

Épigénétique et cancer

Epigenetics and cancer

Guillaume J.P. FILION
Pierre-Antoine DEFOSSEZ

CNRS UMR218,
Institut Curie, Section Recherche,
26 rue d'Ulm,
75248 Paris Cedex 05
<Defossez@Curie.fr>

Résumé. L'épigénétique désigne l'ensemble des modifications stables au cours des générations cellulaires n'impliquant aucun changement de la séquence du génome. Les modifications post-traductionnelles des histones et la méthylation de l'ADN sont les deux types d'information épigénétique les plus étudiés en raison de leur impact majeur sur la transcription. Le lien entre épigénétique et cancer provient du fait que les dérégulations épigénétiques participent fréquemment à la tumorigenèse par l'inactivation des gènes suppresseurs de tumeur. Ces dérégulations étant réversibles, des espoirs de traitement reposent sur une meilleure compréhension des mécanismes de maintien de l'information épigénétique. Parmi les différents systèmes d'inhibition de la transcription, la méthylation de l'ADN est le plus simple et le mieux caractérisé à l'heure actuelle. Des inhibiteurs d'ADN méthyltransférases sont actuellement en cours d'essais cliniques et montrent déjà des résultats prometteurs. ▲

Mots clés : épigénétique, méthylation, méthyltransférases, histone, HDAC

Abstract. The term epigenetics encompasses all the modifications that are stable across cell generations, but which do not imply any change in DNA sequence. Post-translational modifications of the histones and DNA methylation are the most studied types of epigenetic information due to their major impact on transcription. The link between epigenetics and cancer arises from the fact that epigenetic deregulations frequently participate in tumorigenesis by inactivation of tumour-suppressor genes. Since these deregulations are reversible, hopes of treatment rely on a better understanding of the maintenance mechanisms of the epigenetic information. Among the different pathways of transcription inhibition, DNA methylation is the simplest and one of the best characterized at the present time. Inhibitors of DNA methyltransferases are currently under clinical trials and already show promising results. ▲

Key words: epigenetics, methylation, methyl-transferase, histone, HDAC

Ce Point sur... rend compte principalement de la réunion du Club Facteurs de croissance organisée par Louise Harel, François Radvanyi et Geneviève Almouzni à l'Institut Curie le 30 janvier 2006, avec le soutien de la Société française du cancer et du canceropôle d'Ile-de-France.

Modification des histones et méthylation de l'ADN : des marques épigénétiques

Il est frappant de constater que certains concepts biologiques que l'on croyait définitivement acceptés ont discrètement quitté la scène au cours des dernières années. Ainsi en va-t-il du « programme génétique », désormais largement supplanté par la notion moderne de « génome ». Ce changement de vocabulaire, apparemment anodin, n'en reflète pas moins une vision radicalement différente de la génétique. Le rapport

des organismes à leur patrimoine génétique est aujourd'hui envisagé de façon beaucoup moins déterministe.

En effet, il est établi depuis longtemps que les cellules d'un organisme, aussi différenciées soient-elles, partagent le même génome. Une information supplémentaire est donc nécessaire pour rappeler à la cellule une décision de développement prise plusieurs générations cellulaires auparavant. Ce constat a amené à supposer l'existence d'une mémoire cellulaire qui puisse traverser la mitose ou la méiose et réguler l'activité du génome d'une cellule, baptisée « mémoire épigénétique ». Le terme épigénétique regroupe dans son acception actuelle l'ensemble des modifications n'altérant pas la séquence du génome, et stables au cours des générations cellulaires. Les supports de l'information épigénétique sont multiples, mais deux sites sont particulièrement importants : les histones et la molécule d'ADN elle-même [1].

Les histones sont des protéines basiques, assemblées en octamères, et autour desquelles l'ADN s'enroule pour former une structure appelée nucléosome. L'existence des nucléosomes est un des éléments qui permet la compaction de l'ADN dans le noyau. Cependant, l'action des histones ne se limite pas à

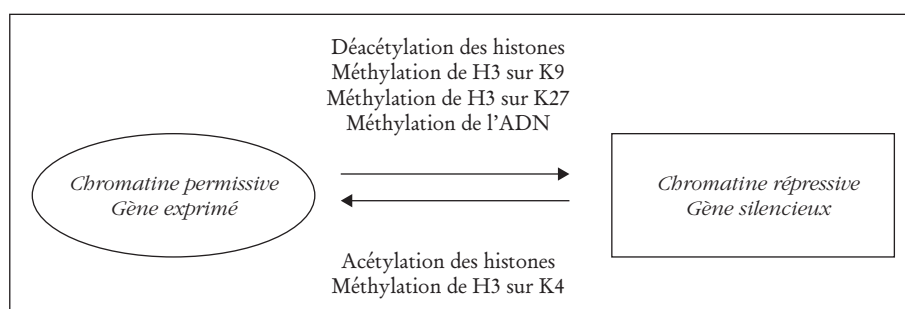


Figure 1. Modifications épigénétiques et expression des gènes. L'activité d'un gène dépend du contexte chromatinien dans lequel il se trouve. L'état d'acétylation et de méthylation des histones ainsi que l'état de méthylation de l'ADN régulent cette activité et ont un caractère épigénétique. Le schéma est en réalité plus complexe, notamment en raison des interactions entre les marques épigénétiques.

ce rôle mécanique. Il est au contraire bien plus complexe et influence notamment l'activité des gènes. En effet, un grand nombre de résidus des molécules d'histones peuvent subir des modifications biochimiques, telles que l'acétylation et la méthylation. La combinatoire de ces modifications favorise ou non la transcription et régule ainsi localement l'expression des gènes (figure 1). Au cours de la synthèse de l'ADN, les histones sont déplacées pour permettre le passage de la fourche de réplication, puis rapidement redéposées sur les nouveaux brins d'ADN. Différents mécanismes s'exercent pour assurer que les marques portées par les histones sont reproduites à l'issue de la réplication. Cette stabilité justifie le qualificatif de marques épigénétiques [2].

L'ADN lui-même est la cible d'une seule modification épigénétique : la méthylation. Cette modification chimique peut seulement s'exercer sur la cytosine du dinucléotide CpG. L'adjonction d'un groupement méthyle ne perturbe pas les appariements Watson-Crick mais régule la liaison des facteurs de transcription à l'ADN. De nombreux gènes présentent un promoteur riche en CpG ; dans la vaste majorité des cas, la méthylation du promoteur entraîne une répression transcriptionnelle forte (figure 1). Lors de la réplication, l'ADN néosynthétisé est déposé sous forme non méthylée, mais un processus de relecture entraîne la méthylation rapide d'un brin d'ADN apparié à un brin méthylé (figure 2). Par conséquent, la méthylation de l'ADN est stable au cours de la

réplication et mérite donc elle aussi la qualification de marque épigénétique.

Anomalies épigénétiques contribuant à la transformation tumorale

Le cancer est causé par l'activation de gènes transformants (les oncogènes) et la perte de gènes protecteurs (les gènes suppresseurs de tumeurs). La perte des gènes suppresseurs de tumeurs peut être causée par des altérations structurales du génome : mutations ponctuelles, délétions ou réarrangements. Outre ces causes génétiques, l'expression des gènes suppresseurs de tumeurs peut aussi être perdue à la suite d'anomalies épigénétiques, parfois appelées « épimutations » [3].

La perte des gènes par épimutation est au moins aussi fréquente que leur perte par mutation structurale [4]. Certains gènes, comme HIC1, sont même affectés exclusivement par les anomalies épigénétiques [5]. La transformation tumorale est un phénomène multi-étapes, nécessitant l'activation de plusieurs oncogènes et l'inactivation de plusieurs gènes suppresseurs de tumeurs. Or, les mutations de l'ADN sont peu fréquentes ; la probabilité d'inactiver successivement plusieurs gènes est donc très faible. En revanche, des mutations altérant le fonctionnement normal de la machinerie épigénétique

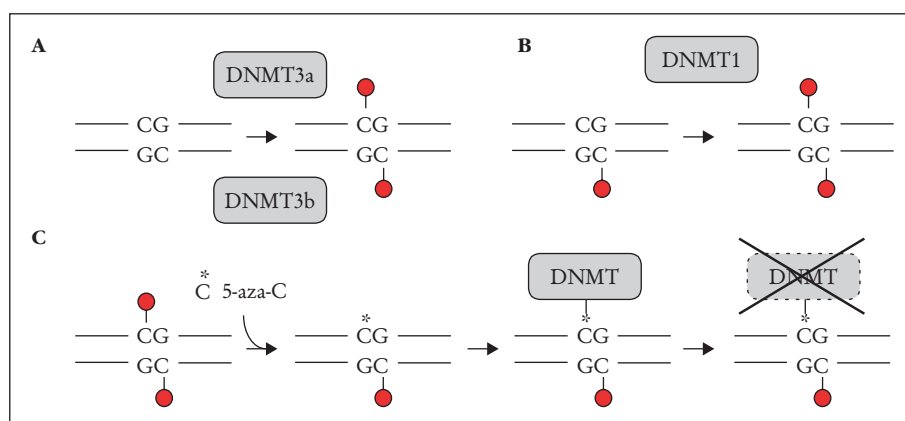


Figure 2. Action des ADN méthyltransférases et d'un de leurs inhibiteurs. **A.** Les enzymes DNMT3a et DNMT3b ajoutent des groupements méthyle (cercles) sur les deux brins de l'ADN. Elles déposent ainsi de nouvelles marques épigénétiques. **B.** DNMT1 méthyle un seul brin à la fois et assure ainsi le maintien des motifs de méthylation après la réplication de l'ADN. **C.** La 5-aza-cytidine est un inhibiteur des DNMT. Elle est incorporée dans l'ADN au cours de la réplication, puis forme un complexe covalent avec les DNMT. Ces complexes sont ensuite dégradés, ce qui cause la déplétion des enzymes dans la cellule et l'impossibilité de maintenir les motifs de méthylation.

tique peuvent causer la perte simultanée de différents gènes. Par ailleurs, l'information épigénétique étant plus labile, les probabilités d'épimutations sont plus importantes.

Un gène méthylé est invalidé de façon aussi totale que s'il avait fait l'objet d'une mutation. Une différence fondamentale existe cependant entre ces deux situations. Une mutation n'est pas réversible, alors qu'un gène méthylé est silencieux mais structurellement intact. Lever la répression transcriptionnelle dont il est l'objet suffit donc à rétablir sa fonction [3]. Si, par exemple, la fonction en question est de contrôler le cycle cellulaire, la cellule tumorale traitée arrêtera de proliférer.

Deux thèmes centraux ont donc motivé la rencontre du 30 janvier 2006 entre chercheurs et cliniciens sur le thème de l'épigénétique : la fréquence des dérégulations épigénétiques dans les tumeurs et la réversibilité de ces anomalies épigénétiques. Les enjeux de l'épigénétique se traduisent en termes d'outils de diagnostic et de traitements. Lors de la journée Épigénétique et cancer, les interventions de Geneviève Almouzni (Institut Curie, Paris), Wendy Bickmore (MRC, Edinburgh), Adrian Bird (Wellcome Trust, Edinburgh), Guillaume Filion (Institut Curie, Paris), Annick Harel-Bellan (Institut André Lwoff, Villejuif), Anja Groth (Institut Curie, Paris), Sylvie Gazzari (Inserm, Grenoble), Bryan Turner (université de Birmingham) et Jean-Pierre Issa (MD Anderson Cancer Center, Houston) ont contribué à mieux caractériser les relations entre les marques épigénétiques, à présenter les interprètes de ces marques épigénétiques et, enfin, à proposer des thérapies anticancéreuses.

Lien entre les différents systèmes épigénétiques dans les cancers

Les phénomènes épigénétiques sont intimement liés au cycle cellulaire car leur nature même implique l'existence de mécanismes de conservation de l'information au cours de la synthèse de l'ADN et de la mitose. Le cancer étant notamment un dérèglement du cycle cellulaire, il est naturel que ces anomalies se reflètent sur les principaux acteurs de l'épigénétique. Une partie de la présentation de Geneviève Almouzni s'est attachée à décrire l'utilisation potentielle du couplage entre épigénétique et réplication pour le diagnostic. Lors de la réplication, un chaperon d'histones, CAF1, facilite l'assemblage des nucléosomes sur l'ADN nouvellement synthétisé. L'assemblage de la chromatine stimulé par CAF1 est donc intimement lié à la capacité de prolifération de la cellule. Ainsi, il est possible d'utiliser CAF1 comme marqueur de prolifération à des fins diagnostiques, comme le montrent les travaux réalisés sur le cancer du sein à l'Institut Curie.

Les premières études sur la transcription avaient déjà mis en évidence l'existence de différents états de la chromatine. Ainsi parlait-on de chromatine « ouverte » ou « fermée ». Le travail présenté par Wendy Bickmore sur l'organisation du noyau soulève des questions intéressantes sur les mécanismes de dérégulation transcriptionnelle dans les cancers. Le génome est partagé en larges régions, certaines extrêmement compactées dans le noyau et très peu exprimées, d'autres extrêmement flexibles, mobiles et transcrites. Ainsi, le chromosome 18 est essentiellement compacté alors que le chromosome 19 est plus décondensé. L'existence de domaines permissifs à la transcription suggère que certaines activations géniques sont plus « aisées » et donc plus fréquentes dans les cancers. De fait, de nombreux gènes du chromosome 19 sont

surexprimés dans les cancers. Les liens de cause à effet entre marques épigénétiques et structure spatiale de la chromatine sont encore inconnus. Il n'en reste pas moins qu'il faut désormais inclure la structure à grande échelle de la fibre de l'ADN parmi les paramètres influençant l'expression des gènes.

Un des dangers pour la réflexion actuelle est de considérer que toutes les modifications des histones sont de nature épigénétique et constituent un « code ». C'est un point sur lequel Bryan Turner s'est étendu dans son introduction, afin de rappeler les distinctions entre transduction d'un signal et régulation épigénétique de la transcription. Certains mécanismes de transduction aboutissent en effet à des modifications des histones, qui vont déterminer l'activation ou la répression du gène cible. Or, ces modifications ne sont pas permanentes et vont progressivement être effacées après la disparition du signal. Cette remarque soulève une question sans réponse à l'heure actuelle. Quels sont les déterminants qui confèrent à une marque un statut épigénétique ? Pourquoi certaines modifications des histones ou méthylations de l'ADN sont-elles stables alors que d'autres sont labiles ? Cette question est vouée à prendre une grande importance car seuls les mécanismes stables peuvent potentiellement conduire au cancer. Existerait-il un système de vérification et de réparation de l'information épigénétique qui aurait pour rôle de surveiller l'intégrité et la coordination des marques épigénétiques ? Une réponse séduisante à cette question résiderait dans la coopération entre les différents systèmes. Une marque épigénétique ne serait pas stable seule, mais seulement en présence d'une marque synonyme.

De tels mécanismes d'auto-entretien entre marques sont déjà établis entre la méthylation de l'ADN et la méthylation de la lysine 9 de l'histone H3, toutes deux inhibitrices de la transcription. Apparemment, chacune de ces marques peut entraîner la conservation de l'autre et ainsi renforcer le maintien au cours des générations cellulaires. Jean-Pierre Issa a cependant apporté, dans sa conclusion, des données suggérant que les gènes peuvent être réprimés dans les cancers *via* le système méthylation de l'ADN/méthylation de la lysine 9 de l'histone H3, ou *via* celui de méthylation de la lysine 27 de l'histone H3, témoignant en faveur de l'indépendance des deux systèmes. Des résultats obtenus sur des cellules en culture suggèrent un couplage entre méthylation de l'ADN et méthylation de la lysine 27 de l'histone H3, si bien que, à l'heure actuelle, la question des relations entre ces deux grands systèmes n'est pas tranchée.

Acteurs de la répression transcriptionnelle par méthylation

L'anomalie épigénétique la plus fréquemment relevée dans les tumeurs est la méthylation de l'ADN de certains gènes, causant la perte de leur expression [5-7]. Différentes avancées techniques font que cette marque est aisément détectable et quantifiable, même en présence d'un large excès d'ADN non méthylé. Par ailleurs, comme la méthylation est un événement précoce de la tumorigenèse, elle peut servir de marqueur. Ainsi, la détection de méthylation du gène *CDH1*, codant la E-cadhérine, dans les cellules présentes dans l'urine est utilisée dans le diagnostic du cancer de la vessie [8]. Pour prendre un autre exemple, l'examen de l'ADN des cellules présentes dans des lavages bronchiques

permet de détecter la méthylation de gènes impliqués dans le cancer du poumon.

Bien que le phénomène d'hyperméthylation des promoteurs ait été mis en évidence depuis longtemps dans les tumeurs, le mécanisme moléculaire expliquant la répression transcriptionnelle qui en découle a été découvert tardivement. Des protéines capables de reconnaître spécifiquement l'ADN méthylé se fixent aux promoteurs hyperméthylés et inhibent fortement leur transcription.

Adrian Bird, découvreur des premières protéines capables de reconnaître l'ADN méthylé, a présenté ses travaux récents sur deux d'entre elles : MBD2 et MeCP2. MBD2 semble grandement favoriser l'apparition des tumeurs du côlon. Le modèle murin où le gène *Mbd2* a été invalidé ne montre en apparence que quelques défauts de comportement. Ce phénotype apparemment anodin cache en réalité des bouleversements transcriptionnels importants. De plus, dans un contexte génétique, *APC^{Min/+}* favorisant l'apparition précoce des polypes et tumeurs dans le côlon, la délétion de *Mbd2* a un effet grandement protecteur. Étonnamment, la réduction globale du niveau de méthylation chez des souris *Dnmt1[±]* conduit au même effet protecteur, suggérant par là même que l'hyperméthylation suivie du recrutement de MBD2 est nécessaire à la formation des cancers.

Par comparaison, *MeCP2* est lié au chromosome X et son invalidation dans un contexte hétérozygote chez les souris femelles conduit à des défauts d'apprentissage et de comportement rappelant le syndrome de Rett chez l'homme. Les perturbations transcriptionnelles causées par la délétion sont extrêmement subtiles et ne semblent pas protéger contre les tumeurs. En résumé, tout en établissant à nouveau le rôle des inactivations épigénétiques dans la formation des cancers, ces données incriminent spécifiquement MBD2. Des protéines possédant apparemment les mêmes propriétés moléculaires ont donc des contributions inégales dans le cancer.

Les protéines humaines capables de se lier à l'ADN méthylé se divisent actuellement en trois familles, selon le motif protéique responsable de la reconnaissance du groupement méthyle. Lors de son intervention, Guillaume Filion a présenté deux protéines récemment caractérisées qui reconnaissent elles aussi l'ADN méthylé. Ces protéines sont apparentées à Kaiso et lient l'ADN méthylé par un motif à doigt de zinc. Cette découverte suggère que le nombre de protéines cellulaires susceptibles de participer à l'inactivation des gènes par méthylation est plus élevé qu'il n'est couramment supposé, et qu'il pourrait encore augmenter dans le futur.

Comment réexprimer les gènes suppresseurs de tumeurs ?

Comme nous l'avons souligné plus haut, il est possible d'effacer les épimutations en bloquant soit le processus de maintien des marques, soit le processus d'interprétation de celles-ci. Bryan Turner a présenté son travail récent sur deux molécules inhibitrices des déacétylases d'histones (HDAC). En bloquant ces enzymes, les histones incorporées au cours de la réplication de l'ADN restent dans un état acétylé, favorisant ainsi la transcription (figure 1). Les promesses de réactivation des gènes suppresseurs de tumeurs ne semblent pourtant pas tenues par ces molécules. Les études par puces à ADN souffrent d'une grande variabilité entre les expériences et ne montrent pas de bouleversements transcriptionnels majeurs. Cette grande hétérogénéité est retrouvée chez les patients

souffrant de leucémie myéloïde aiguë et l'absence de corrélation entre le traitement et le degré d'acétylation ou l'expression des gènes laisse perplexe. Le manque d'efficacité de cette approche réside sans doute dans la complexité du système. D'une part, les HDAC ont d'autres cibles que les histones et, d'autre part, les nombreuses modifications des histones ne sont pas indépendantes. Une stratégie alternative consiste donc à viser le système plus simple de méthylation de l'ADN. *In vitro*, ces traitements sont particulièrement efficaces lorsqu'ils sont combinés à un traitement inhibant les HDAC [9].

Plusieurs inhibiteurs des ADN méthyltransférases sont actuellement en essais cliniques et présentent des résultats prometteurs, notamment sur les leucémies myéloïdes aiguës et les myélodysplasies. Les molécules principalement employées en clinique sont la 5-aza-cytidine (5-aza-C) et la 5-aza-2-déoxycytidine (5-aza-dC, ou décitabine). Ces deux homologues de la cytosine agissent en s'intégrant dans l'ADN et en formant des complexes irréversibles avec les ADN méthyltransférases, entraînant leur destruction (figure 2). Ce type de molécule ne provoque donc pas directement la déméthylation de l'ADN, mais empêche sa reméthylation après la synthèse de l'ADN. Ainsi, au moins deux divisions cellulaires sont nécessaires à la perte totale de méthylation. D'autres classes d'inhibiteurs, agissant directement sur les enzymes sans s'intégrer dans l'ADN, sont actuellement en cours de développement [10].

Jean-Pierre Issa, un des précurseurs des thérapies épigénétiques, a présenté les résultats d'une étude clinique de phase III des effets de la décitabine sur 170 patients atteints de myélodysplasie. Deux faits marquants sont à retenir. Premièrement, les paramètres du traitement (dose et espacement des soins) sont critiques. La dose de décitabine la moins élevée, environ un dixième de la dose maximale tolérée, est aussi la plus efficace. Cette observation paradoxale s'explique par le fait qu'une dose élevée freine la division des cellules et, par là même, la déméthylation des gènes cibles. Deuxièmement, le traitement, s'il est appliqué de façon optimisée, est d'une remarquable efficacité, avec un taux de rémission complète de l'ordre de 50 %. Par opposition à un traitement chimiothérapeutique classique, la décitabine induit une disparition des cellules anormales avec une cinétique relativement lente. En revanche, ce traitement n'a que peu d'effets secondaires toxiques et ne nécessite pas d'hospitalisation. Ces résultats très encourageants permettent d'envisager maintenant des essais à plus grande échelle, ainsi que l'application à d'autres types de cancers.

Il se dégage clairement, à l'issue de cette journée de conférences, que l'épigénétique est un domaine scientifique en plein essor, bénéficiant de l'apport des chercheurs comme des cliniciens. Les découvertes des phénomènes épigénétiques et de leurs mécanismes traduisent des avancées majeures sur le plan fondamental et ouvrent un vaste champ d'applications thérapeutiques. ▼

RÉFÉRENCES

1. Jaenisch R, Bird A. Epigenetic regulation of gene expression : how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nat Genet* 2003 ; 33 : 245-54.
2. Ray-Gallet D, Gerard A, Polo S, Almouzni G. Variations sur le thème du « Code des histones ». *Med Sci (Paris)* 2005 ; 21 : 384-9.

3. Laird PW. Cancer epigenetics. *Hum Mol Genet* 2005 ; 14 ; (Spec No 1) : R65-76.
4. Jones PA, Baylin SB. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet* 2002 ; 3 : 415-28.
5. Chopin V, Leprince D. HIC1 : le nœud du problème en 17p13.3? *Med Sci (Paris)* 2006 ; 22 : 54-61.
6. Jeanteur P. 14-3-3sigma (stratifin), un potentiel gène suppresseur de tumeur fréquemment inactivé par méthylation dans les cancers du sein. *Bull Cancer* 2000 ; 87 : 525.
7. Larsen CJ. La répression de p16 (INK4a) par méthylation du promoteur est un événement précoce de l'oncogenèse. *Bull Cancer* 2000 ; 87 : 132-3.
8. Laird PW. The power and the promise of DNA methylation markers. *Nat Rev Cancer* 2003 ; 3 : 253-66.
9. Peixoto P, Lansiaux A. Inhibiteurs des *histone-deacetylases inhibitors* : de la TSA au SAHA. *Bull Cancer* 2006 ; 93 : 27-36.
10. Lyko F, Brown R. DNA methyltransferase inhibitors and the development of epigenetic cancer therapies. *J Natl Cancer Inst* 2005 ; 97 : 1498-506.