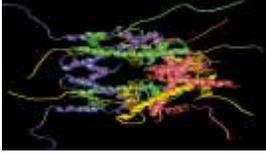


ET



ONZAO

**4^{èmes} Journées Auressiennes Internationales de Pneumologie
BATNA 20-21 mai 2009**

Association Franco-Algérienne
de Pneumologie: AFAP

Claude KRESPINE HÔPITAL SIMONE VEIL

Définition de l'épigénétique

"mécanismes de **régulation cellulaire** non codés par la séquence d'ADN, en étant néanmoins **transmissibles** lors de la mitose et méiose*

☐ l'épigénétique comble la brèche entre l'inné et l'acquis

☞ Elle est l'étude des changements héréditaires dans la fonction des gènes ayant lieu sans altération de la séquence ADN

☉ En se greffant sur l'information contenue dans la séquence ADN, les modifications épigénétiques contribuent à moduler l'expression des gènes**

** Kern I et coll. Rev Med Suisse. 2007; 3: 100: 540-545
*Herman JG et al. N Engl J Med; 2003; 349: 21: 2042-2054

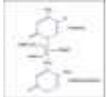
Les rôles physiologiques de l'épigénétique

❖ Expression des gènes réglée par des facteurs de transcription se liant à l'ADN en fonction des besoins cellulaires

Les mécanismes épigénétiques peuvent moduler l'expression des gènes



En modifiant la **méthylation** des résidus de cytosine au niveau de l'ADN



Par modification post traductionnelles des Histones **acétylation**

Le changement de conformation des histones module la transcription

* Sadoni M. et al. J Cell Biol. 1999; 146: 6/ 211-2265

La transcription d'un gène peut être **réprimée** par la méthylation des cytosines

☞ Dans les séquences dinucléotidiques CpG*

☑ Ils sont sous représentés dans le génome humain

SAUF

Dans de courtes régions appelées "îlots (motifs) CpG"

Au niveau des régions promotrices ou le 1er exon de 60% des gènes humains

Les profils de méthylation des îlots CpG dans les différents types de cellules sont acquis durant la différenciation cellulaire



* Déoxycytidine phosphate Déoxyguanosine

Plus le niveau de **méthylation des îlots CpG** présents dans les régions régulatrices d'un gène donné est **élevé**, plus faible sera le taux de transcriptions de ce gène

Les cellules embryonnaires totipotentes: les moins méthylées



Les îlots CpG situés dans les promoteurs ne sont pas méthylés

Les CpG dans les exons, introns ou régions non codantes qui constituent la majorité de l'ADN des cellules somatiques ont des niveaux élevés de méthylation

La méthylation est catalysée par une famille d'ADN méthyltransférase (DNMT)

Une fois les cellules différenciées, l'état de méthylation des îlots CpG est transmis lors de la division cellulaire

☞ Transmission de cellules mère à fille de certaines régions du génome dans un état hyperméthylé

Les séquences méthylées attirent des protéines contenant un "methyl-CpG binding domain" (MBP) qui s'attache à l'ADN

Les MBP et DNMT vont à leur tour recruter des enzymes (histones déacétylases) qui vont modifier les histones

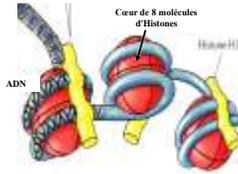
➔ **Compaction de la chromatine des gènes hyperméthylés**



Répression de leur transcription

Les Histones

Elles sont constituées d'un octamère contenant 2 de chacune des sous unités H2A, H2B, H3 et H4

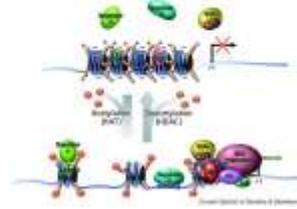


Le filament d'ADN s'enroule autour de l'histone = chromatine

- ☐ l'extrémité N-terminale de chacune de ces sous unités porte plusieurs possibilités modifications covalentes
 - Phosphorylation
 - Acétylation
 - Méthylation.....

Le type et la localisation de ces modifications entraînent un changement de conformation de la chromatine qui facilite ou bloque l'accès de l'ADN aux protéines de transcription

de manière simplifiée



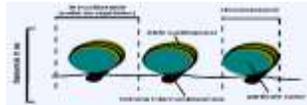
Acétylation des histones

Activation de la transcription

Déacétylation des histones

Blocage transcription

Au total



Les modifications du degré de méthylation des cytosines dans les îlots CpG

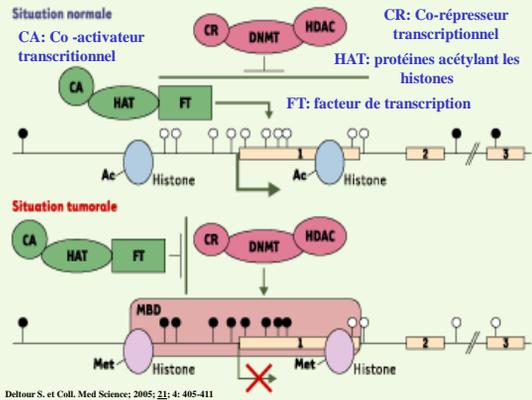
Modulent le degré de compaction de la chromatine

Régulation épigénétique majeure pour déterminer et fixer les destinées cellulaires

Au cours de la gamétogénèse

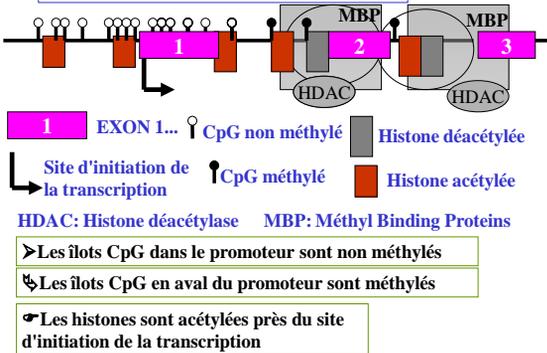
Lors du développement embryonnaire

Dans la cancérogénèse

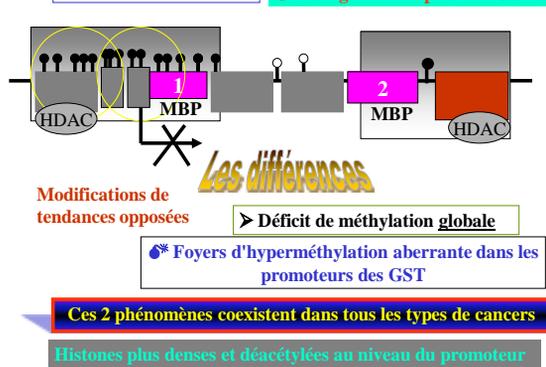


Deltour S. et Coll. Med Science; 2005; 21; 4: 405-411

Cellule normale: GST activement transcrit*



Cellule tumorale: GST **⊗** Blocage transcription du GST



Modifications de tendances opposées

➤ Déficit de méthylation globale

⊛ Foyers d'hyperméthylation aberrante dans les promoteurs des GST

Ces 2 phénomènes coexistent dans tous les types de cancers

Histones plus denses et déacétylées au niveau du promoteur

Kern L. et Coll. Rev Med Suisse; 2007; 2: 100: 540-545

Suivant le type de cancer, l'hyperméthylation focale aberrante peut concerner un ou plusieurs GST

- ☑ La méthylation du promoteur et du site d'initiation de la transcription entraîne une inhibition de la transcription du GST
- ☑ La méthylation des dinucléotides CpG situés dans des zones non régulatrices du gène et des exons en aval du promoteur n'a pas d'influence sur son expression

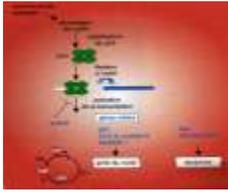
Conséquences fonctionnelles d'une hyperméthylation dans le promoteur identiques à celles d'une mutation dans le gène

➔ Avantage de croissance due à l'inactivation d'un GST qui va favoriser une expansion clonale

Au total

Accumulation successives

- ✳ d'altérations épigénétiques
 - ✳ de mutations génétiques
- Dans des GST appartenant aux principales voies de régulation



- ✦ Contrôle du cycle cellulaire
- ✦ Contrôle réparation de l'ADN
- ✦ Contrôle de l'apoptose
- ✦ Contrôle des interactions intercellulaires
- ✦ Contrôle de la réponse aux facteurs de croissance

TRANSFORMATION EN CELLULE TUMORALE

Implications de mutations génétiques et/ou épigénétiques de GST

GST	Autres noms	Cancers associés	Mutations génétiques	Altérations épigénétiques	Rôles biologiques
APC		Côlon, estomac, foie, pancréas...	++	++	Multiples
BRAC1		Sein, ovaire	++	++	Réparation ADN
CDHI		Estomac, thyroïde, sein	++	++	Adhérence cellulaire
CDKN2A	p ^{16INK4A}	Multiples	++	++	Cycle cellulaire
MGMT	E-cadherin	Multiples	Non décrit	++	Réparation ADN
RB1		Rétinoblastome, Poumon	++	++	Cycle et apoptose

Les cellules cancéreuses sont habituellement caractérisées par un déficit global de méthylation de 25%

Effet cellulaire de cette hypométhylation mal compris*

✳ Activation possible de proto oncogènes par déméthylation de séquences régulatrices de leur promoteur

Plus généralement

⊗ l'hypométhylation de séquences répétitives peut augmenter leur instabilité

➔ Réarrangements chromosomiques en particulier dans les régions centromériques



* Wilson AS et al. Biochim Biophys Acta; 2007; 1775: 1: 138-162

La méthylation comme marqueur diagnostique tumoral?

Le marqueur tumoral idéal

Présent à des stades tumoraux précoces ☉ Analyse aisée, reproductible et peu onéreuse

☉ Sensibilité et spécificité élevée

Hyperméthylation focale de divers GST et hypométhylation globale du génome sont retrouvées précocement dans le processus de cancérogénèse voire dans les lésions précancéreuses

➤ poumon, côlon, foie, œsophage, sein,...

☑ Étudier les altérations moléculaires génétiques comme épigénétiques de l'ADN tumoral circulant

Détection de tumeurs par étude de méthylation de l'ADN extrait du plasma ou du sérum*

Méta-analyse {

- ☉ Sensibilité autour de 50%
- ☉ Spécificité proche de 100%

Diagnostic épigénétique de cancer par recherche de méthylation de l'ADN comme marqueurs**

- ☑ Prostate: GSTP1-TIG1-RARβ-APC: spécificité 100%
- ☑ Cancer du poumon: MGMT-p16-RARβ-RASSF1A-DAKP-CDHI-ARF dans le LBA

☉ Identification du cancer dans 68% des cas > cytologie

**Paluszczak J et al. J Appl Genet 2006; 47: 4 : 365-375

*Laird PW. Nature Rev Cancer. 2003; 3: 4: 253-256

Hyperméthylation de p16-MGMT dans cancer épidermoïde du poumon: + de 3 ans avant le diagnostic*

Méthylation de l'ADN dans de nombreux cancers

- col de l'utérus
- rein
- Vessie
- Sein
- Lymphome.....

La méthylation comme marqueur histologique tumoral?

- ↳ Différencier mésothéliome et adénocarcinome
- ↳ Différencier cancers épidermoïde et adénocarcinome
- ↳ Différencier les sous groupe histologiques du cancer du sein

*Palmisano WA et al. Cancer Res; 2000; 60; 21: 5954-5958

Autres sources prometteuses d'ADN

- salive
 - ↳ Cancers ORL
 - ↳ Cancers du poumon
- LBA
 - ↳ Cancers du poumon
- Urines
 - ↳ Cancers de la prostate
 - ↳ Cancers de vessie

- ⊗ Sensibilité meilleure qu'avec le plasma
- ⊗ Mais diminution spécificité due à la détection de lésions précancéreuses

La méthylation comme marqueur pronostique?

⊗ Le tabac majore les méthylation dans les CBNPC*

* Russo AL et al. Clin Cancer Res. 2005; 11; 7: 2466-2470

⊗ Hyperméthylation de E-cadhérine diminue la survie du cancer gastrique**

** Graziانو F et al. Clin Cancer Res; 2004; 10; 8: 2784-2789

⊗ Hyperméthylation de E-cadhérine diminue la survie du cancer de la langue***

*** Chang HW et al. Cancer; 2002; 94; 2: 386-392

⊗ Hyperméthylation de E-cadhérine augmente le risque de rechute du cancer du col de l'utérus****

**** Widschender A et al. Int J Cancer; 2004; 109; 2: 163-166

⊗ Méthylation aberrante des promoteurs des gènes codant la laminine-5

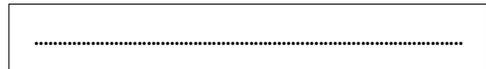
↳ laminine-5: ancrage cellules épithéliales à la membrane basale

Mauvais pronostic dans le cancer de la prostate*

* Sathyanarayana UG. et al. Clin Cancer Res. 2003; 9; 17: 6395-6400

Mauvais pronostic dans le cancer invasif de la vessie**

** Sathyanarayana UG. et al. Cancer Res; 2004; 64; 4: 1425-1430



Épigénétique et effets trans-générationnels

L'alimentation des parents et grands-parents lors de leur préadolescence

détermine majeure

↳ un risque de développer des complications cardiovasculaires ou un diabète de type 2*

- ⊗ Vinclozoline (fongicide agricole) chez des rates gestantes**
- ↳ Rats mâles in utero
 - ↳ Altération des fonctions testiculaires
 - ↳ Réduction motilité et nombre de leurs spermatozoïdes

Infertilité transmise de mâle à mâle sur au moins 4 générations

Corrélation avec altérations de la méthylation de l'ADN génomique

** Anway MD et al. Science; 2005; 308; 5727: 1466-1469
*Kaati G et al. Patient Educ Couns; 2006; 62; 1: 95-103

Epigénétique Tabagisme

et majoration des risques de cancers chez les descendants ?

L'empreinte parentale

* Normalement expression biallélique

↳ Les 2 allèles expriment le gène à des niveaux comparables

Une centaine de gènes ont une expression monoallélique

↳ l'origine parentale de l'allèle détermine s'il est ou non exprimé

Seul l'allèle paternel ou maternel est exprimé

L'autre allèle est "éteint" par des modifications épigénétiques

L'expression monoallélique des gènes à empreinte parentale est contrôlée par une méthylation différentielle des îlots CpG dans les régions régulatrices

Le dérèglement de ce mécanisme d'expression monoallélique entraîne des perturbations dans l'expression des gènes et peut conduire à certaines maladies

Syndrome de Prader-Willi Syndrome d'Angelman

Implication de gènes à empreinte parentale dans les cancers

IGF2	⚔ Vessie Poumon Ovaire	IGF2R	⚔ Sein Colon Poumon	Neurnatin	⚔ leucémies
-------------	------------------------------	--------------	---------------------------	------------------	-------------



Transmission d'îlots CpG hyperméthylés dans les régions promotrices des gènes soumis à l'empreinte parentale des parents fumeurs *



Russo AL et al. Clin Cancer Res. 2005; 11: 7: 2466-2470

Mécanisme épigénétique: une approche prometteuse

Les modifications épigénétiques sont réversibles

But: Inverser l'expression génique des cellules tumorales

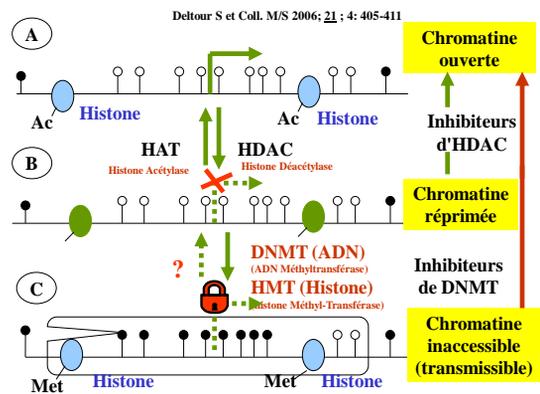
2 catégories d'inhibiteurs épigénétiques

Les inhibiteurs des méthyltransférases de l'ADN (DNMT)

Tableau DNMT

Les inhibiteurs des histones déacétylases (HDAC)

Tableau HDAC



Inhibiteurs épigénétiques	Autres déterminations	Mécanismes, structures chimiques	État de développement (2007)
5-azacytidine	Azacytidine Vidaza	Inh DNMT Analogue nucléosidique	S. Myélodysplasiques Phase I,II,III pour autres hémopathies
5-aza-2'-déoxycytidine	Décitabine Dacogen	Inh DNMT Analogue nucléosidique	Idem+ Phase I,II,III pour K col utérus, poumon
5,6-dihydro-5-azacytidine	DHAC	Inh DNMT Analogue nucléosidique	Phase I,II pour K ovaire et lymphome
Hydralazine		Inh DNMT Analogue nucléosidique	Phase I pour K col utérus
MG98	DNMT1 antisens	Inh DNMT Oligonucléotide antisens	Phase I,II pour tumeurs solides évoluées

Inhibiteurs épigénétiques	Autres déterminations	Mécanismes, structures chimiques	État de développement (2007)
Butyrate	Phénylbutyrate Buphenyl	Inh HDAC Acide gras	Phase I,II K rectocolique
Valproate	Dépakine	Inh HDAC Acide gras	Phase I pour LMA, leucémies
Suberoylanilide	SAHA, Vorinostat, Zolinza	Inh HDAC Acide hydroxamique	Phase I,II pour hémopathies malignes et tumeurs solides
FK228	Depsipeptide, FR 901228	Inh HDAC Térapeptide cyclique	Phase I,II pour LLC, LMA, Lymphome T
MS-275	Benzamidine	Inh DNMT Benzamide	Phase I,II pour tumeurs solides, lymphomes

Un exemple: la Décitabine (analogue de la cytidine)

À forte dose

- Inhibe la synthèse d'ADN
- Induit un arrêt du cycle cellulaire
- ↳ Entraîne la mort cellulaire

À faible dose

- * Induit une déméthylation en se liant de manière covalente aux DNMT
- ↳ Réactivation de GST dont les promoteurs étaient hyperméthylés

À faible dose *

- Dans les syndromes myélodysplasiques

◆ 100mg/m² toutes les 4 semaines. N= 80 patients

70% de réponses

35% de réponses complètes

+ moindre toxicité

* Kantarjian HM et al. Cancer; 2007; 109; 2: 265-273

