LA RECHERCHE

Chapitre 1 : L'activité antileucémique de la génistéine, une isoflavone présente dans les produits du soja

1.1 Traduction du résumé de l'article :

Le soja est utilisé par la médecine traditionnelle pour le traitement de nombreuses maladies incluant le cancer. Les isoflavones retrouvées dans le soja ont démontré, chez des modèles animaux, une activité chimiopréventive. Cependant, les effets thérapeutiques des isoflavones contre le cancer méritent d'être clarifiés. Nous avons évalué l'activité antileucémique *in vitro* et *in vivo* de la génistéine, une isoflavone retrouvée majoritairement dans le soja. Nous avons observé qu'elle produit une activité antinéoplasique dépendante de la dose et du temps contre des lignées cellulaires de leucémies myéloïde et lymphoïde. De plus, le traitement à la génistéine chez des cellules leucémiques a réactivé des gènes suppresseurs de tumeurs qui étaient inhibés par une méthylation anormale de l'ADN. Une diète enrichie en génistéine a produit un effet antileucémique modéré, mais significatif chez la souris. Cette action plus limitée *in vivo* serait causée par une inactivation métabolique de la génistéine chez la souris. Grâce à une demi-vie plus longue chez l'humain, une diète enrichie en soja a le potentiel de produire des niveaux plasmatiques de cette isoflavone à des concentrations, qui *in vitro*, produisent une activité antileucémique.

1.2 Contribution de l'étudiant :

Toutes les expériences présentées dans cet article, la rédaction du manuscrit et la soumission à des revues scientifiques ont été réalisées par le premier auteur de l'article.

1.3 Antileukemic Activity of Genistein, a Major Isoflavone Present in Soy Products :

Noël J-M. Raynal, [†] Louise Momparler, [‡] Michel Charbonneau, [†] and Richard L. Momparler*[‡]

[†]INRS-Institut Armand-Frappier, Université du Québec, 531 Boul. des Prairies, Laval, Québec, H7V 1B7, Canada, and Centre de Recherche, [‡]Service d'Hématologie/Oncologie, Hôpital Sainte-Justine, Département de Pharmacologie, Université de Montréal, 3175 Côte Ste. Catherine Road, Montreal, Québec, H3T 1C5, Canada

* To whom correspondence should be addressed. Tel: +1(514)345 4931 ext 6140. Fax: +1(514)345 4801. E-mail: richard.l.momparler@umontreal.ca.

[†] INRS-Institut Armand-Frappier, Université du Québec.

[‡] Université de Montréal and Hôpital Sainte-Justine.

J. Nat. Prod. **2008**, *71*, 3–7

10.1021/np070230s CCC: \$40.75 □ 2008 American Chemical Society and American Society of Pharmacognosy

Published on Web 12/29/2007

Soy has been used in traditional medicine for the treatment of various diseases, including cancer. The isoflavones present in soy have been shown in animal models to have cancer-preventing activity. However, the therapeutic effects of isoflavones against cancer are still unclear. We have evaluated the *in vitro* and *in vivo* antileukemic activity of genistein (1), a major isoflavone present in soy. We observed that it produced a dose- and time-dependent antineoplastic activity against myeloid and lymphoid leukemic cell lines. In addition, genistein treatment of the leukemic cells reactivated tumor suppressor genes that were silenced by aberrant DNA methylation. A genistein-enriched diet produced a moderate, but significant, antileukemic effect in mice. The limited extent of this *in vivo* response may have been due to the rapid metabolic inactivation of genistein in mice. Due to the longer half-life of genistein in humans, a soy-enriched diet has the potential to produce plasma levels of this isoflavone in the range of the concentrations used *in vitro* that produced an antileukemic activity.

Soy (*Glycine max* L.; Leguminosae) has been used in traditional medicine for the treatment of various diseases.¹ Previous research indicates that genistein (**1**, Figure 1), a major isoflavone in soy, has some activity for the chemoprevention of cancer.² Recent epidemiological studies showed a significant correlation between the plasma level of genistein (**1**) and a reduction of the risk of breast cancers in Asian populations, who consume 20-50 times more soy than Western populations.^{2,3} A recent comprehensive study in Japan showed that soy intake significantly reduced the incidence of prostate cancers.⁴

Plasma levels of total genistein (**1**) in high soy consumers are in the micromolar range.^{3,5} Genistein in the plasma can reach 4-16 μM with an elimination half-life between 15-22 h.⁶ Higher plasma levels of 20-25 μM can be reached after ingestion of high dose supplements.^{7,8}

Genistein (**1**) produces pleiotropic effects against cancer cells that can influence cell proliferation, cell cycle progression, and apoptosis.⁹⁻¹¹ Its effects on a number of cellular targets have been proposed to be responsible for its anticancer activity.³ In breast carcinoma cells, its antiproliferative effects were shown to be mediated through the formation of an intracellular metabolite that inhibits cell cycle progression.¹² Normal lymphocytes survived after treatment with concentrations that were cytotoxic to HL-60 leukemic cells, indicating that genistein is non-toxic to normal cells.¹³ No significant genotoxicity was observed in tumor patients treated with genistein.⁸

Genistein (**1**) was reported to inhibit cell proliferation and induce differentiation of human leukemic cell lines.^{13,14} In these latter studies, the *in vitro* antileukemic activity of genistein was assessed at very high concentrations, which are not obtainable in humans.⁶ To our knowledge the action of genistein on colony formation of the leukemic cell lines has yet to be investigated. This property is important for the complete evaluation of its *in vitro* antineoplastic activity.¹⁵ In comparison to other *in vitro* methods, the clonogenic assay is the method of choice to assess antineoplastic activity,¹⁵ since the major objective of chemotherapy is the irreversible eradication of the clonogenic potential of leukemic stem cells.^{16,17} Moreover, the antileukemic activity of genistein, including dietary supplementation, has not been tested in animals. This study aimed to assess the effect of

genistein on *in vitro* growth inhibition, loss of clonogenicity and gene reactivation of both myeloid and lymphoid leukemic cells. The concentrations used in this study were those that are obtainable in plasma of high soy consumers or people treated by genistein supplements. In addition, our second objective was to evaluate in an *in vivo* model the antineoplastic activity of genistein administered in the diet of mice with L1210 leukemia. We observed significant antileukemic activity for genistein in both models.

Results and Discussion

The effect of genistein (**1**) on growth inhibition of human HL-60, MOLT-3, Raji and KG1a leukemic cells is shown in Figure 2. The growth inhibitory activity of this isoflavone was dose and time-dependent in all the four cell lines. MOLT-3 lymphoid cells were the most sensitive cell line to the anti-proliferative effect of genistein as shown by growth inhibition >10% produced by 2 μ M after 48 h exposure (Figure 2B). For the other cell lines, the growth inhibitory effect of genistein >10% was obtained at concentrations starting at 5 μ M. The concentrations that produced a 50% inhibition of growth (IG₅₀) for 48 h exposure were: 18.2 μ M for HL-60 (Figure 2A), 12.7 μ M for MOLT-3 (Figure 2B), 18.6 μ M for Raji (Figure 2C), and 23 μ M for KG1a (Figure 2D) leukemic cells.

The effect of genistein (**1**) on loss of clonogenicity as determined by a colony assay (Figure 3) was investigated for HL-60, MOLT-3 and Raji leukemic cell lines, but not in KG1a cells (due to their inability to grow in soft agar). Both lymphoid and myeloid human leukemic cell lines showed a dose and time-dependent loss of clonogenicity after genistein exposure. After 24 h exposure, **1** produced a loss of clonogenicity >10% starting at 1 μ M for MOLT-3 (Figure 3B). The other cell lines required a concentration >2 μ M to produce a loss of clonogenicity >10%. The concentrations that produced a 50% loss of clonogenicity (LC₅₀) for 24 h exposure were: 6.3 μ M for HL-60 (Figure 3A), 7.5 μ M for MOLT-3 (Figure 3B), and 13.7 μ M for Raji (Figure 3C) leukemic cells.

For L1210 murine leukemic cells, genistein (**1**) at concentrations of 1 to 20 μ M induced a dose- and time-dependent growth inhibition and a loss of clonogenicity at 12, 24 and 48 h (Table 1). Genistein produced growth inhibition and loss of clonogenicity

>10% starting at 2 μ M. The IG_{50} and LC_{50} values of genistein for 24 h exposure were 18.5 μ M and 6.5 μ M, respectively.

The effect of different concentrations (1 to 20 μ M) of genistein (**1**), on gene expression was assessed by RT-PCR in human HL-60 and mouse L1210 leukemic cell lines after 48 and 24 h, respectively. For HL-60 cells, the cDNA products of p57^{KIP2} and 18S ribosomal RNA (used as the reference standard) are shown in Figure 4A. For L1210 cells, the cDNA products of p15^{CDKN2B} and 18S ribosomal RNA are shown in Figure 4B. Genistein induced variable re-expression of these two silenced tumor suppressor genes at concentrations ranging from 1 to 20 μ M. An analysis of the promoter methylation level of p57^{KIP2} gene in HL-60 was performed by methylation-specific PCR (Figure 4C). Genistein at 10 μ M produced a weak demethylation of the promoter region that was shown by the detection of a weak band amplified by the primers for unmethylated DNA (U) and by a decrease in the intensity of the band amplified by the primers for the methylated DNA (M), compared to non-treated cells.

The activity of genistein (**1**) was tested in a mouse model in order to evaluate its potential as a chemotherapeutic agent against leukemia. CD2F1 male mice were placed on 0.5% genistein-enriched diet (10-days period). The food intake was similar to the mice fed with control diet. The mice received an i.v. injection of 10^4 L1210 leukemic cells. Control mice survived 175 ± 2 h after injection of leukemia (Figure 5). The leukemic mice fed with 0.5% genistein-enriched diet had a moderate, but significant, increase in life span of 7% and died after 187 ± 2 h ($p < 0.05$). In each experiment, it was observed that all the control mice showed symptoms of advanced leukemic disease before the genistein-treated mice.

The objective of this study was to evaluate the *in vitro* and *in vivo* antileukemic activity of genistein (**1**), a major isoflavone present in soy that has been used in traditional medicine.¹ In this study, genistein was shown to inhibit growth of human and murine leukemic cell lines. Our results confirmed the growth inhibitory activity on leukemic cells as reported by other investigators.^{13,14} However, these investigators used very high concentrations of genistein, which are not obtainable in humans, as compared to our lower concentrations that are reachable for a person on a high soy diet. In addition, these reports

did not use a clonogenic assay, which is of primary importance for the evaluation of the *in vitro* activity of antineoplastic agents. This ability in reducing the clonogenicity of leukemic cells by genistein is very important in the evaluation of its antineoplastic activity, since the current focus of therapy is the inactivation of the clonogenic potential of leukemic stem cells.^{16,17}

In this report, we show that genistein induced a time- and dose-dependent effect on both myeloid and lymphoid leukemic cell lines. Loss of clonogenicity by the leukemic cells was observed at levels (1-20 μ M), which are in the range of the observed plasma concentration of genistein by a soy-enriched diet.⁸ Interestingly, low concentrations (2 μ M) were able to induce loss of clonogenicity >10% after 24 h exposure. It has been reported that genistein is a cytotoxic agent for neoplastic, but not for normal cells.¹³ In addition, genistein shows no genotoxicity in patients.⁸ We also investigated the effects of genistein (1) on the reactivation of tumor suppressor genes, which were reported to be silenced by promoter hypermethylation in leukemic cell lines.^{18,19} Genistein (1-20 μ M) induced a re-expression of two silenced tumor suppressor genes, p57^{KIP2} in a human cell line and p15^{CDKN2B} in a mouse cell line. The variable cDNA amplification of these genes after genistein exposure may have been due to the pleotropic action of this isoflavone on various targets. At the higher concentrations of genistein, the expression appeared to decrease which was probably due to the perturbation of cellular function. Our data are in accord with the report that genistein on esophageal squamous carcinoma cells reactivated the expression of several tumor suppressor genes, which were silenced by aberrant DNA methylation.²⁰ The reactivation of tumor suppressor genes by genistein and its demethylation effect on one of these genes suggests that part of the antileukemic activity of this agent is related to its epigenetic action. Its actions on other targets, like an inhibition of tyrosine kinases, may also contribute to its antileukemic effect.³ For example, inhibitors of tyrosine kinases have been reported to have antineoplastic activity and are under clinical investigation in patients with cancer.²¹

In our *in vivo* model, the leukemic mice fed with a 0.5% genistein-enriched diet showed a significant increase in survival time as compared to control mice on normal diet. This effect was moderate but significant. This mouse model is very sensitive to detect the antineoplastic activity of experimental agents because of an excellent correlation between

the number of surviving leukemic cells and the survival time of the mice.²² The major cause for this moderate *in vivo* response was probably that genistein did not exceed 1 μ M in the blood of the mice as reported by others in mice fed with 0.6% soy extract-supplement.²³ Indeed, the metabolism of genistein is very rapid in the strain of mice (CD2F1) used in our *in vivo* leukemic model as shown by its short half-life of less than 15 min.²⁴ Therefore, we and other investigators have found it very difficult to obtain adequate concentrations of genistein, a lipophilic agent, to produce potent antineoplastic activity in mice.²³ In this regard, it was recently published that genistein (injected i.p.) did not produced a significant increase in survival time ($p = 0.06$) of nude mice bearing subcutaneous HL-60 tumors.²⁵

In conclusion, the present data show that genistein (**1**), a key isoflavone present in soy, has promising potential against leukemia. It can produce a significant loss of clonogenicity of both myeloid and lymphoid leukemic cells. Genistein was shown to produce the reactivation of tumor suppressor genes associated with a weak effect on promoter demethylation. In a preclinical model, the antileukemic effect of genistein administrated directly in the diet were evaluated. The moderate *in vivo* antileukemic effect of genistein is probably due to its very rapid inactivation in mice. The longer half-life of genistein in humans can produce plasma levels of this isoflavone after an enriched-soy diet in the range of the concentrations used *in vitro* which produced a potent antileukemic activity. The interesting antileukemic activity of genistein merits further investigation.

Experimental Section

Cell Lines and Culture Conditions. Human myeloid leukemic cells HL-60, KG1a, and lymphoid leukemic cells MOLT-3 were obtained from ATCC (Manassas, VA). The Raji lymphoid leukemic cell line was donated by Dr. J. Menezes (Hôpital Saint-Justine). Human cell lines were cultured in RPMI-1640 medium (Invitrogen, Burlington, Ontario, Canada) supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (Wisent, St-Bruno, Quebec, Canada). The doubling times of HL-60 and Raji cells were 16-18 h, whereas those of MOLT-3 and KG1a leukemic cells were 23-24 and 35-36 h, respectively. The murine lymphoid leukemic cell line L1210 was obtained from Dr. T. Khwaja (University

of Southern California, Los Angeles) and cultured in RPMI-1640 with 5% heat-inactivated fetal calf serum and with 6 μ M of 2-mercaptoethanol. The doubling time of the L1210 cells was about 10 h. All cell lines were incubated at 37 °C in 5% CO₂ atmosphere. Genistein (LC Laboratories, Woburn, MA) was dissolved in DMSO (Sigma, Oakville, Ontario, Canada) to prepare stock solutions of 2 and 20 mM and kept frozen at -20 °C until use.

Inhibition of Growth and Clonogenic Assays. Human and murine cell lines in log phase at 2×10^4 cells/mL were placed in tissue culture flasks. Genistein (**1**) was added at 1, 2, 5, 10, and 20 μ M. For the growth inhibition assay, aliquots of cells were counted at 12, 24, 48, 72, and 96 h using a Beckman Z1 Coulter Particle Counter (Hialeah, FL). For the clonogenic assay, **1** was removed by centrifugation and cells were suspended in drug-free medium then 100 cells were placed in 2 mL of 0.45% soft agar RPMI-1640 medium containing 10% serum for murine cell line or 20% serum for human cell lines. After 7 days of incubation for murine cell line or 15 days for human cell lines, the number of colonies (> 50 cells) was counted. The cloning efficiency in soft agar without drug treatment was in the range of 50-60% for all the cell lines. The inhibition of growth and loss of clonogenicity (%) were expressed relative to control cells without treatment. All the experiments were performed in triplicate and the mean values were divided by the control mean value. The experiments were repeated three times and expressed as mean $\pm$ S.E.M.

Isolation of RNA and RT-PCR Analysis. Total RNA from human (HL-60) and mouse (L1210) leukemic cell lines was isolated using RNeasy Mini Kit (Qiagen, Mississauga, Ontario, Canada) and reversed-transcribed using Omniscript Reverse Transcriptase kit (Qiagen) at 37 °C for 60 min. DNA amplifications were performed using HotStar Plus Taq Polymerase (Qiagen) in a Whatman Biometra T gradient thermocycler (Göttingen, Germany). For each gene, the number of cycles was selected during the exponential phase of DNA amplification. The cDNA products were electrophoresed on 2% agarose gel and detected by ethidium bromide staining. Specific primers spanning different exons and conditions for DNA amplification of human 18S ribosomal RNA and p57^{KIP2} and for mouse 18S ribosomal RNA and p15^{CDKN2B} were described previously.^{26,27}

Isolation of DNA and methylation specific-PCR analysis. HL-60 cells were exposed for 48 h to genistein at 10 μ M. After treatment, drug was removed and cells were harvested after an additional 24 h. Genomic DNA was isolated using DNeasy Tissue Kit (Qiagen) and 2 μ g was treated with sodium bisulfite as per the manufacturer's instructions (EpiTect Bisulfite, Qiagen, Mississauga, Ontario) for methylation analysis. Using specific primers and PCR conditions, the methylation status of *p57* promoter region was assessed as previously described.²⁶ The number of cycles used corresponded to the exponential phase of DNA amplification. The PCR products were electrophoresed on 2% agarose gel and detected by ethidium bromide staining.

In Vivo Experiments. Male CD2F1 mice (24-28 g) were purchased from Taconic Biotechnology (Germantown, NY). Mice were acclimatized to housing conditions at least 2 weeks before experiments. They received food and water *ad libitum*. The institutional animal committee approved the experimental protocol and animals were handled in accordance with the institutional guidelines. For transplantation of leukemia in mice, i.p. injections of 10^4 L1210 cells in RPMI-1640 medium were performed weekly into the CD2F1 mice. Seven days later, the ascetic fluid was obtained from the mice and a cell count of the leukemic cells was performed with a hemocytometer prior to subsequent transplantation. Mice were separated in two groups. The control group ($n = 11$) received the 2016 diet (Harlan Teklad, Madison, WI) and treated mice ($n = 11$) received the 2016 diet supplemented with 0.5% genistein (1) (Harlan Teklad). Treated mice were acclimated to the genistein-enriched regimen over a 10-days period before injection of leukemic cells. Control and treated mice were injected i.v. with 0.1 mL of L1210 (10^4) cells and were kept on either control or 0.5% genistein-supplemented diet. Toxicity was evaluated by body weight loss. The survival times of each group of mice were monitored 2 or 3 times per day and the increase in life span was calculated.

Statistical Considerations. In order to evaluate whether the variations between groups were random, a Student's t test was performed. A *p* value of 0.05 was taken for statistical significance.

Acknowledgment. The authors would like to thank the Canadian Cancer Society for grant support.

References and Notes

- (1) Chen, X.; Zhou, H.; Liu, Y. B.; Wang, J. F.; Li, H.; Ung, C. Y.; Han, L. Y.; Cao, Z. W.; Chen, Y. Z. *Br. J. Pharmacol.* **2006**, *149*, 1092-1103.
- (2) Park, O. J.; Surh, Y. J. *Toxicol. Lett.* **2004**, *150*, 43-56.
- (3) Ravindranath, M. H.; Muthugounder, S.; Presser, N.; Viswanathan, S. *Adv. Exp. Med. Biol.* **2004**, *546*, 121-165.
- (4) Kurahashi, N.; Iwasaki, M.; Sasazuki, S.; Otani, T.; Inoue, M.; Tsugane, S. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **2007**, *16*, 538-545.
- (5) Mathey, J.; Lamothe, V.; Coxam, V.; Potier, M.; Sauvart, P.; Pelissero, C. B. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2006**, *41*, 957-965.
- (6) Takimoto, C. H.; Glover, K.; Huang, X.; Hayes, S. A.; Gallot, L.; Quinn, M.; Jovanovic, B. D.; Shapiro, A.; Hernandez, L.; Goetz, A.; Llorens, V.; Lieberman, R.; Crowell, J. A.; Poisson, B. A.; Bergan, R. C. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **2003**, *12*, 1213-1221.
- (7) Izumi, T.; Piskula, M. K.; Osawa, S.; Obata, A.; Tobe, K.; Saito, M.; Kataoka, S.; Kubota, Y.; Kikuchi, M. *J. Nutr.* **2000**, *130*, 1695-1699.
- (8) Milytyk, W.; Craciunescu, C. N.; Fischer, L.; Jeffcoat, R. A.; Koch, M. A.; Lopaczynski, W.; Mahoney, C.; Crowell, J.; Paglieri, J.; Zeisel, S. H. *Am. J. Clin. Nutr.* **2003**, *77*, 875-882.
- (9) Matsui, J.; Kiyokawa, N.; Takenouchi, H.; Taguchi, T.; Suzuki, K.; Shiozawa, Y.; Saito, M.; Tang, W. R.; Katagiri, Y. U.; Okita, H.; Fujimoto, J. *Leuk. Res.* **2005**, *29*, 573-581.
- (10) Park, S. S.; Kim, Y. N.; Jeon, Y. K.; Kim, Y. A.; Kim, J. E.; Kim, H.; Kim, C. W. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2005**, *56*, 271-278.
- (11) Sarkar, F. H.; Adsule, S.; Padhye, S.; Kulkarni, S.; Li, Y. *Mini Rev. Med. Chem.* **2006**, *6*, 401-407.

- (12) Nguyen, D. T.; Hernandez-Montes, E.; Vauzour, D.; Schonthal, A. H.; Rice-Evans, C.; Cadenas, E.; Spencer, J. P. *Free Radic. Biol. Med.* **2006**, *41*, 1225-1239.
- (13) Traganos, F.; Ardelt, B.; Halko, N.; Bruno, S.; Darzynkiewicz, Z. *Cancer Res.* **1992**, *52*, 6200-6208.
- (14) Constantinou, A.; Kiguchi, K.; Huberman, E. *Cancer Res.* **1990**, *50*, 2618-2624.
- (15) Momparler, R. L. *Pharmacol. Ther.* **1980**, *8*, 21-35.
- (16) Kvinlaug, B. T.; Huntly B. J. P. *Expert Opin. Ther. Targets.* **2007**, *11*, 915-927.
- (17) Ravandi, F.; Estrov, Z. *Clin. Cancer Res.* **2006**, *12*, 340-344.
- (18) Shen, L.; Toyota, M.; Kondo, Y.; Obata, T.; Daniel, S.; Pierce, S.; Imai, K.; Kantarjian, H. M.; Issa, J. P.; Garcia-Manero, G. *Blood* **2003**, *101*, 4131-4136.
- (19) Toyota, M.; Kopecky, K. J.; Toyota, M. O.; Jair, K. W.; Willman, C. L.; Issa, J. P. *Blood* **2001**, *97*, 2823-2829.
- (20) Fang, M. Z.; Chen, D.; Sun, Y.; Jin, Z.; Christman, J. K.; Yang, C. S. *Clin. Cancer Res.* **2005**, *11*, 7033-7041.
- (21) Nichols, G. L. *Cancer Investigation* **2003**, *21*, 758-771.
- (22) Momparler, R. L.; Gonzales, F. A. *Cancer Res.* **1978**, *38*, 2673-2678.
- (23) Hewitt, A. L.; Singletary, K. W. *Cancer Lett.* **2003**, *192*, 133-143.
- (24) Supko, J. G.; Phillips, L. R. *J. Chromatogr. B. Biomed. Appl.* **1995**, *666*, 157-167.
- (25) Shen, J.; Tai, Y. C.; Zhou, J.; Stephen Wong, C. H.; Cheang, P. T.; Wong, F. W. S.; Xie, Z.; Khan, M.; Han, J. H.; Chen, C. S. *Exp. Hematol.* **2007**, *35*, 75-83.
- (26) Lemaire, M.; Momparler, L. F.; Bernstein, M. L.; Marquez, V. E.; Momparler, R. L. *Anticancer Drugs* **2005**, *16*, 301-308.

- (27) Lemaire, M.; Momparler, L. F.; Farinha, N. J.; Bernstein, M.; Momparler, R.
L. Leuk. Lymphoma **2004**, *45*, 147-154.

Legends for figures :

Figure 1. Molecular structure of genistein (**1**): 4',5,7-trihydroxyisoflavone.

Figure 2. Effect of genistein (**1**) on growth inhibition in (A) HL-60, (B) MOLT-3, (C) Raji and (D) KG1A human leukemic cell lines. Cells were exposed to genistein at indicated concentrations (1-20 μ M) and cell counts were performed at 24, 48, 72 and 96 h after exposure. Graphs represent the percentage of growth inhibition relative to control cells. Data shown are mean values $\pm$ S.E.M., $n = 3$.

Figure 3. Effect of genistein (**1**) on loss of clonogenicity in (A) HL-60, (B) MOLT-3, and (C) RAJI human leukemic cell lines. Cells were treated with the indicated concentrations of **1**. At different times (24, 48, 72, and 96 h) genistein was removed and colony formation was determined on day 17-20. Loss of clonogenicity (%) was expressed relative to control cells. Data shown are mean values $\pm$ S.E.M., $n = 3$.

Figure 4. Effect of genistein (**1**) on gene expression. The reactivation of tumor suppressor genes, (A) p57^{KIP2} in HL-60 and (B) p15^{CDKN2B} in L1210 leukemic cells treated with indicated concentrations of genistein were determined by RT-PCR for 48 and 24 h, respectively. (C) Methylation-specific PCR of p57^{KIP2} promoter was performed in HL-60 cells exposed 48 h to genistein at 10 μ M. Unmethylated (U) and methylated (M) primers amplified DNA when promoter region is demethylated or methylated, respectively. Experiments were repeated two times. CTL, control non-treated cells.

Figure 5. Effect of genistein-enriched diet on the survival time of mice with L1210 leukemia. Control mice on normal diet and mice on genistein-enriched diet were injected i.v. with 10^4 L1210 leukemic cells at 0 h. Leukemic mice ($n = 11$) fed with control diet

died after 175 ± 2 h. Leukemic mice ($n = 11$) fed with 0.5% genistein-enriched diet survived 187 ± 2 h ($p < 0.05$). The time of death (h) was plotted on a survival chart.

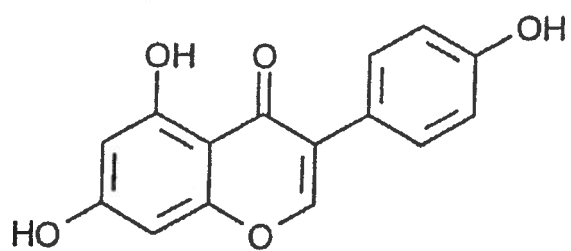


Figure 1.

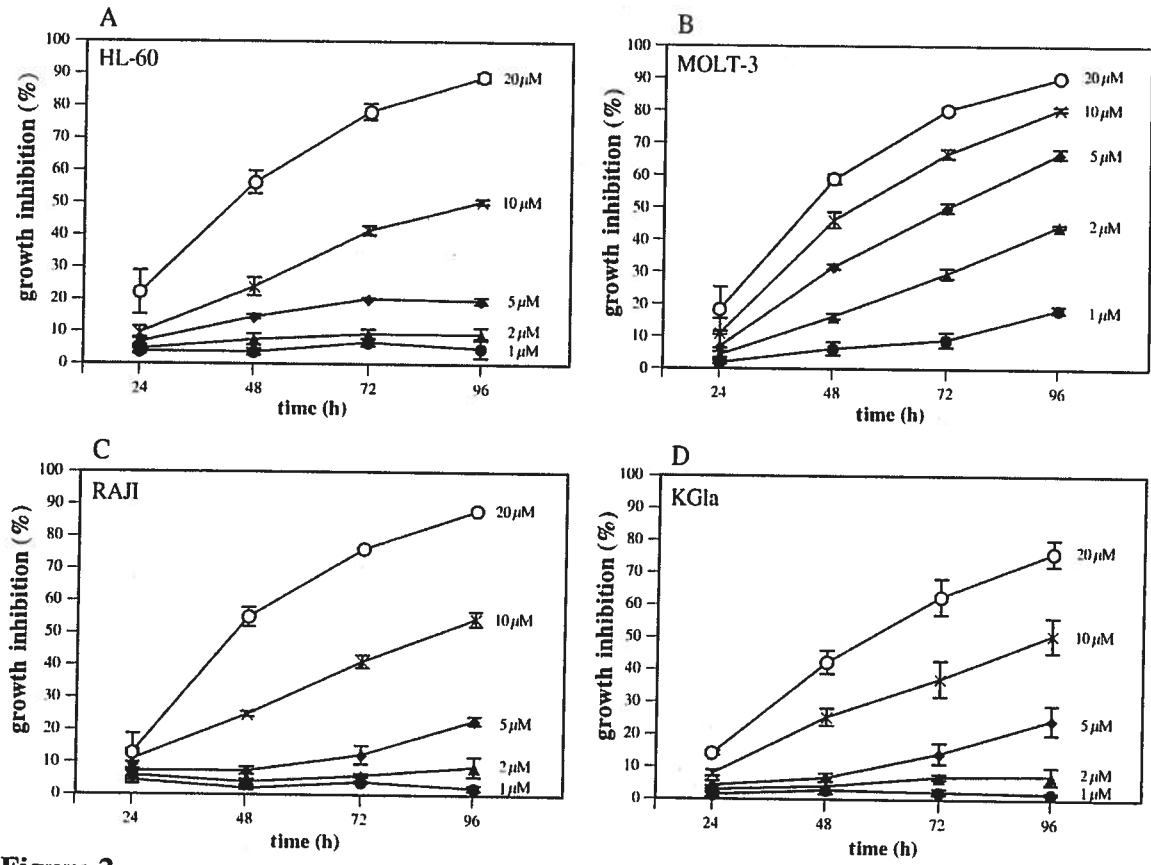
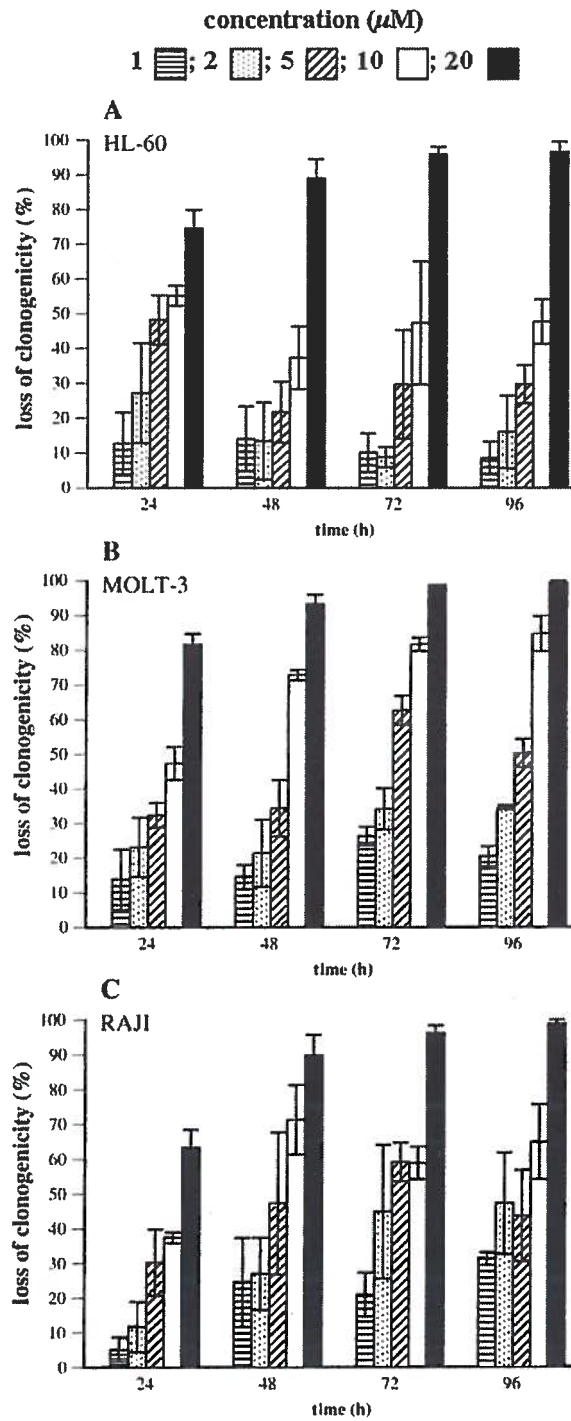
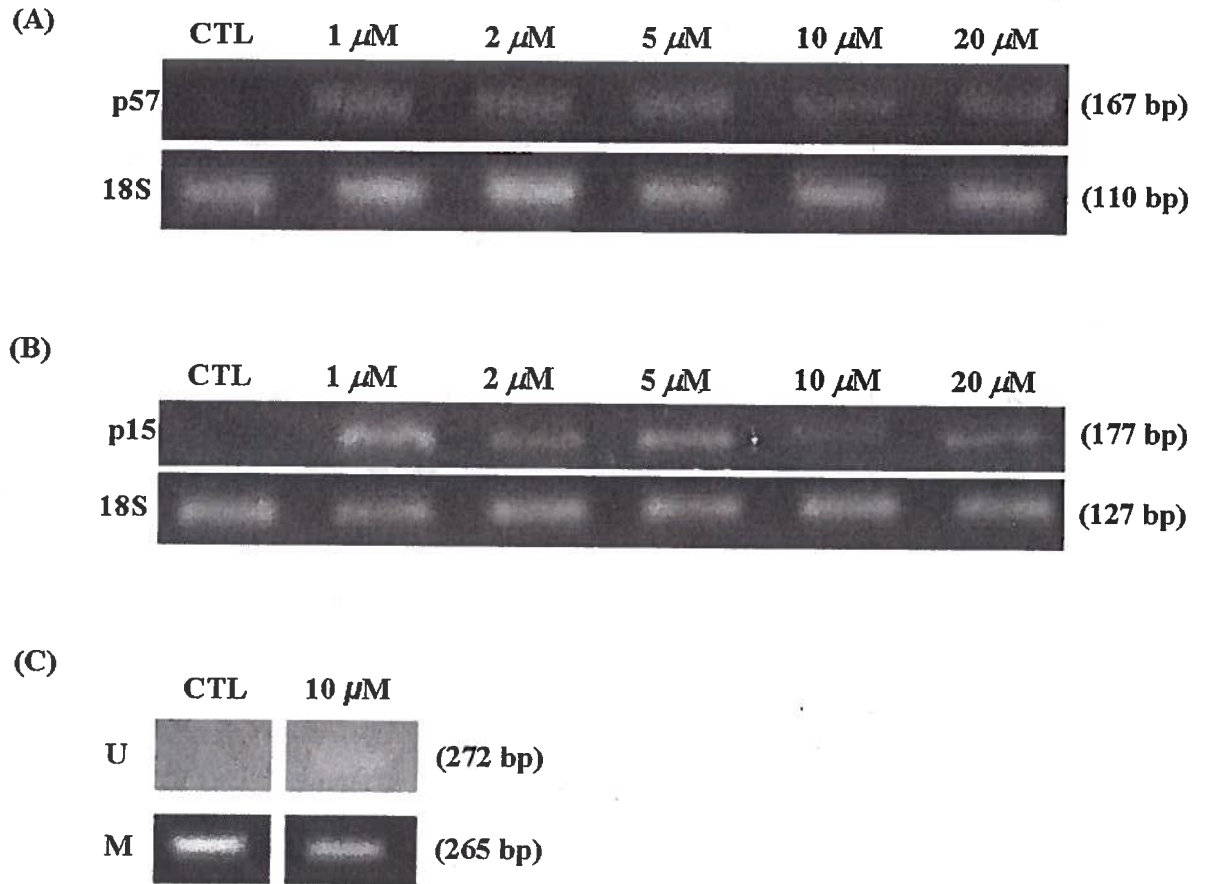


Figure 2.

**Figure 3.**

**Figure 4.**

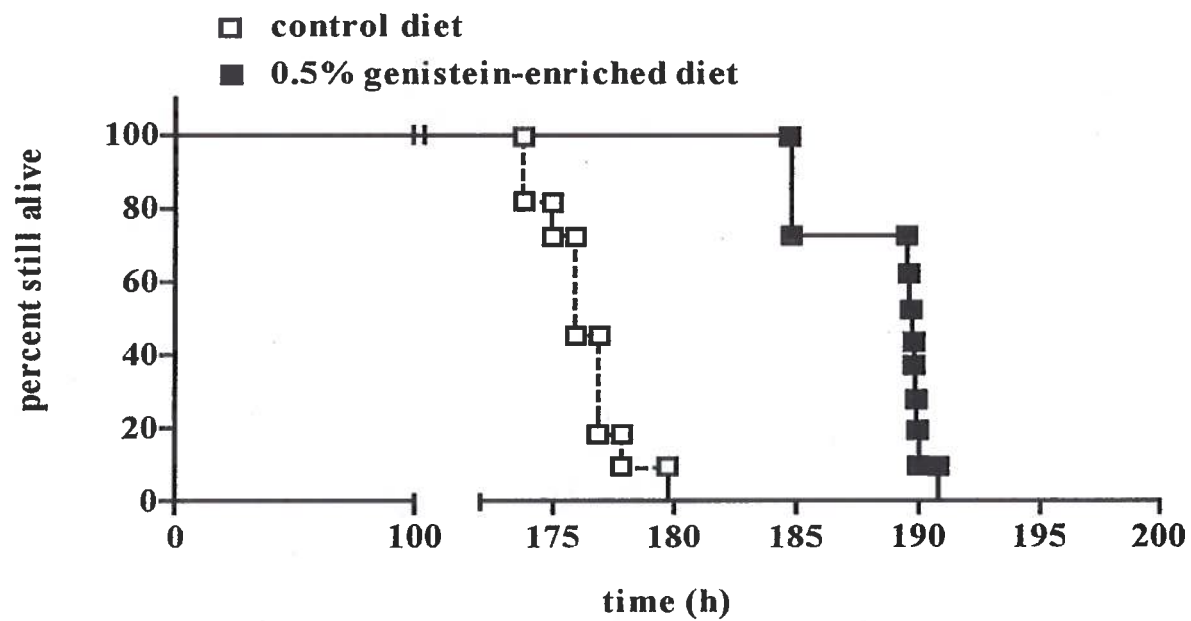


Figure 5.

Table 1. Effect of Genistein (1) on Growth Inhibition and Loss of Clonogenicity in L1210 Murine Leukemic Cell Line^a

genistein (μ M)	<u>growth inhibition (%)</u>			<u>loss of clonogenicity (%)</u>		
	12 h	24 h	48 h	12 h	24 h	48 h
1	3.2 $\pm$ 1.7	4.1 $\pm$ 0.1	13.2 $\pm$ 0.1	11 $\pm$ 6.1	6 $\pm$ 0.5	11.9 $\pm$ 6.0
2	6.2 $\pm$ 3.2	11.4 $\pm$ 0.1	21.9 $\pm$ 1.6	14 $\pm$ 6.9	13 $\pm$ 4.8	8.9 $\pm$ 5.7
5	15.1 $\pm$ 2.7	28.5 $\pm$ 1.4	55.9 $\pm$ 0.6	44 $\pm$ 4.9	16 $\pm$ 3.8	32.9 $\pm$ 7.3
10	23.8 $\pm$ 0.2	42.8 $\pm$ 0.9	79.2 $\pm$ 1.6	94 $\pm$ 0.8	63 $\pm$ 8.1	81.1 $\pm$ 5.1
20	54.2 $\pm$ 2.0	66.7 $\pm$ 2.2	93.1 $\pm$ 1.2	100 $\pm$ 0.0	97 $\pm$ 1.3	99.7 $\pm$ 0.3

^a Cells were treated with genistein at indicated concentrations (1-20 μ M) for 12, 24, or 48 h. Cell counts and colony formation assay were expressed in percentage relative to control cells. Data shown are mean values $\pm$ S.E.M., $n = 3$.

Chapitre 2 : Effet synergique de la combinaison de la 5-aza-2'-désoxycytidine et de la génistéine contre la leucémie

2.1 Traduction du résumé de l'article :

La 5-aza-2'-désoxycytidine (5-AZA-CdR), un inhibiteur irréversible de la méthylation de l'ADN est un agent efficace dans le traitement des syndromes myélodysplasiques. L'objectif était d'étudier l'activité antileucémique de cet agent épigénétique en combinaison avec la génistéine, une isoflavone non-toxique possédant une activité chimiopréventive. La combinaison a produit une perte synergique de la clonogénicité des lignées cellulaires humaines leucémiques myéloïde (HL-60) et lymphoïde (MOLT-3). La génistéine a produit une activité antileucémique significative contre des cellules résistantes à la 5-AZA-CdR, qui était augmentée quand elle était utilisée en combinaison avec la 5-AZA-CdR. La combinaison a produit aussi une augmentation synergique du temps de survie des souris transplantées avec des cellules leucémiques L1210. Ces résultats suggèrent que la génistéine a le potentiel d'augmenter l'efficacité clinique de la 5-AZA-CdR pour le traitement des leucémies.

2.2 Contribution de l'étudiant :

Toutes les expériences présentées dans cet article, la rédaction du manuscrit et la soumission à des revues scientifiques ont été réalisées par le premier auteur de l'article.

2.3 Synergistic effect of 5-aza-2'-deoxycytidine and genistein in combination against leukaemia :

N. J.-M. Raynal^a, M. Charbonneau^a, L. Momparler^b, and R. L. Momparler^{b,*}.

^a*INRS-Institut Armand-Frappier, Université du Québec, 531 boul. des Prairies, Laval, Quebec, H7V 1B7, Canada.*

^b*Service of Hematology/Oncology, Centre de recherche, Ste-Justine Hospital, Dep de pharmacologie, Université de Montréal, 3175 Cote Ste. Catherine Road, Montreal, Quebec, H3T 1C5, Canada.*

* Corresponding author at: Service of Hematology/Oncology, Centre de recherche, Ste-Justine Hospital, Université de Montréal, 3175 Cote Ste. Catherine Road, Montreal, Quebec, H3T 1C5, Canada. Tel.: +5143424931 ext 6140; fax +5143454801.

E-mail address: richard.l.momparler@umontreal.ca (R. L. Momparler).

ABSTRACT

5-Aza-2'-deoxycytidine (5-AZA-CdR), a potent inhibitor of DNA methylation, is an effective agent for the treatment of leukemia. The aim of this study was to investigate the antileukemic activity of this epigenetic agent in combination with genistein, a non-toxic isoflavone with chemopreventive activity. The combined treatment produced a synergistic loss of clonogenicity in human myeloid (HL-60) and lymphoid (MOLT-3) leukemic cell lines. Genistein alone showed a significant antileukemic activity against murine 5-AZA-CdR-resistant cells, and this effect was enhanced when used in combination with 5-AZA-CdR. The combined treatment also produced a synergistic increase in life span of mice with L1210 leukemia. These results suggest that genistein may have the potential to increase the clinical efficacy of 5-AZA-CdR for the treatment of leukemia.

Key words: 5-Aza-2'-deoxycytidine; Epigenetic; Leukemia; Genistein; Chemotherapy; Drug resistance

INTRODUCTION

Epigenetic changes, such as silencing of tumor suppressor genes (TSG) by promoter DNA hypermethylation, play a causative role in the development of malignancies (1). Demethylation of DNA by 5-aza-2'-deoxycytidine (5-AZA-CdR), a potent hypomethylating agent, triggers TSG reactivation and subsequent loss of clonogenicity in cancer cells (2). This is a very important characteristic since the broad objective of cancer chemotherapy is irreversible eradication of the clonogenic potential of cancer stem cells (3,4). 5-AZA-CdR is approved for the treatment of leukemia and is under investigation for other types of cancers. However, there are two major challenges limiting the clinical use of 5-AZA-CdR: (i) the need to increase its antineoplastic action without increasing its hematopoietic toxicity and (ii) the problem of drug resistance. In the latter context, leukemic cells can develop resistance to 5-AZA-CdR by becoming deficient in deoxycytidine kinase (5), the enzyme responsible for its activation. Indeed, 5-AZA-CdR is a nucleoside analog that requires phosphorylation by this enzyme prior being incorporated into the DNA where it blocks DNA methylation. It is hoped that the use of combination chemotherapy will overcome these problems.

Genistein is a non-toxic soybean isoflavone reported to have chemopreventive and anti-cancer activity (6), as well as the ability to enhance the activity of some cytotoxic antineoplastic drugs (7,8). Prior reports have indicated that genistein can weakly inhibit DNA methylation and reactivate TSG (9). We previously showed that genistein could reduce the clonogenicity and reactivate TSG in myeloid and lymphoid leukemic cell lines (10).

The objective of this work was to investigate the antileukemic activity of a combined treatment with 5-AZA-CdR plus genistein. We assessed the chemotherapeutic potential of this co-treatment in leukemic cells using an *in vitro* clonogenic assay, and examined its *in vivo* antineoplastic activity in a mouse model of L1210 leukemia. Our results suggest that the combined treatment of 5-AZA-CdR and genistein confers promising antineoplastic activity.

MATERIALS AND METHODS

Cell Lines and Drug Exposure

Human myeloid (HL-60) and lymphoid (MOLT-3), and murine lymphoid (L1210) leukemic cells were cultured as previously described (10). Murine lymphoid L1210/ARA-C leukemic cells were cultured in the same conditions as the L1210 cells (10). The doubling times of HL-60, MOLT-3, L1210, and L1210/ARA-C leukemic cells were about 18, 24, 10 and 12 h, respectively. L1210/ARA-C cells are deficient in deoxycytidine kinase resulting in resistance to cytosine arabinoside (cytarabine, ARA-C) and 5-AZA-CdR due to a reduction in the incorporation of these nucleoside analogs into DNA (11). All cell lines were incubated at 37 °C in a 5% CO₂ humidified atmosphere.

A stock solution of 5-AZA-CdR (Pharmachemie, Haarlem, Netherlands) was prepared at 1,000 µg/ml in PBS and stored in aliquots at -70 °C. [6-³H]-5-AZA-CdR was obtained from Moravsek Biochemicals (La Brea, CA) and stored frozen at -20 °C until use. Genistein (> 99%, LC Laboratories, Woburn, MA) was dissolved in DMSO (Sigma, Oakville, Ontario) and stock solutions of 2 and 20 mM were prepared and stored frozen at -20 °C.

In Vitro Clonogenic Assay

Human and murine leukemic cell lines, in log phase at 5×10^4 and 2×10^4 cells/ml, respectively, were exposed to different concentrations of genistein and/or 5-AZA-CdR for 48 h at 44 nM (10 ng/ml) and 4.4 nM (1 ng/ml) for human and murine leukemic cells, respectively. After 48 h exposure, drugs were removed by centrifugation. The capacity of leukemic cells to form colonies in soft agar after treatment was evaluated using a clonogenic assay with 150 human or 100 murine cells, as previously described (10). The cloning efficiency in soft agar without drug treatment was in the range of 50-60% for all

cell lines. Each clonogenic assay was performed in triplicate. The experiments were repeated three times and the data were expressed as mean $\pm$ S.E.M.

Chemotherapy in Leukemic Mice

Male CD2F1 mice (24-28 g) were purchased at Taconic Biotechnology, (Germantown, NY). Mice were injected with 10^4 L1210 leukemic cells intravenously (i.v.) into the lateral tail vein (10). Control mice were fed with the control diet 2016 (Harlan Teklad, Madison WI) and genistein-treated mice were fed with the 2016 diet supplemented with 0.5% (w/w) genistein (Harlan Teklad) (10). Twenty-four hours after injection of leukemic cells, the mice (fed with control or genistein-enriched diet) were administered a continuous 8 h i.v. infusion of 5-AZA-CdR at a total dose of 2 mg/kg. Toxicity was evaluated by body weight loss. The survival times were monitored 2 or 3 times per day and the increase in life span relative to control mice was calculated.

Cell Cycle Analysis

HL-60, L1210 and L1210/ARA-C cells (5×10^6 cells) were exposed for 24 h to 5-AZA-CdR and/or genistein at the same concentrations used for the clonogenic assay. Cells were centrifuged (5 min at 1500 rpm) and pellets were suspended in 3 ml of PBS. Slowly, 7 ml of 100% ethanol (at -20°C) was added under gentle vortexing for 15 min followed by incubation at -20°C . After additional centrifugation, 1 ml of RNase A (Amersham; 0.5 mg/ml in PBS) was added to the cell pellets for 15 min incubation at 37°C . Cell pellets were resuspended in propidium iodide (50 $\mu\text{g/ml}$) for 16 h incubation at 4°C before FACScan analysis.

Measurement of 5-AZA-CdR Incorporation into DNA

HL-60 and L1210 cells (3×10^5) were suspended in 5 ml of RPMI-1640 with 10% and 5% of dialysed serum, respectively. Cells were incubated with 1 μ Ci of 175 nM [$6\text{-}^3\text{H}$]-5-AZA-CdR alone or in combination with genistein at 0.1 and 1 μ M for 4 and 24 h. The cells were then poured onto glass fiber filters (AC, 25 mm diameter; Pall Corporation, Ann Arbor, MI) previously humidified with 0.9% NaCl. Using gentle aspiration, cells were washed with 5 ml of 0.9% NaCl followed by 3 ml of 5% trichloroacetic acid at 4 °C and with 3 ml of 100 % ethanol, as previously described (11,12). Filters were dried for 10 min and placed into vials with 5 ml of scintillation liquid for measurement of radioactivity.

RT-PCR and Methylation-Specific PCR Analysis

HL-60 cells were exposed to the same treatments used for the clonogenic assay. Extraction of total RNA, reverse-transcription, conditions for DNA amplification and primers sequences of human 18S ribosomal RNA and *p57* were described previously (10,13). The number of cycles selected corresponded to the exponential phase of DNA amplification. The cDNA products were subjected to electrophoresis on 2% agarose gels and detected by ethidium bromide staining.

HL-60 cells were exposed for 48 h to 5-AZA-CdR (44 nM) and/or genistein (10 μ M) and harvested after an additional 24 h without drug treatment. Genomic DNA was isolated using a DNeasy Tissue Kit (Qiagen) and 2 μ g was treated with sodium bisulfite (EpiTect Bisulfite, Qiagen, Mississauga, Ontario). The Methylation Specific-PCR (MSP) assay that distinguishes methylated from unmethylated DNA (14) was used to assess the methylation status of the *p57* promoter, as previously described (13). The number of cycles used corresponded to the exponential phase of DNA amplification. The PCR products were subjected to electrophoresis on 2% agarose gels and detected by ethidium bromide staining.

Statistical Analysis

Differences between groups were assessed using a one-way ANOVA. The *p* value was evaluated by the Tukey-Kramer Multiple Comparison Test. A *p* value of 0.05 was taken for statistical significance. Data on the loss of clonogenicity and *in vivo* experiments were evaluated using the approach of Valeriote and Lin (15) for the analysis of drug interactions.

RESULTS

Effects of 5-AZA-CdR and/or Genistein on the In Vitro Clonogenicity of Leukemic Cells

In human myeloid HL-60 cells (Fig. 1A), 5-AZA-CdR at 44 nM for 48 h produced a 17% loss of clonogenicity. Genistein at 0.1, 1, and 10 μ M, produced 1, 15, and 40% loss of clonogenicity, respectively. In human lymphoid MOLT-3 cells (Fig. 1B), 5-AZA-CdR at 44 nM for 48 h produced a 28% loss of clonogenicity. Genistein at 0.1, 1, and 10 μ M produced 1, 16, and 66% loss of clonogenicity, respectively. For both human leukemic cell lines (Fig. 1A and 1B), the combined treatment of 5-AZA-CdR with 0.1 and 1 μ M genistein showed a significant synergistic loss of clonogenicity as compared to each agent alone as defined by Valeriote and Lin (15). In murine L1210 lymphoid cells (Fig. 1C), 5-AZA-CdR at 4.4 nM for 48 h produced a 28% loss of clonogenicity. Genistein at 0.1, 1, and 10 μ M produced 2, 13, and 69% loss of clonogenicity, respectively. The co-treatment of 5-AZA-CdR with 0.1 and 1 μ M genistein produced significant synergistic loss of clonogenicity as compared to each agent alone. For all three cell lines, the combined treatment of 5-AZA-CdR and genistein at 10 μ M produced only a sub-additive interaction. Due to a high loss of clonogenicity produced by 10 μ M genistein alone, its interaction with 5-AZA-CdR was difficult to evaluate. In L1210/ARA-C resistant cells to 5-AZA-CdR, genistein at 0.1, 1, and 10 μ M produced 2, 12, and 83% loss of clonogenicity, respectively. 5-AZA-CdR at 4.4 nM for 48 h did not produce a significant loss of

clonogenicity. However, the drug combination showed a statistically significant greater loss of clonogenicity than either agent alone (Fig. 2).

Effect of 5-AZA-CdR Combined With a Genistein Enriched-Diet on L1210 Leukemic Mice

The effects of the agents alone and the drug co-treatment are shown on Kaplan-Meier survival curves (Fig. 3). Control leukemic mice on a normal diet had a mean survival time of 7.6 ± 0.4 days. Leukemic mice fed with the genistein-enriched diet had a small increase in life span of 8% ($p < 0.05$), relative to mice fed the control diet. Symptoms of advanced leukemic disease appeared earlier in all control mice as compared to genistein-treated mice. 5-AZA-CdR as an 8 h i.v. infusion produced a significant increase in life span of 73% as compared to control mice. Leukemic mice treated with the drug combination had an increase in life span of 94% ($p < 0.01$) indicating a synergistic interaction as compared to mice treated with each agent alone, as defined by the method of Valeriote and Lin (15).

Cell Cycle Effects of 5-AZA-CdR and/or Genistein in Leukemic Cells

Cell cycle analysis revealed that genistein and 5-AZA-CdR at the concentrations showing a strong synergistic interaction in the clonogenic assays did not produce significant changes in cell cycle parameters (data not shown). At 10 μ M, genistein increased by 10 to 20% the proportion of cells in the G2/M phase which did not change by the addition of 5-AZA-CdR (data not shown).

Effect of Genistein on 5-AZA-CdR Incorporation into DNA of Leukemic Cells

5-AZA-CdR incorporation into DNA of L1210 cells produced a level of $1,200 \pm 65$ cpm at 4 h and $4,540 \pm 960$ cpm at 24 h (Fig. 4A). In HL-60 cells, the levels were $4,700 \pm 680$ cpm at 4 h and $7,310 \pm 980$ cpm at 24 h (Fig. 4B). Co-incubation with genistein (0.1

and 1 μ M) did not produce a significant change in 5-AZA-CdR incorporation into DNA for both cell lines at 4 and 24 h.

Effect of 5-AZA-CdR and/or Genistein on the Expression and Promoter Methylation of p57 TSG in HL-60 Leukemic Cells

5-AZA-CdR alone at 44 nM did not produce a significant re-expression of *p57* in HL-60 cells, whereas genistein alone at 0.1 to 10 μ M produced a weak, but detectable reactivation (Fig. 5A). The combined treatment of 5-AZA-CdR and 10 μ M genistein produced a marked enhancement of the expression of *p57*, whereas at the lower concentrations of genistein, the combination showed only a small enhancement. MSP analysis of *p57* (Fig. 5B) was performed with the co-treatment that produced the greater enhancement of gene expression (5-AZA-CdR with genistein at 10 μ M). Untreated cells showed only a band for the methylated promoter form of *p57* that correlates with its lack of expression. After treatment of leukemic cells with 5-AZA-CdR, the MSP assay showed bands for both the unmethylated and methylated forms indicating that this analog induced partial demethylation of the *p57* promoter. Genistein (10 μ M) produced a slight inhibition of DNA methylation of the *p57* promoter as shown by a weak unmethylated band. Cells exposed to the co-treatment showed no changes in the intensity of the unmethylated band when compared to the genistein alone, whereas the intensity of the methylated band decreased compared to the band for genistein alone.

DISCUSSION

Combination chemotherapy has the potential to increase the antineoplastic action of 5-AZA-CdR and help to overcome the problem of drug resistance (2). The objective of this report was to investigate whether the antileukemic action of 5-AZA-CdR could be enhanced by genistein, a non-toxic natural agent. Since recent reports have stated that chemotherapy should seek to target the clonogenic potential of cancer stem cells [3,4], we

evaluated the antineoplastic activity of our combined treatment using a clonogenic assay. Our findings indicate that the combined treatment with 5-AZA-CdR and genistein produced a synergistic loss of clonogenicity on both human myeloid and lymphoid leukemic cells. Our results also revealed that genistein alone significantly reduced the clonogenic potential of murine 5-AZA-CdR-resistant cells. This effect appeared to be enhanced by co-treatment with 5-AZA-CdR. The action of genistein on sensitive and resistant leukemic cells, plus its enhancement of the antileukemic action of 5-AZA-CdR, makes this isoflavone a very interesting agent for future investigation in patients with leukemia.

We next tested this combined treatment in the L1210 leukemic mouse model, which is appropriate for the evaluation of cytosine nucleoside analogs, as shown by reports indicating concordance between ARA-C studies in this model and clinical response to high dose ARA-C for the treatment of acute myeloid leukemia (16,17). Combined treatment with 5-AZA-CdR (by continuous i.v. infusion) and genistein (given orally) synergistically increased survival compared to mice treated with 5-AZA-CdR alone. Genistein alone induced a moderate, but significant, enhancement of survival likely due to the very rapid inactivation of genistein ($t_{1/2} < 15$ min) in mice (18).

The mechanism underlying the synergistic interaction observed for the first time in the present study remains to be elucidated. However, this may prove difficult (7) due to the pleiotropic action of genistein, which is a broad tyrosine kinase inhibitor (19) capable of simultaneously affecting various signaling pathways in cancer cells. Previous cell cycle analyses revealed that genistein treatment induced a weak G2/M block (19), while 5-AZA-CdR treatment induced no cell cycle changes (20). In the present study, we found that co-treatment with the two agents under the conditions used did not induce a significant change in the cell cycle progression of the leukemic cells. Examination of 5-AZA-CdR incorporation into DNA showed that genistein did not increase the incorporation of 5-AZA-CdR into the DNA of leukemic cells, suggesting that the synergistic interaction between these agents was not related to activation of the nucleoside analog. Our finding that the incorporation of 5-AZA-CdR remained unchanged seems to indicate that the combined treatment may not increase the hematopoietic toxicity of 5-AZA-CdR.

The synergistic loss of clonogenicity observed in response to treatment with 5-AZA-CdR and genistein at 0.1 and 1 μ M was not associated with reactivation of the TSG *p57*. Co-treatment with a higher concentration of genistein (10 μ M) markedly enhanced *p57* expression, but did not produce detectable demethylation of the gene promoter. These results are consistent with previous findings that co-treatment with 5-AZA-CdR plus genistein reactivated TSG in squamous carcinoma cells (9). Although the mechanism responsible for the synergy remains to be clarified, these findings suggest that the co-treatment may be clinically useful for eradicating the clonogenic potential of leukemic stem cells.

From a chemotherapeutic perspective, the drug levels tested in the present study were relevant to those obtainable in humans. The concentration of 5-AZA-CdR used in our experiments (44 nM) is in the range of the plasma level observed in patients treated with low doses of this epigenetic drug (21). Pharmacokinetic studies in humans showed that a high oral dose of genistein can yield plasma levels of 1 to 20 μ M of this isoflavone (19,22-25). Thus, the concentrations of genistein and 5-AZA-CdR found to produce a synergistic response are realistic within the clinical setting.

In conclusion, our preclinical results suggest that 5-AZA-CdR plus genistein has chemotherapeutic potential against leukemia. This combination shows synergistic activity against both human myeloid and lymphoid leukemic cells, as well as 5-AZA-CdR-resistant cells. The synergistic action of 5-AZA-CdR and genistein co-treatment could offer clinical benefits by reducing the progression of leukemia and decreasing the number of resistant clones, which may be responsible for relapse in patients treated with this nucleoside analog (5). Since genistein is a non-toxic agent, it may have the potential to be used in combination with low doses of 5-AZA-CdR in patients with poor health status, who may not be candidates for cytotoxic chemotherapy. The feasibility of future clinical studies on genistein is illustrated by its current use in a phase II study in combination with gemcitabine in women with breast cancer (26).

ACKNOWLEDGMENTS: The authors would like to thank the Canadian Cancer Society and Cancer Research Society for grant support.

REFERENCES

1. Jones, P. A.; Baylin, S. B. The epigenomics of cancer. *Cell* 128:683-692; 2007.
2. Momparler, R. L. Epigenetic therapy of cancer with 5-aza-2'-deoxycytidine (decitabine). *Semin. Oncol.* 32:443-451; 2005.
3. Jordan, C. T. The potential of targeting malignant stem cells as a treatment for leukemia. *Future Oncol.* 1:205-7; 2005.
4. Ravandi, F.; Estrov, Z. Eradication of leukemia stem cells as a new goal of therapy in leukemia. *Clin. Cancer Res.* 12:340-344; 2006.
5. Momparler, R. L. Pharmacology of 5-Aza-2'-deoxycytidine (decitabine). *Semin. Hematol.* 42:S9-16; 2005.
6. Park, O. J.; Surh, Y. J. Chemopreventive potential of epigallocatechin gallate and genistein: evidence from epidemiological and laboratory studies. *Toxicol. Lett.* 150:43-56; 2004.
7. Sarkar, F. H.; Li, Y. Using chemopreventive agents to enhance the efficacy of cancer therapy. *Cancer Res.* 66:3347-3350; 2006.
8. Shen, J.; Tai, Y. C.; Zhou, J.; Stephen Wong, C. H.; Cheang, P. T.; Fred Wong, W. S.; Xie, Z.; Khan, M.; Han, J. H.; Chen, C. S. Synergistic antileukemia effect of genistein and chemotherapy in mouse xenograft model and potential mechanism through MAPK signaling. *Exp. Hematol.* 35:75-83; 2007.
9. Fang, M.Z.; Chen, D.; Sun, Y.; Jin, Z.; Christman, J. K.; Yang, C. S. Reversal of hypermethylation and reactivation of p16INK4a, RARbeta, and MGMT genes by genistein and other isoflavones from soy. *Clin. Cancer Res.* 11:7033-7041; 2005.
10. Raynal, N. J.; Momparler, L.; Charbonneau, M.; Momparler, R. L. Antileukemic Activity of Genistein, a Major Isoflavone Present in Soy Products. *J. Nat. Prod.* 71:3-7; 2008.

11. Momparler, R. L.; Momparler, L. F. Chemotherapy of L1210 and L1210/ARA-C leukemia with 5-aza-2'-deoxycytidine and 3-deazauridine. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 25:51-54; 1989.
12. Momparler, R. L.; Vesely, J.; Momparler, L. F.; Rivard, G. E. Synergistic Action of 5-Aza-2'-deoxycytidine and 3-Deazauridine on L1210 Leukemic Cells and EMT6- Tumor Cells. *Cancer Res.* 39:3822-3827; 1979.
13. Lemaire, M.; Momparler, L. F.; Bernstein, M. L.; Marquez, V. E.; Momparler, R. L. Enhancement of antineoplastic action of 5-aza-2'-deoxycytidine by zebularine on L1210 leukemia. *Anticancer Drugs* 16:301-308; 2005.
14. Herman, J. G.; Graff, J.R.; Myohanen S.; Nelkin, B. D.; Baylin, S. B. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 93:9821-9826; 1996.
15. Valeriote, F.; Lin, H. Synergistic interaction of anticancer agents: a cellular perspective. *Cancer Chemother. Rep.* 59:895-900; 1975.
16. Momparler, R. L.; Momparler, L. F.; Samson, J. Comparison of the antileukemic activity of 5-AZA-2'-deoxycytidine, 1-beta-D-arabinofuranosylcytosine and 5-azacytidine against L1210 leukemia. *Leuk. Res.* 8:1043-1049; 1984.
17. Mayer, R. J.; Davis, R. B.; Schiffer, C. A.; Berg, D. T.; Powell, B. L.; Schulman, P.; Omura, G. A.; Moore, J. O.; McIntyre, O. R.; Frei, E. 3rd. Intensive postremission chemotherapy in adults with acute myeloid leukemia. *Cancer and Leukemia Group B. N. Engl. J. Med.* 331:896-903; 1994.
18. Supko, J. G.; Phillips, L.R. High-performance liquid chromatographic assay for genistein in biological fluids. *J. Chromatogr. B. Biomed. Appl.* 666:157-167; 1995.
19. Ravindranath, M. H.; Muthugounder, S.; Presser, N.; Viswanathan, S. Anticancer therapeutic potential of soy isoflavone, genistein. *Adv. Exp. Med. Biol.* 546:121-165; 2004.
20. Momparler, R. L.; Samson, J.; Momparler, L.F.; Rivard, G. E. Cell cycle effects and cellular pharmacology of 5-aza-2'-deoxycytidine. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 13:191-194; 1984.

21. Liu, Z.; Marcucci, G.; Byrd, J. C.; Grever, M.; Xiao, J.; Chan, K. K. Characterization of decomposition products and preclinical and low dose clinical pharmacokinetics of decitabine (5-aza-2'-deoxycytidine) by a new liquid chromatography/tandem mass spectrometry quantification method. *Rapid. Commun. Mass Spectrom.* 20:1117-1126; 2006.
22. Izumi, T.; Piskula, M. K.; Osawa, S.; Obata, A.; Tobe, K.; Saito, M.; Kataoka, S.; Kubota, Y.; Kikuchi, M. Soy isoflavone aglycones are absorbed faster and in higher amounts than their glucosides in humans. *J. Nutr.* 130:1695-1699; 2000.
23. Busby, M.G.; Jeffcoat, A.R.; Bloedon, L. T.; Koch, M. A.; Black, T.; Dix, K. J.; Heizer, W. D.; Thomas, B. F.; Hill, J. M.; Crowell, J. A.; Zeisel, S. H. Clinical characteristics and pharmacokinetics of purified soy isoflavones: single-dose administration to healthy men. *Am. J. Clin. Nutr.* 75:126-136; 2002.
24. Miltyk, W.; Craciunescu, C. N.; Fischer, L.; Jeffcoat, R. A.; Koch, M. A.; Lopaczynski, W.; Mahoney, C.; Crowell, J.; Paglieri, J.; Zeisel, S. H. Lack of significant genotoxicity of purified soy isoflavones (genistein, daidzein, and glycitein) in 20 patients with prostate cancer. *Am. J. Clin. Nutr.* 77:875-882; 2003.
25. Mathey, J.; Lamothe, V.; Coxam, V.; Potier, M.; Sauvart, P.; Pelissero, C. B. Concentrations of isoflavones in plasma and urine of post-menopausal women chronically ingesting high quantities of soy isoflavones. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 41:957-965; 2006.
26. <http://www.cancer.gov/search/ResultsClinicalTrialsAdvanced.aspx?protocolsearchid=4148806>

Legends to figures

Figure 1. Effect of 5-AZA-CdR and/or genistein on the loss of clonogenicity in leukemic cell lines. (A) Human myeloid HL-60 and (B) human lymphoid MOLT-3 leukemic cell lines were exposed for 48 h to 5-AZA-CdR at 44 nM alone or in combination with different concentrations of genistein (0.1, 1, and 10 μ M). (C) Murine lymphoid L1210 leukemic cells were exposed for 48 h to 5-AZA-CdR at 4.4 nM alone or in combination with different concentrations of genistein (0.1, 1, and 10 μ M). Loss of clonogenicity was determined by a colony assay. The results are expressed as the means $\pm$ SEM compared to non-treated cells ($n = 3$). Statistical significance ($p < 0.05$), between combination of agents compared to single agent, is indicated by a star (*) at the top of the bars.

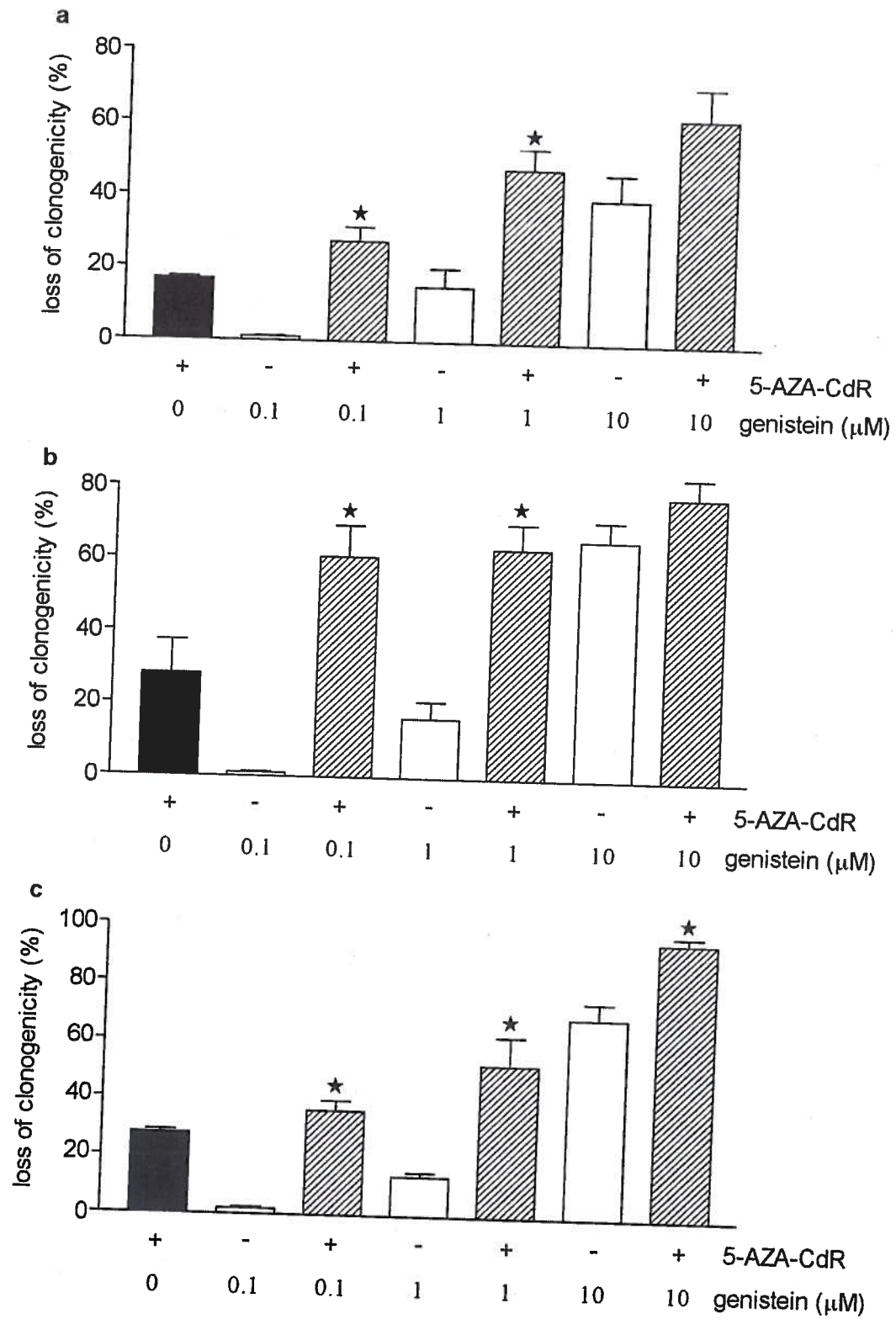
Figure 2. Effect of 5-AZA-CdR and/or genistein on the clonogenic potential of murine L1210/ARA-C leukemic cells resistant to 5-AZA-CdR. The L1210/ARA-C cells are resistant to 5-AZA-CdR due to a deficiency in deoxycytidine kinase. Cells were exposed 48 h to 5-AZA-CdR (4.4 nM) alone or in combination with different concentrations of genistein (0.1, 1, and 10 μ M). Loss of clonogenicity was determined by a colony assay. The results are expressed as mean $\pm$ SEM compared to non-treated cells ($n = 3$). Statistical significance ($p < 0.05$), between combination of agents compared to single agent, is indicated by a star (*) at the top of the bars.

Figure 3. Effect of an 8 h i.v. infusion of 5-AZA-CdR (2 mg/kg total dose) and/or a 0.5% genistein-enriched diet on the survival time of CD2F1 mice bearing L1210 leukemia. The survival time (h) of control ($n = 11$), genistein ($n = 11$), 5-AZA-CdR ($n = 10$) and genistein plus 5-AZA-CdR-treated mice ($n = 13$), is shown on a Kaplan-Meier survival curve. The mice received an i.v. injection of leukemia cells on day 0.

Figure 4. Effect of different concentrations of genistein on the incorporation of 5-AZA-CdR into DNA of leukemic cells. Radiolabeled 5-AZA-CdR incorporation was measured

in (A) L1210 murine and (B) HL-60 human leukemic cell lines. Cell suspensions were exposed 4 h and 24 h to radiolabeled 5-AZA-CdR at 175 nM alone (CTL; black column) and in presence of indicated concentrations of genistein (GEN). The experiments were done in triplicate and repeated three times.

Figure 5. Analysis of *p57* tumor suppressor gene expression and promoter methylation in HL-60 leukemic cells treated with 5-AZA-CdR and/or genistein. (A) RT-PCR analysis of *p57* expression was performed in HL-60 leukemic cells exposed 48 h to 5-AZA-CdR at 44 nM in absence or in presence of genistein at 0.1, 1, and 10 μ M. (B) MSP was performed on *p57* promoter of HL-60 leukemic cells exposed 48 h to 5-AZA-CdR at 44 nM in absence or in presence of genistein at 10 μ M. Experiments were repeated twice with similar results.

**Figure 1.**

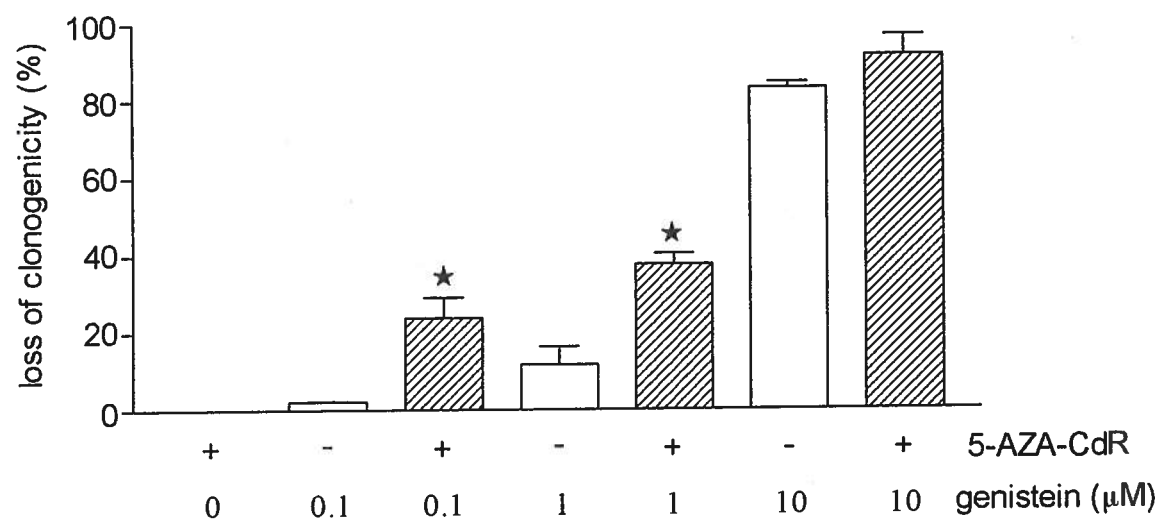


Figure 2.

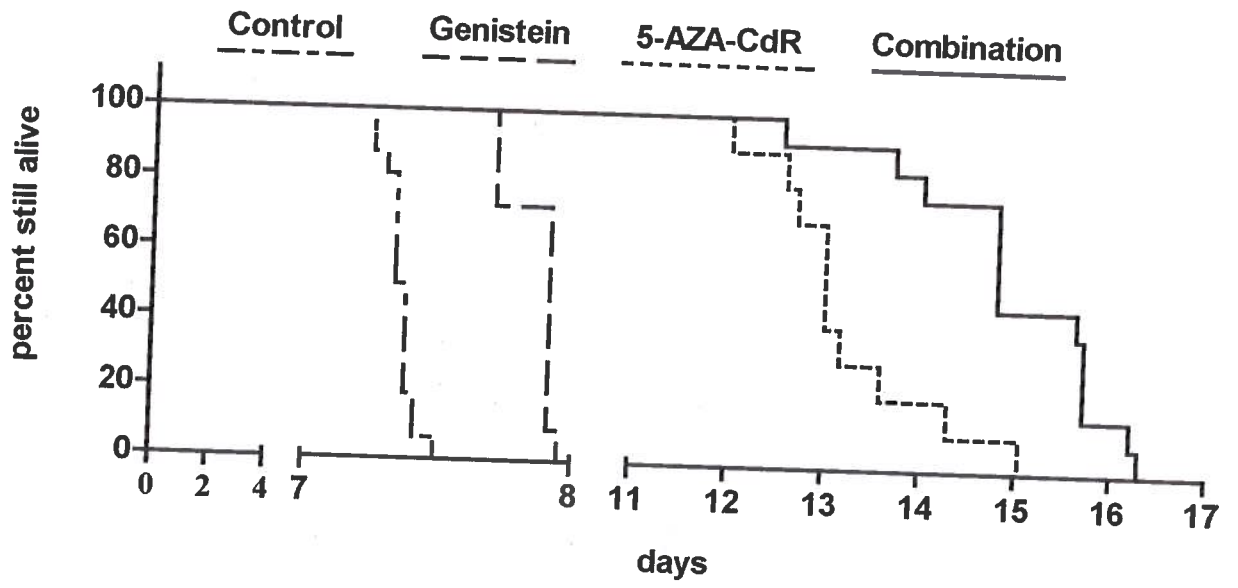
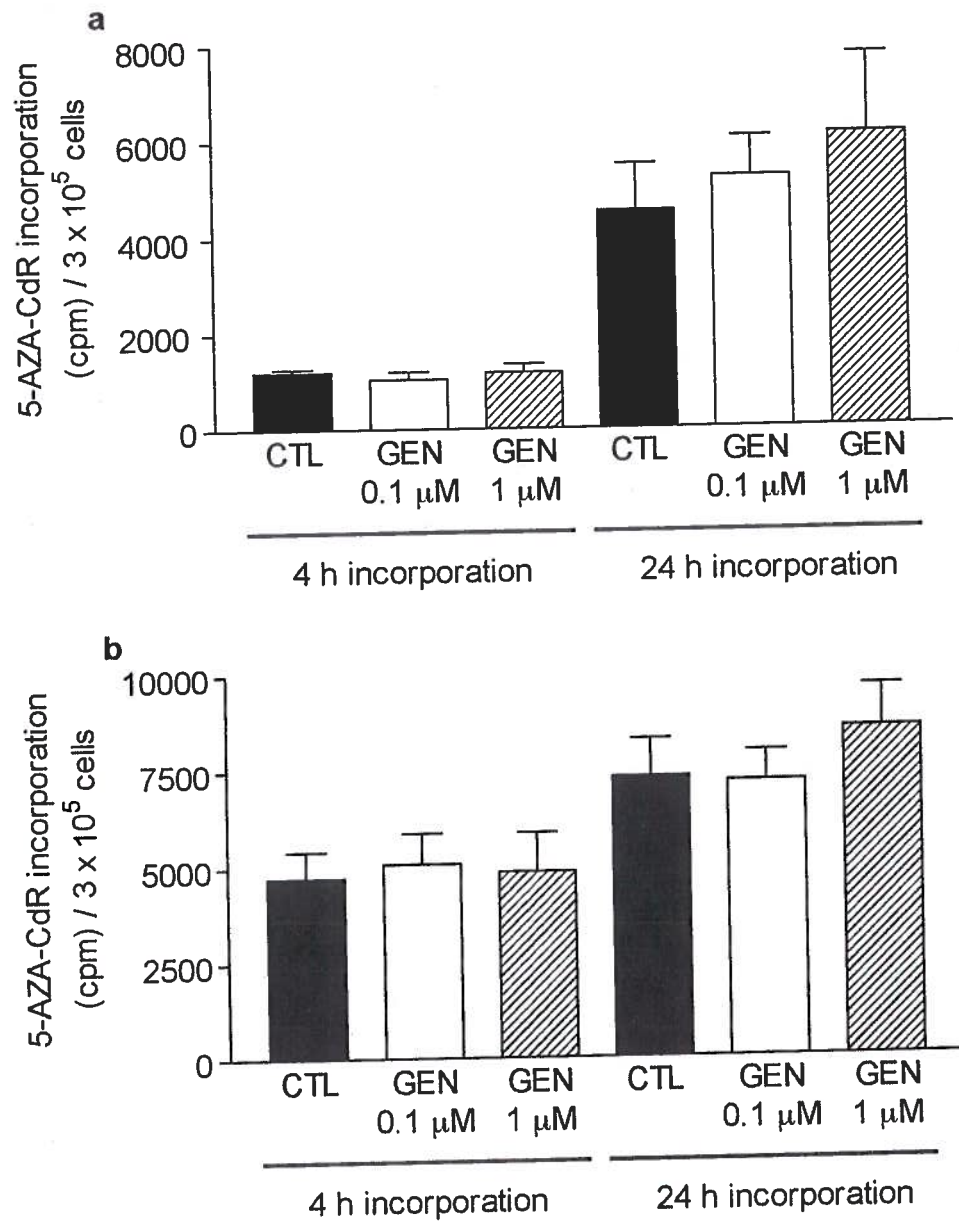


Figure 3.

**Figure 4.**

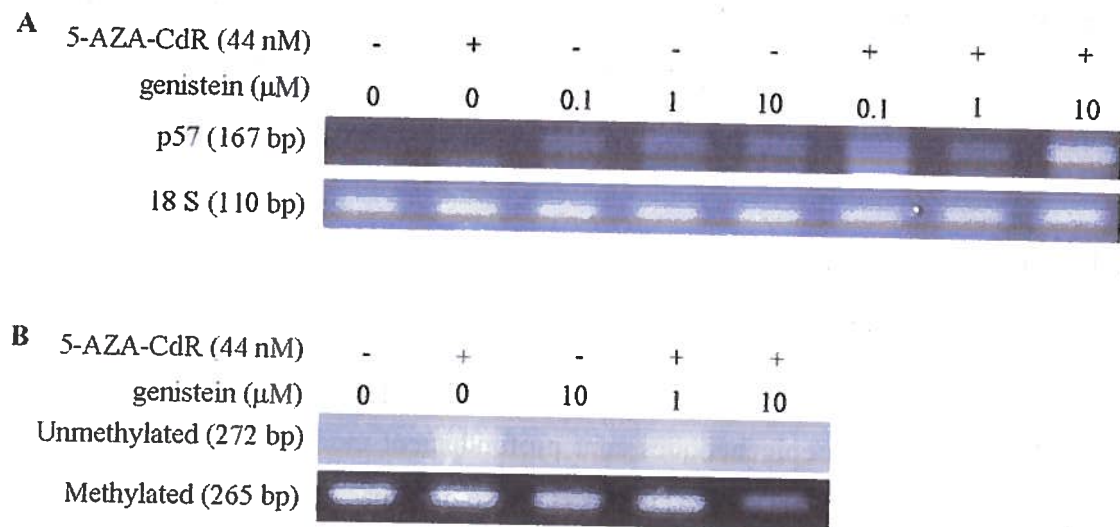


Figure 5.

Chapitre 3 : Augmentation de l'effet antitumoral de la 5-aza-2'-désoxycytidine par la génistéine sur des lignées humaines de cancer du poumon

3.1 Traduction du résumé de l'article :

Le cancer du poumon est le cancer qui est responsable du plus grand nombre de mort par cancer. Les mécanismes épigénétiques sont profondément modifiés dans les cancers du poumon. L'hyperméthylation de l'ADN est la cause de l'inactivation de nombreux gènes suppresseurs de tumeurs. Ces changements épigénétiques sont des cibles intéressantes pour la chimiothérapie utilisant la 5-aza-2'-désoxycytidine (5-AZA-CdR), un inhibiteur puissant de la méthylation de l'ADN qui est utilisé pour le traitement des hémopathies malignes. Nos travaux ont montré que l'activité antinéoplasique de la 5-AZA-CdR est augmentée de façon synergique par la génistéine dans des modèles de leucémie. Notre hypothèse est que la combinaison de la 5-AZA-CdR et de la génistéine devrait aussi être efficace contre d'autres types de cellules cancéreuses. Le but de cette recherche est de tester l'efficacité de cette combinaison sur les lignées humaines d'adénocarcinome pulmonaire Calu-6 et H2087 ; puis sur la lignée de cancer du poumon H69AR qui est résistante aux agents chimiothérapeutiques. L'effet anticancéreux de la 5-AZA-CdR et de la génistéine a été évalué en mesurant la perte de clonogénicité, les modifications histologiques et l'inhibition de la croissance cellulaire par un test de MTT. Les résultats suggèrent que l'effet anticancéreux de la 5-AZA-CdR est augmenté de façon synergique par la génistéine produisant une perte de clonogénicité, des changements morphologiques et une réduction de nombre de cellules vivantes. Les résultats ont démontré que la combinaison de la 5-AZA-CdR avec la génistéine augmente la perte de clonogénicité pour les H2087 et de façon synergique pour les cellules Calu-6. Des analyses histopathologiques ont montré que la combinaison induit des changements morphologiques (cellules nécrotiques et de cellules géantes) pour les cellules Calu-6. De plus, cette combinaison produit un effet additif sur l'inhibition de la croissance de cellules

du cancer du poumon résistantes aux agents chimiothérapeutiques conventionnels. En conclusion, ces travaux suggèrent que la combinaison de la 5-AZA-CdR et de la génistéine présente un intérêt dans la chimiothérapie pour le traitement du cancer du poumon.

3.2 Contribution de l'étudiant :

Le premier auteur a réalisé toutes les expériences portant sur l'effet des médicaments sur la perte de la clonogénicité, les statistiques, la préparation des lames pour la microscopie, l'analyse des résultats et la rédaction du manuscrit. La coloration des lames et l'analyse des résultats de la microscopie (tableau 1) ont été réalisées par un pathologiste de l'hôpital Ste-Justine, le Dr Hervé Sartelet. Les expériences sur la lignée cancéreuse H69AR ont été réalisées par Guylaine Lassonde, technicienne du Dr Michel Charbonneau.

3.3 Enhancement of the antitumoral effect of 5-aza-2'-deoxycytidine by genistein on human lung carcinoma cells:

Noël. J-M. Raynal^a, Hervé Sartelet^b, Guylaine Lassonde^a, Michel Charbonneau^a, and Richard L. Momparler^{c,*}.

^a*INRS-Institut Armand-Frappier, Université du Québec, 531 boul. des Prairies, Laval, Quebec, H7V 1B7, Canada.*

^b*Département de Pathologie, 3175 Cote Ste. Catherine Road, Montreal, Quebec, H3T 1C5, Canada.*

^c*Service of Hematology/Oncology, Centre de recherche, Ste-Justine Hospital, Dép de pharmacologie, Université de Montréal, 3175 Cote Ste. Catherine Road, Montreal, Quebec, H3T 1C5, Canada.*

* Corresponding author at: Service of Hematology/Oncology, Centre de recherche, Ste-Justine Hospital, Université de Montréal, 3175 Cote Ste. Catherine Road, Montreal, Quebec, H3T 1C5, Canada. Tel.: +5143424931 ext 6140; fax +5143454801.

E-mail address: richard.l.momparler@umontreal.ca (R. L. Momparler).

Abstract

Lung cancer is the leading cause of cancer death. Epigenetic mechanisms are highly modified in lung cancer where DNA hypermethylation is responsible for the inactivation of many tumor suppressor genes. These epigenetic changes provide an interesting target for chemotherapeutic intervention using 5-aza-2'-deoxycytidine (5-AZA-CdR), a potent inhibitor of DNA methylation that is currently used for the treatment of haematological malignancies. Our previous work has shown that the antineoplastic action of 5-AZA-CdR is synergistically increased by genistein in leukemic models. Our working hypothesis is that the combination of 5-AZA-CdR and genistein should also be efficient against other cancer cell lines. The aim of this research is to test the effect of this combination on human lung adenocarcinoma cell lines Calu-6 and H2087 and on a lung cancer cell line H69AR resistant to different chemotherapeutic agents. The anti-cancer effect of 5-AZA-CdR and genistein were evaluated by measuring the loss of clonogenicity, histological modifications and the number of viable cells by a MTT assay. These results have demonstrated that the combination of 5-AZA-CdR with genistein produced a greater and synergistic loss of clonogenicity against H2087 and Calu-6 cells, respectively. Histological analysis has shown that the combination induced morphological changes (necrotic and giant cells) in Calu-6 cells at higher incidence than single agent. Moreover, this combination also induced additive cell growth inhibition on H69AR, a lung cancer showing multi-drug resistance to conventional chemotherapeutic drugs. In conclusion, this work suggests that the combination of the 5-AZA-CdR and genistein present an interest in the chemotherapy for the treatment of lung cancer.

1. Introduction

Lung cancer is the major cause of death by cancer and smoking is responsible for 80-90% of cases. The disease is classified into small cell (SCLC) and non-small cell (NSCLC) lung cancer which the latter account for 80% (Patel *et al.*, 2007). The disease is largely diagnosed at an advanced stage (IIIB or IV) without effective therapeutic treatment and only 10 % of the patients can expect long-term survival (Digel and Lubbert, 2005). The therapy of lung cancer includes surgery, chemotherapy and radiotherapy which depend on stage and performance status of the patient (Patel *et al.*, 2007). The chemotherapy of lung cancer has reached a therapeutic plateau since new agents have not been successful to prolong survival (Schiller *et al.*, 2002). There is an urgent need to increase the efficacy of lung cancer treatment by selecting new chemotherapeutic options.

Targeting the epigenetic aberrations may represent a very interesting approach in the chemotherapy of lung cancer. The epigenetic term is defined as heritable and reversible changes in gene expression that are not related by a change in DNA sequence. The epigenetic mechanisms include noncoding RNAs, covalent histone modifications, nucleosomal positioning, and DNA methylation. Epigenetic aberrations in cancer, like DNA hypermethylation in the promoter region, can lead to the inactivation of many tumor suppressor genes (TSG) (Jones and Baylin, 2007). In lung cancer, more than 30 genes are silencing by DNA hypermethylation for example *p15*, *p16^{INK4a}*, *MGMT*, *E-cadherin*, and *RAR β* (Belinsky, 2005). The fact that DNA hypermethylation is pharmacologically reversible has stimulated the interest in DNA methylation inhibitors like 5-aza-2'-deoxycytidine (5-AZA-CdR). This nucleoside analog is an anticancer agent inducing an irreversible inhibition of the DNMT1 (DNA methyltransferase 1) which causes TSG reactivation and subsequent loss of clonogenicity in cancer cells (Momparker, 2005). 5-AZA-CdR was approved by the FDA for the treatment of the myelodysplastic syndromes and is under evaluation for other types of cancers.

For the chemotherapy of lung cancer, different clinical trials have investigated the effect of 5-AZA-CdR. In a phase I/II trial, lung cancer patients (stage IV NSCLC) were treated with an 8 hours (h) i.v. infusion of 5-AZA-CdR at 200-660 mg/m² per course for one or

more cycles. Out of nine patients, two patients survived 15.3 and 16 months and one patient that received the most intense therapy (first cycle : 660 mg/m², i.e. 82.5 mg/m²/h for 8 h, and 4 cycles at 495 mg/m², i.e. 61.8 mg/m²/h for 8 h) survived 6.75 years. The side effect was a delayed, but reversible hematopoietic toxicity (Momparler *et al.*, 1997; Momparler and Ayoub, 2001). This study suggests that 5-AZA-CdR may have some clinical activity against lung cancer using this type of dose-schedule. A more effective approach for modulating epigenetic aberrations in cancer would be to combine 5-AZA-CdR with other epigenetic drugs to produce a synergistic reexpression of TSG as shown by Cameron and colleagues with a histone deacetylase inhibitor (Cameron *et al.*, 1999).

Recently, we reported that genistein, one of the major isoflavone in soy, could increase the antineoplastic effect of 5-AZA-CdR *in vitro* and *in vivo* in leukemic models (Raynal *et al.*, 2008a). Genistein is a non-toxic substance known to have chemopreventive and chemotherapeutic potential by targeting weakly multiple cancer related pathways including the epigenetic machinery (Fang *et al.*, 2005; Banerjee *et al.*, 2008; Kikuno *et al.*, 2008). In human, an enriched diet of genistein can result in plasma levels of this isoflavones in the range of 1 to 5 μ M (Klein and King, 2007). Genistein was shown to act on epigenetic mechanisms at dietary relevant concentrations (Fang *et al.*, 2005). Interestingly, our data showed that genistein, at these concentrations alone has the ability to inhibit the clonogenic potential of leukemic cells (Raynal *et al.*, 2008b). The combination of 5-AZA-CdR and genistein produced a synergistic loss of clonogenicity in leukemic cells and increases the survival of leukemic mice. The combination of this nucleoside analog and genistein is not expected to increase the toxicity of the 5-AZA-CdR, which is of major importance for a clinical application (Raynal *et al.*, 2008a).

Here, we hypothesize that the combination of 5-AZA-CdR and genistein would be effective, not only for leukemic cells, but also for other types of cancer cells. The objective of this work was to investigate the effect of the combination of 5-AZA-CdR and genistein on the survival and the morphology of lung cancer cell lines. Moreover, the combination was tested in a multidrug-resistant lung cancer cell line to evaluate its potential in the case of treating patients showing drug resistance after conventional chemotherapy.

2. Materials and methods

2.1. Cell culture

Human lung cancer cells Calu-6 and H2087 were obtained from ATCC (Manassas, Virginia, USA) and cultured as monolayer respectively in RPMI-1640 and DMEM (Canadian Life Technologies) supplemented with 10 % heat-inactivated foetal bovine serum (Wisent, St-Bruno, Qc, Canada). Doubling times of Calu-6 and H2087 cells were respectively 24 and 35 h. Cell passages were performed weekly using 0.25 % trypsin-EDTA (Invitrogen, Grand Island, N.Y.) at 5000 cell/ml. H69AR, a human small cell lung cancer cell line that is multidrug resistant (Mirski et al., 1987) was obtained from ATCC. H69AR cell line was cultured in RPMI-1640 supplemented with HEPES at 2.38 g/l (pH 7.4), sodium pyruvate (0.11 g/l), L-glutamine (0.3 g/l) and 5% foetal bovine serum. In order to maintain the stability of the drug resistance, cell culture was performed in presence of 0.8 μ M doxorubicin from a stock solution of 0.8 mM in 100 % ethanol stored at -20°C. Cells were grown in suspension in 500 ml glass bottles. For cell passages, cells in suspension were aspirated and centrifuged at 800 RPM for 10 min. The culture medium was removed and the cell pellet was resuspended in fresh medium. The cells were syringed using a 20G needle to break up the clumps sufficiently to count. The cell count was performed with trypan blue and cells were seeded at 100 000 cell/ml. As H69AR cells tend to adhere, the bottles were changed every 2 weeks to avoid the selection of adherent clones. The doubling time of the H69AR cells was 58 h. All cell lines were incubated at 37°C in 5 % CO₂ atmosphere.

5-aza-2'-deoxycytidine (5-AZA-CdR, 228,2 g/mol) was obtained from Pharmachemie (Haarlem, Netherlands) and was prepared in sterile PBS at 1,000 μ g/ml and stored at -70 °C. Genistein (99 %, LC Laboratories, Woburn, MA) was dissolved in DMSO (Sigma, Oakville, Ontario), stock solutions of 0.2 and 2 mM were prepared and stored at -20 °C until use.

2.2. *In vitro* clonogenic assay

The loss of clonogenicity induced by 5-AZA-CdR alone or in combination with genistein was assessed in Calu-6 and H2087 cell lines. 100 and 150 cells of Calu-6 and H2087 were respectively placed in each well of a 6 well 35 mm dish (Corning, NY). The next day, drugs were added to the cell culture medium. For the Calu-6 cells, 5AZA-CdR (10 and 50 nM) and/or genistein (0.1 and 1 μ M) were added simultaneously during 48 h. For the H2087 cells, 5AZA-CdR (220 nM) and/or genistein (5 μ M) were added simultaneously during 24 h. After treatment, the cell culture medium was removed and replaced by drug-free medium for an additional incubation of 15 days to allow the formation of the colonies. Once the colonies were visible, the culture medium was removed and the colonies (>500 cells) were stained with 0.5% methylene blue in 50% methanol and counted manually.

The percentage of loss of clonogenicity was assessed by dividing the mean colony number on the drug treated samples by the mean colony number on the untreated samples and multiplying the quotient by 100. This number was subtracted from 100 to determine the percent of loss of clonogenicity. The experiments were performed in triplicate sets and repeated three times for the Calu-6 cells. The experiments with the H2087 cells were performed one time in triplicate sets.

2.2. *Histopathological analysis*

The histopathological analysis was performed on Calu-6 cell lines grown in glass chamber slides (Nalge Nunc Lab-Tekk II Chamber Slide, Canadian Life Technologies). Each chamber was plated with 200 cells in 0.8 ml medium and incubated at 37 °C in 5 % CO₂ atmosphere. The next day, drugs (5-AZA-CdR at 50 nM and/or genistein 1 μ M) were added to the medium for a 48 h exposure. Then, the medium was replaced by a drug-free medium for an additional 24 h. After treatment, medium was removed and the cells were fixed in a 3.7 X formaldehyde solution (incubation of 20 min at room temperature) and

stained with haematoxylin and eosin. The pathological analysis was established by counting in a total of 100 cells the number of normal, necrotic, giant and mitotic cells.

2.3. Cell growth inhibition by 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide assay

H69AR cells were seeded at a density of 100,000 cells per well in 48-well microplates and treated immediately with 10 μ M genistein with different concentrations of 5-AZA-CdR (0.1 and 0.5 μ M) in a total volume of 600 μ l. In the samples treated with 5-AZA-CdR, fresh drug was added after 24, 48 and 72 incubation because of its instability at 37°C. On completion of 90 hours of incubation, 200 μ l were removed in each well. 100 μ l of 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) solution (at 5 mg/ml in a 1 : 1 solution of medium and PBS) was added in each well, and incubated for 4 hours. Upon termination, the MTT formazan formed by metabolically active cells was dissolved by adding 500 μ l of isopropanol-HCl 0.1N to each well. Absorbance was measured at 560 nm using a plate reader (690 nm reference wavelength) (Synergy HT, Bio-Tek instrument inc., VT).

2.4. Statistical analysis

Data are presented as mean $\pm$ SEM as the percentage of controls or absolute values as indicated in the legends. The statistical significance between experimental groups was determined by a One Way ANOVA followed by Tukey's Multiple Comparison test as implemented by GraphPad Software (San Diego, CA). A *P* value less than 0.05 was considered statistically significant.

3. Results

3.1. Effects of 5-AZA-CdR and/or genistein on the in vitro clonogenicity of lung cancer cells

The anticancer action of the 5-AZA-CdR and/or the genistein was evaluated using a clonogenic assay on lung cancer Calu-6 and H2087 cell lines (Fig. 1a-b and in Table 1). In human lung adenocarcinoma Calu-6 cells (Fig. 1a), a 48 h exposure of 5-AZA-CdR at 10 and 50 nM produced a 24 ± 5 and 35 ± 8 % loss of clonogenicity, respectively. Genistein after a 48 h treatment at 0.1 and 1 μ M produced a 2 ± 10 and 1 ± 6 % loss of clonogenicity, respectively. The combined treatment of 5-AZA-CdR at 10 nM with 0.1 and 1 μ M genistein produced a 28 ± 8 and 25 ± 8 % loss of clonogenicity, respectively. The combined treatment of 5-AZA-CdR at 50 nM with 0.1 and 1 μ M genistein produced a 69 ± 7 and 66 ± 9 % loss of clonogenicity, respectively. The combination of 5-AZA-CdR at 50 nM with 0.1 and 1 μ M genistein showed a significant synergistic ($P < 0.05$) loss of clonogenicity as compared to each agent alone as characterized by the method of Valeriote and Lin (Valeriote and Lin, 1975). This method is designed for the evaluation of the anticancer drug interaction at the cellular level where the endpoint is the cell survival. Fig. 1b shows four representative wells in which Calu-6 colonies are stained in blue. The difference in the number of colonies between the control group and the group treated with 0.1 μ M genistein was not significant. Interestingly, the number and the size of the colonies in the 5-AZA-CdR treated groups, decreased compared to the control group. The number of colonies between the group of the 5-AZA-CdR and the combination is significantly reduced. In the experiment on H2087 cells (Table 1), 5-AZA-CdR at 220 nM for 24 h produced a 60 ± 4 % loss of clonogenicity. Genistein at 5 μ M produced a 3 ± 9 % loss of clonogenicity. The combination produced a greater loss of clonogenicity than each agent alone (69 ± 3 %).

3.2. The histopathological modifications induced by 5-AZA-CdR, genistein and their combination in Calu-6 cells

Human lung adenocarcinoma Calu-6 cells grown on glass chamber slides were treated for 48 h with 1 μ M genistein, 50 nM 5-AZA-CdR and the combination of these agents. Then, the cells were fixed and stained with haematoxylin and eosin for histopathological analysis (Fig. 1c). The cellular modifications were characterized by counting in a total of 100 cells the number of normal, necrotic, giant and mitotic cells (Table 2). In the control group, 85 out of 100 cells were normal cells and 15 necrotic cells were counted. The group treated with 1 μ M genistein showed 58 normal cells, 31 necrotic cells, 6 giant cells and 5 mitotic cells. The group treated with 5-AZA-CdR at 50 nM showed 52 normal cells, 28 necrotic cells, and 20 giant cells. The group treated with the combination of these agents showed 28 normal cells, 29 necrotic cells, 42 giant cells and 1 mitotic cell. The drug combination resulted in an increase in the histopathological changes as compared to cells treated with a single agent.

3.3 Cell growth inhibition by the MTT assay on the H69AR lung cancer resistant cell line

A MTT assay was performed on the lung cancer resistant H69AR cells to assess the effect of the treatment of 5-AZA-CdR with or without genistein (Fig. 2). The absorbance level measured in the control cells was 0.601 ± 0.006 . A positive control for drug resistance with H69AR cells treated with doxorubicin (0.8 μ M) showed no effect on growth inhibition with an absorbance of 0.59 ± 0.006 . Cells treated with 0.1 μ M 5-AZA-CdR did not show a significant cell growth inhibition compared to controls (data not shown). The treatment with 10 μ M genistein and 0.5 μ M 5-AZA-CdR inhibited the cell growth significantly ($P < 0.05$) compared to control with an absorbance of 0.541 ± 0.013 and 0.536 ± 0.011 , respectively. The groups treated with the combination of genistein (10 μ M) and 5-AZA-CdR at 0.1 μ M or 0.5 μ M showed an absorbance 0.507 ± 0.009 and 0.471 ± 0.004 , respectively. The cell growth inhibition in these combination groups was significantly different than the control. Only the group treated with genistein (10 μ M) and

5-AZA-CdR at 0.5 μ M showed an additive significant cell growth inhibition ($P < 0.05$) compared to the inhibition obtained with the single agents.

4. Discussion

Targeting the epigenetic aberrations is a promising perspective for the chemotherapy of lung cancer. The use of 5-AZA-CdR against lung cancer has some clinical potential (Momparler *et al.*, 1997; Momparler and Ayoub, 2001). The epigenetic therapy of cancer has to be part of a combinational approach with other antineoplastic agents to increase the efficacy of the treatment. Preclinical data showed that 5-AZA-CdR in combination with taxotere, an inhibitor of microtubule polymerization resulting in G2/M block, produced an interesting anticancer effect against lung cancer cells (Hurtubise and Momparler, 2004). We showed recently that genistein in combination with 5-AZA-CdR produced a synergistic antileukemic effect *in vitro* and *in vivo* (Raynal *et al.*, 2008a). In this study, our results revealed that the combination of 5-AZA-CdR and genistein produced an additive/synergistic response against lung cancer cell lines.

The effect of the drug combination was assessed by using the clonogenic assay (Puck and Marcus, 1955) which is based on the evaluation of the ability of a single cell to grow into a colony long time after the treatment (typically 10-20 days for mammalian cells). The death of cancer cells following the damage of the chemotherapy might occur through different time-lapse and manners, i.e.: apoptosis, necrosis, mitotic catastrophe, senescence, and autophagy. The clonogenic assay permits to correctly assess the fraction of cells dying or actually the converse of cells surviving after treatment. Because of its duration, it integrates all forms of cell death as well as the ability to proliferate. Therefore, the clonogenic assay overcomes some of the limitations of short-term *in vitro* assays and examines cellular response with longer-term kinetics that is more reflective of therapeutic response (Brown and Attardi, 2005). Our results have shown that genistein alone did not produce significant loss of clonogenicity at the dose tested (0.1 and 1 μ M). The absence of reduction in the clonogenic potential was also observed by others in KYSE 510 cells

(genistein < 10 μ M) whereas genistein at low doses produced epigenetic gene reactivation (Fang *et al.*, 2005). 5-AZA-CdR alone produced a marked loss of clonogenicity. The combination of genistein and 5-AZA-CdR produced a synergistic loss of clonogenicity in Calu-6 cell line. Preliminary data obtained on the H2087 cell line showed that the genistein enhanced the antineoplastic action of 5-AZA-CdR by increasing the percentage of loss of clonogenicity.

5-AZA-CdR is known to induce differentiation and morphological changes in neoplastic cells (Jones and Taylor, 1980; Côté and Momparler, 1995). Hence, it was of interest to investigate this aspect in lung cancer cells exposed to 5-AZA-CdR in combination with genistein. The analysis of the histopathological modifications observed 72 h after the beginning of the treatment revealed that the cellular morphology was disrupted by the action of these agents. Genistein and 5-AZA-CdR alone produced an increase in abnormal cellular features like giant and necrotic cells. The drug combination enhanced the number of abnormal cells and correlated with the enhanced loss of clonogenicity. Interestingly, it was shown that the inactivation of the DNMT1 produced cellular morphological changes leading eventually to cell death of human colorectal carcinoma cells (Chen *et al.*, 2007). The process of DNMT1 inactivation may be responsible for the enhancement of morphological changes observed in our experiments. Indeed, 5-AZA-CdR is an irreversible inhibitor of this enzyme (Momparler, 2005) whereas genistein is a weak inhibitor ($IC_{50} \sim 67 \mu$ M) of the DNMT1 (Fang *et al.*, 2005). The combined inhibition of 5-AZA-CdR and genistein on the DNMT1 may be a possible mechanism of action to explain the enhancement of the morphological changes and the synergistic loss of clonogenicity. Further experiments need to confirm this hypothesis.

This drug combination was tested on the H69AR multi-drug resistance cell line. This cell line was generated by culturing the H69 cells (SCLC cells) with increasing doses of doxorubicin (Adriamycin®) up to 0.8 μ M. H69AR cells do not overexpress P-glycoprotein, but express an ATP-binding superfamily of transport proteins, designated as multidrug resistance-associated protein (MRP) (Cole *et al.*, 1992; Slovak *et al.*, 1993). This MRP produces cross-resistant to anthracycline analogues (daunomycin, epirubicin...), etoposide, colchicine and the *Vinca* alkaloids (vincristine and vinblastine) (Mirski *et al.*, 1987). The effect of 5-AZA-CdR and/or genistein was assessed by classical growth

inhibition assay (MTT) since these cells have a weak ability to form colonies. The results showed that 5-AZA-CdR and genistein alone inhibited the growth inhibition H69AR cells. The combination produced an additive significant growth inhibition on the H69AR multi-drug resistance cell line compared to each agent alone. These results are of clinical interest since lung cancer cells of patients showing drug resistance after conventional chemotherapy show growth inhibition after treatment with 5-AZA-CdR, genistein and their combination.

Therefore, our results confirm the hypothesis that the combination of 5-AZA-CdR and genistein shows an anticancer potential on cancer cells of different phenotypes like in leukemic and lung cancer cells. The results on lung cancer have to be confirmed by *in vivo* experiments in nude mice bearing human lung cancer cells. This preclinical work shows the potential of this new approach in the chemotherapy of lung cancer. Since most lung cancer patients are over 65 years old, the use of genistein, a non-toxic agent, as a combinational agent with 5-AZA-CdR may represent an option for patients with poor health status.

Acknowledgments

The authors would like to thank the Canadian Cancer Society and Cancer Research Society for grant support.

References

- Banerjee, S., Li, Y., Wang, Z., and Sarkar, F. H. (2008). Multi-targeted therapy of cancer by genistein. *Cancer letters* **In press**.
- Belinsky, S. A. (2005). Silencing of genes by promoter hypermethylation: key event in rodent and human lung cancer. *Carcinogenesis* **26**, 1481-1487.
- Brown, J. M., and Attardi, L. D. (2005). The role of apoptosis in cancer development and treatment response. *Nat Rev Cancer* **5**, 231-237.
- Cameron, E. E., Bachman, K. E., Myohanen, S., Herman, J. G., and Baylin, S. B. (1999). Synergy of demethylation and histone deacetylase inhibition in the re-expression of genes silenced in cancer. *Nature genetics* **21**, 103-107.
- Chen, T., Hevi, S., Gay, F., Tsujimoto, N., He, T., Zhang, B., Ueda, Y., and Li, E. (2007). Complete inactivation of DNMT1 leads to mitotic catastrophe in human cancer cells. *Nature genetics* **39**, 391-396.
- Cole, S. P., Bhardwaj, G., Gerlach, J. H., Mackie, J. E., Grant, C. E., Almquist, K. C., Stewart, A. J., Kurz, E. U., Duncan, A. M., and Deeley, R. G. (1992). Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line. *Science (New York, N.Y)* **258**, 1650-1654.
- Côté, S., and Momparler, R. L. (1995). Antineoplastic action of all-trans retinoic acid and 5-Aza-2'-deoxycytidine on human DLD-1 colon carcinoma cells. *Cellular Pharmacology* **2**, 221-228.
- Digel, W., and Lubbert, M. (2005). DNA methylation disturbances as novel therapeutic target in lung cancer: preclinical and clinical results. *Crit Rev Oncol Hematol* **55**, 1-11.
- Fang, M. Z., Chen, D., Sun, Y., Jin, Z., Christman, J. K., and Yang, C. S. (2005). Reversal of hypermethylation and reactivation of p16INK4a, RARbeta, and MGMT genes by genistein and other isoflavones from soy. *Clin Cancer Res* **11**, 7033-7041.

- Hurtubise, A., and Momparler, R. L. (2004). Evaluation of antineoplastic action of 5-aza-2'-deoxycytidine (Dacogen) and docetaxel (Taxotere) on human breast, lung and prostate carcinoma cell lines. *Anti-cancer drugs* **15**, 161-167.
- Jones, P. A., and Baylin, S. B. (2007). The epigenomics of cancer. *Cell* **128**, 683-692.
- Jones, P. A., and Taylor, S. M. (1980). Cellular differentiation, cytidine analogs and DNA methylation. *Cell* **20**, 85-93.
- Kikuno, N., Shiina, H., Urakami, S., Kawamoto, K., Hirata, H., Tanaka, Y., Majid, S., Igawa, M., and Dahiya, R. (2008). Genistein mediated histone acetylation and demethylation activates tumor suppressor genes in prostate cancer cells. *International journal of cancer* **123**, 552-560.
- Klein, C. B., and King, A. A. (2007). Genistein genotoxicity: critical considerations of in vitro exposure dose. *Toxicol Appl Pharmacol* **224**, 1-11.
- Mirski, S. E., Gerlach, J. H., and Cole, S. P. (1987). Multidrug resistance in a human small cell lung cancer cell line selected in adriamycin. *Cancer research* **47**, 2594-2598.
- Momparler, R. L. (2005). Epigenetic therapy of cancer with 5-aza-2'-deoxycytidine (decitabine). *Semin Oncol* **32**, 443-451.
- Momparler, R. L., and Ayoub, J. (2001). Potential of 5-aza-2'-deoxycytidine (Decitabine) a potent inhibitor of DNA methylation for therapy of advanced non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* **34 Suppl 4**, S111-115.
- Momparler, R. L., Bouffard, D. Y., Momparler, L. F., Dionne, J., Belanger, K., and Ayoub, J. (1997). Pilot phase I-II study on 5-aza-2'-deoxycytidine (Decitabine) in patients with metastatic lung cancer. *Anti-cancer drugs* **8**, 358-368.
- Patel, N., Adatia, R., Mellemaard, A., Jack, R., and Moller, H. (2007). Variation in the use of chemotherapy in lung cancer. *Br J Cancer* **96**, 886-890.
- Puck, T. T., and Marcus, P. I. (1955). A rapid method for viable cell titration and clone production with HeLa cells in tissue culture. The use of X-irradiated cells to supply conditioning factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **41**, 432-437.

- Raynal, N. J., Charbonneau, M., Momparler, L., and Momparler, R. L. (2008a). Synergistic Effect of 5-Aza-2'-deoxycytidine and Genistein in Combination Against Leukemia. *Oncology Research* **17**, 1-8.
- Raynal, N. J., Momparler, L., Charbonneau, M., and Momparler, R. L. (2008b). Antileukemic activity of genistein, a major isoflavone present in soy products. *J Nat Prod* **71**, 3-7.
- Schiller, J. H., Harrington, D., Belani, C. P., Langer, C., Sandler, A., Krook, J., Zhu, J., and Johnson, D. H. (2002). Comparison of four chemotherapy regimens for advanced non-small-cell lung cancer. *The New England journal of medicine* **346**, 92-98.
- Slovak, M. L., Ho, J. P., Bhardwaj, G., Kurz, E. U., Deeley, R. G., and Cole, S. P. (1993). Localization of a novel multidrug resistance-associated gene in the HT1080/DR4 and H69AR human tumor cell lines. *Cancer research* **53**, 3221-3225.
- Valeriote, F., and Lin, H. (1975). Synergistic interaction of anticancer agents: a cellular perspective. *Cancer Chemother Rep* **59**, 895-900.

Legends to figures:

Figure 1. Effect of the combination of 5-AZA-CdR and genistein in human lung adenocarcinoma cell line, Calu-6. (a) Loss of clonogenicity in Calu-6 cells ($n = 6$), after a 48 h treatment of 5-AZA-CdR (10 and 50 nM) and/or genistein (0.1 and 1 μ M). Data shown are mean values $\pm$ SEM ($n \geq 3$). Statistical significance ($P < 0.05$), between drug combination compared to single agent, is indicated by a star (*) at the top of the bars. (b) Photographs showing the loss of clonogenicity of Calu-6 colonies stained with methylene blue after a 48 h treatment of 5-AZA-CdR (10 and 50 nM) and/or genistein (0.1 and 1 μ M). (c) Haematoxylin eosin staining of Calu-6 cell exposed 48 h to 5-AZA-CdR at 50 nM) and/or genistein at 1 μ M (Magnification, x400). An arrow is pointing a gigantic cell.

Table 1. Loss of clonogenicity of H2087 human lung cancer cells following a 24 h treatment with genistein (5 μ M) and/or 5-AZA-CdR (220 nM). Data show mean values $\pm$ SD ($n = 1, 3$ replicates).

Table 2. Histological analysis of Calu-6 cells exposed 48 h to 5-AZA-CdR (50 nM) and/or genistein (1 μ M). After haematoxylin eosin staining, Calu-6 cells (100 cells) were analysed according their cellular characteristics (normal, necrotic, giant and mitosis).

Figure 2. Cell growth inhibition by the MTT assay on H69AR lung cancer resistant cells. H69AR cells were exposed 90 h to 5-AZA-CdR (0.1 and 0.5 μ M) and genistein (10 μ M). A control for drug resistance was generated with doxorubicin at 0.8 μ M. Each bar represents average of 6 independent experiments. Statistical significance ($P < 0.05$) between control and the agent alone is indicated by the letter "a" at the top of the bars and between single agent and combination is indicated by the letter "b" at the top of the bars.

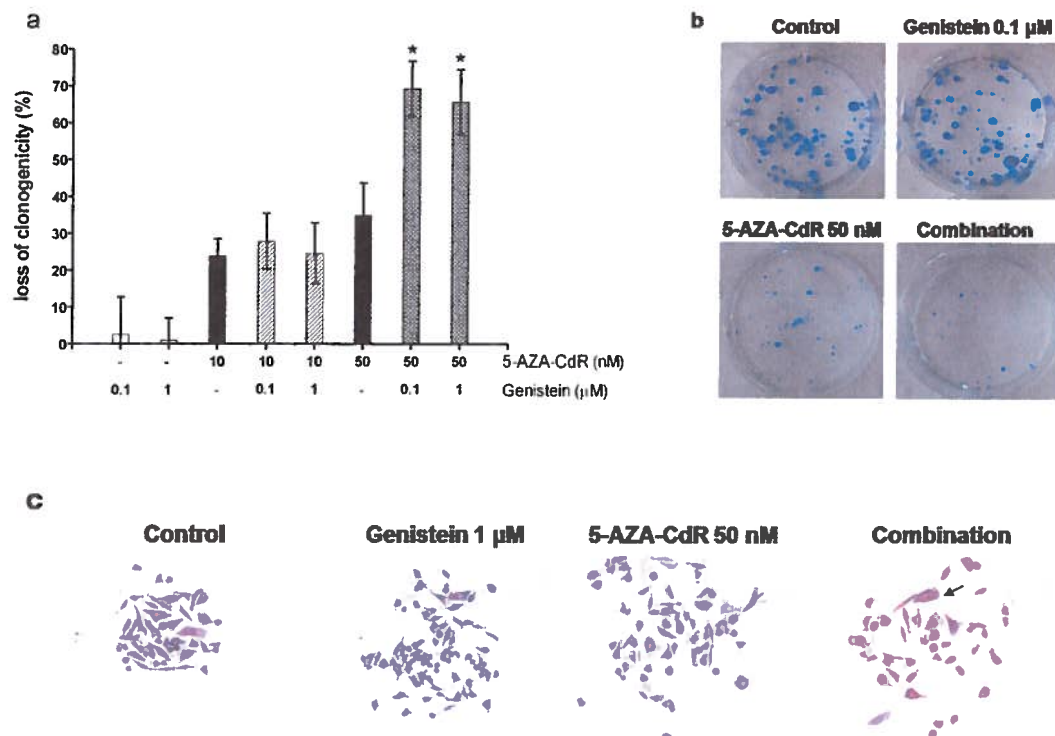


Figure 1.

Table 1.

Treatment	Loss of clonogenicity (%)
5-AZA-CdR (220 nM)	60 ± 4
Genistein (5 μ M)	3 ± 9
Combination	69 ± 3

Table 2.

<i>Groups</i>	<i>Cellular characteristics</i>				
	Normal cells	Necrotic cells	Giant cells	Mitosis	Total
Control	85	15	0	0	100
Genistein 1 μ M	58	31	6	5	100
5-AZA-CdR 50 nM	52	28	20	0	100
Combination	28	29	42	1	100

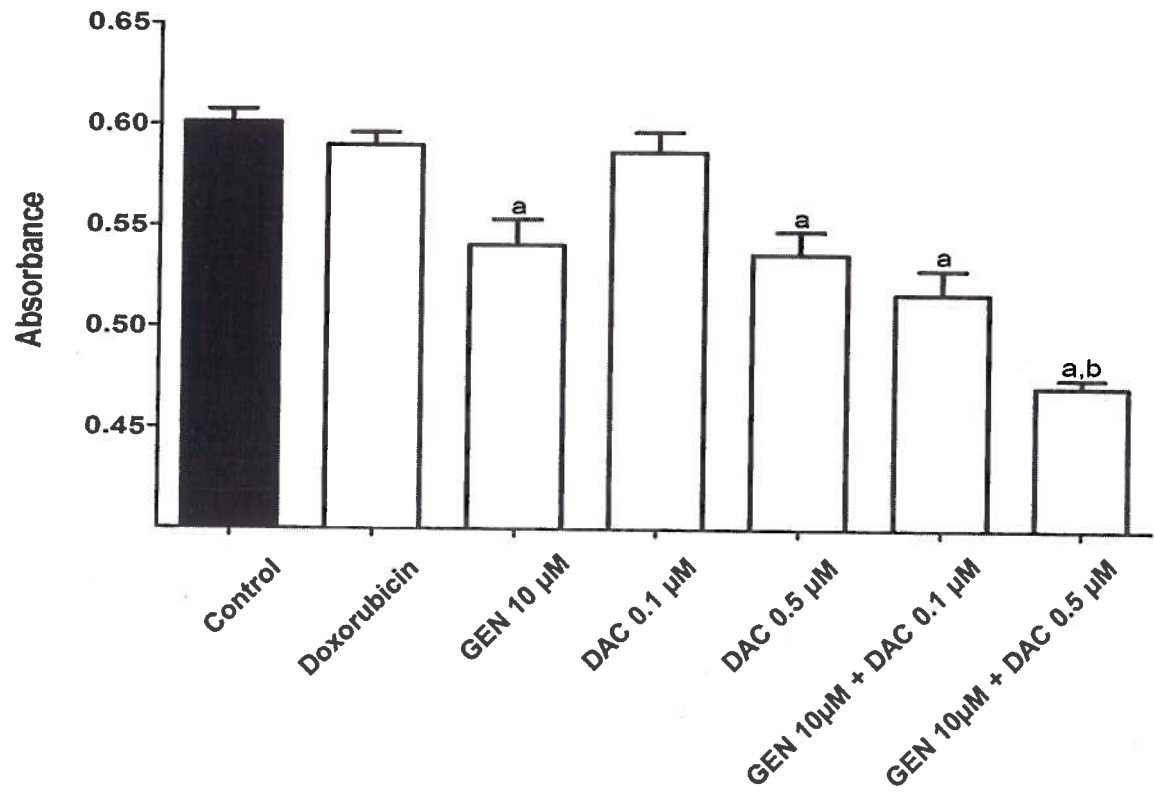


Figure 2.

TROISIÈME PARTIE : DISCUSSION ET CONCLUSIONS

Discussion

Les recherches décrites dans le cadre de cette thèse de doctorat ont porté dans un premier temps sur l'effet antileucémique de la génistéine. Selon notre recherche bibliographique, il n'y avait pas d'étude qui portait sur l'effet antileucémique de la génistéine lorsqu'elle était utilisée à des concentrations équivalentes à celles mesurées chez l'humain ayant pris des suppléments de génistéine ou une diète enrichie en soja. Ces travaux ont fait l'objet d'une publication dans une revue scientifique (*Journal of Natural Products*) en janvier 2008 (Raynal *et al.*, 2008b).

Comme nous l'avons déjà décrit dans la première partie de cette thèse, l'efficacité de la thérapie contre le cancer dépend de son potentiel à cibler les CSC. Bien que de nombreuses questions restent encore sans réponse au sujet des CSC, on sait qu'elles ont la capacité de former des clones de façon illimitée. Les CSC sont responsables de la propagation de la maladie et des métastases. Ainsi, le but de la chimiothérapie est d'éradiquer la clonogénicité des CSC (Jordan, 2005; Ravandi et Estrov, 2006; Kvinlaug et Huntly, 2007). Notre objectif a été d'évaluer l'effet de la génistéine sur le potentiel clonogénique des cellules leucémiques. Les types de cellules leucémiques étudiées sont des cellules qui ont la capacité de former des clones comme les CSL. En effet, on dénombre environ 50 à 70 % des cellules de ces lignées cellulaires qui possèdent la capacité de former des colonies. Ainsi, pour étudier l'effet de la génistéine sur ce paramètre clé de l'évaluation des agents anticancéreux, nous avons utilisé la technique du test de clonogénicité développée au milieu des années cinquante par Puck et Markus (Puck et Marcus, 1955).

Cette technique est basée sur l'étude de la capacité des cellules cancéreuses à proliférer en s'autorenouvelant *in vitro* jusqu'à la formation de colonies (> 50 cellules) qui sont visibles à l'œil nu en général entre 10 et 20 jours après la fin du traitement. De fait, le test de

clonogénicité intègre de façon simultanée toutes les formes de mort cellulaire. En effet, la mort des cellules cancéreuses causées par les médicaments chimiothérapeutiques peut se produire de différentes manières et selon des cinétiques différentes. On distingue généralement différents types de mort cellulaire comme l'apoptose, la nécrose, la catastrophe mitotique et la sénescence. L'apoptose a d'ailleurs un rôle mineur dans la réponse à la chimiothérapie puisque la voie de l'apoptose est inactivée dans la plupart des cellules cancéreuses (Brown et Attardi, 2005). Cette évaluation à long-terme de l'effet des agents anticancéreux est plus représentative de la réponse thérapeutique (Brown et Attardi, 2005). C'est un avantage par rapport aux tests qui mesurent un seul type de mort cellulaire. Les tests de toxicité à court terme comme les tests de lactate déshydrogénase (LDH), de 3-(4,5-diméthyl-2-thiazolyl)-2,5-diphényl-2H-tétrazolium bromide (MTT) ou autres peuvent donner une mauvaise estimation de la cytotoxicité des agents anticancéreux par rapport à la survie à long terme évaluée par le test de clonogénicité. Aussi, les tests qui mesurent uniquement l'inhibition de la croissance cellulaire après un temps court de traitement pourraient donner des résultats erronés. En effet, l'inhibition de la croissance peut se produire seulement pendant la présence du traitement. Les cellules cancéreuses ou les CSC pourraient survivent et recommencer à proliférer une fois que le médicament n'est plus présent dans le milieu de culture. Ces arguments démontrent qu'il est donc important de considérer qu'un test de survie à long-terme comme le test de clonogénicité donne une évaluation précise de l'effet anticancéreux des médicaments. Nous choisissons ainsi ce test pour l'étude de la cytotoxicité *in vitro*.

Toutefois, il y a des inconvénients à l'utilisation des tests de clonogénicité. En effet, ils mesurent la capacité d'une cellule à former une colonie dans des conditions qui sont très spécifiques. En effet, la réalisation de ce test implique la dilution de la suspension cellulaire à un point tel où les conditions de concentrations en oxygène et en éléments nutritifs du milieu de croissance ne ressemblent pas à celles retrouvées dans l'environnement des cellules cancéreuses *in vivo* (Minchinton et Tannock, 2006). De plus, les cellules ainsi isolées ne sont pas en contact avec d'autres cellules comme dans les tumeurs *in situ* (Brown et Attardi, 2005). En dépit de ces limites, le test de clonogénicité

reste le plus efficace à l'heure actuelle pour déterminer la mort des cellules cancéreuses suivant l'exposition à un agent anticancéreux (Brown et Attardi, 2005).

Nos résultats sont les premiers à démontrer que la génistéine possède une activité anticancéreuse à des concentrations nutritionnelles dont l'effet principal est de produire la perte de la clonogénicité des cellules leucémiques lymphoïdes et myéloïdes (Raynal *et al.*, 2008b). Ces données ont un potentiel clinique important, notamment pour des patients âgés ou dont l'état de santé ne permet pas de supporter une chimiothérapie cytotoxique. De plus, la génistéine pourrait jouer un rôle prépondérant si elle est administrée entre les cycles de thérapie. En effet, durant ces quelques semaines, elle permettrait de réduire la progression des cellules leucémiques. Cet effet pourrait être intéressant chez des patients qui doivent attendre 4 à 5 semaines entre les cycles de chimiothérapie afin de permettre le rétablissement du système hématopoïétique. Un tel effet donnerait un rôle important à la génistéine dans le contrôle de la progression de la leucémie.

De plus, dans les cellules leucémiques humaines HL-60, la génistéine produit la ré-expression d'un TSG, le gène $p57^{KIP2}$ (Raynal *et al.*, 2008b). Lors de ces expériences, nous avons mesuré l'expression de nombreux gènes dont la liste est présentée en appendice C. Le gène $p57^{KIP2}$ a été le seul gène testé dans cette lignée cellulaire dont le niveau d'expression était modifié par la génistéine. La réactivation de ce gène est particulièrement intéressante car ce dernier est réprimé dans la lignée cellulaire HL-60 par une hyperméthylation de l'ADN au niveau de son promoteur. Nous avons aussi observé que la génistéine produisait une légère déméthylation des cytosines du promoteur du gène $p57^{KIP2}$. D'autres travaux ont montré que la génistéine avait une faible capacité à inhiber la méthylation de l'ADN (Fang *et al.*, 2005). Une hyperméthylation du gène $p57^{KIP2}$ est retrouvée chez des patients leucémiques et elle est associée à un pronostique défavorable (Shen *et al.*, 2003). Ainsi, cet effet souligne le potentiel de la génistéine à agir sur des mécanismes épigénétiques.

Le mécanisme précis par lequel la génistéine exerce son action antileucémique est difficile à caractériser. En effet, la génistéine produit *in vitro* une multitude d'effets sur des voies moléculaires impliquées dans le cancer comme l'inhibition des tyrosines kinases (produisant l'inhibition de la croissance cellulaire), l'inhibition des topoisomérases, le déclenchement de l'apoptose, un effet clastogénique, l'inhibition de l'angiogenèse, l'inhibition de l'invasion tissulaire et des métastases Ces effets pourraient être reliés à l'effet spécifique de la génistéine sur les voies de signalisation de l'Akt, NFκB et Bax/Bcl-2 (Banerjee *et al.*, 2008). Il est toutefois difficile de conclure que ces mécanismes se produisent *in vivo* chez l'humain car la grande majorité de ces études ont été réalisées *in vitro* à des concentrations supérieures aux concentrations nutritionnelles mesurées chez l'humain. Toutefois, une expérience préliminaire sur des volontaires sains a prouvé que la prise d'un mélange de 50 mg d'isoflavones incluant la génistéine (deux fois par jours pendant trois semaines) a réduit l'activation de NFκB dans les lymphocytes (Davis *et al.*, 2001). Cette voie cellulaire est normalement activée lors de stress cellulaires comme l'oxydation. Donc des suppléments d'isoflavone du soja peuvent protéger les cellules du stress oxydatif en induisant une baisse de l'activation de NFκB, ce qui contribue à diminuer les adduits à l'ADN et pourrait être la cause du mécanisme chimiopréventif de la génistéine (Davis *et al.*, 2001). Hormis le cas de cette étude, la majorité des travaux sur la génistéine a été réalisée *in vitro* à des concentrations dépassant de loin le niveau de génistéine atteignable chez l'humain (Klein et King, 2007).

Les effets de la génistéine mentionnés dans la littérature doivent être reconsidérés en fonction de la dose (Klein et King, 2007). En effet, on détermine que des concentrations *in vitro* supérieure à 5μM ne sont pas envisageables *in vivo*. Chez l'humain, les niveaux plasmatiques et sériques de génistéine non conjuguée varient de moins de 1 μM à 5 μM. La plus grande partie de la génistéine est liée aux protéines sériques. La fraction libre de la génistéine dans le sérum est plus probablement de l'ordre du nanomolaire. Les effets de la génistéine dans l'induction de l'apoptose des cellules cancéreuses n'ont pas été démontré à des concentrations inférieures à moins de 5 μM (Klein et King, 2007), ce qui confirme nos résultats *in vitro* dans les cellules leucémiques (voir les résultats de la deuxième partie, section 2). De plus, il est peu probable que la génistéine produise une inhibition des

topoisomérases à des concentrations nutritionnelles (Klein et King, 2007). De même, son effet sur les tyrosines kinases (Akiyama *et al.*, 1987) ne semble pas se produire à des doses atteignables chez l'humain. Une diminution de l'activité des tyrosines kinases est considérée comme un facteur important dans le traitement et la prévention du cancer puisque cette voie est suractivée dans les cellules cancéreuses. D'autres travaux sur l'inhibition des tyrosines kinases et l'arrêt du cycle cellulaire chez l'humain seront nécessaires pour clarifier cet effet. Toutefois, la génistéine à des concentrations atteignables par la diète (0,5 μM pendant 6 jours) produit des effets épigénétiques sur induisant une réexpression de TSG (*p16*, *RAR β 2*, *MGMT*) et une déméthylation de l'ADN de leurs promoteurs ainsi qu'une faible inhibition de la DNMT1 ($\text{IC}_{50} \sim 67 \mu\text{M}$) dans des cellules de cancer de l'œsophage et de la prostate (Fang *et al.*, 2005). Notre hypothèse, en regard de l'activité antileucémique de la génistéine à des concentrations atteignables chez l'humain est que cet effet est causé par la somme des effets inhibiteurs et inducteurs sur les voies moléculaires utilisées par les cellules cancéreuses produisant la perte de clonogénicité des cellules leucémiques.

Après avoir évalué l'effet *in vitro* de la génistéine, nous avons mené des recherches pour étudier son effet *in vivo* dans un modèle de leucémie. En effet, la confirmation des expériences *in vitro* par des résultats *in vivo* est essentielle dans l'évaluation préclinique des médicaments. Nous avons utilisé le modèle de leucémie lymphoblastique murine L1210. Il s'agit d'un modèle dans lequel on injecte des cellules leucémiques murines de type L1210 dans la veine latérale de la queue des souris. Ce type d'administration produit une distribution anatomique des cellules leucémiques semblable à celle observée dans la maladie chez l'humain. En effet, les cellules L1210 se propagent dans le système circulatoire, forment des nodules dans la rate et le foie et vont se propager dans le système nerveux des souris souvent en phase terminale (ce qui correspond chez les patients aux leucémies dites méningées). L'utilisation des cellules L1210 ayant un fort potentiel clonogénique confère à ce modèle *in vivo* une grande reproductibilité en ce qui a trait à la progression de la leucémie et au temps de survie des souris. En effet, les souris leucémiques, auxquelles on a injecté le même nombre de cellules (10 000 dans le cas de nos expériences) meurent dans un laps de temps très rapproché. Des études ont montré

qu'il existait une relation directe entre le nombre de cellules injectées et le temps de survie des souris (Momparler et Gonzales, 1978). L'injection i.v. d'une seule cellule leucémique L1210 produit la mort de la souris causée par la leucémie en 14 jours ce qui démontre que la population des cellules L1210 transplantées *in vivo* a des caractéristiques qui s'apparentent fortement aux CSL (Momparler et Gonzales, 1978). Dans ce modèle, le déclenchement de la maladie est plus rapide que dans les modèles génétiquement modifiés de leucémie (Kuo *et al.*, 2006) et il est plus précis en ce qui a trait au temps de survie que les modèles de souris immunodéficientes transplantées avec des cellules humaines (Shen *et al.*, 2007). Le modèle de leucémie L1210 est intéressant pour caractériser l'effet antileucémique de nombreuses molécules. Il a d'ailleurs servi à l'étude et à la mise au point du traitement de la leucémie par un analogue de nucléoside, la cytosine arabinoside (ARA-C). Les résultats obtenus avec l'ARA-C dans ce modèle se sont montrés représentatifs des réponses obtenues chez les patients atteints de leucémies myéloblastiques aiguës traités à l'ARA-C à haute dose (Momparler *et al.*, 1984; Mayer *et al.*, 1994).

Ce modèle présente toutefois certaines limites pour ce qui est de l'étude de la génistéine *in vivo*. En effet, la souche de souris utilisées dans ce modèle (CD2F1) est connue pour métaboliser la génistéine avec une demi-vie d'élimination inférieure à 15 minutes en formant un produit inactif de façon très rapide. Le pic plasmatique de génistéine totale (fraction libre et conjuguée) ne dépasse pas la concentration de 1 μM (Supko et Phillips, 1995). De plus, cette concentration maximale de l'ordre du micromolaire ne peut être maintenue pendant de longues périodes à cause de la demi-vie d'élimination de la génistéine. Ainsi dans le cas de l'administration orale de la génistéine chez ces souris, la concentration est dépendante de leur habitude alimentaire. Étant donnée que les souris se nourrissent uniquement la nuit et par périodes espacées, les niveaux de génistéine ne sont pas constants dans le plasma de ces souris. Ainsi, l'exposition des cellules leucémiques *in vivo* doit se faire par courte période et à une concentration maximale de génistéine totale de l'ordre d'un micromolaire. Malgré cet inconvénient, nous avons choisi de caractériser l'effet de la génistéine *in vivo* avec le modèle L1210 car il est reproductif quant au temps de survie des souris leucémiques. De plus, ce modèle sera très utile pour l'étude avec la 5-

AZA-CdR (voir plus bas), car dans ce modèle, l'activité des analogues de nucléoside comme l'ARA-C et la 5-AZA-CdR est très représentative des résultats qui peuvent être obtenus en clinique (Rivard *et al.*, 1981; Momparler, 2005b). De plus, il a été démontré dans ce modèle *in vivo* que la 5-AZA-CdR inhibe la méthylation de l'ADN des cellules L1210 de façon dose-dépendante (Wilson *et al.*, 1983).

Notre approche a été d'administrer la génistéine à des souris atteintes de la leucémie. Nous avons choisi de traiter les souris par la diète ce qui présente l'avantage de ne pas être une approche invasive. Ainsi, les souris ont été nourries par une diète enrichie en génistéine à 0,5 % donnant un apport quotidien de génistéine de 0,6 g/kg. Il est intéressant de noter que des expériences *in vivo* dans une autre souche de souris ont montré qu'une diète donnant un apport quotidien de 0,3 g/kg produisait un effet épigénétique induisant des changements de la méthylation de l'ADN de la prostate (Day *et al.*, 2002). Lors du changement de la diète contrôle à la diète enrichie en génistéine, les souris arrêtaient de s'alimenter. Étant donné que les deux diètes avaient des odeurs légèrement différentes, il est possible que les souris accoutumées à la diète régulière montraient une aversion pour la nouvelle diète. Le protocole utilisé pour que les souris consomment la diète enrichie en génistéine était de placer au-dessus de la cage des souris, un récipient, non-accessible contenant de la diète régulière broyée afin de l'odeur de celle-ci couvre l'odeur de la nouvelle diète. En effet, après une période de 2-3 jours où les souris s'alimentaient très peu et perdaient du poids (environ 8 % de perte de poids), les animaux recommençaient à se nourrir. Une période d'adaptation pouvait durer une dizaine de jours jusqu'au moment où les souris se remettaient à consommer quotidiennement la même quantité de nourriture que les souris nourries à la diète régulière (2-3 g par jour). Par la suite, on injectait les cellules leucémiques chez les souris contrôles et chez les souris nourries à la diète enrichie en génistéine.

Nos résultats ont montré que la génistéine administrée dans l'alimentation des souris CD2F1 augmente faiblement (une demi-journée) mais de façon significative le temps de survie des souris leucémiques. En effet, toutes les souris du groupe contrôle présentaient

des signes cliniques de leucémie avancée alors que les souris nourries à une diète enrichie en génistéine ne présentaient aucun signe de progression de la maladie (Raynal *et al.*, 2008b). Les signes cliniques permettant de faire le diagnostic de la leucémie chez ces souris étaient basés sur l'observation de l'aspect général des souris comme l'augmentation du volume corporel, le poil hérissé, un ralentissement de leur niveau d'activité et parfois des difficultés à respirer. Certaines souris étaient disséquées pour confirmer la cause du décès. Dans ce cas, on observait une augmentation de la taille du foie et de la rate avec la présence de nombreuses formations tumorales dans ces organes. Les résultats *in vivo* sont la confirmation de nos résultats *in vitro*.

Après avoir démontré dans un premier temps l'effet de la génistéine, nous avons ensuite étudié l'effet de la combinaison de la génistéine avec la 5-AZA-CdR dans des modèles *in vitro* et *in vivo* de leucémies. Ces résultats ont été publiés dans la revue scientifique *Oncology Research* (Raynal *et al.*, 2008a). L'intérêt d'utiliser la 5-AZA-CdR, un médicament épigénétique, pour la chimiothérapie provient du fait que cet analogue de nucléoside permet de réexprimer les TSG inhibés par un mécanisme épigénétique : l'hyperméthylation de l'ADN (Jones et Baylin, 2007). Dans le cas plus précis des leucémies, on retrouve souvent la présence de plus d'une trentaine de gènes dont le promoteur est hyperméthylé (Kuang *et al.*, 2008). La 5-AZA-CdR présente un grand potentiel pour le traitement des leucémies en inhibant de façon irréversible la DNMT1 où elle réactive l'expression de ces TSG ce qui produit la mort des cellules cancéreuses (Momparler, 2005a). La 5-AZA-CdR a été approuvée en 2006 pour le traitement des SMD. À l'heure actuelle, l'utilisation de la 5-AZA-CdR est en cours d'évaluation pour les leucémies myéloblastiques aiguës et chroniques. Son utilisation a permis d'améliorer la qualité de vie et l'espérance de survie de ces patients pour lesquels les soins palliatifs étaient la seule option thérapeutique (Jabbour *et al.*, 2008). Toutefois, la dose et le temps d'administration de la 5-AZA-CdR doivent encore être optimisés pour le traitement des hémopathies malignes et aussi en ce qui a trait au traitement des tumeurs solides. En effet, l'ensemble des résultats précliniques et les résultats de certaines études cliniques suggèrent qu'une dose d'administration différente pourrait augmenter significativement

les effets cliniques de la 5-AZA-CdR par rapport à ceux obtenus avec la posologie utilisée à l'heure actuelle (Momparker et Raynal, 2007; Jabbour *et al.*, 2008; Lemaire *et al.*, 2008).

En chimiothérapie, l'utilisation de combinaison de médicaments est un pré-requis pour augmenter l'efficacité thérapeutique et lutter contre la résistance aux médicaments. La combinaison de la 5-AZA-CdR avec d'autres agents notamment des inhibiteurs des mécanismes épigénétiques a été l'objet de nombreuses études. Ces recherches ont été basées sur la découverte que la combinaison de la 5-AZA-CdR avec un inhibiteur d'histone acétyltransférase (la trichostatine A) produit une plus grande réactivation de TSG tel que démontré par Cameron et ses collègues (Cameron *et al.*, 1999). Comme la génistéine possède une faible activité de modulateur épigénétique *in vivo* et *in vitro*, elle pourrait augmenter l'activité antinéoplasique de la 5-AZA-CdR.

Nos travaux ont montré pour la première fois qu'une combinaison entre la génistéine et la 5-AZA-CdR produisait un effet synergique sur la perte de clonogénicité des cellules leucémiques lymphoïdes et myéloïdes. De plus, cette combinaison est efficace contre les cellules leucémiques résistantes à la 5-AZA-CdR (Raynal *et al.*, 2008a). Ces résultats *in vitro* nous ont conduits à émettre l'hypothèse que l'interaction synergique entre la 5-AZA-CdR et la génistéine devait se produire dans d'autres types de cellules cancéreuses. Ainsi, nous avons évalué le potentiel de cette combinaison *in vitro* sur différentes lignées cellulaires de cancer du poumon (deuxième partie, section 3), puis sur des lignées de cancer du sein et du colon (Appendice E et F). L'effet de cette combinaison était évalué en mesurant les effets sur la clonogénicité et sur la morphologie sur les cellules tumorales. L'ensemble des effets morphologiques de la 5-AZA-CdR et/ou de la génistéine est présenté en appendice D. Les résultats ont montré que la combinaison de la 5-AZA-CdR et de la génistéine produisait, contre des cellules de cancer du poumon, une perte de clonogénicité additive avec les cellules H2087 et synergique avec les cellules Calu-6. Contre les cellules du cancer du sein et du colon, la combinaison produisait une augmentation de la perte de clonogénicité par rapport à l'effet de la 5-AZA-CdR. L'effet de la 5-AZA-CdR combinée à la génistéine produisait une augmentation des changements

morphologiques (cellules nécrotiques et cellules géantes) dans toutes les lignées cellulaires étudiées (Appendice D). Ainsi, l'ensemble de ces résultats confirment notre hypothèse selon laquelle la combinaison de la 5-AZA-CdR et de la génistéine a le potentiel de produire une réponse anticancéreuse applicable à de nombreux types de cellules cancéreuses même celles ayant acquis la capacité de résistance aux analogues de nucléosides comme la lignée L1210/ARAC (deuxième partie section 2, appendice G) ou à de nombreux médicaments anticancéreux utilisés en clinique comme la lignée H69AR (deuxième partie, section 3).

Le potentiel de la combinaison entre la 5-AZA-CdR et la génistéine, démontré *in vitro*, a été évalué dans un modèle *in vivo*. En effet, la démonstration de l'efficacité dans des modèles précliniques *in vivo* est un pré-requis pour faire une demande d'étude clinique. Comme nous l'avons vu plus haut, les souris étaient nourries à la diète enrichie 10 jours avant le début de l'expérience (injection des cellules leucémiques) pour éviter les variations du poids des animaux pendant l'expérience. L'infusion i.v. de la 5-AZA-CdR ne produisait pas de changement du poids des animaux à la dose testée (2 mg/kg pour une infusion de 8 h) et les changements hématopoïétiques étaient réversibles (Momparler et Gonzales, 1978). Toutefois, la 5-AZA-CdR infusées 8 h de 25 à 45 mg/kg est associée à des pertes de poids, une toxicité hématopoïétique voire de la mortalité (Momparler et Frith, 1981). La dose de 2 mg/kg pour une infusion de 8 h i.v. a été choisie car elle se trouve au début de la partie linéaire de la courbe dose-réponse de la 5-AZA-CdR sur le temps de survie des souris (Appendice H). De cette façon, la dose de 2 mg/kg permet de se placer dans les conditions expérimentales optimales pour évaluer l'augmentation du temps de survie lors du traitement combiné avec la génistéine. Cette combinaison a produit une augmentation significative de la survie des souris transplantées avec des cellules leucémiques. Le résultat de cette expérience démontre que la combinaison de la génistéine et de la 5-AZA-CdR produit un effet anticlonogénique synergique *in vivo* sur la population de cellules leucémiques dont une grande majorité possède des caractéristiques propres aux CSL. Le fait que l'interaction entre ces deux agents anticancéreux soit modérée, mais significative en terme d'augmentation du temps de survie est probablement causée par le faible niveau plasmatique de génistéine dû à l'inactivation rapide de cette

isoflavone dans cette souche de souris (Supko et Phillips, 1995). Des niveaux plus élevés de génistéine sont potentiellement atteignables chez l'humain à cause d'une demi-vie plus longue (Klein et King, 2007). De tels niveaux pourraient produire chez l'humain un plus grand effet cytotoxique contre les cellules leucémiques. Cette expérience démontre le potentiel thérapeutique intéressant de la combinaison de la 5-AZA-CdR et de la génistéine.

Les mécanismes moléculaires responsables de l'interaction entre la génistéine et la 5-AZA-CdR sont complexes à déterminer avec précision. Comme nous l'avons démontré l'interaction produit des changements morphologiques des cellules puis la perte de clonogénicité. Lors de la recherche de la cause de l'interaction entre la génistéine et la 5-AZA-CdR, nous avons démontré que la présence de la génistéine n'augmente pas l'incorporation de la 5-AZA-CdR dans l'ADN des cellules leucémiques (Raynal *et al.*, 2008a). Ainsi, l'interaction entre la génistéine et la 5-AZA-CdR ne se situe pas au niveau d'une activation de l'effet de la 5-AZA-CdR. Toutefois, une explication possible de la cause de cette interaction entre la 5-AZA-CdR et la génistéine réside au niveau de la DNMT. En effet, ces deux agents anticancéreux sont des inhibiteurs de la DNMT, la 5-AZA-CdR étant un inhibiteur irréversible (Momparker, 2005b) et la génistéine étant un faible inhibiteur de cette enzyme (Fang *et al.*, 2005). De plus, la génistéine lors de nos expériences sur la lignée leucémique humaine HL-60 a montré qu'elle produisait une réactivation du gène *p57* associée à une faible déméthylation de son promoteur. La combinaison de ces deux molécules pourrait conduire à une plus grande inhibition de cette enzyme. D'ailleurs, il a récemment été démontré que l'inactivation de la DNMT1 produit une baisse globale de la méthylation de l'ADN d'environ 10 % qui est associée à des changements morphologiques des cellules humaines de cancer colorectal (Chen *et al.*, 2007). Ces cellules, où la DNMT1 était inactivée, présentaient des changements morphologiques ainsi que l'apparition de cellules géantes (comme nous avons observé dans nos expériences sur les cellules tumorales). Ces cellules survivaient quelques jours et finissaient par mourir (Chen *et al.*, 2007). L'importance de l'inactivation de la fonction de la DNMT1 liée aux changements morphologiques et à la mort cellulaire pourrait expliquer en partie les effets de la combinaison entre la 5-AZA-CdR et la génistéine.

L'interaction entre la génistéine et la 5-AZA-CdR peut aussi se produire à un autre niveau. En effet, la réactivation de certains gènes par la 5-AZA-CdR pourrait entrer en interaction avec des protéines dont le niveau de phosphorylation est inhibé par l'action de la génistéine en tant qu'inhibiteur des tyrosines kinases. Les inhibiteurs spécifiques des tyrosines kinases font partis d'une nouvelle voie de recherche en oncologie moléculaire. En effet, l'amplification génique de certains récepteurs de tyrosines kinases dans les cellules cancéreuses a conduit au développement de la première thérapie ciblée en utilisant un anticorps spécifique, le trastuzumab (Herceptin, Genetech, Inc.). Ensuite, d'autres petites molécules qui inhibent l'activité des tyrosines kinases, ont été au centre d'une course à la recherche et au développement par les industries pharmaceutiques. Parmi ces petites molécules, l'imatinib ou Glivec (Novartis) a été le premier inhibiteur sélectif approuvé par la FDA pour le traitement du cancer (Gschwind *et al.*, 2004). Ainsi, la suractivation des tyrosines kinases est une cible de choix pour le traitement du cancer. La génistéine s'inscrit dans les approches d'inhibition des tyrosines kinases tel que le trastuzumab et l'imatinib. La combinaison entre un inhibiteur de tyrosines kinases et un agent épigénétique représente une voie de recherche très intéressante pour l'éradication des cellules cancéreuses (Gschwind *et al.*, 2004).

Une autre explication possible de l'interaction se situe au niveau du cycle cellulaire des cellules cancéreuses. En effet, durant les 48 h de traitement réalisé lors des expériences *in vitro*, une fraction des cellules est bloquée en phase G2/M du cycle cellulaire par l'action anticancéreuse de la génistéine. Une autre fraction des cellules cancéreuses en phase S du cycle cellulaire est sensible à l'action anticancéreuse de la 5-AZA-CdR. Parmi ces cellules en phases S, il y a trois cas de figures, (1) une certaine proportion va mourir à cause de la réactivation des TSG par la 5-AZA-CdR (Jabbour *et al.*, 2008); (2) une autre fraction sera atteinte uniquement par l'action épigénétique de la 5-AZA-CdR mais pourra reméthyler ses TSGs et survivre (Egger *et al.*, 2007), (3) enfin une dernière fraction ne sera pas affectée par la 5-AZA-CdR (cellules résistantes) grâce aux mécanismes de résistance à ce médicament (Momparler, 2005b). Étant donnée que les cellules dans le premier cas de figure arrêteront leur croissance et seront éliminées par la 5-AZA-CdR, seules les cellules des 2 autres cas de figures progresseront dans le cycle cellulaire vers les phases G2 puis M

où elles seront arrêtées dans cette phase du cycle cellulaire à cause de l'action de la génistéine. Ainsi, les paramètres cinétiques des cellules cancéreuses, pourraient jouer un rôle important dans l'explication de l'interaction entre la 5-AZA-CdR et la génistéine.

Bien que les effets de la génistéine aient une conséquence sur la perte du potentiel clonogénique des cellules cancéreuses, son mécanisme d'action provient d'un ensemble d'effets sur une multitude de voies cellulaires. En ce qui a trait au mode d'action de la 5-AZA-CdR, il est basé sur l'inhibition de la méthylation de l'ADN et la réexpression de nombreux TSG. Or, l'incorporation de cet analogue de nucléoside se fait au hasard, ce qui provoque une réactivation aléatoire de nombreux TSG. Ainsi, il y a peu de chance pour que l'explication de l'interaction synergique réside sur une voie moléculaire spécifique. Cet effet serait plutôt le résultat d'une action coordonnée entre la réactivation par la 5-AZA-CdR de certains gènes jouant un rôle clé dans des voies moléculaires modifiées par la génistéine. En conclusion, il sera difficile d'élucider avec précision les causes moléculaires de l'interaction entre la 5-AZA-CdR et de la génistéine à cause de l'action pléiotropique et simultanée de cette isoflavone sur une multitude de voie cellulaire impliquées dans le cancer (Banerjee *et al.*, 2008).

L'ensemble de ces travaux et le potentiel clinique de cette combinaison ont fait l'objet du dépôt d'une demande provisoire de brevet au Bureau américain des brevets et des marques de commerce (N°: 60/939,752) en mai 2007 qui a été suivie par le dépôt officiel en mai 2008. Aussi, ce brevet est l'objet d'une protection intellectuelle au Canada grâce au dépôt de l'invention à l'Office de la propriété intellectuelle du Canada, en mai 2007 (N°: 2,590,048). Aux États-Unis et au Canada, le brevet se retrouve sous le nom de : «CYTOSINE NUCLEOSIDE ANALOGS AND ISOFLAVONES AND USES THEREOF».

Le travail expérimental effectué dans le cadre de ce doctorat présente un intéressant potentiel clinique pour le traitement du cancer. En effet, il y a un besoin urgent de trouver de nouvelles approches thérapeutiques pour améliorer les thérapies où le taux de survie à 5

ans est de l'ordre de 20 % pour les leucémies myéloïdes aiguës. De plus, la majorité des patients âgés atteints de LAM qui reçoivent un traitement standard ont une espérance de survie de moins d'un an (Estey et Dohner, 2006). La 5-AZA-CdR produit une meilleure réponse clinique que les thérapies conventionnelles et améliore la qualité de vie de ces patients (Estey, 2007). Ainsi, la combinaison avec la génistéine s'avère répondre à un besoin clinique important. La génistéine est une molécule non-toxique qui peut être ajoutée à la thérapie épigénétique de la 5-AZA-CdR sans produire d'effets secondaires menaçant la survie des patients dont l'âge ou l'état de santé ne leur permet pas d'être traités avec des thérapies cytotoxiques. En effet, la majorité des patients atteints de SMD ou de LAM ont plus de 70 ans et souffrent de comorbidités limitant l'usage des traitements plus efficaces à haute dose utilisés pour traiter de plus jeunes patients (thérapie à l'ARA-C à haute dose et greffe de moelle). La génistéine peut être administrée pendant de longue période sans produire d'effets secondaires (concentrations plasmatiques de l'ordre de 5 μ M) et réduire la progression de la maladie. De plus, associées à la 5-AZA-CdR, des doses de génistéine atteignables chez les patients leucémiques peuvent conduire à un plus grand effet thérapeutique sans induire d'augmentation de la toxicité. Nous avons aussi démontré que la présence de la génistéine n'augmente pas l'incorporation de la 5-AZA-CdR dans l'ADN des cellules en division, ce qui ne produirait pas d'augmentation de la toxicité de la 5-AZA-CdR pour les cellules normales (Raynal *et al.*, 2008a).

La chimiothérapie du cancer du poumon n'est pas très efficace et elle a atteint un plateau thérapeutique (Schiller *et al.*, 2002). En effet, moins de 10% des patients survivent 5 ans à la maladie (Digel et Lubbert, 2005). Dans le cancer du poumon, de nombreux TSG sont inhibés par une hyperméthylation de l'ADN de la région promotrice (Belinsky, 2005). On détecte, d'ailleurs dans l'expectorat de 100 % des patients une hyperméthylation des TSG de 5 à 35 mois avant la détection clinique de la maladie (Palmisano *et al.*, 2000). Il est évident que la meilleure chance de survie des patients est de leur fournir un diagnostic précoce. L'hyperméthylation de l'ADN offre ainsi un potentiel intéressant pour la détection de la maladie. La 5-AZA-CdR a aussi montré un potentiel très intéressant pour le traitement du cancer du poumon (Momparler *et al.*, 1997; Momparler et Ayoub, 2001). Un des problèmes de la thérapie intensive de la 5-AZA-CdR est l'intervalle de 6 semaines à

respecter entre les cycles de 5-AZA-CdR afin de permettre le rétablissement du système hématopoïétique suite à la toxicité de la 5-AZA-CdR. Durant cet intervalle, la croissance tumorale peut progresser et les cellules peuvent former de nouvelles métastases. Ces phénomènes peuvent être inhibés partiellement par l'administration de la génistéine entre les cycles de la 5-AZA-CdR sans augmenter la toxicité de celle-ci. De plus, un niveau plasmatique de génistéine pourra augmenter l'activité de la 5-AZA-CdR contre les cellules cancéreuses du poumon tel que démontré dans la section 3 du deuxième chapitre de la thèse.

L'application de nos recherches en clinique doit s'appuyer sur une bonne connaissance pharmacocinétique et pharmacodynamique des médicaments pour atteindre les doses efficaces de la génistéine et de la 5-AZA-CdR chez le patient. Concernant la génistéine, de nombreuses études ont déjà caractérisé ces paramètres. La posologie optimale de la génistéine pour obtenir des concentrations de l'ordre du micromolaire est connue (Bloedon *et al.*, 2002; Miltyk *et al.*, 2003; Takimoto *et al.*, 2003). Cependant, la posologie optimale de la 5-AZA-CdR n'est pas encore déterminée (Jabbour *et al.*, 2008). Des travaux du laboratoire, publiés dans la revue scientifique *BioMed Central Cancer*, démontrent que la dose et la durée de l'infusion sont des paramètres déterminants pour obtenir une efficacité optimale de la 5-AZA-CdR (Appendice B). De plus, dans une revue de la littérature (*Touch Briefing US Oncological Disease*, Appendice A) publiée en 2007, nous proposons que la posologie optimale de la 5-AZA-CdR pour le traitement de la LAM soit de 30 mg/m²/h, pour une durée d'infusion variant de 48 à 120 h (Appendice A). La posologie adéquate pour des tumeurs solides, comme celle du cancer du poumon, devrait être différente à cause d'une cinétique de division des cellules tumorales plus longue que celle des cellules leucémiques et de la difficulté des médicaments à pénétrer les tumeurs (Minchinton et Tannock, 2006). Une posologie de la 5-AZA-CdR appliquée aux tumeurs solides serait basée sur l'utilisation de plusieurs cycles répétés de thérapie intensive avec des périodes d'infusion de 12 à 24 h (Momparker, 2005b). L'application de la combinaison de la génistéine et de la 5-AZACdR devrait être réalisée dans le cadre d'une phase clinique chez des patients atteints de stades avancés du cancer du poumon, puisque ces patients répondent peu aux traitements. Une étude pilote réalisée sur des patients atteints

de stades avancés du cancer du poumon a révélé que l'efficacité de la 5-AZA-CdR est supérieure aux traitements actuels. Ainsi, en association avec la génistéine, cette combinaison chimiothérapeutique pourrait offrir un bénéfice pour ces patients dont les soins palliatifs sont souvent la seule option envisageable.

Des travaux futurs pourraient être réalisés afin d'approfondir les effets anticancéreux de la 5-AZA-CdR en combinaison avec la génistéine ou de combiner une de ces deux molécules avec d'autres agents anticancéreux. Des futures recherches sur l'effet anticancéreux de génistéine pourront être réalisées pour évaluer son potentiel de réducteur de la clonogénicité à de plus petites concentrations de l'ordre du nanomolaire mais administrées pendant de plus longue période afin de mieux comprendre l'effet de la fraction libre de la génistéine sur la survie des cellules cancéreuses. De même, il serait aussi intéressant de connaître le potentiel anticancéreux des produits conjugués de la génistéine comme ceux qui sont glucuro- ou sulfo- conjugués. En effet, les formes conjuguées représentent une fraction majoritaire de la génistéine plasmatique.

Pour mieux caractériser le mécanisme de coopération entre la 5-AZA-CdR et la génistéine, il serait pertinent d'étudier l'inhibition de la DNMT avec différentes concentrations de chacune de ces deux molécules. Tout d'abord, des tests pourraient être réalisés sur des extraits enzymatiques de DNMT1. Puis l'inhibition de cette enzyme pourrait être évaluée au niveau cellulaire en mesurant les variations en 5-méthylcytosine marquées présentes dans l'ADN. Cet effet pourrait être caractérisé en mesurant aussi les variations de la méthylation globale de l'ADN par électrophorèse capillaire à haute performance.

Comme nous l'avons vu plus haut, l'effet de la 5-AZA-CdR et de la génistéine produit des actions sur de nombreuses voies cellulaires en même temps. La mesure de leurs effets sur certains promoteurs ou gènes particuliers ne peut refléter que partiellement les modifications moléculaires induites par le traitement de ces agents épigénétiques. Ainsi, des approches de biologie moléculaire utilisant des micropuces à ADN et des puces

mesurant la méthylation des promoteurs des gènes impliqués dans le cancer donneraient un meilleur portrait des voies moléculaires modifiées par ces agents anticancéreux.

Ensuite, pour étudier *in vivo* l'effet de la génistéine, d'autres modèles pourraient être utilisés, notamment pour démontrer l'effet de la combinaison sur des cellules cancéreuses du poumon. Le modèle décrit par Belinsky et ses collaborateurs pourrait présenter des qualités intéressantes dans cette optique. Il s'agit d'un modèle de métastases pulmonaires induites par un carcinogène présent dans la fumée de cigarette (Belinsky *et al.*, 2003). L'avantage de ce modèle avec des souris de souche C57BL/6 est que la génistéine administrée dans l'alimentation n'est pas inactivée aussi rapidement que dans notre modèle de leucémie. En effet, des expériences chez cette souche de souris, ayant des métastases pulmonaires induites par des cellules de mélanomes, ont montré que la génistéine produisait une augmentation du temps de survie des souris (Menon *et al.*, 1998). Ce modèle est d'autant plus intéressant que la localisation des tumeurs *in vivo* au niveau pulmonaire est un excellent atout quant à l'étude des propriétés pharmacocinétiques et pharmacodynamiques de la combinaison pour traiter des tumeurs du poumon. L'étude de la combinaison sur des modèles *in vivo* permettra de mesurer son effet sur la survie des animaux. De plus, ce genre de modèle peut être utilisé pour mesurer l'effet du traitement sur la survie des cellules cancéreuses en extrayant les cellules tumorales après le traitement de l'animal et en plaçant ces cellules *in vitro* pour mesurer la perte de clonogénicité induite par les médicaments (Brown et Attardi, 2005; Lemaire *et al.*, 2008).

La combinaison de la 5-AZA-CdR avec la génistéine présente de nombreux avantages tout comme celle avec les inhibiteurs d'histones acétyltransférases (Cameron *et al.*, 1999; Jabbour *et al.*, 2008). Récemment, la découverte de molécules inhibitrices de l'activité histone méthyltransférase offre aussi un autre volet de recherche dans la combinaison d'agents épigénétiques contre le cancer. La combinaison d'inhibiteur de la méthylation de l'ADN et des histones pourrait interagir de façon synergique pour inhiber la clonogénicité *in vitro* et *in vivo* des cellules cancéreuses. La chaetocine est un inhibiteur spécifique de la

méthyltransférase SU(VAR)3-9 (Greiner *et al.*, 2005) qui serait très intéressant d'étudier en combinaison avec la 5-AZA-CdR. D'autres combinaisons pourraient faire l'objet d'étude notamment celle basée sur la combinaison de la génistéine et/ou de la 5-AZA-CdR avec des molécules inhibitrices des tyrosines kinases, lesquelles sont l'objet de réponses cliniques très intéressantes tels que l'imatinib ou le trastuzumab (Gschwind *et al.*, 2004).

Conclusions

La recherche effectuée au cours de ce doctorat a démontré que la génistéine, une isoflavone naturelle du soja, possède une activité antileucémique à des concentrations qui sont mesurées dans le plasma de personnes ayant une alimentation enrichie en soja ou prenant des suppléments de génistéine. Ces travaux nous ont amenés à considérer l'étude de la combinaison entre la génistéine avec la 5-AZA-CdR, un médicament épigénétique qui possède un grand potentiel dans la chimiothérapie contre le cancer. La recherche de molécules pouvant augmenter l'activité anticancéreuse de la 5-AZA-CdR suscite beaucoup d'intérêt pour améliorer son efficacité clinique et faire face aux problèmes de la résistance à la chimiothérapie. Nos travaux ont démontré que la génistéine augmente de façon synergique l'activité anticancéreuse de la 5-AZA-CdR dans des modèles *in vitro* et *in vivo* de leucémie et *in vitro* de cellules tumorales. La combinaison de la 5-AZA-CdR et de la génistéine possède un potentiel très intéressant dans le traitement chimiothérapeutique du cancer et devrait être évaluée lors de recherche clinique sur des patients.

CONTRIBUTION À L'AVANCEMENT DES CONNAISSANCES

Les travaux présentés dans le cadre de ce projet de doctorat contribuent à l'avancement des connaissances en chimiothérapie contre le cancer à plusieurs niveaux. Tout d'abord, ces recherches ont permis de mieux caractériser le potentiel anticancéreux de la génistéine. En effet, l'approche employée mesure sa capacité à réduire la clonogénicité des cellules cancéreuses. Cet aspect méritait d'être étudié, car l'objectif de la chimiothérapie est l'éradication de la clonogénicité des cellules cancéreuses. De plus, ces études ont démontré un effet anticlonogénique intéressant à des concentrations nutritionnelles de génistéine.

Dans un deuxième temps, ces travaux ont contribué à l'avancement de la recherche sur la thérapie épigénétique de la 5-AZA-CdR. En effet, ils ont permis de démontrer pour la première fois que la 5-AZA-CdR interagit de façon synergique avec la génistéine pour réduire la clonogénicité des cellules cancéreuses. Ainsi, une substance naturelle non toxique a le potentiel d'augmenter l'efficacité de la thérapie épigénétique. De tels résultats serviront à l'établissement de futurs essais cliniques.

RÉFÉRENCES

- Abe, T. (1999). Infantile leukemia and soybeans--a hypothesis. *Leukemia* **13**, 317-320.
- Agarwal, R. (2000). Cell signaling and regulators of cell cycle as molecular targets for prostate cancer prevention by dietary agents. *Biochem Pharmacol* **60**, 1051-1059.
- Agrawal, S., Unterberg, M., Koschmieder, S., zur Stadt, U., Brunnberg, U., Verbeek, W., Buchner, T., Berdel, W. E., Serve, H., et Muller-Tidow, C. (2007). DNA methylation of tumor suppressor genes in clinical remission predicts the relapse risk in acute myeloid leukemia. *Cancer research* **67**, 1370-1377.
- Akiyama, T., Ishida, J., Nakagawa, S., Ogawara, H., Watanabe, S., Itoh, N., Shibuya, M., et Fukami, Y. (1987). Genistein, a specific inhibitor of tyrosine-specific protein kinases. *The Journal of biological chemistry* **262**, 5592-5595.
- Allfrey, V. G., Faulkner, R., et Mirsky, A. E. (1964). Acetylation and Methylation of Histones and Their Possible Role in the Regulation of Rna Synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **51**, 786-794.
- Allred, C. D., Twaddle, N. C., Allred, K. F., Goepfing, T. S., Churchwell, M. I., Ju, Y. H., Helferich, W. G., et Doerge, D. R. (2005). Soy processing affects metabolism and disposition of dietary isoflavones in ovariectomized BALB/c mice. *J Agric Food Chem* **53**, 8542-8550.
- Aribi, A., Borthakur, G., Ravandi, F., Shan, J., Davisson, J., Cortes, J., et Kantarjian, H. (2007). Activity of decitabine, a hypomethylating agent, in chronic myelomonocytic leukemia. *Cancer* **109**, 713-717.
- Banerjee, S., Li, Y., Wang, Z., et Sarkar, F. H. (2008). Multi-targeted therapy of cancer by genistein. *Cancer letters* *In press*.
- Belinsky, S. A. (2005). Silencing of genes by promoter hypermethylation: key event in rodent and human lung cancer. *Carcinogenesis* **26**, 1481-1487.
- Belinsky, S. A., Klinge, D. M., Stidley, C. A., Issa, J. P., Herman, J. G., March, T. H., et Baylin, S. B. (2003). Inhibition of DNA methylation and histone deacetylation prevents murine lung cancer. *Cancer research* **63**, 7089-7093.
- Berger, S. L. (2007). The complex language of chromatin regulation during transcription. *Nature* **447**, 407-412.
- Bestor, T. H. (2000). The DNA methyltransferases of mammals. *Hum Mol Genet* **9**, 2395-2402.
- Bird, A. P. (1986). CpG-rich islands and the function of DNA methylation. *Nature* **321**, 209-213.
- Bloedon, L. T., Jeffcoat, A. R., Lopaczynski, W., Schell, M. J., Black, T. M., Dix, K. J., Thomas, B. F., Albright, C., Busby, M. G., Crowell, J. A., et Zeisel, S. H. (2002). Safety and pharmacokinetics of purified soy isoflavones: single-dose administration to postmenopausal women. *Am J Clin Nutr* **76**, 1126-1137.
- Boersma, B. J., Barnes, S., Kirk, M., Wang, C. C., Smith, M., Kim, H., Xu, J., Patel, R., et Darley-Usmar, V. M. (2001). Soy isoflavonoids and cancer -- metabolism at the target site. *Mutat Res* **480-481**, 121-127.

- Brena, R. M., Huang, T. H., et Plass, C. (2006). Toward a human epigenome. *Nature genetics* **38**, 1359-1360.
- Brown, J. M., et Attardi, L. D. (2005). The role of apoptosis in cancer development and treatment response. *Nat Rev Cancer* **5**, 231-237.
- Bueso-Ramos, C., Xu, Y., McDonnell, T. J., Brisbay, S., Pierce, S., Kantarjian, H., Rosner, G., et Garcia-Manero, G. (2005). Protein expression of a triad of frequently methylated genes, p73, p57Kip2, and p15, has prognostic value in adult acute lymphocytic leukemia independently of its methylation status. *J Clin Oncol* **23**, 3932-3939.
- Busby, M. G., Jeffcoat, A. R., Bloedon, L. T., Koch, M. A., Black, T., Dix, K. J., Heizer, W. D., Thomas, B. F., Hill, J. M., Crowell, J. A., et Zeisel, S. H. (2002). Clinical characteristics and pharmacokinetics of purified soy isoflavones: single-dose administration to healthy men. *Am J Clin Nutr* **75**, 126-136.
- Cameron, E. E., Bachman, K. E., Myohanen, S., Herman, J. G., et Baylin, S. B. (1999). Synergy of demethylation and histone deacetylase inhibition in the re-expression of genes silenced in cancer. *Nature genetics* **21**, 103-107.
- Casciato, D. A. (2004). *Manual of clinical oncology*. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA.
- Chen, D., Daniel, K. G., Chen, M. S., Kuhn, D. J., Landis-Piwowar, K. R., et Dou, Q. P. (2005a). Dietary flavonoids as proteasome inhibitors and apoptosis inducers in human leukemia cells. *Biochem Pharmacol* **69**, 1421-1432.
- Chen, J., Lin, H., et Hu, M. (2003). Metabolism of flavonoids via enteric recycling: role of intestinal disposition. *J Pharmacol Exp Ther* **304**, 1228-1235.
- Chen, J., Wang, S., Jia, X., Bajimaya, S., Lin, H., Tam, V. H., et Hu, M. (2005b). Disposition of flavonoids via recycling: comparison of intestinal versus hepatic disposition. *Drug Metab Dispos* **33**, 1777-1784.
- Chen, T., Hevi, S., Gay, F., Tsujimoto, N., He, T., Zhang, B., Ueda, Y., et Li, E. (2007). Complete inactivation of DNMT1 leads to mitotic catastrophe in human cancer cells. *Nature genetics* **39**, 391-396.
- Chim, C. S., Wong, A. S., et Kwong, Y. L. (2005). Epigenetic inactivation of the CIP/KIP cell-cycle control pathway in acute leukemias. *Am J Hematol* **80**, 282-287.
- Chou, T. C., et Talalay, P. (1984). Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. *Advances in enzyme regulation* **22**, 27-55.
- Clark, S. J., et Melki, J. (2002). DNA methylation and gene silencing in cancer: which is the guilty party? *Oncogene* **21**, 5380-5387.
- Davis, J. N., Kucuk, O., Djuric, Z., et Sarkar, F. H. (2001). Soy isoflavone supplementation in healthy men prevents NF-kappa B activation by TNF-alpha in blood lymphocytes. *Free radical biology & medicine* **30**, 1293-1302.

- Davis, J. N., Muqim, N., Bhuiyan, M., Kucuk, O., Pienta, K. J., et Sarkar, F. H. (2000). Inhibition of prostate specific antigen expression by genistein in prostate cancer cells. *International journal of oncology* **16**, 1091-1097.
- Day, J. K., Bauer, A. M., DesBordes, C., Zhuang, Y., Kim, B. E., Newton, L. G., Nehra, V., Forsee, K. M., MacDonald, R. S., Besch-Williford, C., Huang, T. H., et Lubahn, D. B. (2002). Genistein alters methylation patterns in mice. *J Nutr* **132**, 2419S-2423S.
- Deininger, P. L., Moran, J. V., Batzer, M. A., et Kazazian, H. H., Jr. (2003). Mobile elements and mammalian genome evolution. *Curr Opin Genet Dev* **13**, 651-658.
- DeVita, V. T., Hellman, S., et Rosenberg, S. A. (2005). *Cancer : principles & practice of oncology*. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, Penn. ; London.
- Digel, W., et Lubbert, M. (2005). DNA methylation disturbances as novel therapeutic target in lung cancer: preclinical and clinical results. *Crit Rev Oncol Hematol* **55**, 1-11.
- Dong, A., Yoder, J. A., Zhang, X., Zhou, L., Bestor, T. H., et Cheng, X. (2001). Structure of human DNMT2, an enigmatic DNA methyltransferase homolog that displays denaturant-resistant binding to DNA. *Nucleic Acids Res* **29**, 439-448.
- Egger, G., Aparicio, A. M., Escobar, S. G., et Jones, P. A. (2007). Inhibition of histone deacetylation does not block resilencing of p16 after 5-aza-2'-deoxycytidine treatment. *Cancer research* **67**, 346-353.
- Esteller, M. (2007a). Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps. *Nat Rev Genet* **8**, 286-298.
- Esteller, M. (2007b). Epigenetic gene silencing in cancer: the DNA hypermethylome. *Hum Mol Genet* **16 Spec No 1**, R50-59.
- Estey, E. (2007). Acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes in older patients. *J Clin Oncol* **25**, 1908-1915.
- Estey, E., et Dohner, H. (2006). Acute myeloid leukaemia. *Lancet* **368**, 1894-1907.
- Fang, M. Z., Chen, D., Sun, Y., Jin, Z., Christman, J. K., et Yang, C. S. (2005). Reversal of hypermethylation and reactivation of p16INK4a, RARbeta, and MGMT genes by genistein and other isoflavones from soy. *Clin Cancer Res* **11**, 7033-7041.
- Farinha, N. J., Shaker, S., Lemaire, M., Momparler, L., Bernstein, M., et Momparler, R. L. (2004). Activation of expression of p15, p73 and E-cadherin in leukemic cells by different concentrations of 5-aza-2'-deoxycytidine (Decitabine). *Anticancer research* **24**, 75-78.
- Feinberg, A. P., Ohlsson, R., et Henikoff, S. (2006). The epigenetic progenitor origin of human cancer. *Nat Rev Genet* **7**, 21-33.
- Feinberg, A. P., et Vogelstein, B. (1983). Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts. *Nature* **301**, 89-92.
- Fraga, M. F., Ballestar, E., Villar-Garea, A., Boix-Chornet, M., Espada, J., Schotta, G., Bonaldi, T., Haydon, C., Ropero, S., Petrie, K., Iyer, N. G., Perez-Rosado, A.,

- Calvo, E., Lopez, J. A., Cano, A., Calasanz, M. J., Colomer, D., Piris, M. A., Ahn, N., Imhof, A., Caldas, C., Jenuwein, T., et Esteller, M. (2005). Loss of acetylation at Lys16 and trimethylation at Lys20 of histone H4 is a common hallmark of human cancer. *Nature genetics* **37**, 391-400.
- Fraga, M. F., Herranz, M., Espada, J., Ballestar, E., Paz, M. F., Ropero, S., Erkek, E., Bozdogan, O., Peinado, H., Niveleau, A., Mao, J. H., Balmain, A., Cano, A., et Esteller, M. (2004). A mouse skin multistage carcinogenesis model reflects the aberrant DNA methylation patterns of human tumors. *Cancer research* **64**, 5527-5534.
- Fritz, W. A., Wang, J., Eltoum, I. E., et Lamartiniere, C. A. (2002). Dietary genistein down-regulates androgen and estrogen receptor expression in the rat prostate. *Mol Cell Endocrinol* **186**, 89-99.
- Goldie, J. H., et Coldman, A. J. (1979). A mathematic model for relating the drug sensitivity of tumors to their spontaneous mutation rate. *Cancer Treat Rep* **63**, 1727-1733.
- Goll, M. G., et Bestor, T. H. (2005). Eukaryotic cytosine methyltransferases. *Annu Rev Biochem* **74**, 481-514.
- Greiner, D., Bonaldi, T., Eskeland, R., Roemer, E., et Imhof, A. (2005). Identification of a specific inhibitor of the histone methyltransferase SU(VAR)3-9. *Nat Chem Biol* **1**, 143-145.
- Gschwind, A., Fischer, O. M., et Ullrich, A. (2004). The discovery of receptor tyrosine kinases: targets for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* **4**, 361-370.
- Hake, S. B., Xiao, A., et Allis, C. D. (2004). Linking the epigenetic 'language' of covalent histone modifications to cancer. *Br J Cancer* **90**, 761-769.
- Hanahan, D., et Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* **100**, 57-70.
- Herman, J. G., et Baylin, S. B. (2003). Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *The New England journal of medicine* **349**, 2042-2054.
- Huntly, B. J., et Gilliland, D. G. (2005). Leukaemia stem cells and the evolution of cancer-stem-cell research. *Nat Rev Cancer* **5**, 311-321.
- Hwang, C. S., Kwak, H. S., Lim, H. J., Lee, S. H., Kang, Y. S., Choe, T. B., Hur, H. G., et Han, K. O. (2006). Isoflavone metabolites and their in vitro dual functions: they can act as an estrogenic agonist or antagonist depending on the estrogen concentration. *J Steroid Biochem Mol Biol* **101**, 246-253.
- Hwang, J. T., Ha, J., et Park, O. J. (2005). Combination of 5-fluorouracil and genistein induces apoptosis synergistically in chemo-resistant cancer cells through the modulation of AMPK and COX-2 signaling pathways. *Biochem Biophys Res Commun* **332**, 433-440.
- Issa, J. P. (2004). CpG island methylator phenotype in cancer. *Nat Rev Cancer* **4**, 988-993.
- Iwasaki, H., et Akashi, K. (2007). Hematopoietic developmental pathways: on cellular basis. *Oncogene* **26**, 6687-6696.

- Izumi, T., Piskula, M. K., Osawa, S., Obata, A., Tobe, K., Saito, M., Kataoka, S., Kubota, Y., et Kikuchi, M. (2000). Soy isoflavone aglycones are absorbed faster and in higher amounts than their glucosides in humans. *J Nutr* **130**, 1695-1699.
- Jabbour, E., Issa, J. P., Garcia-Manero, G., et Kantarjian, H. (2008). Evolution of decitabine development: accomplishments, ongoing investigations, and future strategies. *Cancer* **112**, 2341-2351.
- Jair, K. W., Bachman, K. E., Suzuki, H., Ting, A. H., Rhee, I., Yen, R. W., Baylin, S. B., et Schuebel, K. E. (2006). De novo CpG island methylation in human cancer cells. *Cancer research* **66**, 682-692.
- Jenuwein, T., et Allis, C. D. (2001). Translating the histone code. *Science (New York, N.Y)* **293**, 1074-1080.
- Jones, P. A., et Baylin, S. B. (2007). The epigenomics of cancer. *Cell* **128**, 683-692.
- Jones, P. A., et Taylor, S. M. (1980). Cellular differentiation, cytidine analogs and DNA methylation. *Cell* **20**, 85-93.
- Jordan, C. T. (2005). The potential of targeting malignant stem cells as a treatment for leukemia. *Future Oncol* **1**, 205-207.
- Kantarjian, H. M., O'Brien, S., Shan, J., Aribi, A., Garcia-Manero, G., Jabbour, E., Ravandi, F., Cortes, J., Davisson, J., et Issa, J. P. (2007). Update of the decitabine experience in higher risk myelodysplastic syndrome and analysis of prognostic factors associated with outcome. *Cancer* **109**, 265-273.
- Kazazian, H. H., Jr. (2004). Mobile elements: drivers of genome evolution. *Science (New York, N.Y)* **303**, 1626-1632.
- Kazi, A., Daniel, K. G., Smith, D. M., Kumar, N. B., et Dou, Q. P. (2003). Inhibition of the proteasome activity, a novel mechanism associated with the tumor cell apoptosis-inducing ability of genistein. *Biochem Pharmacol* **66**, 965-976.
- Kikuchi, T., Toyota, M., Itoh, F., Suzuki, H., Obata, T., Yamamoto, H., Kakiuchi, H., Kusano, M., Issa, J. P., Tokino, T., et Imai, K. (2002). Inactivation of p57KIP2 by regional promoter hypermethylation and histone deacetylation in human tumors. *Oncogene* **21**, 2741-2749.
- Kikuno, N., Shiina, H., Urakami, S., Kawamoto, K., Hirata, H., Tanaka, Y., Majid, S., Igawa, M., et Dahiya, R. (2008). Genistein mediated histone acetylation and demethylation activates tumor suppressor genes in prostate cancer cells. *International journal of cancer* **123**, 552-560.
- King-Batoon, A., Leszczynska, J. M., et Klein, C. B. (2008). Modulation of gene methylation by genistein or lycopene in breast cancer cells. *Environ Mol Mutagen* **49**, 36-45.
- Klaasen, C. D. (2001). *Casarell and Doull's TOXICOLOGY. The Basic Science od Poisons*.
- Klein, C. B., et King, A. A. (2007). Genistein genotoxicity: critical considerations of in vitro exposure dose. *Toxicol Appl Pharmacol* **224**, 1-11.

- Knudson, A. G., Jr. (1971). Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* **68**, 820-823.
- Krivtsov, A. V., et Armstrong, S. A. (2007). MLL translocations, histone modifications and leukaemia stem-cell development. *Nat Rev Cancer* **7**, 823-833.
- Kuang, S. Q., Tong, W. G., Yang, H., Lin, W., Lee, M. K., Fang, Z. H., Wei, Y., Jelinek, J., Issa, J. P., et Garcia-Manero, G. (2008). Genome-wide identification of aberrantly methylated promoter associated CpG islands in acute lymphocytic leukemia. *Leukemia* **22**, 1529-1538.
- Kuo, Y. H., Landrette, S. F., Heilman, S. A., Perrat, P. N., Garrett, L., Liu, P. P., Le Beau, M. M., Kogan, S. C., et Castilla, L. H. (2006). Cbf beta-SMMHC induces distinct abnormal myeloid progenitors able to develop acute myeloid leukemia. *Cancer cell* **9**, 57-68.
- Kurahashi, N., Iwasaki, M., Sasazuki, S., Otani, T., Inoue, M., et Tsugane, S. (2007). Soy product and isoflavone consumption in relation to prostate cancer in Japanese men. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **16**, 538-545.
- Kvinlaug, B. T., et Huntly, B. J. (2007). Targeting cancer stem cells. *Expert opinion on therapeutic targets* **11**, 915-927.
- Laird, P. W., Jackson-Grusby, L., Fazeli, A., Dickinson, S. L., Jung, W. E., Li, E., Weinberg, R. A., et Jaenisch, R. (1995). Suppression of intestinal neoplasia by DNA hypomethylation. *Cell* **81**, 197-205.
- Lamartiniere, C. A., Moore, J. B., Brown, N. M., Thompson, R., Hardin, M. J., et Barnes, S. (1995). Genistein suppresses mammary cancer in rats. *Carcinogenesis* **16**, 2833-2840.
- Lambert, J. D., Hong, J., Yang, G. Y., Liao, J., et Yang, C. S. (2005). Inhibition of carcinogenesis by polyphenols: evidence from laboratory investigations. *Am J Clin Nutr* **81**, 284S-291S.
- Lei, H., Oh, S. P., Okano, M., Juttermann, R., Goss, K. A., Jaenisch, R., et Li, E. (1996). De novo DNA cytosine methyltransferase activities in mouse embryonic stem cells. *Development* **122**, 3195-3205.
- Lemaire, M., Chabot, G. G., Raynal, N. J., Momparler, L. F., Hurtubise, A., Bernstein, M. L., et Momparler, R. L. (2008). Importance of dose-schedule of 5-aza-2'-deoxycytidine for epigenetic therapy of cancer. *BMC Cancer* **8**, 128.
- Li, E., Beard, C., et Jaenisch, R. (1993). Role for DNA methylation in genomic imprinting. *Nature* **366**, 362-365.
- Li, E., Bestor, T. H., et Jaenisch, R. (1992). Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. *Cell* **69**, 915-926.
- Li, Y., Kucuk, O., Hussain, M., Abrams, J., Cher, M. L., et Sarkar, F. H. (2006). Antitumor and antimetastatic activities of docetaxel are enhanced by genistein through regulation of osteoprotegerin/receptor activator of nuclear factor-kappaB (RANK)/RANK ligand/MMP-9 signaling in prostate cancer. *Cancer research* **66**, 4816-4825.

- Li, Y., Nagai, H., Ohno, T., Yuge, M., Hatano, S., Ito, E., Mori, N., Saito, H., et Kinoshita, T. (2002). Aberrant DNA methylation of p57(KIP2) gene in the promoter region in lymphoid malignancies of B-cell phenotype. *Blood* **100**, 2572-2577.
- Lian, F., Li, Y., Bhuiyan, M., et Sarkar, F. H. (1999). p53-independent apoptosis induced by genistein in lung cancer cells. *Nutr Cancer* **33**, 125-131.
- Liang, G., Chan, M. F., Tomigahara, Y., Tsai, Y. C., Gonzales, F. A., Li, E., Laird, P. W., et Jones, P. A. (2002). Cooperativity between DNA methyltransferases in the maintenance methylation of repetitive elements. *Mol Cell Biol* **22**, 480-491.
- Lin, J. C., Jeong, S., Liang, G., Takai, D., Fatemi, M., Tsai, Y. C., Egger, G., Gal-Yam, E. N., et Jones, P. A. (2007). Role of Nucleosomal Occupancy in the Epigenetic Silencing of the MLH1 CpG Island. *Cancer cell* **12**, 432-444.
- Liu, K., Wang, Y. F., Cantemir, C., et Muller, M. T. (2003). Endogenous assays of DNA methyltransferases: Evidence for differential activities of DNMT1, DNMT2, and DNMT3 in mammalian cells in vivo. *Mol Cell Biol* **23**, 2709-2719.
- Macdonald, F., Ford, C. H. J., et Casson, A. G. (2004). *Molecular biology of cancer*. BIOS Scientific Publishers, London ; New York, N.Y.
- Majid, S., Kikuno, N., Nelles, J., Noonan, E., Tanaka, Y., Kawamoto, K., Hirata, H., Li, L. C., Zhao, H., Okino, S. T., Place, R. F., Pookot, D., et Dahiya, R. (2008). Genistein induces the p21WAF1/CIP1 and p16INK4a tumor suppressor genes in prostate cancer cells by epigenetic mechanisms involving active chromatin modification. *Cancer research* **68**, 2736-2744.
- Mathey, J., Lamothe, V., Coxam, V., Potier, M., Sauvant, P., et Pelissero, C. B. (2006). Concentrations of isoflavones in plasma and urine of post-menopausal women chronically ingesting high quantities of soy isoflavones. *J Pharm Biomed Anal* **41**, 957-965.
- Mayer, R. J., Davis, R. B., Schiffer, C. A., Berg, D. T., Powell, B. L., Schulman, P., Omura, G. A., Moore, J. O., McIntyre, O. R., et Frei, E., 3rd (1994). Intensive postremission chemotherapy in adults with acute myeloid leukemia. Cancer and Leukemia Group B. *The New England journal of medicine* **331**, 896-903.
- McClain, R., Wolz, E., Davidovich, A., et Bausch, J. (2006). Genetic toxicity studies with genistein. *Food Chem Toxicol* **44**, 42-55.
- McClain, R. M., Wolz, E., Davidovich, A., Pfannkuch, F., et Bausch, J. (2005). Subchronic and chronic safety studies with genistein in dogs. *Food Chem Toxicol* **43**, 1461-1482.
- Menon, L. G., Kuttan, R., Nair, M. G., Chang, Y. C., et Kuttan, G. (1998). Effect of isoflavones genistein and daidzein in the inhibition of lung metastasis in mice induced by B16F-10 melanoma cells. *Nutr Cancer* **30**, 74-77.
- Miller, K. B., Kim, K., Morrison, F. S., Winter, J. N., Bennett, J. M., Neiman, R. S., Head, D. R., Cassileth, P. A., et O'Connell, M. J. (1992). The evaluation of low-dose

- cytarabine in the treatment of myelodysplastic syndromes: a phase-III intergroup study. *Ann Hematol* **65**, 162-168.
- Miltyk, W., Craciunescu, C. N., Fischer, L., Jeffcoat, R. A., Koch, M. A., Lopaczynski, W., Mahoney, C., Crowell, J., Paglieri, J., et Zeisel, S. H. (2003). Lack of significant genotoxicity of purified soy isoflavones (genistein, daidzein, and glycitein) in 20 patients with prostate cancer. *Am J Clin Nutr* **77**, 875-882.
- Minchinton, A. I., et Tannock, I. F. (2006). Drug penetration in solid tumours. *Nat Rev Cancer* **6**, 583-592.
- Moggs, J. G., Goodman, J. I., Trosko, J. E., et Roberts, R. A. (2004). Epigenetics and cancer: implications for drug discovery and safety assessment. *Toxicol Appl Pharmacol* **196**, 422-430.
- Mohammad, R. M., Al-Katib, A., Aboukameel, A., Doerge, D. R., Sarkar, F., et Kucuk, O. (2003). Genistein sensitizes diffuse large cell lymphoma to CHOP (cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, prednisone) chemotherapy. *Molecular cancer therapeutics* **2**, 1361-1368.
- Momparler, R. L. (2003). Cancer epigenetics. *Oncogene* **22**, 6479-6483.
- Momparler, R. L. (2005a). Epigenetic therapy of cancer with 5-aza-2'-deoxycytidine (decitabine). *Semin Oncol* **32**, 443-451.
- Momparler, R. L. (2005b). Pharmacology of 5-Aza-2'-deoxycytidine (decitabine). *Semin Hematol* **42**, S9-16.
- Momparler, R. L., et Ayoub, J. (2001). Potential of 5-aza-2'-deoxycytidine (Decitabine) a potent inhibitor of DNA methylation for therapy of advanced non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* **34 Suppl 4**, S111-115.
- Momparler, R. L., Bouchard, J., et Samson, J. (1985a). Induction of differentiation and inhibition of DNA methylation in HL-60 myeloid leukemic cells by 5-AZA-2'-deoxycytidine. *Leuk Res* **9**, 1361-1366.
- Momparler, R. L., Bouffard, D. Y., Momparler, L. F., Dionne, J., Belanger, K., et Ayoub, J. (1997). Pilot phase I-II study on 5-aza-2'-deoxycytidine (Decitabine) in patients with metastatic lung cancer. *Anti-cancer drugs* **8**, 358-368.
- Momparler, R. L., et Bovenzi, V. (2000). DNA methylation and cancer. *J Cell Physiol* **183**, 145-154.
- Momparler, R. L., et Frith, C. H. (1981). Toxicology in mice of the antileukemic agent 5-aza-2'-deoxycytidine. *Drug and chemical toxicology* **4**, 373-381.
- Momparler, R. L., et Gonzales, F. A. (1978). Effect of intravenous infusion of 5-aza-2'-deoxycytidine on survival time of mice with L1210 leukemia. *Cancer research* **38**, 2673-2678.
- Momparler, R. L., Momparler, L. F., et Samson, J. (1984). Comparison of the antileukemic activity of 5-AZA-2'-deoxycytidine, 1-beta-D-arabinofuranosylcytosine and 5-azacytidine against L1210 leukemia. *Leuk Res* **8**, 1043-1049.

- Momparler, R. L., et Raynal, N. J.-M. (2007). Optimization of Therapy for Acute Myeloid Leukemia. *Touch Briefing, US Oncological Disease* 64.
- Momparler, R. L., Rivard, G. E., et Gyger, M. (1985b). Clinical trial on 5-aza-2'-deoxycytidine in patients with acute leukemia. *Pharmacol Ther* **30**, 277-286.
- Morgan, H. D., Dean, W., Coker, H. A., Reik, W., et Petersen-Mahrt, S. K. (2004). Activation-induced cytidine deaminase deaminates 5-methylcytosine in DNA and is expressed in pluripotent tissues: implications for epigenetic reprogramming. *The Journal of biological chemistry* **279**, 52353-52360.
- Morton, M. S., Arisaka, O., Miyake, N., Morgan, L. D., et Evans, B. A. (2002). Phytoestrogen concentrations in serum from Japanese men and women over forty years of age. *J Nutr* **132**, 3168-3171.
- Murphy, P. A. (1982). Phytoestrogen content of processed soybean products. *Food Technol* **36**, 60-64.
- Nguyen, D. T., Hernandez-Montes, E., Vauzour, D., Schonthal, A. H., Rice-Evans, C., Cadenas, E., et Spencer, J. P. (2006). The intracellular genistein metabolite 5,7,3',4'-tetrahydroxyisoflavone mediates G2-M cell cycle arrest in cancer cells via modulation of the p38 signaling pathway. *Free radical biology & medicine* **41**, 1225-1239.
- Oakley, E. J., et Van Zant, G. (2007). Unraveling the complex regulation of stem cells: implications for aging and cancer. *Leukemia* **21**, 612-621.
- Okano, M., Bell, D. W., Haber, D. A., et Li, E. (1999). DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell* **99**, 247-257.
- Oki, Y., Aoki, E., et Issa, J. P. (2007). Decitabine--bedside to bench. *Crit Rev Oncol Hematol* **61**, 140-152.
- Page (1999). Pharmacologie intégrée. (D. B. UNiversité, Ed.), pp. 616.
- Palmisano, W. A., Divine, K. K., Saccomanno, G., Gilliland, F. D., Baylin, S. B., Herman, J. G., et Belinsky, S. A. (2000). Predicting lung cancer by detecting aberrant promoter methylation in sputum. *Cancer research* **60**, 5954-5958.
- Park, O. J., et Surh, Y. J. (2004). Chemopreventive potential of epigallocatechin gallate and genistein: evidence from epidemiological and laboratory studies. *Toxicol Lett* **150**, 43-56.
- Paz, M. F., Fraga, M. F., Avila, S., Guo, M., Pollan, M., Herman, J. G., et Esteller, M. (2003). A systematic profile of DNA methylation in human cancer cell lines. *Cancer research* **63**, 1114-1121.
- Petti, M. C., Mandelli, F., Zagonel, V., De Gregoris, C., Merola, M. C., Latagliata, R., Gattei, V., Fazi, P., Monfardini, S., et Pinto, A. (1993). Pilot study of 5-aza-2'-deoxycytidine (Decitabine) in the treatment of poor prognosis acute myelogenous leukemia patients: preliminary results. *Leukemia* **7 Suppl 1**, 36-41.

- Pinto, A., Attadia, V., Fusco, A., Ferrara, F., Spada, O. A., et Di Fiore, P. P. (1984). 5-Aza-2'-deoxycytidine induces terminal differentiation of leukemic blasts from patients with acute myeloid leukemias. *Blood* **64**, 922-929.
- Pliml, J., et Sorm, F. (1964). Synthesis of 2-deoxy-D-ribofuranosyl-5-azacytosine. *Colln.Czech. Chem.Comm.* **29**, 2576-2577.
- Puck, T. T., et Marcus, P. I. (1955). A rapid method for viable cell titration and clone production with HeLa cells in tissue culture. The use of X-irradiated cells to supply conditioning factors. . *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **41**, 432-437.
- Ravandi, F., et Estrov, Z. (2006). Eradication of leukemia stem cells as a new goal of therapy in leukemia. *Clin Cancer Res* **12**, 340-344.
- Ravindranath, M. H., Muthugounder, S., Presser, N., et Viswanathan, S. (2004). Anticancer therapeutic potential of soy isoflavone, genistein. *Adv Exp Med Biol* **546**, 121-165.
- Raynal, N. J., Charbonneau, M., Momparler, L., et Momparler, R. L. (2008a). Synergistic Effect of 5-Aza-2'-deoxycytidine and Genistein in Combination Against Leukemia. *Oncology Research* **17**, 1-8.
- Raynal, N. J., Momparler, L., Charbonneau, M., et Momparler, R. L. (2008b). Antileukemic activity of genistein, a major isoflavone present in soy products. *J Nat Prod* **71**, 3-7.
- Reya, T., Morrison, S. J., Clarke, M. F., et Weissman, I. L. (2001). Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* **414**, 105-111.
- Rice, K. L., Hormaeche, I., et Licht, J. D. (2007). Epigenetic regulation of normal and malignant hematopoiesis. *Oncogene* **26**, 6697-6714.
- Rivard, G. E., Momparler, R. L., Demers, J., Benoit, P., Raymond, R., Lin, K., et Momparler, L. F. (1981). Phase I study on 5-aza-2'-deoxycytidine in children with acute leukemia. *Leuk Res* **5**, 453-462.
- Robertson, K. D. (2001). DNA methylation, methyltransferases, and cancer. *Oncogene* **20**, 3139-3155.
- Sarkar, F. H., Adsule, S., Padhye, S., Kulkarni, S., et Li, Y. (2006). The role of genistein and synthetic derivatives of isoflavone in cancer prevention and therapy. *Mini Rev Med Chem* **6**, 401-407.
- Sarkar, F. H., et Li, Y. (2006). Using chemopreventive agents to enhance the efficacy of cancer therapy. *Cancer research* **66**, 3347-3350.
- Schiller, J. H., Harrington, D., Belani, C. P., Langer, C., Sandler, A., Krook, J., Zhu, J., et Johnson, D. H. (2002). Comparison of four chemotherapy regimens for advanced non-small-cell lung cancer. *The New England journal of medicine* **346**, 92-98.
- Schrump, D. S., Fischette, M. R., Nguyen, D. M., Zhao, M., Li, X., Kunst, T. F., Hancox, A., Hong, J. A., Chen, G. A., Pishchik, V., Figg, W. D., Murgo, A. J., et Steinberg, S. M. (2006). Phase I study of decitabine-mediated gene expression in patients with cancers involving the lungs, esophagus, or pleura. *Clin Cancer Res* **12**, 5777-5785.

- Setchell, K. D., Brown, N. M., Zimmer-Nechemias, L., Brashear, W. T., Wolfe, B. E., Kirschner, A. S., et Heubi, J. E. (2002). Evidence for lack of absorption of soy isoflavone glycosides in humans, supporting the crucial role of intestinal metabolism for bioavailability. *Am J Clin Nutr* **76**, 447-453.
- Setchell, K. D., Zimmer-Nechemias, L., Cai, J., et Heubi, J. E. (1998). Isoflavone content of infant formulas and the metabolic fate of these phytoestrogens in early life. *Am J Clin Nutr* **68**, 1453S-1461S.
- Shao, Z. M., Wu, J., Shen, Z. Z., et Barsky, S. H. (1998a). Genistein exerts multiple suppressive effects on human breast carcinoma cells. *Cancer Res* **58**, 4851-4857.
- Shao, Z. M., Wu, J., Shen, Z. Z., et Barsky, S. H. (1998b). Genistein inhibits both constitutive and EGF-stimulated invasion in ER-negative human breast carcinoma cell lines. *Anticancer research* **18**, 1435-1439.
- Shen, J., Tai, Y. C., Zhou, J., Stephen Wong, C. H., Cheang, P. T., Fred Wong, W. S., Xie, Z., Khan, M., Han, J. H., et Chen, C. S. (2007). Synergistic antileukemia effect of genistein and chemotherapy in mouse xenograft model and potential mechanism through MAPK signaling. *Exp Hematol* **35**, 75-83.
- Shen, L., Toyota, M., Kondo, Y., Obata, T., Daniel, S., Pierce, S., Imai, K., Kantarjian, H. M., Issa, J. P., et Garcia-Manero, G. (2003). Aberrant DNA methylation of p57KIP2 identifies a cell-cycle regulatory pathway with prognostic impact in adult acute lymphocytic leukemia. *Blood* **101**, 4131-4136.
- Skeel, R. T. (1999). *Handbook of cancer chemotherapy*. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia ; London.
- Skipper, H. E. (1971). Kinetics of mammary tumor cell growth and implications for therapy. *Cancer* **28**, 1479-1499.
- Skipper, H. E., Schabel, F. M., Jr., Mellett, L. B., Montgomery, J. A., Wilkoff, L. J., Lloyd, H. H., et Brockman, R. W. (1970). Implications of biochemical, cytokinetic, pharmacologic, and toxicologic relationships in the design of optimal therapeutic schedules. *Cancer Chemother Rep* **54**, 431-450.
- Sorm, F., et Vesely, J. (1968). Effect of 5-aza-2'-deoxycytidine against leukemic and hemopoietic tissues in AKR mice. *Neoplasma* **15**, 339-343.
- Spinozzi, F., Pagliacci, M. C., Migliorati, G., Moraca, R., Grignani, F., Riccardi, C., et Nicoletti, I. (1994). The natural tyrosine kinase inhibitor genistein produces cell cycle arrest and apoptosis in Jurkat T-leukemia cells. *Leuk Res* **18**, 431-439.
- Strick, R., Strissel, P. L., Borgers, S., Smith, S. L., et Rowley, J. D. (2000). Dietary bioflavonoids induce cleavage in the MLL gene and may contribute to infant leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 4790-4795.
- Supko, J. G., et Phillips, L. R. (1995). High-performance liquid chromatographic assay for genistein in biological fluids. *J Chromatogr B Biomed Appl* **666**, 157-167.
- Takimoto, C. H., Glover, K., Huang, X., Hayes, S. A., Gallot, L., Quinn, M., Jovanovic, B. D., Shapiro, A., Hernandez, L., Goetz, A., Llorens, V., Lieberman, R., Crowell, J. A., Poisson, B. A., et Bergan, R. C. (2003). Phase I pharmacokinetic and

- pharmacodynamic analysis of unconjugated soy isoflavones administered to individuals with cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **12**, 1213-1221.
- Tang, L. Y., Reddy, M. N., Rasheva, V., Lee, T. L., Lin, M. J., Hung, M. S., et Shen, C. K. (2003). The eukaryotic DNMT2 genes encode a new class of cytosine-5 DNA methyltransferases. *The Journal of biological chemistry* **278**, 33613-33616.
- Tannock, I. F., Lee, C. M., Tunggal, J. K., Cowan, D. S., et Egorin, M. J. (2002). Limited penetration of anticancer drugs through tumor tissue: a potential cause of resistance of solid tumors to chemotherapy. *Clin Cancer Res* **8**, 878-884.
- Toyota, M., Ahuja, N., Ohe-Toyota, M., Herman, J. G., Baylin, S. B., et Issa, J. P. (1999). CpG island methylator phenotype in colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 8681-8686.
- Toyota, M., et Issa, J. P. (1999). CpG island methylator phenotypes in aging and cancer. *Semin Cancer Biol* **9**, 349-357.
- Traganos, F., Ardelt, B., Halko, N., Bruno, S., et Darzynkiewicz, Z. (1992). Effects of genistein on the growth and cell cycle progression of normal human lymphocytes and human leukemic MOLT-4 and HL-60 cells. *Cancer research* **52**, 6200-6208.
- Turker, M. S. (2002). Gene silencing in mammalian cells and the spread of DNA methylation. *Oncogene* **21**, 5388-5393.
- Valeriote, F., et Lin, H. (1975). Synergistic interaction of anticancer agents: a cellular perspective. *Cancer Chemother Rep* **59**, 895-900.
- Vire, E., Brenner, C., Deplus, R., Blanchon, L., Fraga, M., Didelot, C., Morey, L., Van Eynde, A., Bernard, D., Vanderwinden, J. M., Bollen, M., Esteller, M., Di Croce, L., de Launoit, Y., et Fuks, F. (2006). The Polycomb group protein EZH2 directly controls DNA methylation. *Nature* **439**, 871-874.
- Watanabe, S., Yamaguchi, M., Sobue, T., Takahashi, T., Miura, T., Arai, Y., Mazur, W., Wahala, K., et Adlercreutz, H. (1998). Pharmacokinetics of soybean isoflavones in plasma, urine and feces of men after ingestion of 60 g baked soybean powder (kinako). *J Nutr* **128**, 1710-1715.
- Widschwendter, M., Fiegl, H., Egle, D., Mueller-Holzner, E., Spizzo, G., Marth, C., Weisenberger, D. J., Campan, M., Young, J., Jacobs, I., et Laird, P. W. (2007). Epigenetic stem cell signature in cancer. *Nature genetics* **39**, 157-158.
- Wijermans, P. W., Krulder, J. W., Huijgens, P. C., et Neve, P. (1997). Continuous infusion of low-dose 5-Aza-2'-deoxycytidine in elderly patients with high-risk myelodysplastic syndrome. *Leukemia* **11**, 1-5.
- Wilson, V. L., Jones, P. A., et Momparler, R. L. (1983). Inhibition of DNA methylation in L1210 leukemic cells by 5-aza-2'-deoxycytidine as a possible mechanism of chemotherapeutic action. *Cancer research* **43**, 3493-3496.
- Wood, C. E., Register, T. C., Franke, A. A., Anthony, M. S., et Cline, J. M. (2006). Dietary soy isoflavones inhibit estrogen effects in the postmenopausal breast. *Cancer research* **66**, 1241-1249.

- Worm, J., et Guldberg, P. (2002). DNA methylation: an epigenetic pathway to cancer and a promising target for anticancer therapy. *Journal of Oral Pathology & Medicine* **31**, 443-449.
- Wu, A. H., Yu, M. C., Tseng, C. C., et Pike, M. C. (2008). Epidemiology of soy exposures and breast cancer risk. *Br J Cancer* **98**, 9-14.
- Xu, L., et Bergan, R. C. (2006). Genistein inhibits matrix metalloproteinase type 2 activation and prostate cancer cell invasion by blocking the transforming growth factor beta-mediated activation of mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2-27-kDa heat shock protein pathway. *Molecular pharmacology* **70**, 869-877.
- Yoder, J. A., et Bestor, T. H. (1998). A candidate mammalian DNA methyltransferase related to pmt1p of fission yeast. *Hum Mol Genet* **7**, 279-284.
- Yoo, C. B., et Jones, P. A. (2006). Epigenetic therapy of cancer: past, present and future. *Nat Rev Drug Discov* **5**, 37-50.

Appendice A : Optimisation de la thérapie de la leucémie aiguë.

A.1 Contribution de l'étudiant :

L'étudiant a participé à la rédaction et aux corrections de ce manuscrit.

A.2 Optimization of Therapy of Acute Leukemia :

Richard L Momparler ^{a,*} and Noël J-M Raynal ^{a,b}

^a*Service of Haematology/Oncology, Ste-Justine Hospital, Université de Montréal, 3175 Cote Ste. Catherine Road, Montreal, Quebec, H3T 1C5, Canada.*

^b*INRS-Institut Armand-Frappier, Université du Québec, 245 Hymus boulevard, Pointe-Claire, QC, Canada, H9R 1G6.*

* Corresponding author. Tel +1 514 345 4931 # 6140; fax +1 514 345 4801.

E-mail address: richard.l.momparler@umontreal.ca (R.L. Momparler).

Touch Briefing (2007)

US Oncological Disease,

Issue 1, p. 64 ISSN: 1753-4011

Current therapy of acute myeloid leukemia

Acute myeloid leukemia (AML) is the most common form of acute leukemia in adults.¹ About 60-70% of the patients achieve a complete remission (CR), but only 15-25% survive 5 or more years with most relapses occurring within 3 years. Relapse is associated with a poor response to additional therapy and shorter duration of remission.¹ The 5-year survival rates is 30-40% for patients <45 years and less than 10% for patients >60 years.² Standard induction therapy consists of low dose cytosine arabinoside (ARA-C; 100-200 mg/m²) administered as 7 days continuous i.v. infusion plus 3 days of an anthracycline.¹ Additional therapy after CR is required to achieve long-term disease-free survival. In patients younger than 60 years post-remission treatment with high-dose ARA-C therapy is more effective in inducing disease-free survival than the standard dose.¹ Unfortunately, AML patients classified as high-risk due to an unfavorable karyotype or secondary leukemia, respond poorly to this chemotherapy.¹ For these latter patients the induction of complete remission is <50% with <10% relapse-free survival after post-remission therapy with high-dose ARA-C.^{1,2}

There is an urgent need to improve the effectiveness of chemotherapy for these high risk patients. For the AML patients with a favorable prognosis, the major weakness of the conventional chemotherapy is the maintenance of patients in CR. Even though post-remission therapy using high dose ARA-C has increased survival of patients with AML, the optimal dose-schedule of this form of intensive chemotherapy is still unknown.^{1,3} About 60 to 70% of these latter patients will relapse after high dose ARA-C post-remission therapy and die from disease progression. Despite the improvements in standard chemotherapy and supportive care, we need more effective chemotherapeutic agents to improve the survival of patients with AML.²

Epigenetic therapy

Past research has shown the genetic changes, such as mutations and chromosomal aberrations and translocations, were the important factors in the etiology of AML. Recent research has discovered that epigenetic changes, such as DNA methylation, can also play a key role in the development of leukemia.⁴ Epigenetics is defined as an heritable change in gene expression that is not due to changes in the sequence of DNA.⁵ Gene silencing can occur by DNA methylation, which involves the enzymatic conversion of cytosine to 5-methyl-cytosine in the promoter region of genes. The normal function of this epigenetic event is to program the cell to silence the genes that are not essential for the function of each specific cell type. However, aberrant DNA methylation that silences tumor suppressor genes can also lead to the development of malignant disease.⁵ This epigenetic change can occur early in normal stem cells⁵ and subsequent transformation to leukemic stem cells can take place.⁷ An aberrant methylation pattern, such as promoter hypermethylation resulting in gene silencing, is one of the most common alterations in leukemia.⁴ Many loci in AML cells show aberrant DNA methylation.^{8,9} Since epigenetic events are reversible, they can be targets for chemotherapeutic intervention.

An interesting epigenetic drug to use for this purpose is 5-aza-2'-deoxycytidine (dacogen, decitabine, DAC). DAC is a potent inhibitor of DNA methylation, which can reactivate tumor suppressor genes silenced by DNA methylation as shown in Fig. 1. DAC can induce *in vitro* differentiation and loss of clonogenicity of human leukemic cells.¹⁰ DAC is a S-phase specific agent with a short *in vivo* half-life. Like ARA-C, its pharmacologic activity is dependent on the dose-schedule. The first clinical studies on DAC showed that this analogue could induce complete remissions with advanced acute leukemia.¹⁷ In May 2006, DAC was approved by the FDA for the treatment of myelodysplastic syndrome (MDS) and currently is in clinical trial for treatment of patients with AML who fail on conventional chemotherapy. Preclinical studies have shown that DAC can reactivate silent *p15* and other tumor suppressor genes in AML cells.⁹

Preclinical *in vitro* and *in vivo* studies indicate that DAC is a more potent antineoplastic agent as compared to ARA-C. At equimolar concentrations DAC produced a greater loss of clonogenicity of human myeloid leukemic cells than ARA-C.¹¹ In a mouse model bearing L1210 leukemia at maximum tolerated doses, DAC was able to cure

100% of mice, but no cures were observed with ARA-C.¹² These preclinical studies showed that DAC has a higher therapeutic index than ARA-C.

Optimization of DAC dose-schedule for AML therapy

The important question is will DAC be more effective than ARA-C for the treatment of AML? Another important question is what is the optimal dose-schedule of DAC for the treatment of patients with AML? The current recommended dose schedule of DAC for the treatment of MDS is 20 mg/m² (one hour i.v. infusion) daily for 5 days.¹³ This low dose-schedule of DAC is well tolerated in patients > 60 years or with a very poor hematological status. About > 80% of the MDS patients will relapse after the low dose DAC therapy. The duration of the second disease remissions for these MDS patients was inferior to the first treatment with DAC.¹⁴ These observations suggests that the low dose DAC can permit some recovery by leukemic stem cells, possibly due to remethylation of tumor suppressor genes.⁶ According to the preclinical data, at the higher doses of DAC these changes are irreversible resulting in a complete loss of the clonogenic potential of the leukemic stem cells.

The success with high dose ARA-C for the therapy of AML suggests that a more intensive dose-schedule of DAC could be used for the treatment of these patients. The pharmacology of ARA-C and DAC is almost identical for these two deoxycytidine analogs. Both these S phase specific agents are phosphorylated by the same enzyme, deoxycytidine kinase, and incorporated into DNA. However, their mechanisms of action are different. ARA-C acts as a chain terminator, producing a potent inhibition of DNA synthesis, whereas DAC is a potent inhibitor of DNA methylation.¹² The early published data on ARA-C can be used to help design the optimal schedule for DAC.¹⁵ The initial phase I studies on ARA-C showed that a continuous infusion was a more effective schedule than daily injections in the treatment of patients with acute leukemia.¹⁶ But, what would be the optimal duration of the infusion of DAC? For conventional dose of ARA-C a 120 h infusion was reported to be more effective than 48 h infusion.¹⁶ The optimal schedule for DAC may be somewhere between 48 and 120 h.¹⁵

The major side effect produced by DAC is its hematopoietic toxicity. If one assumes that ARA-C and DAC produce a similar pattern of hematopoietic toxicity, it may be possible to use intensive DAC therapy without encountering unacceptable toxicity.¹⁵ Both these analogs permit the survival of resting hematopoietic stems cells (i.e., cells not in S phase), which allows for the recovery from myelosuppression after intensive dose therapy. The dose-schedules of ARA-C can be used as a guideline for dose-schedule selection for initial clinical trials for DAC. At total dose of 1080-2400 mg/m² as continuous infusion for 36-40h, DAC produced similar myelosuppression¹⁷ as reported for similar schedule for ARA-C in adults.¹⁸ Furthermore, most leukemic patients in relapse are able to recover from the myelosuppression produced by six days (144 h) of high-dose ARA-C therapy.¹⁹

The selection of ideal AML patients for experimental chemotherapy with DAC is a challenge. Since induction with conventional dose ARA-C followed by post-remission therapy with high dose ARA-C can produce >50% long-term survivors for low risk AML, this group of patients are not candidates for DAC therapy. The ideal candidates for experimental therapy are the high risk AML patients, since they respond poorly to conventional chemotherapy and have a very short life expectancy. This latter group consists of patients with adverse cytogenetics, with MDS that progressed to AML and secondary AML. In a pilot clinical trial we administered DAC at 30 mg/m²/h, for 60 h to patients with very advanced AML and obtained some complete remissions.¹⁵ However, the remissions for these patients were short, possibly due to the fact that the duration of therapy was not long enough to permit all of the leukemic cells to progress and enter the S phase, the phase of the cell cycle in which DAC exerts its antileukemic action. For initial clinical trials, we suggest the following dose schedule: DAC at 30 mg/m²/h for 3 days (72 h). This DAC dose-schedule can be modified depending on the observed response and toxicity. For example, the duration of the i.v. infusion can be increased by increments of 12 h while maintaining the dose rate constant. The dose-limiting toxicity produced by DAC is myelosuppression.

Conclusion

In conclusion, the full chemotherapeutic potential of epigenetic therapy of AML is unknown. DAC has a fascinating mechanism of action of reactivating silent genes that suppress leukemia progression. This action of DAC can induce the leukemic stem cells to undergo differentiation or senescence resulting in an irreversible loss of their proliferative potential. The preclinical studies indicate that DAC is a potent antileukemic agent than ARA-C. These observations provide the rationale to support the initiation of clinical trials to optimize the dose-schedule of DAC for patients with high risk AML, who have very little chance of survival with the current conventional chemotherapy.

Acknowledgements

This work was supported by grants from Canadian Cancer Society, Cancer Research Society and Leukemia and Lymphoma Society.

References

1. Estey, E.; Dohner, H., "Acute myeloid leukaemia." *Lancet* (2006), 368: pp. 1894-907.
2. Kern, W.; Estey, E. H., "High-dose cytosine arabinoside in the treatment of acute myeloid leukemia: Review of three randomized trials." *Cancer* (2006), 107: pp. 116-24.
3. Bradstock, K. F.; Matthews, J. P.; Lowenthal, R. M., et al., "A randomized trial of high-versus conventional-dose cytarabine in consolidation chemotherapy for adult de novo acute myeloid leukemia in first remission after induction therapy containing high-dose cytarabine." *Blood* (2005), 105: pp. 481-8.
4. Agrawal, S.; Unterberg, M.; Koschmieder, S., et al., "DNA methylation of tumor suppressor genes in clinical remission predicts the relapse risk in acute myeloid leukaemia." *Cancer Res* (2007), 67: pp. 1370-7.
5. Jones, P. A.; Baylin, S. B., "The epigenomics of cancer." *Cell* (2007), 128: pp. 683-92.
6. Yoo, C. B.; Jones, P. A., "Epigenetic therapy of cancer: past, present and future." *Nat Rev Drug Discov* (2006), 5: pp. 37-50.
7. Reya, T.; Morrison, S. J.; Clarke, M. F., et al., "Stem cells, cancer, and cancer stem cells." *Nature* (2001), 414: pp. 105-11.
8. Rush, L. J.; Dai, Z.; Smiraglia, D. J., et al., "Novel methylation targets in de novo acute myeloid leukemia with prevalence of chromosome 11 loci." *Blood* (2001), 97: pp. 3226-33.
9. Toyota, M.; Kopecky, K. J.; Toyota, M. O., et al., "Methylation profiling in acute myeloid leukemia." *Blood* (2001), 97: pp. 2823-9.
10. Momparler, R. L.; Bovenzi, V., "DNA methylation and cancer." *J Cell Physiol* (2000), 183: pp. 145-54.

11. Momparler, R. L.; Onetto-Pothier, N.; Momparler, L. F., "Comparison of antineoplastic activity of cytosine arabinoside and 5-aza-2'-deoxycytidine against human leukemic cells of different phenotype." *Leuk Res* (1990), 14: pp. 755-60.
12. Momparler, R. L.; Momparler, L. F.; 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: pp. 1043-9.
13. Kantarjian, H.; Oki, Y.; Garcia-Manero, G., et al., "Results of a randomized study of 3 schedules of low-dose decitabine in higher-risk myelodysplastic syndrome and chronic myelomonocytic leukemia." *Blood* (2007), 109: pp. 52-7.
14. Ruter, B.; Wijermans, P. W.; Lubbert, M., "Superiority of prolonged low-dose azanucleoside administration? Results of 5-aza-2'-deoxycytidine retreatment in high-risk myelodysplasia patients." *Cancer* (2006), 106: pp. 1744-50.
15. Momparler, R. L.; Rivard, G. E.; Gyger, M., "Clinical trial on 5-aza-2'-deoxycytidine in patients with acute leukemia." *Pharmacol Ther* (1985), 30: pp. 277-86.
16. Freireich, E. J., "Effect of schedule and combinations on clinical effectiveness of Ara-C in adult acute leukemia." *Med Pediatr Oncol* (1982), 10 Suppl 1, pp. 169-72.
17. Rivard, G. E.; Momparler, R. L.; Demers, J., et al., "Phase I study on 5-aza-2'-deoxycytidine in children with acute leukemia." *Leuk Res* (1981), 5: pp. 453-62.
18. Frei, E., 3rd; Bickers, J. N.; Hewlett, J. S., et al., "Dose schedule and antitumor studies of arabinosyl cytosine (NSC 63878)." *Cancer Res* (1969), 29: pp. 1325-32.
19. Herzig, R. H.; Wolff, S. N.; Lazarus, H. M., et al., "High-dose cytosine arabinoside therapy for refractory leukaemia." *Blood* (1983), 62: pp. 361-9.

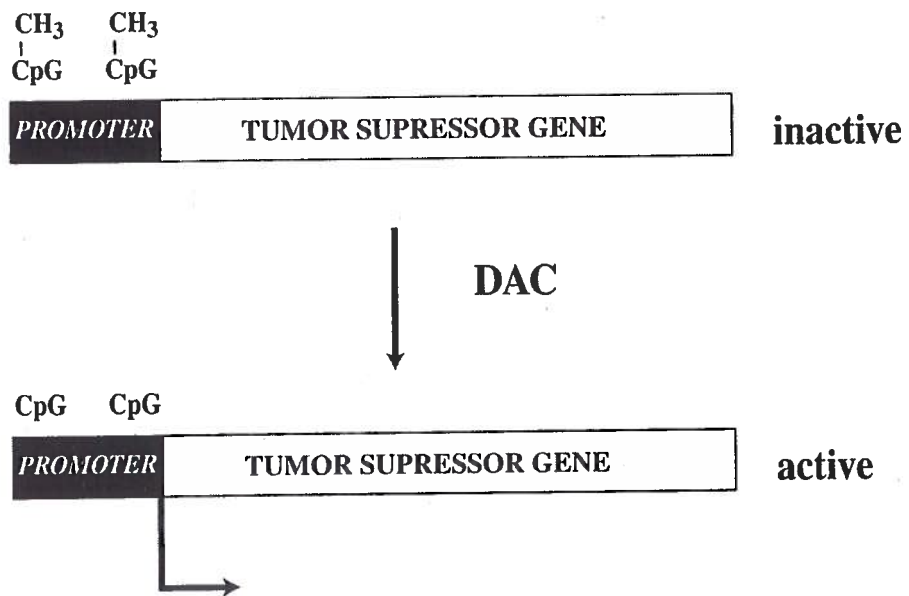


Figure 1: Reactivation of silenced tumor suppressor genes by dacogen (DAC).

**Appendice B : Importance de la posologie de
la 5-aza-2'-désoxycytidine pour la thérapie
épigénétique du cancer.**

B.1 Traduction du résumé de l'article :

État des connaissances : L'inactivation des gènes suppresseurs de tumeurs (TSG) par la méthylation de l'ADN joue un rôle important dans le développement du cancer. Comme les changements épigénétiques sont réversibles, c'est une cible intéressante pour la chimiothérapie en utilisant un inhibiteur de la méthylation de l'ADN, comme la 5-aza-2'-désoxycytidine (DAC). Bien que les études cliniques montrent que la DAC a une activité contre les hémopathies malignes, la posologie optimale de ce médicament épigénétique reste encore à établir.

Méthodes : Des essais clonogéniques ont été réalisés avec des cellules leucémiques et tumorales pour évaluer l'activité *in vitro* antinéoplasique de la DAC. La réactivation de TSG et l'inhibition de la méthylation de l'ADN par la DAC étaient évaluées par RT-PCR et la mesure de la méthylation de Line-1. L'activité antinéoplasique de la DAC administrée par infusion intraveineuse était évaluée chez des souris transplantées avec des cellules L1210 de leucémie murine en mesurant le temps de survie. Puis, l'activité antinéoplasique de la DAC était mesurée chez des souris transplantées avec des cellules EMT6 de tumeur mammaire murine, extraites après la thérapie pour mesurer leur potentiel clonogénique.

Résultats : L'augmentation de la concentration et de la durée de l'exposition à la DAC produisaient une plus grande perte de la clonogénicité pour des lignées cellulaires humaines leucémiques et tumorales. La réactivation de TSG, comme la *p57KIP2* dans les cellules leucémiques HL-60 et la *p16CDKN2A* dans les cellules Calu-6 de carcinome pulmonaire et l'inhibition de la méthylation de l'ADN dans les cellules HL-60 augmentaient avec la concentration en DAC. Chez les souris avec la leucémie L1210 ou portant les tumeurs EMT6, l'action antinéoplasique de la DAC augmentait avec la dose. Le niveau plasmatique en DAC qui produisait un effet antinéoplasique puissant chez les souris avec la leucémie ou avec les tumeurs solides était > 200 ng/ml (~ 1 µM).

Conclusions: Nous avons démontré que l'augmentation de la dose de la DAC augmentait fortement son activité antinéoplasique dans les modèles de souris cancéreuses. Nos résultats présentent aussi qu'il y a une corrélation entre la concentration en DAC, réduisant la clonogénicité *in vitro*, la réactivation des TSG et l'inhibition de la méthylation de l'ADN. Ces résultats suggèrent que l'activité antinéoplastique de la DAC est reliée à son action épigénétique. Nos observations appuient la réalisation de tests cliniques basés sur l'augmentation de la dose de la DAC, pour révéler le plein potentiel de ce médicament épigénétique chez des patients atteints de cancer.

B.2 Contribution de l'étudiant :

L'étudiant a participé aux expériences de pharmacocinétique qui ont généré le tableau 4 du manuscrit. L'étudiant a aussi participé à la rédaction de ce manuscrit qui a été publié dans la revue *BioMed Central Cancer*.

B.3 Importance of dose-schedule of 5-aza-2'-deoxycytidine for epigenetic therapy of cancer :

Maryse Lemaire¹, Guy G. Chabot², Noël J-M Raynal¹, Louise F. Momparler¹, Annie Hurtubise¹, Mark L. Bernstein³ and Richard L. Momparler¹ §

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

Abstract

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

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

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

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

La participation de l'étudiant au niveau expérimental dans cet article a été de réaliser les expériences de pharmacocinétiques. Ces dernières ont été faites sur des souris qui ont reçu une infusion intra-veineuse de différentes doses de la 5-AZA-CdR. Après 4 h d'infusion pour que la concentration de la 5-AZA-CdR soit à l'équilibre, les souris étaient anesthésiées avec de CO₂ et les échantillons de sang étaient prélevés par ponction cardiaque en utilisant des seringues héparinées. Les échantillons de sang étaient placés sur de la glace puis centrifugés à 10 000 g pendant 5 min. Le surnageant était utilisé afin de déterminer la concentration plasmatique de la 5-AZA-CdR à l'équilibre tel que déjà décrit par d'autres travaux du laboratoire (Momparker *et al.*, 1997). Pour cela, une courbe standard était réalisée montrant l'effet de différentes concentrations de la 5-AZA-CdR sur la croissance des cellules leucémiques murines L1210 après 48 h d'incubation (voir plus-bas : Figure 1). Une dilution des échantillons de plasma était ajoutée au milieu de culture contenant les cellules L1210. Les concentrations plasmatiques de la 5-AZA-CdR étaient estimées à l'aide de la courbe standard. L'expérience a été réalisée en duplicat et répétée deux fois.

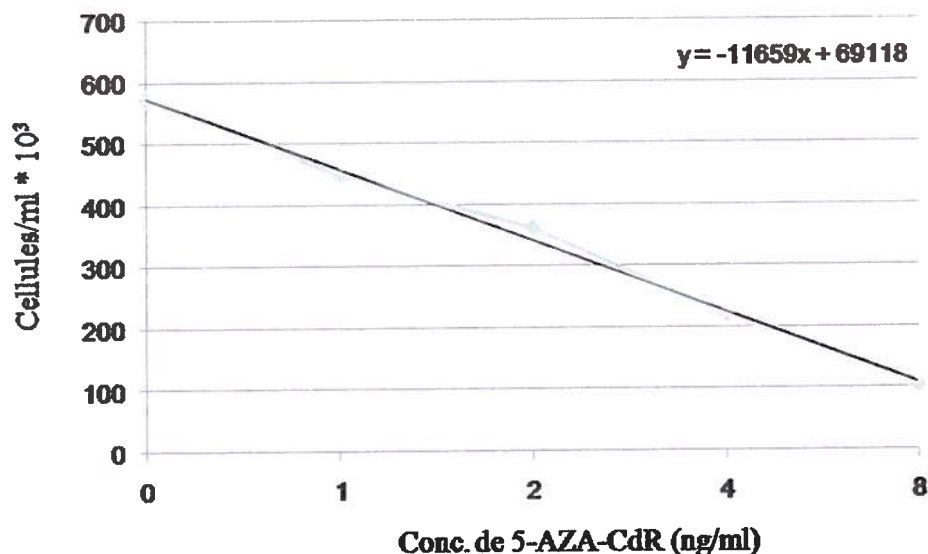


Figure 1 : Courbe standard de l'effet de différente concentration en 5-AZA-CdR sur la croissance des cellules leucémiques murines L1210.

Les résultats obtenus ont montré que les doses totales d'infusions de 5, 10 et 20 mg/kg produisaient des concentrations plasmatiques de 5-AZA-CdR à l'équilibre de $80 \pm 0,3$, $190 \pm 0,5$ et $610 \pm 0,9$ ng/ml (Tableau 1).

Tableau 1. Concentrations plasmatiques à l'équilibre chez des souris recevant une infusion i.v. de différentes doses de la 5-AZA-CdR.

Dose totale ^a	Vitesse d'infusion	Niveau plasmatique
(mg/kg)	(mg/kg/h)	(ng/ml)
5	0,278	$80 \pm 0,3^b$
10	0,556	$190 \pm 0,5$
20	1,11	$610 \pm 0,9$

^a infusion de 18 h i.v. de la 5-AZA-CdR. ^b Valeurs moyennes $\pm$ S.D.

**Appendice C : Tableau des gènes testés pour
des changements d'expression induits par la
génistéine.**

<i>Gènes</i>	<i>Fonctions</i>
<i>p16^{INK4a}</i>	Inhibiteur de kinases dépendantes des cyclines
<i>p15^{INK4b}</i>	Inhibiteur de kinases dépendantes des cyclines
<i>p57^{KIP2}</i>	Inhibiteur de kinases dépendantes des cyclines
<i>Caspase-3</i>	Protéase effectrice de l'apoptose
<i>EZH</i>	Méthyltransférase de la chromatine
<i>BMI</i>	Gène du groupe Polycomb
<i>C-MYC</i>	Oncogène
<i>RUNX3</i>	Facteur de transcription
<i>WIF1</i>	Facteur inhibiteur de Wnt

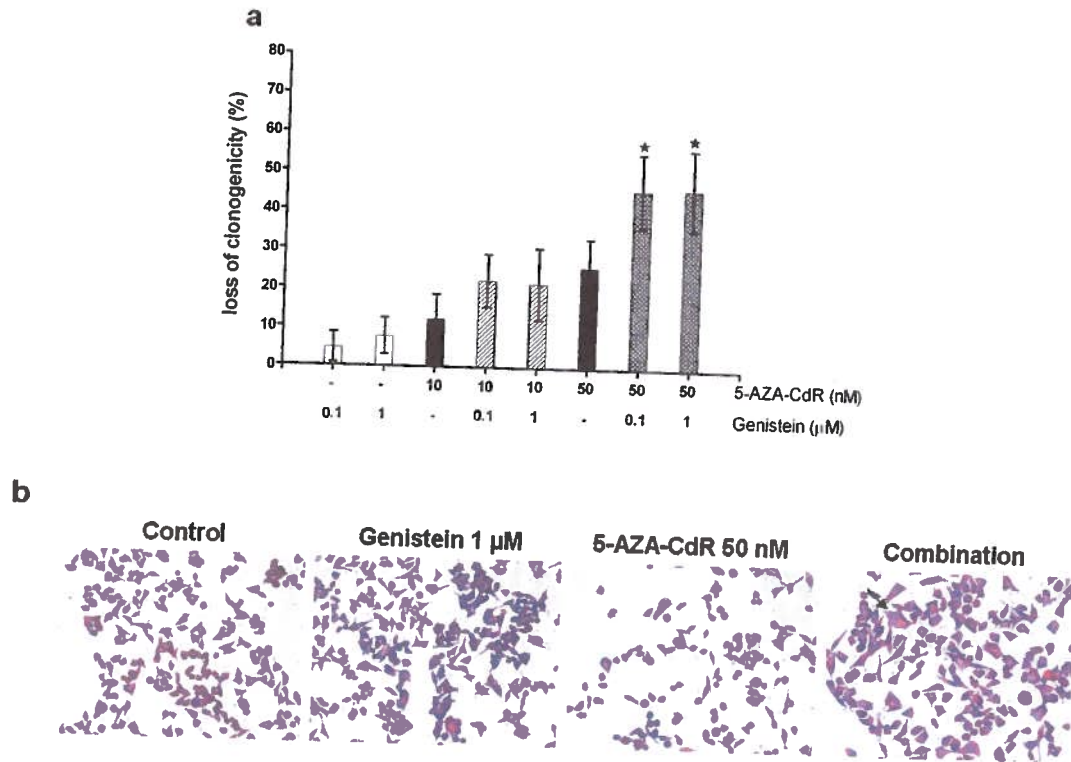
Les niveaux d'expression de ces gènes ont été mesurés dans les cellules HL-60 suite à une exposition de 48 heures à la génistéine (0,1 à 20 microM). Seul, le gène *p57^{KIP2}* a présenté un changement de son niveau d'expression dans ces conditions expérimentales.

**Appendice D : Analyses histopathologiques de
cellules tumorales exposées à la 5-AZA-CdR
et à la génistéine.**

Analyses histopathologiques des cellules tumorales du poumon (Calu-6), du sein MDA-MB-231 et du colon DLD-1 exposées 48 h à la 5-AZA-CdR (50 nM) et/ou à la génistéine (1 μ M). Après une coloration à l'hématoxyline/éosine, 100 cellules de chaque condition et de chaque type cellulaire ont été analysées en fonction de leurs caractéristiques morphologiques (cellules normales, nécrotiques ou géantes). La section de matériels et méthodes est décrite dans la deuxième partie section 3 de la thèse.

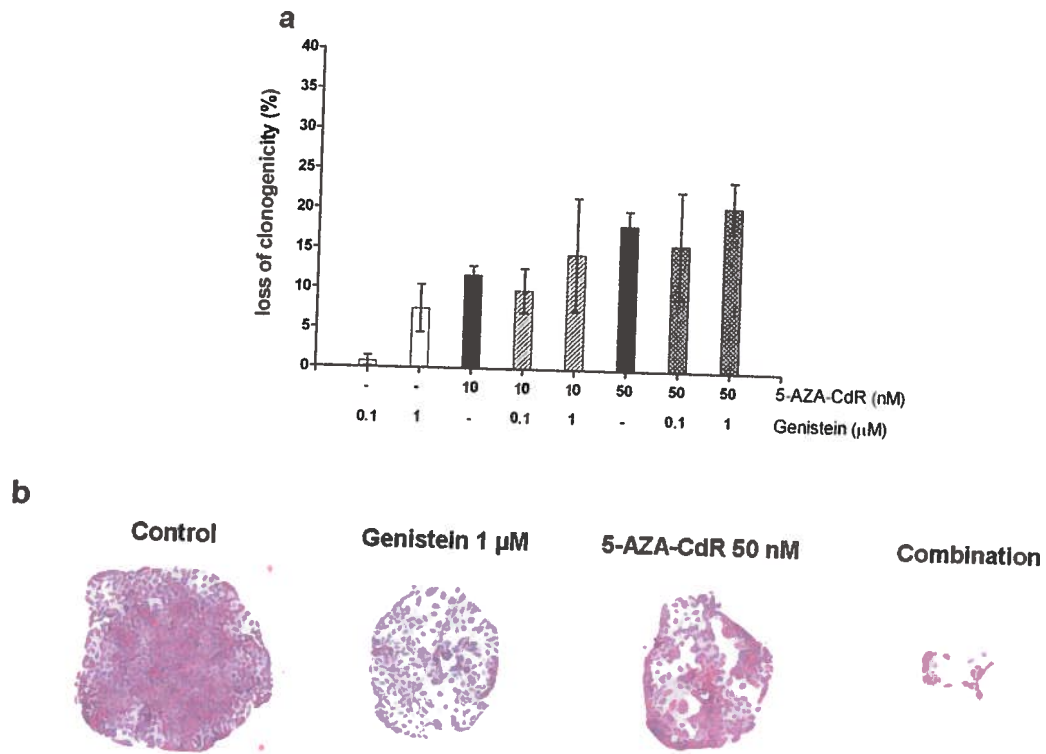
<i>Cell lines</i>	<i>Groups</i>	<i>Cellular characteristics</i>				
		Normal cells	Necrotic cells	Giant cells	Mitosis	Total
Calu-6	Control	85	15	0	0	100
	Genistein 1 μ M	58	31	6	5	100
	5-AZA-CdR 50 nM	52	28	20	0	100
	Combination	28	29	42	1	100
MDA-MB-231	Control	62	38	0	0	100
	Genistein 1 μ M	34	62	3	1	100
	5-AZA-CdR 50 nM	23	74	3	0	100
	Combination	12	81	7	0	100
DLD-1	Control	94	3	0	3	100
	Genistein 1 μ M	84	8	6	2	100
	5-AZA-CdR 50 nM	82	11	7	0	100
	Combination	20	24	28	0	72

**Appendice E : Effet de la 5-AZA-CdR et de la
génistéine sur le potentiel clonogénique et la
morphologie de la lignée de cancer du sein
MDA-MB-231.**



Effet de la combinaison de la 5-AZA-CdR et de la génistéine sur la lignée de cancer du sein MDA-MB-231. (a) Perte de la clonogénicité des cellules MDA-MB-231 ($n = 6$), après un traitement de 48 h à la 5-AZA-CdR (10 and 50 nM) et/ou la génistéine (0,1 and 1 μM). Les résultats montrent que la combinaison avec la 5-AZA-CdR à 50 nM produit une augmentation significative de la perte de clonogénicité ($P < 0,05$). (b) Coloration à l'hématoxyline/éosine des cellules MDA-MB-231 montre l'apparition des changements morphologiques induit par le traitement (Grossissement, x400). La section de matériels et méthodes est identique à celle décrite pour la lignée Calu-6 dans la deuxième partie section 3 de la thèse.

**Appendice F : Effet de la 5-AZA-CdR et de la
génistéine sur le potentiel clonogénique et la
morphologie de la lignée de cancer du colon
DLD-1.**

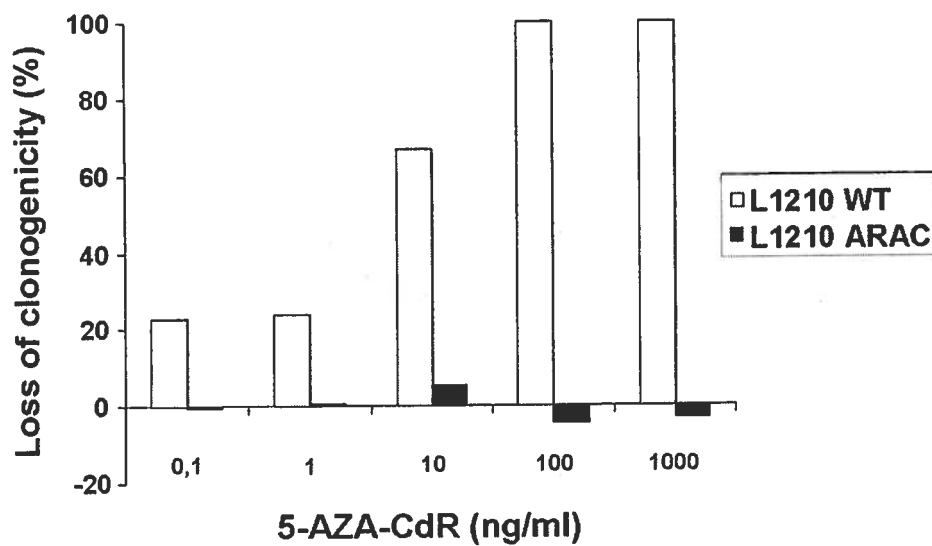


Effet de la combinaison de la 5-AZA-CdR et de la génistéine sur la lignée de cancer du colon, DLD-1. (a) Perte de la clonogénicité des cellules DLD-1 ($n = 6$), après un traitement de 48 h à la 5-AZA-CdR (10 and 50 nM) et/ou la génistéine (0,1 and 1 μM). Les résultats montrent que la combinaison avec la 5-AZA-CdR à 50 nM produit une augmentation de la perte de clonogénicité. (b) Coloration à l'hématoxyline/éosine des cellules DLD-1 montre l'apparition des changements morphologiques induit par le traitement (Grossissement, x400). La section de matériels et méthodes est identique à celle décrite pour la lignée Calu-6 dans la deuxième partie section 3 de la thèse.

Chaque image de microscopie montre un clone représentatif sélectionné pour chaque condition expérimentale. Ainsi, on observe une réduction du nombre de cellules par colonie. Cette expérience montre que le traitement de la génistéine, de la 5-AZA-CdR et de la combinaison diminue le nombre de cellules par colonies ainsi que le nombre de

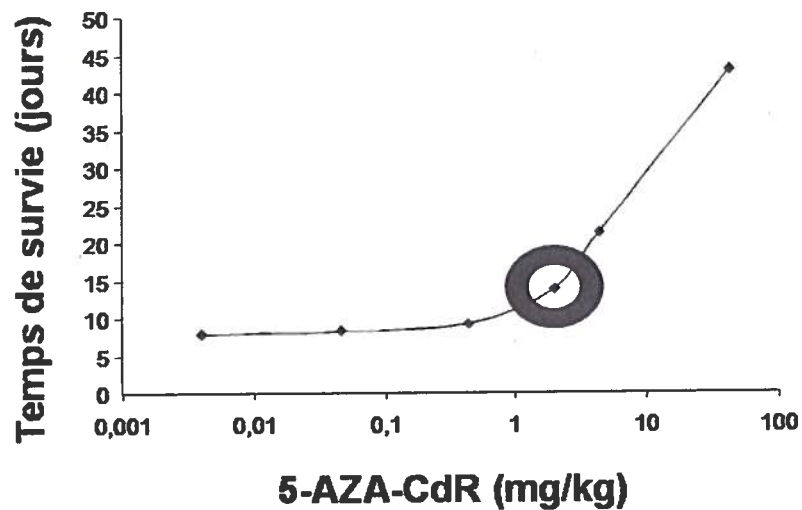
colonies. Dans ce cas présent, la réduction du nombre de clones produite par la combinaison des deux agents n'est pas significative. Or, la combinaison produit une réduction importante de la taille et du nombre de cellules par colonies. Les expériences de microscopies démontrent clairement une limite du test de clonogénicité. En effet, ce test ne peut tenir compte de la réduction du nombre de cellules par colonie.

**Appendice G : Test de la résistance à
l'exposition à la 5-AZA-CdR de la lignée
cellulaire L1210/ARA-C.**



Pourcentage de la perte de clonogénicité lors d'un traitement à la 5-AZA-CdR sur la lignée L1210 ARA/C ($n=1$), pour 24h d'exposition. Les résultats montrent que la lignée est résistante à l'effet anticancéreux de la 5-AZA-CdR comparée à la lignée L1210 sauvage (WT).

**Appendice H : Courbe de dose-réponse de
l'effet d'une infusion de la 5-AZA-CdR sur le
temps de survie des souris.**



Courbe de dose-réponse du temps de survie des souris leucémiques auxquelles on a injecté 10 000 cellules L1210 pour une infusion de 8 h en fonction de la dose de la 5-AZACdR. La dose de 2mg/kg qui produit une augmentation du temps de survie de 14 jours après l'injection des cellules leucémiques, a été choisie. En effet, le temps de survie produit par une infusion à 2 mg/kg, donne un point sur la courbe de dose-réponse qui se situe au bas de la courbe et permettra de mesurer les variations du temps de survie induite par la génistéine.