

MISE AU POINT

Cancers de l'œsophage, de l'estomac et du colorectum : la révolution épigénétique

Cancer in the esophagus, stomach, colon and rectum: the epigenetic revolution

René Lambert¹, Christian Partensky²

1. Screening Group

2. Infection Cancer Epidemiology Group, International Agency on Research on Cancer, 150, cours Albert Thomas, F-69374 Lyon Cedex 08

■ Résumé

La génomique permet de démembrer les étapes de la cancérogenèse et d'identifier des marqueurs biologiques spécifiques. Pour les cancers de l'œsophage, de l'estomac et du colorectum, elle est complémentaire de l'imagerie endoscopique qui confirmera la localisation, le diagnostic histologique et permettra éventuellement le traitement. L'épigénétique étudie les modifications de l'expression des gènes alors que la séquence primaire des nucléotides de l'ADN est respectée. La plus fréquente des modifications épigénétiques associées aux cancers correspond à l'hyperméthylation des îlots CpG du promoteur de multiples gènes et, notamment, de gènes suppresseurs de tumeurs ou de gènes impliqués dans les systèmes de réparation des lésions

de l'ADN, responsables d'un défaut d'expression. Les deux autres mécanismes épigénétiques susceptibles d'interférer avec l'expression des gènes correspondent au remodelage de la structure des histones dans la chromatine du noyau et l'altération des fonctions des microRNAs. Les cellules souches cancéreuses sont caractérisées par la capacité d'auto-renouvellement et la multi-résistance aux médicaments toxiques. L'application des biomarqueurs circulant dans le plasma au diagnostic des cancers digestifs repose sur deux cibles principales : l'hyperméthylation des îlots CpG et la surexpression de microRNAs. L'épigénétique explore aussi de nouvelles stratégies pour le traitement du cancer résistant à la chimiothérapie ou récidivant.

Mots-clés

ADN, Épigénétique, Hyperméthylation, Histones, MicroRNA, Cellules souches, Cancer œsophage, Cancer estomac, Cancer colorectal

■ Abstract

Genomics explores successive steps in cancerogenesis and identification of specific biomarkers. For cancer in the esophagus, stomach, colon and rectum, genomics is complementary to endoscopic imaging, which will confirm, localization, histology; and eventually will offer localized treatment. Epigenetics studies an altered expression of genes occurring in the absence of alterations in the primary sequence of the DNA nucleotides. The most frequent epigenetic mechanism is the hypermethylation of CpG islands in the promoters of many genes with silencing of suppressor or repair genes on DNA. Other mechanisms

include a remodeling in the chromatin of the nucleus of the structure of histones and an altered function of microRNAs resulting in activation of oncogenes or inhibition of repressor genes. Cancerous stem cells are characterized by their capacity to self-renewing and by their resistance to toxic agents. The potential application of circulating biomarkers to the diagnosis of digestive cancer is based on two major factors: hypermethylation of CpG islands and surexpression of microRNAs. Epigenetics also explores new strategies in the treatment of cancer with resistance to chemotherapy or of metastatic cancer.

Keywords

DNA, Epigenetics, Hypermethylation, Histones, MicroRNA, Stem cells, Esophageal cancer, Gastric cancer, Colorectal cancer

La base de données Globocan 2008 estime à 2,7 millions le nombre des cancers incidents de l'œsophage, de l'estomac et du colorectum survenus dans le monde en 2008, soit 21 % du nombre de tous les cancers. Pendant cette même année, le nombre des décès pour ces 3 localisations atteignait 1,8 million, soit 23 % du total des décès par cancer. La réduction récente de la mortalité par cancers du tube digestif est surtout liée au dépistage et à la plus grande précocité des diagnostics. Au moment même où les techniques d'imagerie ont considérablement progressé *et alors* que le dépistage des cancers colorectaux s'est généralisé sous forme d'interventions organisées par les autorités de la Santé et d'exams « opportunistes », la discipline génomique prépare une révolution au moins aussi importante dans le diagnostic précoce des lésions néoplasiques en démembrant les étapes de la cancérogenèse et en identifiant des marqueurs biologiques spécifiques. Cette révolution concerne l'ensemble de l'oncologie mais, pour l'œsophage, l'estomac et le colorectum, elle est complémentaire des progrès de l'imagerie endoscopique dotée de la haute résolution, la magnification et l'essor du traitement de l'image avec la technique de l'imagerie à bandes spectrales étroites (*Narrow Band Imaging* ou NBI).

Alors que la génétique se consacre aux altérations primaires de l'ADN, l'épigénétique étudie l'ensemble des modifications de l'expression des gènes qui se produisent sans que la séquence primaire des nucléotides soit altérée. Ces modifications de l'expression se transmettent d'une génération de cellules à l'autre au cours de la mitose, même si leur cause a disparu. Au cours du développement, vient ainsi s'ajouter à l'héritage génétique une programmation par des mécanismes épigénétiques, sous l'influence de facteurs environnementaux. L'analyse épigénétique apporte une ouverture sur des tests « filtres » qui peuvent être réalisés sur un échantillon de selles ou une prise de sang [1] qui permettraient de cibler les personnes à risque élevé de cancer digestif. La connaissance des étapes de la cancérogenèse et l'identification des cellules à l'origine de la prolifération anormale – les cellules souches cancéreuses [2-8] – permettent enfin d'escompter une ouverture thérapeutique dans un proche avenir.

■ Génome de la cellule normale

Chromosomes et Acide DésoxyriboNucléique (ADN)

Le matériel génétique est réparti dans les chromosomes du noyau de la cellule ; chez l'homme, il y a 23 paires de chromosomes. Chaque paire est composée d'un chromosome d'origine paternelle et d'un chromosome d'origine maternelle. Le matériel génétique du noyau assure le fonctionnement de la cellule et sa reproduction. Le cycle cellulaire consiste en 4 phases successives appelées G1, S, G2 et M (mitose). Les chromosomes se divisent puis la cellule entre en phase de quiescence. La cellule sénescence meurt par apoptose. L'homéostasie tissulaire est assurée par le rythme stable des mitoses équivalent à celui de l'apoptose.

Chaque chromosome est constitué d'une molécule d'Acide DésoxyriboNucléique (ADN). Cette macromolécule est une double

hélice de nucléotides ; le squelette de chaque chaîne est constitué par des molécules de sucre – le désoxyribose – liées entre elles par estérification avec un groupement phosphate, les sucres sont liés de façon covalente à une base purique (Adénine, Guanine) ou pyrimidique (Cytosine, Thymine). À chaque étage de la double hélice, il y a appariement entre une base purique d'une chaîne et une base pyrimidique de l'autre chaîne. La séquence des paires de bases avec les liaisons A-T et C-G est l'alphabet qui définit les gènes. Il y a environ 23 000 gènes codant sur lesquels reposent les instructions pour le développement, le fonctionnement des cellules et aussi leur reproduction. Dans la double hélice, les segments de nucléotides codants sont appelés « exons » ; les segments ou les gènes ne codant pas pour les protéines, bien plus nombreux (97 % de l'ADN), sont appelés « introns ». Les séquences introniques comportent de nombreux gènes codant pour des microRNA susceptibles d'interférer avec l'expression des gènes par interaction avec l'ARN messager.

Dans chaque chromosome, la double hélice de l'ADN est associée à des protéines, les histones, dont il y a 4 variétés (Ia, Ib, III, IV). Les histones assurent la stabilité de l'ADN tout en interférant sur son organisation. L'ADN est compacté dans la chromatine du noyau par enroulement avec les histones en formant les nucléosomes.

Acide RiboNucléique (RNA), ARN messager (mRNA), microARN (miRNA)

L'Acide RiboNucléique est, comme l'ADN, une longue chaîne de nucléotides avec trois différences : 1) il n'y a qu'une seule chaîne de nucléotides ; 2) le squelette de la chaîne est constitué par un autre sucre, le ribose, estérifié à un ion phosphate et lié de façon covalente aux 4 bases ; 3) la thymine est remplacée par une autre base pyrimidique, l'uracile. Dans le noyau, l'ARN est transcrit à partir de l'ADN par l'ARN-polymérase qui copie la séquence informative des gènes. L'ARN, avec ses séquences codantes et non codantes, est l'agent de la synthèse des protéines. Dans le cytoplasme, l'ARN est compacté avec des protéines et localisé dans de petits granules : les ribosomes.

L'ARN messager (mRNA) résulte de la maturation et de l'épissage de l'ARN qui est « expurgé » de ses séquences introniques. Il permet la synthèse des protéines au niveau des ribosomes du cytoplasme.

Les MicroARN (miRNA) sont des petites molécules d'ARN [9-11] constituées en moyenne de 22 nucléotides. Ils interfèrent avec les processus de prolifération et de différenciation cellulaires, de même qu'avec le métabolisme cellulaire et l'apoptose. Ils ne codent pas pour des protéines mais interagissent avec les séquences complémentaires des mRNAs pour réguler et souvent inactiver l'expression des gènes. Jusqu'à maintenant, environ 1 000 miRNAs ont été identifiés dans le génome humain ; ils peuvent cibler environ 60 % des gènes. Les mRNAs et miRNAs sont exportés de la cellule dans de petites vésicules, les exosomes, sous forme de complexes moléculaires avec des protéines. Les exosomes sont des structures robustes qui peuvent être identifiées plusieurs heures après leur libération dans

les liquides biologiques. Les miRNA circulent dans le sang où ils peuvent être identifiés par les techniques modernes de biologie moléculaire.

■ Méthodes d'étude des acides nucléiques dans le matériel biologique

Le développement des techniques de biologie moléculaire est à l'origine des progrès très rapides de la génétique et de l'épigénétique. La biotechnologie moderne permet de mesurer le niveau d'expression des gènes dans l'échantillon biologique prélevé, par rapport à un échantillon de référence. Le principe de la « puce à ADN » repose sur la propriété que possède l'ADN dénaturé de reformer spontanément sa double hélice lorsqu'il est porté face à un brin solitaire. Les « puces à ADN » sont aussi appelées « puces à gènes » ou « DNA-microarrays ». Il s'agit d'un ensemble de molécules d'ADN fixées en rangées ordonnées sur une petite surface qui peut être du verre, du silicium ou du plastique. Les DNA microarrays (Affymetrix) renferment des dizaines de milliers de nucléotides fixés sur le support qui seront hybridés avec le segment de nucléotides que l'on veut étudier. Sur ces sondes, les points d'hybridation sont repérés et quantifiés par fluorescence.

Amplification en chaîne par polymérase ou Polymerase Chain Reaction (PCR)

Cette technique permet d'amplifier une séquence de l'ADN jusqu'à des millions de copies. Cette technique qui reproduit *in vitro* la réplication naturelle de l'ADN consiste à effectuer une digestion d'un fragment d'ADN par l'intermédiaire d'enzymes de restriction qui vont encadrer la zone à amplifier sur la molécule d'ADN. On synthétise ensuite les fragments complémentaires en utilisant la polymérase qui est une enzyme capable d'assembler des nucléotides, formant ainsi un brin d'ADN complémentaire au fragment à analyser.

Reverse Transcriptase avec amplification en chaîne par polymérase PCR (RT-PCR)

Cette technique est une PCR « classique » d'amplification réalisée sur un ADN complémentaire qui est une copie d'un ARN obtenue par une transcription inverse avec changement de base dans les nucléotides en faisant appel à l'enzyme reverse-transcriptase. La RT-PCR est certainement la méthode la plus sensible pour détecter (et éventuellement quantifier) les m-RNA au niveau d'un organe, d'un tissu ou d'une cellule. Dans ce but, elle est souvent réalisée sur du matériel biologique.

Immunoprécipitation de la chromatine ou Chromatin ImmunoPrecipitation (ChIP)

L'étude des protéines interagissant avec la molécule d'ADN est possible par immunoprécipitation de la chromatine. Cette

technique précise la localisation des sites codants de la molécule d'ADN pour une protéine particulière ; elle permet de décrire les interactions entre protéines et ADN qui surviennent dans les tissus *in vivo*. Le principe est que les protéines comme les histones qui se lient à l'ADN, peuvent se lier par un pontage covalent. En utilisant un anticorps spécifique à la protéine concernée, on peut alors immunoprécipiter le complexe protéine-ADN hors du lysat cellulaire préparé. Après l'établissement du pontage covalent, les cellules sont lysées et l'immunoprécipitation permet d'isoler un complexe protéine-ADN purifié. On inverse alors le pontage covalent, et l'ADN est isolé et soumis à PCR. Le « ChIP sequencing », utilisant des séquenceurs à très haut débit, émerge comme une nouvelle « puce à ADN » ; cette technique cartographie sur l'ADN les sites de liaison aux protéines pour analyser le rôle des protéines dans la régulation de l'expression des gènes sur l'ADN. Ces interactions déterminent une information épigénétique surimposée aux données transcritibles.

■ Impact de l'épigénétique sur l'expression du génome

L'information génétique est stockée dans le noyau sous la forme d'ADN. L'organisation du génome à l'intérieur d'une structure compacte influence grandement la capacité des gènes à être activés ou mis sous silence. Les modifications de l'expression des gènes sont en général établies durant la différenciation cellulaire et maintenues de façon stable au cours des multiples cycles de la division cellulaire, ce qui permet aux cellules de disposer d'identités distinctes, tout en possédant la même information génétique. Les facteurs épigénétiques qui sont sensibles au milieu environnant activent ou désactivent l'expression des gènes, sans changer la séquence primaire de l'ADN. Ces différents mécanismes agissent de concert pour réguler la transcription génique et jouent un rôle essentiel dans la physiologie cellulaire. La dérégulation des mécanismes épigénétiques peut être à l'origine de maladies, notamment du cancer. Les trois principaux mécanismes sont la méthylation de l'ADN, les modifications des histones et l'action des RNA non codants pour les protéines, notamment celles des miRNA. Il y a une étroite relation entre les 3 mécanismes. En effet : i) les enzymes qui modifient les histones (dé-acétylases) sont sous le contrôle direct des miRNA ; ii) l'hyperméthylation a un impact sur l'interaction des histones avec l'ADN ; iii) l'expression de certains miRNA dépend de la méthylation de leurs promoteurs.

Hyperméthylation de l'ADN

C'est le mécanisme le mieux étudié. Il résulte de l'addition covalente d'un groupe méthyl aux cytosines des dinucléotides CpG sous l'influence d'une méthyltransférase. Les dinucléotides CpG représentent 2 à 5 % du génome. Ils ne sont pas disposés de façon uniforme dans le génome, mais concentrés dans des îlots appelés « CpG islands » au niveau du promoteur des gènes. Alors que la plupart des îlots CpG sont habituellement

méthylés, ceux des promoteurs restent habituellement déméthylés lors du développement des tissus différenciés ; leur hyperméthylation peut induire un changement d'expression du gène. L'hyperméthylation des îlots CpG d'un gène dans un tissu ou dans le plasma est détectée par autofluorescence avec un anticorps spécifique d'où son application potentielle à des tests de dépistage. L'hyperméthylation du promoteur retentit sur la fonction des gènes suppresseurs de tumeurs, des gènes réparateurs d'ADN et des autres gènes associés au cancer. Elle est souvent associée à une diminution de l'expression de certains gènes et peut expliquer leur perte de fonction en l'absence de mutations. Les altérations de la méthylation de l'ADN sont plus fréquentes que les modifications génétiques.

Altération des histones dans la chromatine

Le remodelage par translation des acides aminés des protéines (histones) associés à l'ADN dans la chromatine du noyau est un mécanisme épigénétique. Les histones sont en contact étroit avec l'ADN et leurs modifications complexes qui incluent méthylation, acétylation, phosphorylation constituent le code des histones. Ces phénomènes régulent la transcription génique en modifiant le degré de compaction de l'ADN qui interfère avec l'activité des facteurs de transcription. La dé-acétylation des histones réduit leur charge négative et donc leur interaction avec les groupements phosphates de la chaîne d'ADN qui se trouve libérée de la liaison avec les histones. Ainsi, l'activité aberrante des facteurs modificateurs d'histone est susceptible de favoriser le développement du cancer par dérégulation du fonctionnement de l'ADN.

Les micro-RNA (miRNAs)

Ces molécules de petite taille ont pour fonction de contrôler l'expression des gènes. En s'appariant aux mRNA, ils peuvent réprimer la traduction et la synthèse des protéines. Selon leur gène-cible, les miRNAs peuvent agir, soit comme suppresseurs de tumeurs, soit comme oncogènes. La mise sous silence de miRNAs suppresseurs de tumeur peut aboutir à l'activation d'oncogènes. Les miRNAs étant présents dans le sang circulant, ils peuvent servir de biomarqueurs.

■ Génome de la cellule cancéreuse

Altérations génétiques et cancer

La transformation d'une cellule normale en cellule cancéreuse résulte d'altérations successives du génome, touchant en général 15 à 20 gènes. Les mutations ponctuelles qui modifient la structure de base de l'ADN peuvent toucher trois catégories de gènes : 1) les oncogènes qui sont des régulateurs positifs de la prolifération cellulaire et peuvent être activés après mutation (exemple du gène *KRAS*, (localisé au niveau du chromosome 12) ; 2) les gènes suppresseurs qui correspondent généralement à des régulateurs négatifs de la prolifération cellulaire et dont la perte de

fonction implique une inactivation des deux allèles (mode récessif ; exemple du gène *TP53*, (localisé au niveau du bras court du chromosome 17) ; 3) les gènes impliqués dans les mécanismes de réparation des lésions de l'ADN dont la défaillance est associée à une accumulation tumorigène de mutations (exemple du gène *MHL1*, impliqué dans le système de réparation des mésappariements de l'ADN ou système MMR dont les altérations sont responsables d'une perte de la fidélité de la réplication de l'ADN, mise en évidence par la recherche d'une instabilité des microsatellites).

Altérations épigénétiques et cancer

Le cancer, s'il est avant tout une maladie génétique, peut aussi se développer sous l'influence de mécanismes épigénétiques qui interviennent en l'absence de modifications de l'ADN [12-15]. Ces altérations qui ne concernent pas la séquence des paires de base de l'ADN, sont appelées des « épimutations ». En fait, des associations sont possibles entre mécanismes génétiques et épigénétiques.

- 1) Parmi les mécanismes épigénétiques du cancer, le plus fréquent est l'hyperméthylation des îlots CpG au niveau du promoteur de multiples gènes de l'ADN [16-19], ce qui induit le silence de gènes suppresseurs ou de gènes réparateurs de l'ADN. La recherche du profil de méthylation de l'ADN, en tant que biomarqueur du cancer, est séduisante car les modifications de ce profil sont précoces au cours de la carcinogénèse, et peuvent être corrélées au stade de développement du cancer. Enfin, l'utilisation d'agents déméthylants est un champ d'investigation prometteur pour le traitement.
- 2) Le remodelage de la structure des histones, protéines associées à l'ADN dans la chromatine du noyau, est un autre mécanisme épigénétique du cancer. La dé-acétylation des histones, modifiant leur charge et leur liaison à l'ADN, favorise la dérégulation de leur structure et permet de suggérer des thérapeutiques ciblées du cancer par des inhibiteurs de l'histone dé-acétylase [20].
3. Le contrôle de l'expression génique par les miRNAs justifie leur implication fréquente dans les cancers digestifs lorsque leur expression est altérée, ce qui aboutit à activer des oncogènes ou inhiber des gènes répresseurs pour mise en position « on » ou « off ». Plusieurs miRNAs ont été identifiés dans le cancer colorectal. Les miRNAs présents dans la tumeur circulent aussi dans le plasma comme dans les milieux fluides (salive, bile, suc pancréatique, urines, selles), ce qui permet de développer des tests non invasifs de détection précoce des tumeurs ou un suivi de l'évolution des tumeurs sous traitement.

■ Les cellules souches cancéreuses

Dans un tissu adulte normal, un faible contingent de cellules a un renouvellement propre et donne naissance à d'autres cellules qui ont la même capacité. Ces cellules maintiennent le turnover de régénération tissulaire en équilibre avec l'apoptose et

agissent comme un système de réparation du tissu ; ce sont les cellules souches normales. Les cellules souches cancéreuses (CSC) [2-8] ont plusieurs caractéristiques en commun avec la capacité d'auto-renouvellement, la multirésistance aux médicaments cytotoxiques et la capacité de survivre en hypoxie. Ces cellules expriment fortement les transporteurs membranaires appelés « ABC » (ATP Binding Cassette) qui éliminent les toxiques et, en particulier, les agents de chimiothérapie. Les CSCs forment une sous-population cellulaire distincte de la majorité des cellules tumorales, leur nombre est très faible (moins de 1 % de la masse tumorale). L'existence de CSCs nettement individualisées par rapport aux cellules qui forment le gros de la masse tumorale, a profondément modifié le schéma de la cancérogenèse. Au sein de la masse tumorale seulement, un sous-groupe de cellules a la capacité d'entretenir la maladie, de se multiplier et de se propager à distance ; ce sous-groupe cellulaire doit constituer une cible privilégiée du traitement. Les CSCs résistent aux altérations de l'ADN en raison d'une aptitude extraordinaire à les réparer et peuvent survivre en toute indépendance. Elles ont un taux de renouvellement nettement plus faible que les cellules non cancéreuses, ce qui les rend particulièrement résistantes aux traitements cytotoxiques ou à la radiothérapie à la faveur de l'allongement du temps disponible pour réparer les altérations de l'ADN. Elles ont une immunogénicité réduite et des propriétés anti-apoptotiques. Les CSCs peuvent rester dormantes au sein de « niches » puis être réactivées à l'occasion de phénomènes épigénétiques. La résistance des CSCs peut expliquer les récurrences souvent tardives après résection complète de la tumeur primaire. Il y a cependant controverse sur l'origine de ces cellules ; ce doute sur leur origine explique que les CSCs soient aussi dénommées « Cellules Initiatrices de Tumeur (TIC) » ou encore « Cellules Propagatrices de Tumeur ».

Chaque cancer a ses propres CSCs avec différents phénotypes. Leur détection fait appel aux techniques de détection par immunofluorescence qui révèlent l'augmentation d'expression de molécules d'adhésion cellulaire propres aux CSCs qui conditionnent la capacité de renouvellement. Les progrès de la biologie moléculaire ont permis d'isoler les CSCs dans un certain nombre de cancers solides par l'utilisation d'une combinaison de différents marqueurs de surface. Cette étude s'est développée grâce à la cytométrie en flux ou « fluorescence-activated cell sorting (FACS) » qui extrait et dénombre rapidement des cellules marquées par un anticorps fluorescent spécifique. La technique repose sur l'expression des protéines de surface de la cellule tumorale comme CD44, CD24, CD133, EpCAM ou ALDH. Ainsi, la protéine EpCAM (epithelial cell adhesion molecule), détectée par la cytométrie de flux, est un antigène dominant dans les cancers du côlon qui déclenche une réaction immunitaire aboutissant à la production d'anticorps chez la souris. Une autre méthode d'étude des CSCs consiste à transplanter ces cellules par xénogreffe chez des souris immunodéprimées pour révéler leur tumorigénicité après transplantation. Certaines CSCs ont une aptitude aux métastases dans le cadre de transitions épithélium-mésenchyme

et plusieurs miRNA appelés « Métastamir » jouent un rôle dans la genèse de ces métastases. L'identification des Métastamir en ferait des marqueurs efficaces du risque de métastase. En pratique, la détection et la quantification des CSCs à partir de matériel tumoral (biopsies ou pièce opératoire) peuvent constituer une source essentielle de données pour déterminer l'agressivité de la tumeur, prédire le pronostic et sélectionner le type de traitement.

La résistance des CSCs aux thérapies conventionnelles explique que la récurrence soit possible malgré l'éradication du cancer. La résistance aux agents cytotoxiques diffère pour la population cellulaire tumorale générale et pour le sous-groupe des CSCs. La singularité de ces cellules est leur capacité d'auto-renouvellement qui implique plusieurs voies de signalisation; mais ces voies pourraient être inhibées épigénétiquement par des miRNAs. Une autre interrogation concerne l'explication de l'état « dormant » de certaines tumeurs pendant des périodes plus ou moins prolongées donnant lieu à des récurrences tardives, après une longue période d'apparente guérison.

■ Contribution attendue de l'épigénétique au diagnostic

L'application des biomarqueurs au diagnostic des cancers digestifs avant la caractérisation de la lésion par l'endoscopie et l'histopathologie repose sur deux cibles principales : 1) l'hyperméthylation des îlots CpG sur les promoteurs de différents gènes ; 2) la surexpression de miRNA spécifiques de chaque type de cancer et circulant dans le plasma. Aujourd'hui, la majorité des biomarqueurs liés à l'ADN ou aux miRNA sont encore au stade d'investigation et leur rapport coût/efficacité est défavorable mais, dans un avenir proche, ils apporteront sans aucun doute une révolution dans le diagnostic des cancers par leur détection dans un échantillon de fluides ou de selles du patient ou dans le plasma [1,21-23]. Cette dernière méthode aurait l'avantage de simplifier le test diagnostique « filtre » en le limitant à une simple prise de sang, pour une application plus facile au dépistage.

Cancer de l'œsophage [24,25]

L'hyperméthylation épigénétique des promoteurs des gènes CLDN6, FBN2, RBP4, TFPI2 et TMEFF2, situés respectivement sur les chromosomes 16, 5, 14, 7 et 2, a été mise en évidence pour le cancer épidermoïde. Dans ce même cancer, l'hyperméthylation du gène CYP26C1 (chromosome 10) diminue après chimioradiothérapie ; ce résultat suggère que le traitement a un impact sur l'altération épigénétique. Pour l'adénocarcinome de l'œsophage développé sur l'œsophage de Barrett, l'hyperméthylation du gène APC (chromosome 5) est fréquente. Il en est de même pour le gène p16 (chromosome 9). La mesure dans le plasma de l'hyperméthylation des îlots CpG du promoteur du gène APC pourrait être un biomarqueur de la tumeur évaluant son stade, la réponse au traitement et les récurrences.

Cancer de l'estomac [26,27]

L'hyperméthylation épigénétique des promoteurs inactive les gènes suppresseurs dans le cancer gastrique. L'infection du milieu gastrique par *Helicobacter pylori* potentialise l'hyperméthylation de ces gènes. L'inactivation épigénétique a été mise en évidence pour les gènes RASSF1A, TIMP-3 et RECK, situés respectivement sur les chromosomes 3, 22 et 9. La méthylation aberrante du gène RECK serait un indicateur précoce des métastases péritonéales du cancer gastrique. L'inactivation par hyperméthylation des gènes RASSF2 et SFRP2 sur les chromosomes 20 et 4 est proposée comme un test diagnostique du cancer gastrique réalisé sur l'ADN fécal.

Cancer colorectal [1,28-34]

Les travaux consacrés au diagnostic moléculaire du cancer colorectal sont les plus nombreux [1]. L'hyperméthylation des promoteurs inactive de nombreux gènes suppresseurs dans le cancer colorectal : il s'agit des gènes p16INK4, MGMT, GSTP1, CDH1, APC et TIMP3 situés respectivement sur les chromosomes 9, 10, 11, 16, 5 et 22. Ces altérations épigénétiques surviennent dès le stade précoce du développement de la tumeur et aussi dans les adénomes. L'inactivation des gènes RASSF2 et SFRP2 sur les chromosomes 20 et 4 a été suggérée pour des applications diagnostiques. Une prévalence plus élevée de l'hyperméthylation des gènes ALX4 et SEPT 9 (chromosomes 11 et 17) a été mise en évidence par PCR dans le plasma de sujets atteints de cancer colorectal par rapport aux témoins. Le biomarqueur SEPT 9, présenté comme un test plasmatique de diagnostic du cancer colorectal, a reçu en 2009 une licence aux États-Unis ; licence attribuée à « Epidemics AG » pour SEPT 9, et proposée comme test diagnostique sensible de la présence d'un cancer. Enfin, un ensemble de 7 marqueurs, les gènes ANXA3, CLEC4D, TNFAIP6, LMNB1, PRRG4, VNN1 et IL2RB, situés respectivement sur les chromosomes 4, 12, 2, 5, 11, 8 et 22 vient d'être proposé [29] à la suite d'une étude cas-témoins pour classer les sujets en catégories de risque pour le cancer colorectal avec une précision de 70 %. La majorité des études sont conduites à partir de l'extraction de l'ADN dans des échantillons de selles ou dans le plasma. Les études sur le RNA sont moins nombreuses : cependant, l'intérêt diagnostique des miRNA, miR-29a et miR92a, circulant dans le plasma et dosés par RT-PCR, a été souligné [10].

■ Contribution attendue de l'épigénétique au traitement

L'épigénétique permet d'explorer de nouvelles stratégies pour le traitement des cancers résistant à la chimiothérapie ou récidivant. Les miRNA interviennent dans le contrôle du cancer comme y a insisté le prix Nobel David Baltimore dans un récent symposium (FALK-IPSEN) sur la complexité biologique. De nombreux oncogènes et des gènes suppresseurs de tumeurs sont régulés par

des microRNA qui peuvent aussi agir comme des oncogènes ou des gènes suppresseurs de tumeurs. Le traitement dit « radical du cancer » peut cependant préserver quelques CSGs qui seront à l'origine de la résurgence du cancer. Les traitements qui attaquent directement ces CSCs survivantes seraient seuls capables d'obtenir une guérison complète. L'isolement des CSCs par microdissection au sein de la tumeur pourra définir le profil d'expression génique de ces cellules et ouvrir la voie à de nouvelles approches thérapeutiques. Les cellules souches du cancer sont la cible du traitement avec l'objectif de les mettre en sommeil (dormancy) à l'aide de leurs miARN. Ainsi, le miARN (miR34), associé au gène p53 (chromosome 17), introduit dans une préparation de cellules cancéreuses humaines déficientes en p53 restaure à la fois la présence de p53 et la fonction d'apoptose [35].

■ Références

- Ahlquist DA, Sargent DJ, Loprinzi CL, et al. Stool DNA and occult blood testing for screen detection of colorectal neoplasia. *Ann Intern Med* 2008;149:441-50.
- Allan AL, Vantghem SA, Tuck AB, et al. Tumor dormancy and cancer stem cells: implications for the biology and treatment of breast cancer metastasis. *Breast Dis* 2006-2007;26:87-98.
- Fabrizi E, di Martino S, Pelacchi F, et al. Therapeutic implications of colon cancer stem cells. *World J Gastroenterol* 2010;16:3871-7.
- Goss PE, Chambers AF. Does tumour dormancy offer a therapeutic target? *Nat Rev Cancer* 2010 Nov 4 [Epub ahead of print].
- Hermann PC, Bhaskar S, Cioffi M, Heeschen C. Cancer stem cells in solid tumors. *Semin Cancer Biol* 2010 Apr;20(2):77-84.
- Alison MR, Lim SM, Nicholson LJ. Cancer stem cells: problems for therapy? *J Pathol.* 2010 Sep 27 [Epub ahead of print].
- Shackleton M. Normal stem cells and cancer stem cells: similar and different. *Semin Cancer Biol* 2010 Apr;20(2):85-92.
- Visvader JE, Lindeman GJ. Stem cells and cancer - The promise and puzzles. *Mol Oncol* 2010 Jul 27.
- Aslam MI, Taylor K, Pringle JH, et al. MicroRNAs are novel biomarkers of colorectal cancer. *Br J Surg* 2009;96:702-10.
- Huang Z, Huang D, Ni S, Peng Z, et al. Plasma microRNAs are promising novel biomarkers for early detection of colorectal cancer. *Int J Cancer* 2010;127:118-26.
- Krutovskikh VA, Herceg Z. Oncogenic microRNAs (OncomiRs) as a new class of cancer biomarkers. *Bioessays* 2010 Oct;32(10):894-904.
- Herceg Z. Epigenetic information in chromatin and cancer. *Eur J Cancer* 2009 Sep;45 Suppl 1:442-4.
- Lima SC, Hernandez-Vargas H, Herceg Z. Epigenetic signatures in cancer: Implications for the control of cancer in the clinic. *Curr Opin Mol Ther* 2010;12:316-24.
- Lopez J, Percharde M, Coley HM, Webb A, Crook T. The context and potential of epigenetics in oncology. *Br J Cancer* 2009 Feb 24;100(4):571-7.
- Sharma S, Kelly TK, Jones PA. Epigenetics in cancer. *Carcinogenesis* 2010;31:27-36.
- Arai T, Kasahara I, Sawabe M, et al. Role of methylation of the hMLH1 gene promoter in the development of gastric and colo-

- rectal carcinoma in the elderly. *Geriatr Gerontol Int* 2010;10 Suppl 1:S207-12.
17. Chan AO, Rashid A. CpG island methylation in precursors of gastrointestinal malignancies. *Curr Mol Med* 2006;6:401-8.
 18. Hiraoka S, Kato J, Horii J, Saito S, Harada K, Fujita H, et al. Methylation status of normal background mucosa is correlated with occurrence and development of neoplasia in the distal colon. *Hum Pathol* 2010 Jan;41(1):38-47.
 19. Lee BB, Lee EJ, Jung EH, et al. Aberrant methylation of APC, MGMT, RASSF2A, and Wif-1 genes in plasma as a biomarker for early detection of colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 2009;15: 6185-91.
 20. Hoshino I, Matsubara H. Recent advances in histone deacetylase targeted cancer therapy. *Surg Today* 2010 Sep;40(9):809-15.
 21. Lansdorp-Vogelaar I, Kuntz KM, Knudsen AB, et al. Stool DNA testing to screen for colorectal cancer in the Medicare population: a cost-effectiveness analysis. *Ann Intern Med* 2010;153:368-77.
 22. Pritchard CC, Grady WM. Colorectal cancer molecular biology moves into clinical practice. *Gut* 2010 Oct 4 [Epub ahead of print].
 23. van Dam L, Kuipers EJ, van Leerdam ME. Performance improvements of stool-based screening tests. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2010;24:479-92.
 24. Lehmann K, Schneider PM. Differences in the molecular biology of adenocarcinoma of the esophagus, gastric cardia, and upper gastric third. *Recent Results Cancer Res* 2010;182:65-72.
 25. Tomizawa Y, Wang KK. Changes in screening, prognosis and therapy for esophageal adenocarcinoma in Barrett's esophagus. *Curr Opin Gastroenterol* 2009;25:358-65.
 26. Worthley DL, Leggett BA. Colorectal cancer: molecular features and clinical opportunities. *Clin Biochem Rev* 2010 May;31(2):31-8.
 27. Zanghi A, Di Vita M, Zanet E. Clinical and biological markers in gastric cancer: update and perspectives. *Cappellani Front Biosci* 2010;2:403-12.
 28. Yasui W, Sentani K, Motoshita J, et al. Molecular pathobiology of gastric cancer. *Scand J Surg* 2006;95:225-31.
 29. Yip KT, Das PK, Suria D, et al. A case-controlled validation study of a blood-based seven-gene biomarker panel for colorectal cancer in Malaysia. *J Exp Clin Cancer Res* 2010 Sep 16;29:128.
 30. Kisiel JB, Ahlquist DA. Stool DNA Screening for Colorectal Cancer: Opportunities to Improve Value With Next Generation Tests. *J Clin Gastroenterol* 2010 Sep 17 [Epub ahead of print].
 31. Lang DL. Current Stool DNA Tests More Costly and Less Effective for Colorectal Cancer Screening. *Gastroenterology* 2010 Oct 20 [Epub ahead of print].
 32. Deschoolmeester V, Baay M, Specenier P, et al. A review of the most promising biomarkers in colorectal cancer: one step closer to targeted therapy. *Oncologist* 2010;15:699-731.
 33. Duffy MJ, van Dalen A, Haglund C, et al. Tumour markers in colorectal cancer: European Group on Tumour Markers (EGTM) guidelines for clinical use. *Eur J Cancer* 2007;43:1348-60.
 34. Zou H, Taylor WR, Harrington JJ, et al. High detection rates of colorectal neoplasia by stool DNA testing with a novel digital melt curve assay. *Gastroenterology* 2009;136:459-70.
 35. Ji Q, Hao X, Zhang M, et al. MicroRNA miR-34 inhibits human pancreatic cancer tumor-initiating cells. *PLoS One* 2009 Aug 28;4:e6816.