

JEAN-FRANÇOIS GAGNON

RÉGULATION DE L'INACTIVATION
INTRATUMORALE DE L'AGENT ANTINÉOPLASIQUE
IRINOTÉCAN PAR UN MÉCANISME ÉPIGÉNÉTIQUE

Mémoire présenté
à la Faculté des études supérieures de l'Université Laval
dans le cadre du programme de maîtrise en pharmacie
pour l'obtention du grade de maître ès sciences (M.Sc.)

FACULTÉ DE PHARMACIE
UNIVERSITÉ LAVAL
QUÉBEC

SEPTEMBRE 2005

© Jean-François Gagnon, 2005

Résumé

UGT1A1 est responsable de l'inactivation du SN-38, métabolite actif de l'irinotécan utilisé en première intention dans le traitement du cancer colorectal métastatique. Certains facteurs génétiques du gène *UGT1A1* sont en partie responsables des variations dans la réponse à cette thérapie. Parallèlement, nous avons émis l'hypothèse qu'un mécanisme épigénétique module les niveaux intratumoraux d'UGT1A1 ainsi que les taux d'inactivation du SN-38 à son site d'action. Nos données démontrent que la méthylation d'îlots CpG spécifiques dans le promoteur et l'exon 1 d'*UGT1A1* est associée à la répression de son expression, à la diminution du taux de protéine et d'inactivation du SN-38 dans les cellules tumorales de côlon *in vitro*. De plus, l'hyperméthylation de ces régions corrèle avec la faible expression du gène dans les tumeurs primaires du côlon de patients. Ces données soulèvent la possibilité que le profil de méthylation du gène *UGT1A1* pourrait déterminer la concentration tumorale du métabolite actif et ainsi aider à prédire l'efficacité de la thérapie.

Abstract

UGT1A1 is the main enzyme involved in the hepatic and tumoral inactivation of SN-38, an anticancer agent used in first line treatment of metastatic colorectal cancer. UGT1A1 genetic factors determine response to irinotecan therapy. We hypothesised that an epigenetic mechanism, more specifically methylation, is involved in tumoral regulation of UGT1A1 levels. Specific CpG islands in the *UGT1A1* gene are hypermethylated and linked to the repression of gene expression and to lower levels of SN-38 glucuronidation in colon tumor cells *in vitro*. In addition, methylation of specific CpG was linked to lower expression of *UGT1A1* gene in primary colon tumors from patients. Our data support that methylation profile of the *UGT1A1* gene determine SN-38 tumoral concentration and may help to predict tumoral response to irinotecan.

Avant-Propos

Ce mémoire est divisé en quatre grandes parties : le chapitre I constitue l'introduction, le chapitre II pose l'hypothèse ainsi que les objectifs de l'étude, le chapitre III pour les résultats et le chapitre IV pour les conclusions.

La section résultat est un article scientifique qui a été initialement soumis dans Journal of Clinical investigation et qui s'intitule: «Irinotecan inactivation is modulated by epigenetic silencing of UGT1A1 in colon cancer». Ma contribution à ces travaux est très importante. J'ai optimisé et mis au point toutes les nouvelles techniques utilisées dans ce projet étant donné qu'aucun autre étudiant n'en a fait des semblables. Mes résultats ont généré toutes les figures à l'exception de la figure 5. L'assistante de recherche Lyne Villeneuve a participé aux résultats de cette figure et en m'aidant dans les reprises de quelques expériences. J'ai rédigé l'article scientifique dans sa totalité et il a été corrigé par mon collègue Olivier Bernard.

Je tiens à remercier tout d'abord ma directrice de recherche Chantal Guillemette pour son travail acharné et pour le partage de ses connaissances. Elle donne beaucoup de temps pour les étudiants et la qualité de nos travaux s'en fait ressentir. Vous serez mon mentor dans bien des domaines pour ma future carrière de chercheur. Je veux remercier également son soutien financier ainsi que celui du fond d'enseignement et de la recherche (FER) de la faculté de pharmacie de l'Université Laval. J'aimerais remercier tous les étudiants qui ont travaillé avec moi : Johanie, Hugo, Jean, Olivier et Yannick, pour toutes les questions de cultures générales qu'on s'est posées et les débats politiques, naturopathiques et de laserothérapie. Nous savons au moins ce que c'est de se coucher moins naïeux le soir. Merci aux assistant(e)s de recherche Kim et Louis-Charles et bien sûr Lyne qui m'a beaucoup aidé dans mon projet.

Merci à mes examinateurs André Castonguay, Alain Bélanger, Olivier Barbier et Chantal Guillemette ainsi que tout le personnel de la faculté de pharmacie de l'Université Laval.

Un merci spécial à mes parents qui m'ont soutenu dans mes études et qui m'ont toujours encouragé à persévérer et à continuer. Également merci à Julie, ma blonde qui me

comprend dans les sacrifices que je fais pour mener à bien mes objectifs. Je sais que ce n'est pas facile de partager sa vie avec un rat de laboratoire. Un merci également à mon frère et ma sœur qui m'ont toujours fait sentir qu'ils étaient fiers de moi.

Finalement, j'aimerais saluer mes 2 grand-mères Pierrette et Gilaine ainsi que mon parrain, Paul et ma marraine, Andrée. Également toute ma famille de St-Félicien et ceux ailleurs dans le Québec ainsi qu'à mes amis. J'ai toujours une petite pensée pour vous...

*À mes parents Yves et Denise qui m'ont
toujours soutenu dans mes études.
À ma blonde Julie pour ta compréhension,
pour tout le temps où je consacre à mes
études où je ne peux être avec toi.*

Table des matières

Résumé.....	i
Abstract.....	ii
Avant-Propos.....	iii
Table des matières.....	vi
Liste des tableaux.....	viii
Liste des figures.....	ix
Liste des abréviations.....	x
Chapitre I: Introduction.....	1
1. Cancer colorectal.....	1
1.1 Incidence et prévalence du cancer colorectal.....	1
1.2 Facteurs de risques connus.....	2
2. Génétique du cancer colorectal.....	3
2.1 Cancer familial versus sporadique.....	3
2.2 Carcinogenèse du cancer colorectal.....	5
2.3 Autres mécanismes impliqués dans la carcinogenèse du côlon.....	8
2.4 Traitement du cancer colorectal.....	11
3. Méthylation.....	11
3.1 Principe.....	11
3.2 Caractéristiques de la méthylation.....	12
3.2.1 Localisation des CpG.....	12
3.2.2 Méthyltransférase.....	13
3.2.3 Fonctions de la méthylation.....	15
3.2.4 Interaction avec les histones.....	18
3.4 Applications cliniques de la méthylation.....	19
3.4.1 Tests diagnostiques impliquant la méthylation.....	19
3.4.2 Nouvelles approches thérapeutiques par les agents déméthylants.....	20
3.4.2 Statut de méthylation et réponse à la chimiothérapie.....	21
4. Enzymes UGT.....	22
4.1 La réaction de glucurono-conjugaison.....	22
4.2 Familles UGT.....	23
4.2.1 UGT1.....	23
4.2.2 UGT2.....	24
4.3 Structure des UGT.....	25
4.4 Distribution tissulaire.....	26
4.5 Rôle étiologique des UGT dans le cancer.....	27
4.5.1 Polymorphismes de la région codante et risque de cancer.....	27
4.5.2 Polymorphismes de la région promotrice et risque de cancer.....	28
Chapitre II : Hypothèse et objectifs du projet.....	30
Chapitre III : Résultats.....	36
Résumé.....	39
Abstract.....	40
Introduction.....	41
Results.....	44
Discussion.....	47

Methods	50
References.....	60
Chapitre IV : Conclusion	68
Bibliographie	73

Liste des tableaux

Tableau I : Prévalence des cancers les plus courants, selon le sexe, Canada, 2000.....	2
Tableau II : Gènes hyperméthylés dans le cancer colorectal.	9
Tableau III : Distribution tissulaire des 18 isoformes UGT transcrites.....	27

Liste des figures

Figure 1 : Risque relatif à variables multiples du cancer du côlon distal en relation avec la consommation de viandes rouges (Larsson et al. 2005).....	4
Figure 2 : Vue générale de la contribution génétique au cancer colorectal. Les allèles de fortes pénétrances incluent plusieurs gènes à caractères dominants ou récessifs responsables de cancers du côlon familiaux dont <i>APC</i> , réparation des mésappariements (<i>MMR</i>), protéine inhibitrice de l'axe 2 (<i>AXIN2</i>), polymérase de l'ADN II (<i>POLD</i>), facteur de croissance transformant 2 (<i>TGFβR2</i>), Sérine/thréonine kinase (<i>LKB1</i>), homologue mère contre DPP 4 (<i>SMAD4</i>), récepteur de l'os morphogénique 1 (<i>BMPRI</i>) et homologue Mut Y humain (<i>MYH</i>) en font partie. Quelques allèles de faibles pénétrance rencontrer généralement dans les cas sporadiques de cancer colorectal ont été découverts comme dans le gène <i>APC</i> et <i>TGFβR1</i> ainsi que dans les gènes syndrome de Bloom (<i>BLM</i>) et Harvey-ras 1 (<i>HRAS1</i>). Les cas sporadiques originent beaucoup plus de l'environnement contrairement aux cancers familiaux qui originent de mutations génétiques. Cependant, ils sont tous sujets aux gènes modifiant qui altère le phénotype d'un autre allèle (de la Chapelle 2004).	6
Figure 3 : Voie métabolique Wnt qui est altérée dans le cancer colorectal. L'oncogène Wnt active une cascade d'interactions protéiques qui mène à la prolifération cellulaire par l'activation du gène facteur de transcription 4 (<i>tcf-4</i>) par la β-catenin. Lorsque la protéine APC est présente, les β-catenin sont dégradées afin de contrôler la prolifération cellulaire. Lorsque la protéine APC est absente, les β-catenin s'accumulent et la prolifération cellulaire est hors de contrôle. Ce phénomène conduit à la formation d'une tumeur cancéreuse (Polakis 2000).....	7
Figure 4 : Modèle génétique hypothétique de la carcinogénèse du cancer colorectal. (Jubb et al. 2005)	10
Figure 5 : Modification de la cytosine en 5-méthylcytosine par l'ajout d'un groupement méthyle en position 5 catalysé par la Dnmt. Le donneur du groupement méthyle est le S-adénosylméthionine (SAM).	14
Figure 6 : Illustration de l'inhibition de la transcription par la méthylation. La présence d'un groupement méthyle sur une cytosine affecte directement la liaison d'un facteur de transcription et bloque ainsi la transcription. Des protéines comme les protéines MBP, dont la protéine MeCP2 en fait partie, bloquent également l'accès aux facteurs de transcription (Attwood et al. 2002).	16
Figure 7 : Hypothèse sur les profils de méthylation de cinq promoteurs de gènes suppresseurs de tumeur dans les différentes morphologies cellulaires. Illustration de la présence d'hyperméthylation dans la carcinogénèse du cancer. Les cercles noirs représentent un CpG méthylé et le cercle blanc un CpG non méthylé. (Nephew et al. 2003)	17
Figure 8 : Mécanisme épigénétique de la régulation transcriptionnelle par l'acétylation ou la déacétylation des histones. L'histone acétyltransférase (HAT) est impliquée dans l'activation transcriptionnelle et l'HDAC est impliquée, avec les MBD, dans la répression transcriptionnelle (Nakao 2001).	19
Figure 9 : Réaction de glucurono-conjugaison. L'enzyme UDP-glucuronosyltransférase catalyse le lien entre le C1 de l'acide glucuronique (Co-substrat) à un groupement aglycone (-OH, -COOH, -SH, -NH ₂) de divers substrats lipophiles. Le substrat glucuronide est beaucoup plus hydrophile et peut être excrété par l'urine ou la bile (Guillemette 2003).....	23
Figure 10 : Région génomique des UGT1A (Tukey et al. 2001).....	24
Figure 11 : Région génomique des UGT2A et UGT2B fonctionnelles (Riedy et al. 2000).	25
Figure 12 : Structure primaire générale des UGT (Radominska-Pandya et al. 1999).....	26
Figure 13 : Rapport aire sous le courbe (AUC) du SN-38G sur SN-38 pour le polymorphisme fonctionnel <i>UGT1A1*28</i> (7 répétitions de TA) dans la boîte TATA au lieu de 6 répétitions (<i>UGT1A1*1</i>). Les sujets homozygotes 7/7 ont un rapport beaucoup plus faible indiquant une capacité moindre à convertir le SN-38 en SN-38G (Iyer et al. 2002).	31

Liste des abréviations

5-Aza-C	5-Aza-cytidine
AAH	Amines aromatiques hétérocyclique
APC	Adenomatous polyposis coli
ATR-X	Alpha thalassémie liée à l'X avec retard mental
AUC	Aire sous la courbe
Axin2	Protéine inhibitrice de l'axe 2
BCNU	1,3-Bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea
BCR/Abl	Point de cassure/Abelson
BLM	Syndrome de Bloom
BMPR1A	Récepteur protéique de l'os morphogénique 1A
BMR1	Récepteur de l'os morphogénique 1
CES2	Carboxylestérase 2
CpG	Cytosine _{phosphate} Guanosine
COMT	Catéchol O-méthyltransférase
Décitabine	2'-Déoxy-5-Azacytidine
DNMT	Méthyltransférase
GST	Glutathione S-transférase
GSTP1	Glutathione S-transférase pi
HAT	Histone acétyltransférase

HDAC	Histone déacétylase
hMLH1	Homologue Mut L humain 1
HNF1 α , HNF1 β	Facteur nucléaire hépatique 1 α et 1 β
HRAS1	Harvey-ras 1
ICF	Immunodéficiences, instabilité des centromères, anomalies faciales
Ki-ras	p21-ras
LKB1	Sérine/thréonine kinase 1
MB-COMT	Catéchol O-méthyltransférase membranaire
MBD	Domaine de liaison au méthyle
MBP	Protéine liant les méthyles
MeCP2	Protéine liant les CpG méthylés
MGMT	O6-méthylguanine-DNA méthyltransférase
MMR	Réparation des mésappariements
MSH2, MSH6	Homologue Mut S humain 2 et 6
MSI	Instabilité des microsatellites
MYH	Homologue Mut Y humain
pb	Paire de base
PMS1, PMS2	Ségrégation postméiotique humaine 1 et 2
POLD	Polymérase de l'ADN II

QRT-PCR	PCR quantitative en temps réel
RFC	Transporteur des folates réduits
RE	Réticulum endoplasmique
SAM	S-adénosylméthionine
Sin3a	Sin3 homologue A
SMAD4	Homologue mère contre DPP 4
SN-38	7-Ethyl-10-hydroxycamptothecin
SN-38G	7-Ethyl-10-hydroxycamptothecin glucuronide
TCF-4	Facteur de transcription 4
TGFBR2	Récepteur du facteur de croissance transformant 2
TGF β	Facteur de croissance transformant β
TOPO I	Topoisomérase-I
TS	Thymidylate synthase
TSA	Trichostatin A
UDPGA	Uridine diphosphate acide glucuronique
UGT	Uridine diphosphate glucuronosyltransférase
UGT1A1	Uridine diphosphate glucuronosyltransférase 1A1
Wnt	Famille type sans aile site d'intégration MMTV

Chapitre I: Introduction

La chimiothérapie demeure le traitement le plus efficace pour traiter les patients atteints du cancer colorectal. L'irinotécan, un de ces agents, est utilisé en première intention dans les cas de cancer métastatique. Il n'a toutefois pas la même efficacité chez tous les patients. Des études récentes démontrent que l'enzyme uridine diphosphate glucuronosyltransférase 1A1 (UGT1A1) est impliquée dans le métabolisme de ce médicament et que l'expression de cette enzyme est extrêmement variable d'une tumeur à l'autre. Mon projet tente d'élucider un des mécanismes impliqués dans la répression de l'expression d'UGT1A1 dans une large proportion de ces tumeurs afin de mieux comprendre les variabilités dans l'efficacité de thérapie pour le traitement de ce cancer.

1. Cancer colorectal

1.1 Incidence et prévalence du cancer colorectal

Au Canada, le cancer est l'une des principales causes de mortalité. On estime qu'il y aura plus de 145 500 nouveaux cas dont 68 300 décès. Depuis 1988, bien que le taux de mortalité diminue lentement et que le taux d'incidence augmente légèrement, le nombre de nouveaux cas et de décès augmentent à chaque année victime du vieillissement de la population. Le tableau I résume les nouveaux cas et le taux d'incidence normalisé par l'âge au Canada entre 1975 et 2004 pour tous les cancers.

Le cancer colorectal vient en troisième position pour l'incidence avec un total pour l'homme de 10 400 nouveaux cas et de 8800 nouveaux cas pour la femme prévus pour l'année 2004. À l'échelle planétaire, le nombre de cas est passé de 500 000 en 1975 jusqu'à 783 000 en 1990 (Boyle et al. 2000). En terme de prévalence, le cancer colorectal occupe autant chez l'homme que chez la femme le deuxième rang de ce peu reluisant palmarès avec un peu plus de 40 000 cas diagnostiqués au Canada.

Une diminution du taux de mortalité a été observée pour ce cancer dans les dernières années. La raison principale est un dépistage occasionnel de plus en plus répandu dans la population canadienne. Le gouvernement Canadien songe à mettre en place un dépistage de

masse pour le cancer colorectal afin de diminuer encore plus la mortalité. Cependant, il reste encore beaucoup de recherche et développement afin d'améliorer l'espérance de vie des gens atteints de ce cancer.

Tableau I : Prévalence des cancers les plus courants, selon le sexe, Canada, 2000

	Prévalence de cas 15 ans		Prévalence en pourcentage de la population de 2000		Rapport cas/population	
	Hommes	Femmes	Hommes	Femmes	Hommes	Femmes
Côlon et rectum	40 700	42 600	0,3	0,3	1:380	1:370
Poumon	17 900	16 200	0,1	0,1	1:850	1:960
Prostate	107 300	–	0,7	–	1:160	–
Sein	–	151 100	–	1,0	–	1:100
Autres cancers	193 900	201 100	1,3	1,3	1:79	1:77
Tous les cancers	359 800	411 000	2,4	2,6	1:42	1:38

Source : Division de la surveillance et de l'évaluation des risques, CPCMC, Santé Canada

1.2 Facteurs de risques connus

Plusieurs facteurs de risques connus du cancer du côlon ont été démontrés à mainte reprise par des études épidémiologiques. On peut classer ces facteurs de risques en deux groupes : les facteurs environnementaux et les facteurs génétiques.

Les facteurs environnementaux incluent une grande diversité de produits de consommation. Plusieurs ont été associés avec le cancer colorectal dont les plus importants d'entre eux sont les graisses et plus particulièrement les graisses animales (Giovannucci et al. 1997). Il a été démontré que les graisses associées avec la préparation des aliments augmentent beaucoup plus le risque de cancer du côlon que ceux déjà contenues dans la nourriture (Slattery et al. 1997). Comme le démontre la figure 1, la consommation de viande rouge est un autre facteur de risque important puisqu'il est une source de substances carcinogènes créée pendant la cuisson des aliments (Turner et al. 2004; Larsson et al. 2005). Les amines hétérocycliques et les hydrocarbures polycycliques aromatiques font partie de ces sous-produits. Ils forment des adduits à l'ADN qui peuvent engendrer des mutations. La relation de ces produits avec le cancer du côlon a déjà été démontrée (Butler et al. 2003). Également, la consommation d'aliment en grande quantité provenant des restaurateurs

rapide augmente les risques de souffrir du cancer du côlon (Slattery et al. 2000; Heavey et al. 2004). À l'inverse, une consommation élevée en fibre alimentaire, en fruit et en légumes diminue de façon significative le risque de cancer du côlon (Papapoulos et al. 2004; Larsson et al. 2005).

Autres que les graisses, d'autres facteurs sont très importants dans l'augmentation du risque. L'obésité, la prise excessive d'alcool, le diabète, la cigarette et l'âge sont tous des facteurs qui augmentent de façon significative le risque de cancer colorectal (Sandhu et al. 2001; Diergaarde et al. 2003; Heavey et al. 2004; Slattery et al. 2004).

Les facteurs génétiques jouent également un très grand rôle dans le cancer du côlon. Ces risques concernent les personnes ayant des antécédents de maladies inflammatoires chroniques du côlon. Le syndrome du côlon irritable, la maladie de Crohn ainsi que des colites hémorragiques sont trois affections du côlon qui font partie de cette catégorie (Itzkowitz 1997; Jain et al. 1997). Ainsi une personne souffrant de la maladie de Crohn présente 6 fois plus de risque, le syndrome du côlon irritable 10 fois plus de risque et les colites hémorragiques 30 fois plus de risque d'être atteinte du cancer du côlon (Greenstein 2000).

La polypose adénomateuse familiale et le syndrome de Lynch sont deux affections du côlon qui confèrent un risque des plus élevés d'être atteint de ce type de cancer. Ces risques passent de 50 pourcents pour le syndrome de Lynch jusqu'à 100 pourcents pour les personnes atteintes de polypose adénomateuse familiale avec présence de mutations dans le gène adénomateux polyposis coli (*APC*) (Baglioni et al. 2004).

2. Génétique du cancer colorectal

2.1 Cancer familial versus sporadique

Le cancer du côlon est un cancer dont on peut distinguer deux origines différentes : le cancer familial et le cancer sporadique.

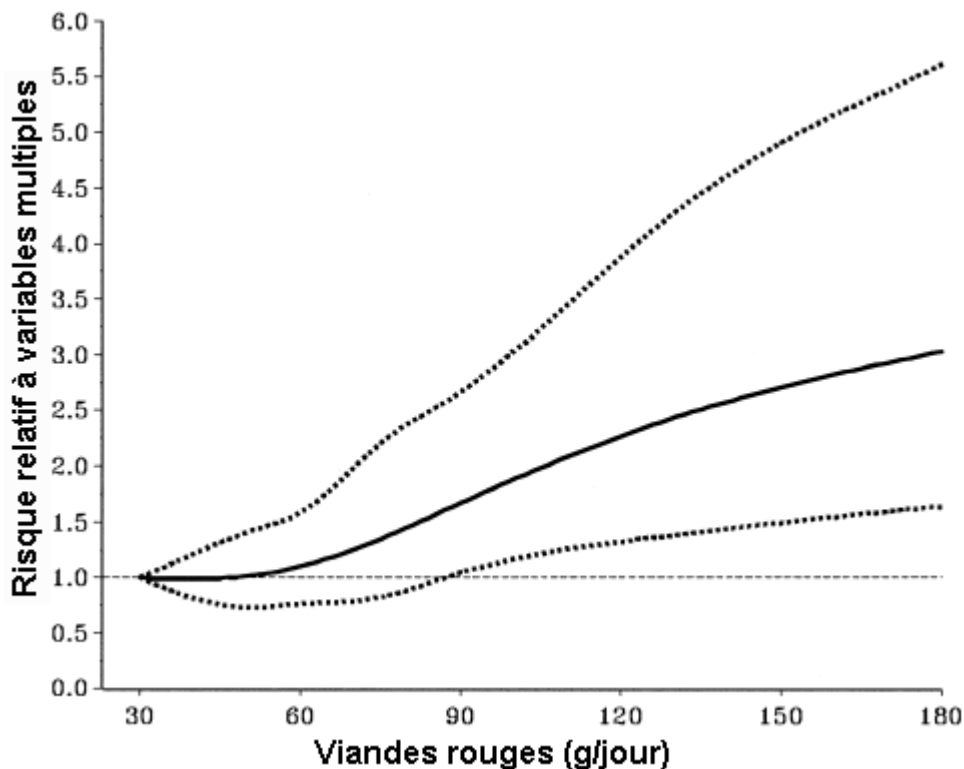


Figure 1 : Risque relatif à variables multiples du cancer du côlon distal en relation avec la consommation de viandes rouges (Larsson et al. 2005).

La forme familiale (héréditaire) du cancer colorectal représente environ 20-25% de tous les cancers colorectaux (de la Chapelle 2004; Hisamuddin et al. 2004). Cependant, il est très difficile de classer avec précision les proportions de cancer sporadique par rapport au cancer familial car les critères pour les classer varient d'une étude à l'autre. Les petites familles et les gens adoptés font également partie des cas incertains. Une étude Suédoise a même démontré que 53% des cas de cancer colorectal ont relaté avoir d'autres cas dans leur famille du premier degré (Olsson et al. 2003).

Il existe présentement des gènes identifiés ayant une forte pénétrance pour le cancer colorectal. Ces gènes ont été identifiés à la suite d'études réalisées sur des cas de syndrome de Lynch ou du polypose adénomateux familiale. Cependant, ces deux maladies représentent moins de 5% de tous les cancers colorectaux (de la Chapelle 2004). Donc il

existe une proportion de gènes à faible pénétrance qui jouent un rôle dans l'apparition du cancer colorectal et qui augmente les proportions de cancers familiaux.

Les cancers sporadiques représentent plus de 75% des cancers colorectaux. Cette catégorie de cancer est représentée par tous les cancers du côlon isolés pour lequel il n'existe pas d'histoire familiale. Même si les cancers sporadiques sont en plus grande proportion, leur cause est beaucoup moins bien définie que celle des cancers familiaux. On pense que les facteurs environnementaux jouent un plus grand rôle dans ce type de cancer et qu'il est fort probable que plusieurs facteurs génétiques à faible et moyenne pénétrance peuvent influencer leur développement (Laso et al. 2002; Heavey et al. 2004).

La figure 2 démontre bien l'interrelation entre les gènes de forte et de faible pénétrance ainsi que les facteurs environnementaux dans l'étiologie du cancer colorectal. Une description plus précise des gènes de susceptibilité du cancer colorectal sera discutée dans la prochaine section.

2.2 Carcinogénèse du cancer colorectal

Plusieurs modèles de la carcinogénèse du côlon ont été proposés. Je décrirai dans cette section les gènes impliqués ainsi que les mécanismes hypothétiques proposés.

Le gène le plus important dans la formation du cancer colorectal est le gène *APC* situé sur le chromosome 5. La protéine APC est impliquée dans plusieurs processus comme l'adhésion cellulaire, l'activation transcriptionnelle, l'apoptose ainsi que la ségrégation des chromosomes. Depuis 1991, plusieurs mutations dans ce gène ont clairement été liées au cancer colorectal (Kinzler et al. 1991; Gordon 1992). Les mutations présentes dans ce gène sont principalement des insertions ou des délétions qui changent le cadre de lecture et qui sont responsables de la maladie appelée polypose adénomateux familiale. L'endroit du changement en acide aminé dans la protéine APC a une influence sur les manifestations phénotypiques de la maladie, à savoir le nombre de polypes présents dans le côlon du patient (Giardiello et al. 1997; Terdiman et al. 1999). L'absence de la protéine APC normale affecte la voie métabolique famille type sans aile site d'intégration MMTV (*WNT*) qui entraîne la formation du cancer (Figure 3).

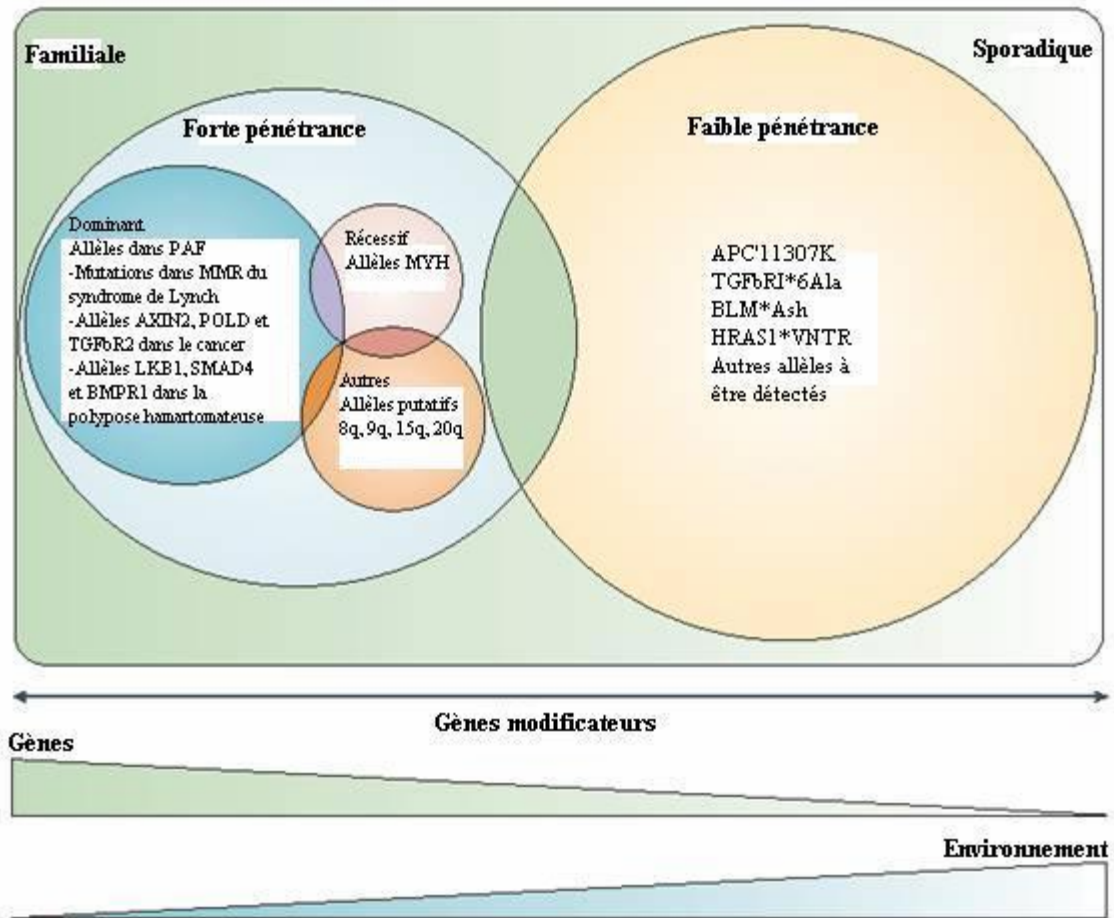


Figure 2 : Vue générale de la contribution génétique au cancer colorectal. Les allèles de fortes pénétrances incluent plusieurs gènes à caractères dominants ou récessifs responsables de cancers du côlon familiaux dont *APC*, réparation des mésappariements (*MMR*), protéine inhibitrice de l'axe 2 (*AXIN2*), polymérase de l'ADN II (*POLD*), facteur de croissance transformant 2 (*TGFβR2*), Sérine/thréonine kinase (*LKB1*), homologue mère contre DPP 4 (*SMAD4*), récepteur de l'os morphogénique 1 (*BMPRI*) et homologue Mut Y humain (*MYH*) en font partie. Quelques allèles de faibles pénétrance rencontrés généralement dans les cas sporadiques de cancer colorectal ont été découverts comme dans le gène *APC* et *TGFβRI* ainsi que dans les gènes syndrome de Bloom (*BLM*) et Harvey-ras 1 (*HRAS1*). Les cas sporadiques originent beaucoup plus de l'environnement contrairement aux cancers familiaux qui originent de mutations génétiques. Cependant, ils sont tous sujets aux gènes modifiant qui altère le phénotype d'un autre allèle (de la Chapelle 2004).

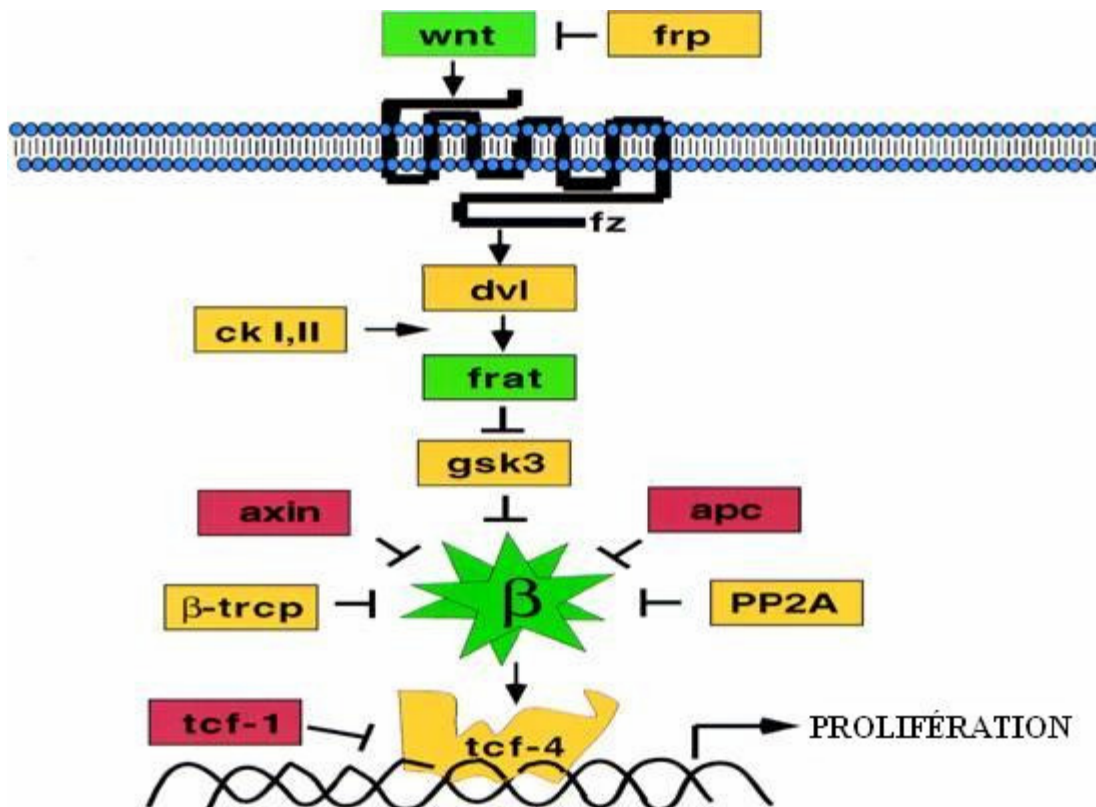


Figure 3 : Voie métabolique Wnt qui est altérée dans le cancer colorectal. L'oncogène Wnt active une cascade d'interactions protéiques qui mène à la prolifération cellulaire par l'activation du gène facteur de transcription 4 (tcf-4) par la β -catenin. Lorsque la protéine APC est présente, les β -catenin sont dégradées afin de contrôler la prolifération cellulaire. Lorsque la protéine APC est absente, les β -catenin s'accumulent et la prolifération cellulaire est hors de contrôle. Ce phénomène conduit à la formation d'une tumeur cancéreuse (Polakis 2000).

Le syndrome de Lynch est une autre maladie génétique du cancer colorectal. Les gènes impliqués sont des gènes de la famille de réparation des mésappariements MMR. Cette famille comprend une vaste gamme de gènes dont homologue Mut L humain 1 (*MLH1*), ségrégation postméiotique humaine 1 et 2 (*PMS2* et *PMS1*) ainsi que homologue Mut S humain 2 et 6 (*MSH2*, *MSH6*) en font partie. Leur rôle est la réparation de l'ADN suite à une erreur dans la réplication du génome lors de la division cellulaire. Des mutations dans ces gènes sont également responsables du phénomène d'instabilité des microsatellites qui est présent dans 15% des tumeurs du côlon sporadiques et dans plus de 90% des cas de syndrome de Lynch (Lawes et al. 2003; Grady 2004). Plusieurs mutations dans ces gènes

ont été trouvées chez des patients atteints du syndrome de Lynch. De 10 à 15% des cancers colorectaux sporadiques ont des mutations dans un des gènes de la famille MMR (Heavey et al. 2004).

Le gène de réparation par excision de bases homologue Mut Y humain (*MYH*) prédispose au cancer colorectal par sa fonction réparatrice des transversions. Des mutations dans ce gène engendrent une accumulation de mutations somatiques (transversions) dans le gène *APC* et peut ainsi causer le cancer colorectal (Al-Tassan et al. 2002; Chow et al. 2004; de la Chapelle 2004).

Plusieurs mutations dans d'autres gènes augmentent le risque de cancer colorectal. Ces gènes peuvent être responsables de la formation d'autres cancers. Parmi ces gènes on peut retrouver Sérine/thréonine kinase 1 (*LKB1*), gène responsable du syndrome de Peutz-Jeghers, également homologue mère contre DPP 4 (*SMAD4*) et récepteur protéique de l'os morphogénique 1A (*BMPRIA*) qui sont la cause de la polypose juvénile (Kemp et al. 2004). Le gène *p21-ras* (*Ki-ras*), *p53* et la β -catenin sont d'autres gènes importants dans la pathogénèse de ce cancer (Fearon et al. 1990; Douglas et al. 2004; Heavey et al. 2004).

Outre ces allèles à forte pénétrance, plusieurs allèles de faible pénétrance qui prédisposent au cancer colorectal ont été découverts. Ces allèles sont principalement localisés dans des gènes déjà identifiés comme *APC* et *MLH1* tandis que d'autres sont présents dans des gènes qui ne portent pas d'allèles de forte pénétrance comme *TGF- β* (Pasche et al. 1999; de la Chapelle 2004). Plusieurs gènes de faible pénétrance restent à découvrir. Jusqu'à maintenant, Wiesner et al ont découvert une liaison au cancer colorectal dans le bras q du chromosome 9 (Wiesner et al. 2003).

2.3 Autres mécanismes impliqués dans la carcinogénèse du côlon

D'autres mécanismes d'altérations de l'ADN sont impliqués dans la carcinogénèse du côlon. Le principal est la méthylation des îlots CpG (Cytosine_{phosphate}Guanosine) dans la région promotrice de gènes suppresseurs de tumeur. L'hyperméthylation entraîne la désacétylation des histones ainsi qu'une condensation de la chromatine empêchant la transcription active du gène suppresseur de tumeur. Ce faisant, l'absence du gène

suppresseur de tumeur permet de franchir un pas de plus dans la cascade d'évènement induisant la formation du cancer colorectal. Les gènes impliqués dans ce phénomène sont divers et incluent autant les gènes de faibles pénétrances que de fortes pénétrances (Xu et al. 2004). L'hyperméthylation des promoteurs est un phénomène très répandu dans le cancer colorectal. Plus d'une trentaine de gènes ont jusqu'à maintenant été identifiée comme étant porteur de cette abération épigénétique (Tableau II) (Kondo et al. 2004).

Tableau II : Gènes hyperméthylés dans le cancer colorectal.

Gènes	Région	Exprimé dans le côlon?	Méthylation liée à l'âge? (Quantitatif)	Méthylation liée à l'âge? (Sensitif)	Méthylation dans le cancer du côlon (%)
COX2	1p25.2-3	Oui	Oui	—	10-20
CSPG2	5q12-14	Oui	Oui	—	70
EGFR	7p12	Oui	Oui	—	0
ER-alpha	6q25.1	Oui	Oui	—	> 90
HPP1/TPEF	2q33	Oui	Oui	—	60-80
IGF2 (P2-4)	11p15.5	Oui	Oui	—	70
MYOD1	11p15.4	Non	Oui	—	> 90
N33	8p22	Oui	Oui	—	80
PAX6	11p13	Oui	Oui	—	70
RARB1	3p24	No	Oui	—	80
RARB2	3p24	Oui	Oui	—	10-30
RASSF1	3p21.3	Oui	Oui	—	50
THBS2	6q27	Oui	Oui	—	50
hMLH1	3p21.3	Oui	Non	Oui	10-20
P14/ARF	9p21	Oui	Non	Oui	10-20
APC	5q21	Oui	Non	ND	10-20
CACNA1G	17q22	Oui	Non	ND	10-20
CALCA	11p15	Non	Non	ND	50
HIC1	17p13.3	Oui	Non	ND	50
HLTF	3q25-26	Non	Non	ND	50
LKB1/STK11	19p13.3	Oui	Non	ND	5-10
MDR1	7q21.1	Oui	Non	ND	20-30
⁶ O-MGMT	10q26	Oui	Non	ND	30
P16 (CDKN2A)	9p21	Oui	Non	ND	20-30
RIZ1	1p36	Non	Non	ND	10-20
THBS1	15q15	Oui	Non	ND	10-20
TIMP3	22q12-13	Oui	Non	ND	27
WT1	11p13	?	Non	ND	50

ND, non déterminé

Source : (Kondo et al. 2004)

Deux autres mécanismes impliqués dans la carcinogenèse du cancer colorectal est l'instabilité chromosomique ainsi que la perte d'hétérozygoté. Le bras q du chromosome 18 est un site qui subit la perte d'hétérozygoté et est retrouvé à 72.5% dans le cancer colorectal (Goel et al. 2003). Cela entraîne la perte de l'expression de plusieurs gènes importants dans cette région telle la famille homologue mère contre DPP 4 (*SMAD*) dont *SMAD2* et *SMAD4* font partis. Cette famille de gène est responsable de la polypose juvénile. L'absence de ces protéines altère la voie *TGF- β* et empêche l'inhibition de la croissance cellulaire par cette voie (Miyaki et al. 2003).

En contre partie, l'instabilité chromosomique est un phénomène très souvent observé dans les cancers et cela entraîne la perte de plusieurs gènes (Grady 2004). Un chromosome instable peut subir une translocation dans un autre chromosome formant ainsi des gènes de fusion et donc des protéines de fusion. C'est le cas de la protéine de fusion point de cassure avec le protooncogène Abelson (*BCR/Abl*) qui est responsable de la leucémie myéloïde chronique (Randolph 2005). Le site de cassure peut également tronquer un gène et rendre des protéines non fonctionnelles. Même si quelques études sont encore contradictoire, il est possible que l'hypométhylation soit directement lié à l'instabilité chromosomique (Okano et al. 1999; Chan et al. 2001; Costello et al. 2001). La figure 4 montre une hypothèse sur les changements génétiques et épigénétiques qui surviennent dans le cancer colorectal (Jubb et al. 2005).

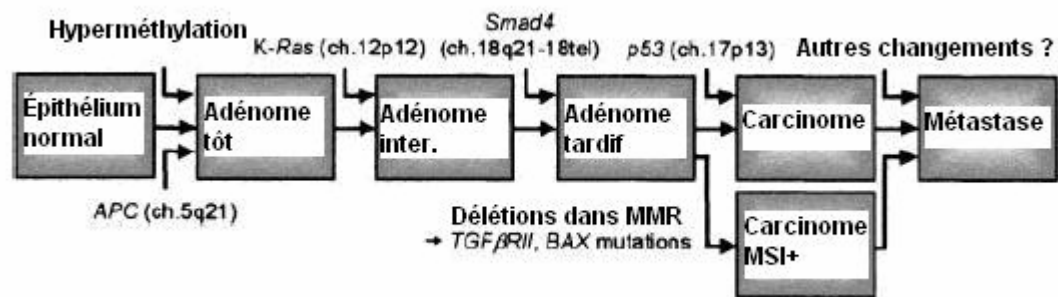


Figure 4 : Modèle génétique hypothétique de la carcinogenèse du cancer colorectal. (Jubb et al. 2005)

2.4 Traitement du cancer colorectal

Le traitement du cancer colorectal consiste, comme pour la plupart des cancers, à une chirurgie suivie d'une chimiothérapie. Un des agents très utilisé en première intention est l'irinotécan, un inhibiteur de la topoisomérase I (TOPO I), essentiel à la réplication de l'ADN. L'irinotécan est activé par les enzymes carboxylestérases hépatiques en un dérivé actif nommé 7-Ethyl-10-hydroxycamptothecin (SN-38) (Kawato et al. 1991). L'élimination du SN-38 se fait par la glucurono-conjugaison, c'est-à-dire l'ajout d'un acide glucuronique sur le SN-38 afin de le rendre beaucoup plus polaire et soluble et de faciliter ainsi son élimination par les voies biliaires et urinaires. Plusieurs UGT sont impliqués dans ce mécanisme dont le principal est UGT1A1 (Hanioka et al. 2001; Gagne et al. 2002).

Ce médicament est responsable d'effets secondaires sévères qui peuvent entraîner dans certains cas la mort. Plusieurs études ont démontré une corrélation entre la présence des polymorphismes du gène *UGT1A1* et les effets indésirables causés par ce médicament (Innocenti et al. 2003; Marsh et al. 2004; Rouits et al. 2004). D'autres études tentent d'adapter la dose du médicament avec l'efficacité de la thérapie tout en minimisant la toxicité. Un des gènes prometteurs est la TOPO I, la cible du SN-38. Plus elle est élevée dans une tumeur, plus la thérapie sera efficace (Sanghani et al. 2003; Pavillard et al. 2004). Plus de 24 gènes sont impliqués dans la disposition, le métabolisme et l'action de l'irinotécan et plusieurs d'entre eux présentent des polymorphismes pouvant affecter l'expression ou la fonctionnalité des protéines. (Toffoli et al. 2003).

3. Méthylation

3.1 Principe

La méthylation est l'ajout d'un groupement méthyle sur une des bases de l'ADN. Toutes les bases de l'ADN peuvent être méthylées. La base la plus souvent méthylée est la cytosine indépendamment de l'espèce. Par leur fonction de régulation des gènes, la méthylation fait partie d'un mécanisme beaucoup plus élaboré qui est la régulation épigénétique. La régulation épigénétique se définit par une modification de la régulation

transcriptionnelle des gènes sans y avoir un changement de bases puriques ou pyrimidiques. L'acétylation des histones et la méthylation des cytosines en font partie.

Chez les procaryotes, plusieurs bases différentes peuvent être méthylées. Les 2 bases les plus méthylées sont l'adénine et la cytosine. La fonction de la méthylation chez les procaryotes est connue. Pour ce qui est de la méthyladénine, cette base méthylée sert dans les mécanismes de réparation comme les mésappariements et sert également dans l'initiation de la réplication de l'ADN. La présence du groupement méthyle sur l'adénine permet l'activation de la transcription (Falnes et al. 2003). Le site de reconnaissance de la méthylase est 5'GATC 3'. La fonction de la méthylcytosine chez les bactéries est de protéger l'ADN bactérien contre ses propres enzymes de restriction.

Chez les plantes et les animaux, les sites méthylés ainsi que leurs fonctions sont différentes des procaryotes. Pour les plantes, seule la cytosine peut être méthylée mais elle possède deux sites de reconnaissance: CpG et CpNpG. La méthylation de ces sites joue un rôle dans l'inactivation des éléments transposables, dans l'inactivation des allèles parentaux et des transgènes et également dans les paramutations (Papa et al. 2001). En ce qui a trait à l'être humain, seul le site CpG est méthylé et les fonctions sont semblables à ceux des plantes en plus de réguler l'expression de nombreux gènes.

3.2 Caractéristiques de la méthylation

3.2.1 Localisation des CpG

Comme déjà mentionné, les CpG sont les seuls sites de reconnaissance et la cytosine est la seule base méthylée dans l'ADN humain. Près de 70% des CpG dans l'ADN sont méthylés et il existe environ 29000 CpG dans tout le génome humain (Lander et al. 2001). Les CpG ne sont pas répartis également dans le génome, ils sont distribués généralement en îlot que l'on appelle îlot CpG. Plus de 50% des gènes possèdent un ou plusieurs îlots CpG (Costello et al. 2001). Ces îlots sont concentrés dans les régions promotrices des gènes, les autres régions comme les introns et les exons sont généralement pauvre en CpG (Robertson et al. 2000). Ainsi, les CpG méthylés sont principalement retrouvés dans les introns, exons et les

promoteurs de gènes non transcrit (Nakao 2001). Lorsque méthylés, il y a répression de la transcription, un phénomène courant dans les cellules cancéreuses. Les CpG non méthylés sont retrouvés dans les promoteurs des gènes transcrits.

3.2.2 Méthyltransférase

La méthylation des CpG est un phénomène très actif dans une cellule et elle est catalysée par 5 différentes enzymes appelées méthyltransférase. Ces enzymes catalysent le transfert d'un groupement méthyle provenant de la S-adénosylméthionine sur la base cytosine de l'ADN qui est suivie d'une guanine. Cette nouvelle base s'appelle 5-méthylcytosine (Bestor 2000) (Figure 5).

La première méthyltransférase découverte est la méthyltransférase 1 (Dnmt1). La Dnmt1 est une grosse protéine de 1620 acides aminés dont la principale fonction est la maintenance de la méthylation. Lorsque qu'il y a une division cellulaire, les sites CpG qui sont méthylés deviennent hémiméthylés puisque le site CpG sur le brin nouvellement formé n'est pas méthylé comparativement au brin parental qui l'est. Cette région palindromique du CpG hémiméthylé est reconnue par la Dnmt1 qui méthyle le brin nouvellement formé. Cela permet de conserver la méthylation à chaque division cellulaire (Robertson et al. 1999; Pradhan et al. 2003). La Dnmt1 a de 5 à 30 fois plus d'affinité pour les sites hémiméthylés que les sites non méthylés (Bestor 2000; Costello et al. 2001). Des études ont démontrées que l'absence du gène de la Dnmt1 affecte très peu le profil de méthylation ce qui suggère l'existence d'un mécanisme compensateur (Leu et al. 2003; Robert et al. 2003).

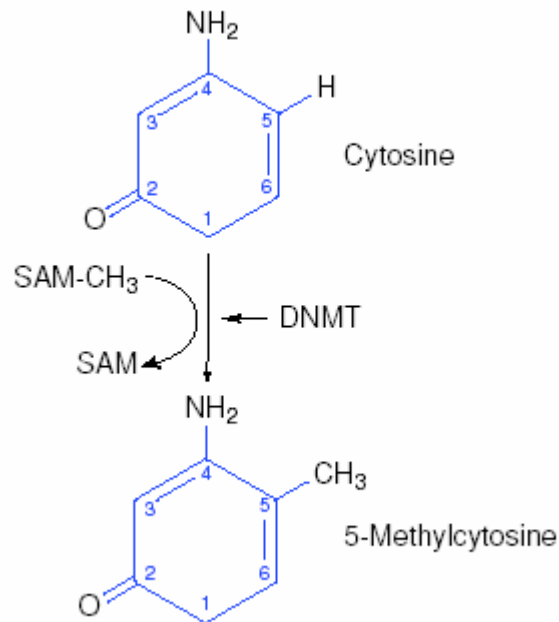


Figure 5 : Modification de la cytosine en 5-méthylcytosine par l'ajout d'un groupement méthyle en position 5 catalysé par la Dnmt. Le donneur du groupement méthyle est le S- adénylméthionine (SAM).

La deuxième méthyltransférase est la Dnmt2. Cette méthyltransférase est la moins connue de tous. L'absence de la Dnmt2 dans les souris mutées a eu très peu d'effet sur le profil de méthylation et il ne semble pas que cette enzyme participe à la méthylation nouvelle telle qu'observée dans les cancers (Saito et al. 2001). Cependant, il semble qu'il y ait une différence dans la structure des centromères pour les souris qui n'ont pas ce gène (Bestor 2000). Récemment, une équipe a découvert que l'ARNm de la Dnmt 2 est fortement diminué dans les cancers colorectaux et gastriques (Kanai et al. 2001).

La troisième famille est composée de trois enzymes très homologues, la Dnmt3a, Dnmt3b et la Dnmt3L. Les Dnmt3a et Dnmt3b sont deux enzymes très semblables mais elles sont codées sur deux chromosomes différents (Bestor 2000). Ces deux enzymes, contrairement à la Dnmt1, n'ont pas une préférence pour les sites hémiméthylés mais ils ont une légère préférence pour les sites non-méthylés (Yokochi et al. 2002). C'est pourquoi ces enzymes sont responsables de la méthylation nouvelle (Robertson et al. 1999). Ces deux enzymes

jouent un rôle important dans le développement embryonnaire et le contrôle de la méthylation nouvelle. La Dnmt3b possède des fonctions spécifiques chez l'être humain et son absence est liée au syndrome ICF (Immunodéficience, instabilité des centromères, anomalies faciales). Le syndrome ICF entraîne une hypométhylation des satellites péri-centromériques (Maraschio et al. 1988).

La Dnmt3L est également codée sur un chromosome différent des deux autres isoformes. Cette isoenzyme est impliquée dans le mécanisme de l'empreinte maternelle de méthylation dans la phase embryonnaire (Bourc'his et al. 2001). De récentes études ont démontré que cette enzyme interagit avec les deux autres isoformes Dnmt3, plus particulièrement Dnmt3a, pour la régulation de la méthylation nouvelle dans la phase embryonnaire (Chedin et al. 2002; Hata et al. 2002; Suetake et al. 2004). Cette enzyme est clairement un inhibiteur de la transcription puisque qu'elle a été démontrée, tout comme les Dnmt3a et Dnmt3b, qu'elle pouvait lier l'histone déacétylase 1 (HDAC1) et désacétyler les queues d'histones pour l'inhibition de la transcription. Sans son domaine de méthylation, la Dnmt3L est encore capable de conserver l'activité de lier HDAC1 et de causer la répression transcriptionnelle (Deplus et al. 2002).

3.2.3 Fonctions de la méthylation

La méthylation possède plusieurs fonctions essentielles à l'intégrité d'une cellule eucaryote. Elle joue un rôle important dans la stabilité chromosomique ainsi que la structure de la chromatine (Robertson 2002). Plusieurs maladies génétiques et syndromes ont été imputés à la méthylation de l'ADN. La maladie ATR-X (Alpha thalassémie liée à l'X avec retard mental) est causée par des mutations dans le gène ATR-X et provoque des changements dans le profil de méthylation des cellules (Gibbons et al. 1997). Le syndrome de Rett est une autre maladie dont la méthylation est impliquée. Ce syndrome résulte de la mutation du gène protéine liant les CpG méthylés (MeCP2). Cette protéine intervient dans les interactions avec les groupements méthyles ainsi que les histones, elle sera discutée plus précisément dans le prochain chapitre (Paulsen et al. 2001). D'autres maladies impliquant uniquement des profils anormaux de méthylation où des désordres d'empreintes parentaux de méthylation ont été décrits comme le syndrome de Prader-Willi/Angelman,

Beckwith/Wiedemann et également dans plusieurs cancers (Paulsen et al. 2001). La méthylation est également responsable de l'inactivation du deuxième chromosome X chez la femme (Riggs 2002).

Une autre fonction importante de la méthylation des cytosines est le contrôle de la régulation transcriptionnelle. La méthylation des CpG sert à l'inactivation de certaines régions dans l'ADN qui consiste en une série d'éléments répétés, des séquences virales intégrées ainsi que des transposons (Herman et al. 2003). Elle sert également à inactiver la transcription de gène via un mécanisme impliquant plusieurs protéines (Figure 6) (Attwood et al. 2002). La présence des groupements méthyles affecte directement la liaison des facteurs de transcription sur l'ADN. D'autres protéines pouvant lier les méthyles provenant de la famille des protéines liant les méthyle (MBP) sont également recrutées et contribuent également à cette inhibition de la liaison des facteurs de transcription et à l'arrêt de la transcription (Robertson et al. 2000). Ces protéines sont capables de se lier sur un seul dinucléotide CpG méthylé et de causer la répression de la transcription (Nan et al. 2001).

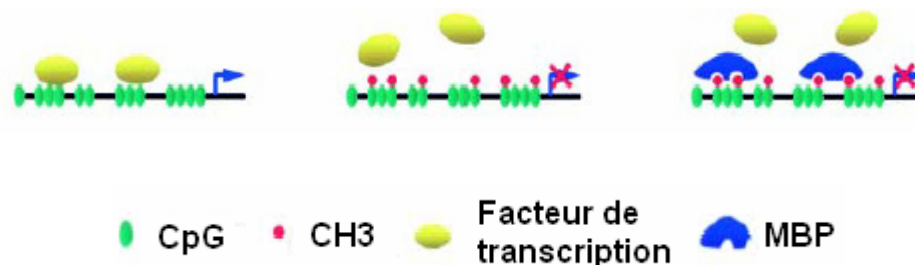


Figure 6 : Illustration de l'inhibition de la transcription par la méthylation. La présence d'un groupement méthyle sur une cytosine affecte directement la liaison d'un facteur de transcription et bloque ainsi la transcription. Des protéines comme les protéines MBP, dont la protéine MeCP2 en fait partie, bloquent également l'accès aux facteurs de transcription (Attwood et al. 2002).

Dans les cancers, plusieurs études ont démontré une hyperméthylation de promoteurs de gènes suppresseurs de tumeur. La présence de cette hyperméthylation inhibe la transcription de l'anti-oncogène et entraîne une cancérisation cellulaire. Environ 60% des gènes ont un îlot CpG dans leur promoteur et il a été estimé que 1.4% des CpG pouvaient avoir une hyperméthylation anormalement élevée et que ce nombre pouvait atteindre 10%

lors du développement de la tumeur (Costello et al. 2000). Plusieurs études tentent de déterminer le rôle des enzymes de la méthylation dans l'initiation et l'évolution des cellules cancéreuses. Les DNMT jouent un rôle prédominant dans la méthylation aberrante des promoteurs. Par exemple, plusieurs études ont démontré que ces enzymes, principalement les DNMT3a et DNMT3b responsables de la méthylation nouvelle, sont exprimées de façon excessive dans les tumeurs comparativement aux tissus normaux (Issa et al. 1993; Robertson et al. 1999). Également, une étude a démontré que la DNMT1 est une enzyme qui lorsque son expression est augmentée dans un tissu normal, elle cause de la méthylation nouvelle et provoque la transformation cellulaire (Bakin et al. 1999).

L'hyperméthylation du promoteur de plusieurs gènes serait une des causes de l'initiation et de l'évolution de la tumeur cancéreuse (Nephew et al. 2003). Ce phénomène est actif dans la cellule puisque l'on retrouve de plus en plus de gènes hyperméthylés dans les différents changements cellulaires menant au cancer (Figure 7) (Nephew et al. 2003).

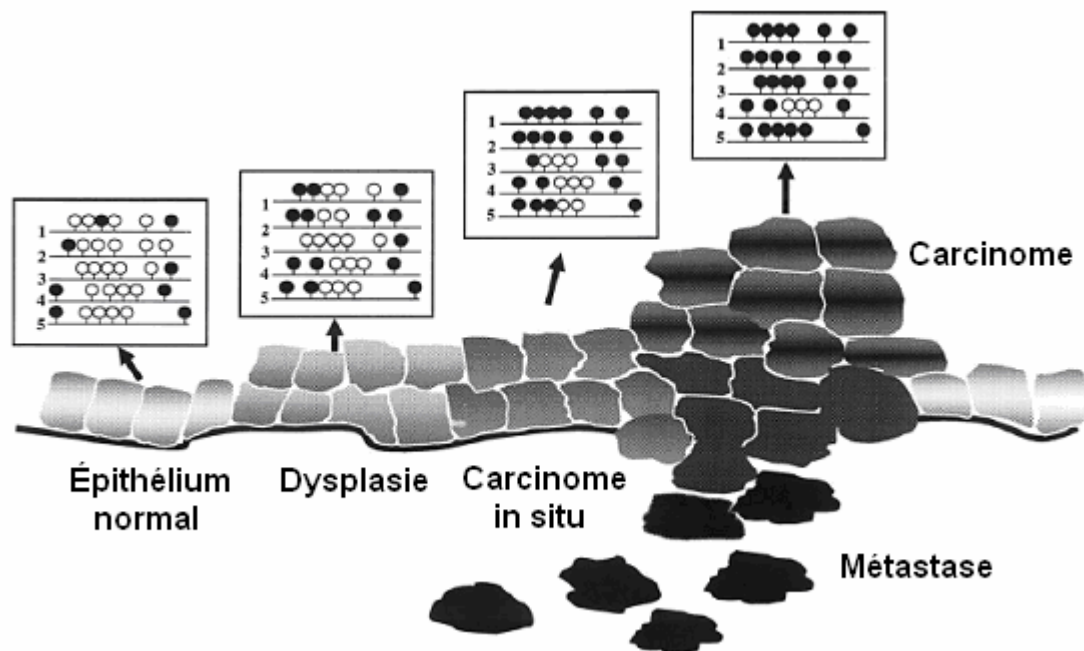


Figure 7 : Hypothèse sur les profils de méthylation de cinq promoteurs de gènes suppresseurs de tumeur dans les différentes morphologies cellulaires. Illustration de la présence d'hyperméthylation dans la carcinogénèse du cancer. Les cercles noirs représentent un CpG méthylé et le cercle blanc un CpG non méthylé. (Nephew et al. 2003)

3.2.4 Interaction avec les histones

La méthylation des CpG interagit avec d'autres protéines très importantes dans la régulation épigénétique. L'accessibilité des facteurs de transcription sur leurs séquences cibles dans l'ADN dépend également du noyau d'histones présent dans cette région. La présence d'un groupement méthyle sur la cytosine de l'ADN permet la liaison de protéines MeCP. Ces protéines ont en commun une région de 85 acides aminés appelée domaine de liaison au méthyle (MBD) qui lie les méthyles et se fixe sur les 5-méthylcytosines de l'ADN. Deux fonctions principales leurs sont associées, ils causent une répression directe de la transcription en masquant le site de liaison à des facteurs de transcription (Yu et al. 2000). Il est également le point de départ d'un complexe protéique incluant un corépresseur Sin3 homologue A (Sin3a) et une HDAC. L'histone déacétylase est une protéine qui désacétyle les queues d'histones. Cette désacétylation est l'un des précurseurs de la formation de l'hétérochromatine, un état condensé de l'ADN non transcriptionnellement actif (Jones et al. 1998). Ce mécanisme est médié par un complexe protéique qui a une activité de réarrangement du chromosome et de désacétylation des histones (Tong et al. 1998; Dobosy et al. 2001) (Figure 8).

À l'inverse, lorsqu'il y a absence de la méthylation, c'est un membre de la famille des histones acétyltransférases (HAT) qui est recruté et permet l'acétylation des queues d'histones. Le complexe protéique formé permet la formation de l'euchromatine, c'est-à-dire un état décontracté de la chromatine et permet donc l'attachement des facteurs de transcription et par conséquent l'activation de la transcription en ARNm (Marmorstein 2001) (Figure 8).

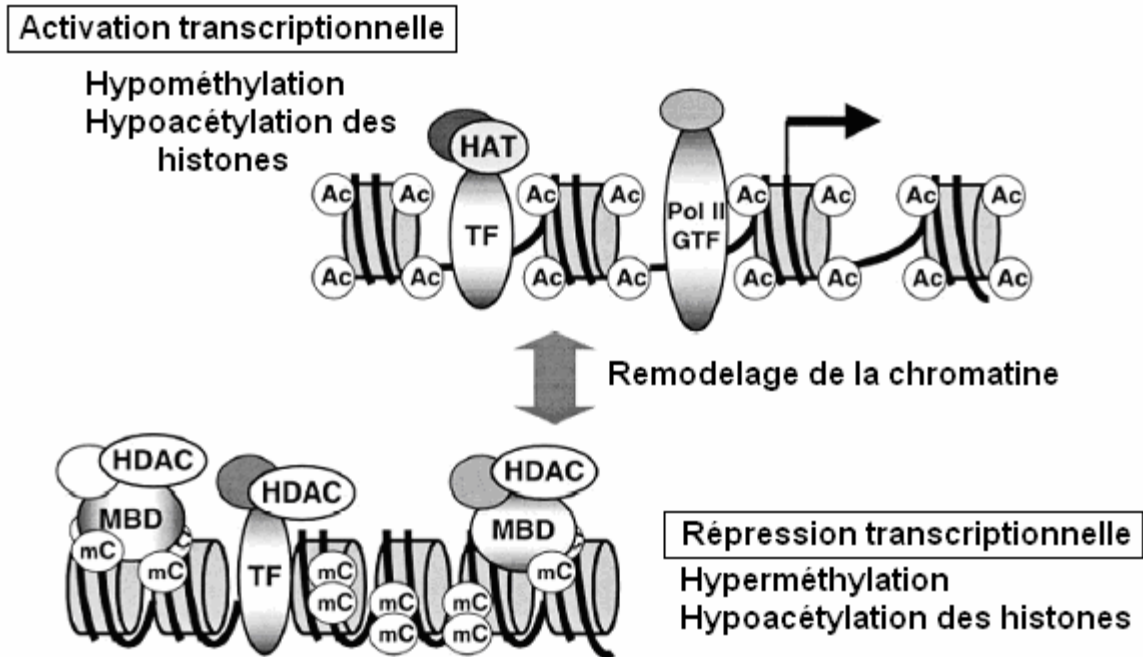


Figure 8 : Mécanisme épigénétique de la régulation transcriptionnelle par l'acétylation ou la déacétylation des histones. L'histone acétyltransférase (HAT) est impliquée dans l'activation transcriptionnelle et l'HDAC est impliquée, avec les MBD, dans la répression transcriptionnelle (Nakao 2001).

3.4 Applications cliniques de la méthylation

3.4.1 Tests diagnostiques impliquant la méthylation

L'hyperméthylation des CpG est un mécanisme très fréquemment observé dans le cancer du côlon et également dans d'autres formes de cancer (Esteller et al. 2001). Beaucoup de gènes pouvant être régulé par la méthylation ont jusqu'à maintenant été identifiés (Esteller et al. 2001). Plusieurs travaux démontrent qu'il est possible de détecter dans le plasma de patients atteints du cancer du côlon, l'ADN de promoteurs méthylés (Herman 2004). Des études ont rapporté que l'on pouvait extraire plus d'ADN dans le sérum de sujets atteints de cancer que chez des sujets normaux (Taback et al. 2004). L'ADN en circulation peut provenir d'une tumeur primaire ou de métastases tumorales et il est possible de déterminer le profil de méthylation de cette ADN (Herman 2004).

La possibilité d'utiliser la méthylation de l'ADN comme biomarqueur d'un cancer est possible et très étudiée. Il représente un avantage de taille comparativement à d'autres biomarqueurs puisqu'il s'agit de l'ADN. Il est beaucoup plus stable que l'ARNm ou les protéines (Cottrell et al. 2003). Une étude a démontré qu'il était possible de détecter l'hyperméthylation du promoteur du gène homologue Mut L humain 1 (hMLH1) dans le sérum de patients atteints du cancer du côlon. Le test a démontré être 33% sensible et 100% spécifique sur 19 patients (Nakayama et al. 2002). Une autre étude a démontré des résultats semblables avec le gène *p16* chez 94 spécimens de cancer colorectal (Grady et al. 2001). La méthylation pourrait servir comme un test diagnostique complémentaire mais également pour le monitoring des gens en rémission du cancer afin de détecter rapidement les rechutes.

3.4.2 Nouvelles approches thérapeutiques par les agents déméthylants

Des agents chimiothérapeutiques sont présentement en essais cliniques et ont comme cible le sentier de la régulation transcriptionnelle par la méthylation. Les deux principaux agents sont le 2'-déoxy-5-azacytidine (décitabine) ainsi que le 5-Azacytidine (5-Aza-C), deux analogues de la cytosine. Le 5-Aza-C agit principalement sur l'ARNm et à moindre échelle sur l'ADN. Cette molécule est très cytotoxique en phase S et agit principalement sur les cellules en fortes divisions cellulaires (Santini et al. 2001). Le décitabine agit principalement sur l'ADN. Il séquestre les DNMT sur l'ADN et l'empêche donc d'agir. Contrairement au 5-Aza-C, le décitabine ne bloque pas la phase S. Cela indique que le décitabine a un effet cytotoxique *in vivo* plus efficace que le 5-Aza-C (Juttermann et al. 1994). Les deux molécules agissent également en tant qu'hypométhylant. Ils sont capable d'induire la différenciation cellulaire, la réactivation de la transcription et la production de protéines (Attadia 1993). Quelques études cliniques avec ces agents ont démontré très peu d'effets pour les tumeurs solides (Santini et al. 2001). Cependant, les tumeurs liquides comme les leucémies répondent beaucoup mieux à la thérapie. Plusieurs études cliniques de phase II confirment ces résultats (Steuber et al. 1996; Willemze et al. 1997). Le décitabine s'est avéré très efficace pour augmenter le décompte plaquettaire et a même pu amener des patients atteints du syndrome myélodysplasique en rémission (van den Bosch et al. 2004).

D'autres molécules sont présentement à l'étude comme la Trichostatin A (TSA), un inhibiteur de l'HDAC. Des études *in vitro* démontrent clairement qu'elle induit une apoptose spontanée sur des hépatocytes de rat (Vanhaecke et al. 2004). Des inhibiteurs de l'histone déacétylase synthétique sont présentement en essai clinique de phase I (Monneret 2005). Finalement, la compagnie Montréalaise MéthylGene est en étude clinique de phase I et de phase II avec des molécules d'ARN antisens spécifiques à la DNMT1 (MG-98) et un autre spécifique à trois isoformes de la famille des HDAC (MGCD0103). Ils ont obtenus des résultats prometteurs en démontrant que certains suppresseurs de tumeur avait été activés et que des oncogènes avait été inhibés après le traitement avec ces molécules (Reid et al. 2002).

3.4.2 Statut de méthylation et réponse à la chimiothérapie

La méthylation d'un gène spécifique dans la tumeur peut influencer la réponse à la chimiothérapie. Le gène le plus étudié est le gène de la O6-méthylguanine-DNA méthyltransférase (*MGMT*) qui est responsable de la réparation des adduits alkyles sur la base guanine dans l'ADN. Plusieurs agents anticancéreux ont comme fonction d'ajouter des groupements alkyles sur la guanine comme par exemple la carmustine. L'hyperméthylation du promoteur de la *MGMT* prédit une bonne réponse à la carmustine (Esteller et al. 2000; Esteller et al. 2004). Plusieurs autres médicaments peuvent bénéficier du statut de méthylation de la *MGMT* afin de prédire la réponse à la thérapie tel le cyclophosphamide dans le lymphome diffus à grandes cellules (Esteller et al. 2002) ou le temozolomide pour le gliome (Paz et al. 2004). D'autres cas similaires de gènes inhibés par l'hyperméthylation dans une tumeur cancéreuse peuvent prédire la réponse à la thérapie. L'efficacité de la thérapie des tumeurs traitées au cisplatine et ses dérivés peuvent être prédite par la détermination du profil de méthylation du gène homologue Mut L humain 1 (*hMLH1*) (Plumb et al. 2000). Également, l'hyperméthylation du gène transporteur des folates réduits (*RFC*) prédit une faible réponse au méthotrexate dans le lymphome du système nerveux central primaire (Ferreri et al. 2004).

Notre hypothèse va dans ce sens et vous sera présentée plus loin. Brièvement, les UGT qui modulent la biotransformation de médicaments et leur concentration tumorale pourrait influencer l'efficacité de la thérapie.

4. Enzymes UGT

4.1 La réaction de glucurono-conjugaison

Les UGT sont des enzymes impliqués dans le métabolisme de diverses substances endogènes et exogènes. La réaction de glucurono-conjugaison consiste en l'ajout d'un acide glucuronique, provenant de l'uridine diphosphate acide glucuronique (UDPGA), sur la partie aglycone d'une molécule cible afin de faciliter son excrétion par la bile ou l'urine en augmentant la polarité (Figure 9) (Belanger et al. 1998; Guillemette 2003). Cette réaction est catalysée par les UGT. La majorité des substances biotransformées par cette famille d'enzyme sont inactivée de cette façon mais il existe des exceptions où l'ajout d'acide glucuronique augmente l'effet pharmacologique comme la morphine. La morphine-6-glucuronide est 20 fois plus puissante que la morphine non conjuguée (Coffman et al. 1997).

Les médicaments ainsi que plusieurs substances carcinogéniques environnementales comme les amines aromatiques hétérocycliques (AAH) ainsi que des substances endogènes comme les stéroïdes ou la bilirubine sont les cibles des UGT (Nowell et al. 1999; Guillemette 2003). La glucurono-conjugaison est une réaction essentielle à la vie qui agit comme protecteur contre diverses substances pharmacologiques potentiellement toxiques ou carcinogéniques et agissent comme modulateur pour les molécules endogènes.

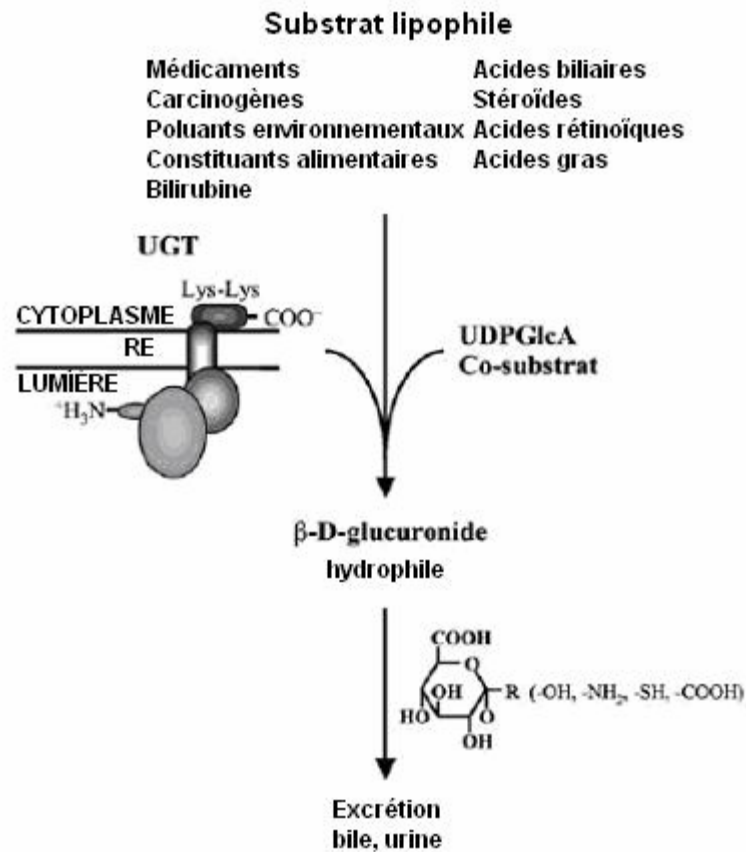


Figure 9 : Réaction de glucurono-conjugaison. L'enzyme UDP-glucuronosyltransférase catalyse le lien entre le C1 de l'acide glucuronique (Co-substrat) à un groupement aglycone (-OH, -COOH, -SH, -NH₂) de divers substrats lipophiles. Le substrat glucuronide est beaucoup plus hydrophile et peut être excrété par l'urine ou la bile (Guillemette 2003).

4.2 Familles UGT

4.2.1 UGT1

Il existe deux familles dans les UGT, la famille 1A et la famille 2 qui comprend les 2A et 2B. La famille 1A est composée de 9 gènes fonctionnels et 4 pseudo gènes. Les gènes UGT1A sont situés sur le chromosome 2q37 et s'étendent sur plus de 198 kb. Ils sont composés de cinq exons dont les exons 2, 3, 4 et 5 sont communs pour toute cette famille. Les exons 1 sont situés en 5' et chacun possède son propre promoteur (Mackenzie et al.

1997; Guillemette 2003). Les UGT partagent plus de 50% d'homologie entre les membres de sa famille et un peu moins de 50% entre les UGT1 et UGT2 (Mackenzie et al. 1997).

Les *UGT1A* sont également très homologues entre eux. *UGT1A1* et *UGT1A6* sont assez unique tandis que *UGT1A2p* jusqu'à *UGT1A5* comprend une homologie de séquence variant entre 87 et 92%. Les UGT compris entre *UGT1A7* et *UGT1A13p* comprend une homologie variant de 67 à 91% (Gong et al. 2001). Ces homologies correspondent à la localisation génomique de l'exon 1 (Figure 10). Les quatre pseudogènes (*UGT1A2p*, *UGT1A11p*, *UGT1A12p*, *UGT1A13p*) possèdent tous un codon stop dans la région codante de l'exon 1 et aucune fonction connue n'a été trouvée pour *UGT1A5*. Toutes les huit autres isoenzymes codent pour une protéine fonctionnelle qui métabolise des substrats spécifiques à chacun ou des substrats communs à plusieurs enzymes.

Chacun des membres de cette famille d'enzyme semble métaboliser préférentiellement certaines substances. *UGT1A1* est le seul isoenzyme à métaboliser la bilirubine, il peut également métaboliser divers composés endogènes comme l'acide rétinoïque et les stéroïdes et également des composés exogènes comme des médicaments tel le SN-38 ainsi que des xénobiotiques tel le 1-naphtol. *UGT1A6* et *UGT1A7* métabolise peu de substances endogènes et *UGT1A8* à *UGT1A10* métabolisent principalement des polluants environnementaux et des médicaments (Nowell et al. 1999; Gregory et al. 2004). Une liste de substances métabolisées par les UGT a été récemment publiée (Kiang et al. 2005).



Figure 10 : Région génomique des UGT1A (Tukey et al. 2001).

4.2.2 UGT2

Les UGT2 peuvent se diviser en deux sous-familles, les UGT2A et les UGT2B et sont tous situés dans la région q13-21.1 du chromosome 4 (Figure 11). Les UGT2A ne possède que deux membres et semblent être impliqués dans l'olfaction (Jedlitschky et al. 1999). Les

UGT2B sont constitués de 6 exons et ils existent 7 gènes fonctionnels chez l'humain (*UGT2B4*, *UGT2B7*, *UGT2B10*, *UGT2B11*, *UGT2B15*, *UGT2B17* et *UGT2B28*) ainsi que 5 pseudogènes (*UGT2B24p* à *UGT2B27p* ainsi que *UGT2B29p*).

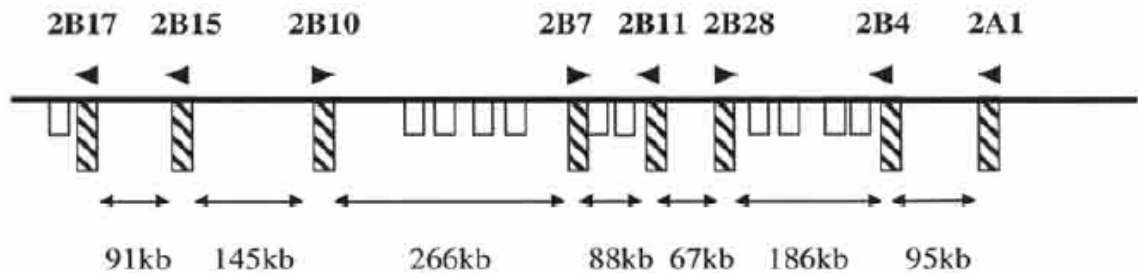


Figure 11 : Région génomique des UGT2A et UGT2B fonctionnelles (Riedy et al. 2000).

Les UGT2B métabolisent, tout comme les UGT1A, un grand nombre de substances autant endogènes qu'exogènes (Kiang et al. 2005). Notons que les androgènes sont principalement glucurono-conjugués par les enzymes de cette famille et qu'ils sont largement étudiés (Belanger et al. 2003).

4.3 Structure des UGT

Les UGT sont des enzymes composées de 529 à 534 acides aminés et sont intégrés dans le réticulum endoplasmique (RE) de la cellule (Kinosaki et al. 1993; Tukey et al. 2000). À l'exception d'*UGT1A10*, la région amino-terminale est composée d'une séquence signal permettant de diriger la protéine vers le réticulum endoplasmique (Strassburg et al. 1997). Cette séquence est clivée suite à l'insertion de la protéine dans le réticulum endoplasmique. Suite à la séquence signal on retrouve une région très importante impliquée dans la spécificité de substrat (Meech et al. 1997). La région carboxyle-terminale comprend une région très conservée qui est impliquée dans la liaison au co-substrat (UDPGA) et se termine par un court domaine transmembranaire suivi d'une courte chaîne de 19 à 26 acides aminés présent dans le cytosol. Cette chaîne est impliquée dans le signal de rétention au RE ainsi que dans la maintenance de l'activité catalytique des UGT par de possibles

interactions avec des protéines provenant de la région cytoplasmique (Jackson et al. 1990; Meech et al. 1996; Meech et al. 1997) (Figure 12).

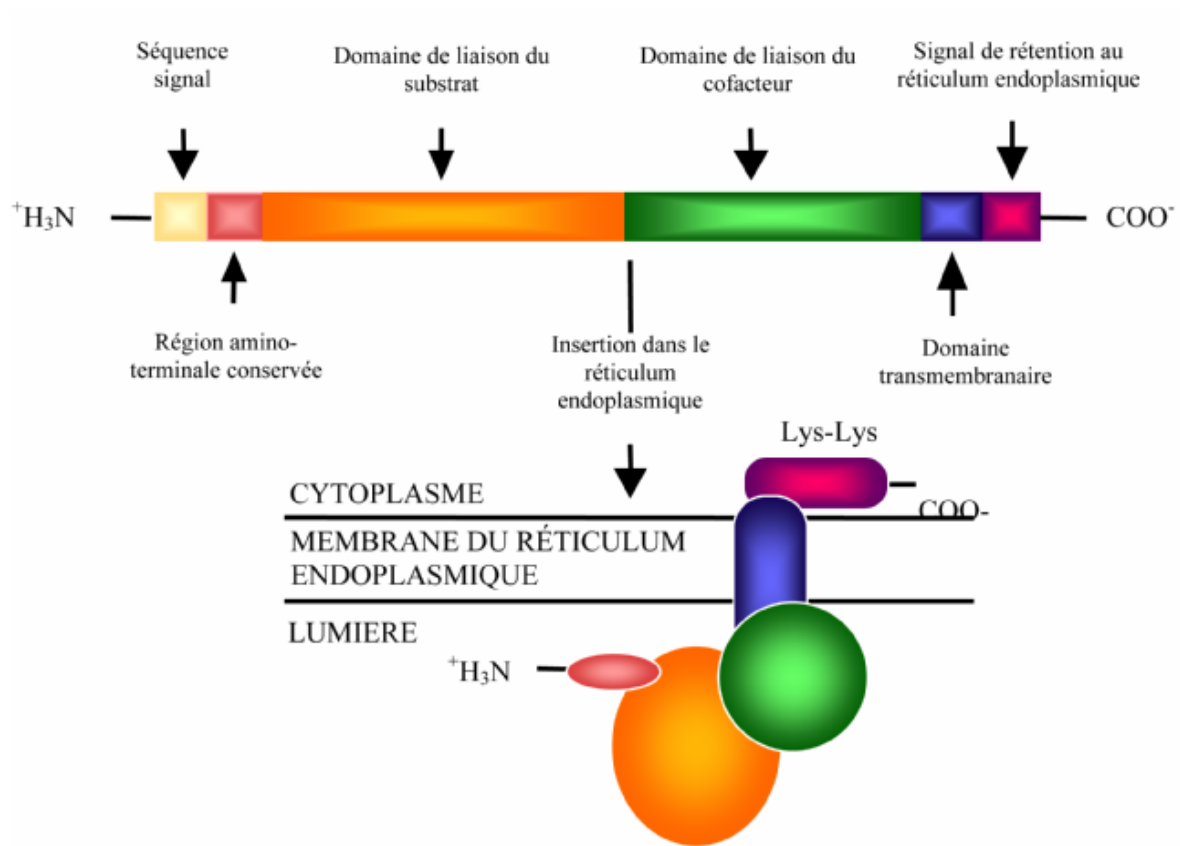


Figure 12 : Structure primaire générale des UGT (Radomska-Pandya et al. 1999).

4.4 Distribution tissulaire

Les UGT sont des enzymes qui ne sont pas exprimés constitutivement dans tous les tissus. Même si le foie est l'organe de prédilection pour le métabolisme de diverses substances chez l'être humain, il n'en demeure pas moins que le foie n'exprime pas tous les isoformes UGT. Il est établi que les organes extra-hépatiques jouent également un rôle majeur dans le métabolisme de ces substances et dans la protection de l'organisme (Strassburg et al. 1998).

Le tractus gastro-intestinal exprime une gamme élevée d'enzymes UGT dont certaines ne sont pas exprimées au foie. Pour cette raison, l'activité de glucurono-conjugaison est propre pour chacun de ces sites (Strassburg et al. 1999). Il existe beaucoup d'autres organes où les

UGT sont exprimés notamment les glandes endocrines comme l'utérus, le sein, la prostate et les testicules. Comme les UGT métabolisent une vaste gamme d'hormones stéroïdiennes tel l'estradiol et ses dérivés ainsi que plusieurs androgènes, il n'est pas surprenant de les détecter dans ces organes (Levesque et al. 1997; Albert et al. 1999; Chouinard et al. 2004; Guillemette et al. 2004). Plusieurs autres tissus expriment également différents UGT comme les reins, les poumons et le cerveau etc. (Desai et al. 2003) (Tableau III).

Tableau III : Distribution tissulaire des 18 isoformes UGT transcrites

Isoforme UGT	Exprimé
UGT1A1	Tissu biliaire, côlon, intestin, foie, estomac
UGT1A3	Tissu biliaire, côlon, foie, estomac
UGT1A4	Tissu biliaire, côlon, intestin, foie
UGT1A5	Non détecté
UGT1A6	Tissu biliaire, cerveau, côlon, intestin, rein, larynx, foie, poumon, estomac
UGT1A7	Oesophage, tissu orolaryngée, estomac
UGT1A8	Côlon, oesophage, intestin, rein, larynx
UGT1A9	Sein, côlon, oesophage, foie, rein, prostate, ovaire, peau, testicule
UGT1A10	Tissu biliaire, côlon, oesophage, intestin, tissu orolaryngée, estomac
UGT2A1	Cerveau, poumon fœtal, épithélium olfactoire
UGT2A2	Côlon, intestin, foie, estomac
UGT2B4	Tissu adipeux, adrénale, sein, rein, foie, poumon, ovaire, placenta, prostate, peau, testicule,
UGT2B7	Cerveau, sein, côlon, oesophage, intestin, rein, foie, poumon, pancréas
UGT2B10	Sein, oesophage, rein, foie, poumon, placenta, prostate, testicule
UGT2B11	Adipeux, adrénale, sein, rein, foie, poumon, prostate, peau
UGT2B15	Adipeux, sein, oesophage, rein, foie, poumon, ovaire, placenta, prostate, peau, testicule, utérus
UGT2B17	Adrénale, sein, rein, foie, poumon, placenta, peau, ovaire, prostate, testicule, utérus
UGT2B28	Sein, foie

Source : (Desai et al. 2003)

4.5 Rôle étiologique des UGT dans le cancer

4.5.1 Polymorphismes de la région codante et risque de cancer

Plusieurs études ont trouvées des polymorphismes dans la région codante de plusieurs enzymes UGT (Guillemette 2003). Certains de ces polymorphismes changent la séquence en acide aminé et modifient son activité envers ses substrats. La présence de polymorphismes dans la région codante de plusieurs UGT affecte l'activité de glucuron-conjugaison sur ses substrats et prolonge ainsi l'exposition aux carcinogènes de la cellule.

Plusieurs études ont démontrés une corrélation entre la présence d'un polymorphisme dans la région codante et le risque de cancer.

UGT1A7 est une enzyme qui est exprimée dans la région proximale du tube digestif (orolaryngée, œsophage, estomac). La région proximale du tube digestif est une des principales voies d'entrées de carcinogènes environnementaux comme le PhIP. Plusieurs polymorphismes de la région codante du gène UGT1A7 ont été décrite (Guillemette et al. 2000) et un d'entre eux, UGT1A7*3, augmente le risque de souffrir d'un cancer de la région proximale du tube digestif et du pancréas (Strassburg et al. 2002; Vogel et al. 2002; Ockenga et al. 2003). UGT2B15 est impliqué dans la régulation de la testostérone, de la DHT et autres dérivées et est exprimé dans la prostate. Le polymorphisme de la région codante d'UGT2B15 qui change l'aspartate pour une tyrosine en position 85 diminue l'activité de glucurono-conjugaison des androgènes et augmente le risque de souffrir d'un cancer de la prostate (MacLeod et al. 2000; Hajdinjak et al. 2004; Park et al. 2004). Les polymorphismes de la région codante présents chez certains UGT semblent jouer un rôle dans la cascade d'évènement menant au cancer.

4.5.2 Polymorphismes de la région promotrice et risque de cancer

La région promotrice des UGT est un élément important dans l'expression des UGT. Certains polymorphismes dans cette région peuvent influencer l'expression des UGT dans un tissu en modifiant le site de reconnaissance d'un facteur de transcription. Contrairement aux polymorphismes de la région codante, cela modifie la quantité absolue d'ARNm dans la cellule et modifie donc le métabolisme des carcinogènes.

Le plus étudié des polymorphismes est *UGT1A1*28* qui correspond à une augmentation de répétition de TA dans la boîte TATA du promoteur d'*UGT1A1* et provoque une diminution de l'expression en ARNm (Bosma et al. 1995). Cela entraîne le syndrome de Gilbert, une affection généralement asymptomatique qui entraîne un ictère néonatal bénin (Beutler et al. 1998). Ce polymorphisme a également été corrélé avec la modification du risque de certains cancers et également d'autres symptômes consécutifs à la prise de médicament. La présence de l'allèle *UGT1A1*28* diminue la capacité de conjuguer certaines hormones dont

les dérivés 2-catechol-estrogènes qui ont été démontrés être des antiprolifératifs (Fotsis et al. 1994). Si il y a diminution de la conjugaison des 2-catechol-estrogènes, il y aura une augmentation de ces métabolites dans le tissu et donc un meilleur effet anti-prolifératif. L'endomètre est un des tissus cible des estrogènes qui expriment UGT1A1 et que le risque de cancer de l'endomètre s'est avéré diminué de 2 fois pour les personnes portant cette allèle de faible expression (Duguay et al. 2004). Une autre étude a démontré que la présence de l'allèle *UGT1A1**28 augmente le risque de cancer du sein par 2 fois (Guillemette et al. 2000).

Chapitre II : Hypothèse et objectifs du projet

La pharmacogénomique est une nouvelle discipline qui a pour objectif d'adapter le traitement pharmacologique avec le profil génotypique d'un patient. La classe de médicament la plus étudiée dans ce domaine est celle des agents chimiothérapeutiques dont la fenêtre thérapeutique entre l'efficacité de la thérapie et les toxicités est généralement étroite. L'irinotécan est l'un de ces agents anticancéreux et est utilisé en première intention dans le traitement du cancer colorectal métastatique (Saltz et al. 2000). Il a également été approuvé pour le traitement d'autres cancers comme le cancer du poumon à petites cellules (Ohe 2004).

La réponse au traitement à l'irinotécan pour un cancer du côlon de même grade varie énormément d'un patient à l'autre (Slatter et al. 2000; Stoehmacher et al. 2003; Lee et al. 2005; Lentz et al. 2005; Yu et al. 2005). Outre les facteurs environnementaux, les facteurs génétiques comme les insertions, les délétions, les réarrangements chromosomiques et les polymorphismes peuvent altérer la composition en acides aminés, l'épissage et l'expression de gènes et ainsi modifier la pharmacocinétique et la pharmacodynamique du médicament (Lee et al. 2005). Plusieurs études tentent d'identifier les changements fonctionnels et phénotypiques dû à la présence de variations génétiques dans les enzymes impliquées dans le métabolisme, le transport et également la cible moléculaire du médicament.

La TOPO I est la cible moléculaire de l'irinotécan et plusieurs études ont démontré que son niveau d'expression pouvait être un bon prédicteur de la réponse à la thérapie du cancer colorectal *in vitro*. Lorsque la TOPO I est très exprimée dans la tumeur, l'irinotécan est plus efficace que lorsque la TOPO I n'est pas exprimée (Paradiso et al. 2004; Pavillard et al. 2004). Une grande variabilité dans l'expression de cette enzyme a été démontrée dans les tumeurs du côlon (Sanghani et al. 2003). Le meilleur prédicteur *in vivo* de l'efficacité de la thérapie à l'irinotécan jusqu'à maintenant est le génotype de l'instabilité des microsatellites (MSI) positif. L'MSI est causée par des mutations ou une inactivation épigénétique (méthylation) des gènes codant pour les enzymes de réparation de l'ADN. Cela entraîne des répétitions anormalement élevées des microsatellites. Les patients présentant ce génotype prédit une meilleure réponse à la thérapie par l'irinotécan

probablement causé par une plus grande difficulté de réparer les bris dans l'ADN (Fallik et al. 2000; Jacob et al. 2001; Fallik et al. 2003).

Deux autres enzymes ont démontré avoir de l'influence sur la biodisponibilité de l'irinotécan. La carboxylestérase 2 (CES2) est l'une des enzymes impliquées dans la transformation de la prodrogue irinotécan en une molécule active, le SN-38. L'expression de cette enzyme est très variable d'un individu à l'autre et corrèle avec les concentrations de SN-38 présentent dans la tumeur (Wu et al. 2002; Sanghani et al. 2003). UGT1A1 est impliqué dans le métabolisme de l'irinotécan par sa capacité à transformer le SN-38 actif en un dérivé inactif le 7-Ethyl-10-hydroxycamptothecin glucuronide (SN-38G). Plusieurs études montrent que le polymorphisme fonctionnel du promoteur *UGT1A1*28* de cette enzyme est associé à une diminution de son expression, augmente les toxicités et modifie le rapport aire sous la courbe (AUC) du SN-38G sur SN-38 dans le plasma *in vivo* (Ando et al. 2002; Iyer et al. 2002) (Figure 13).

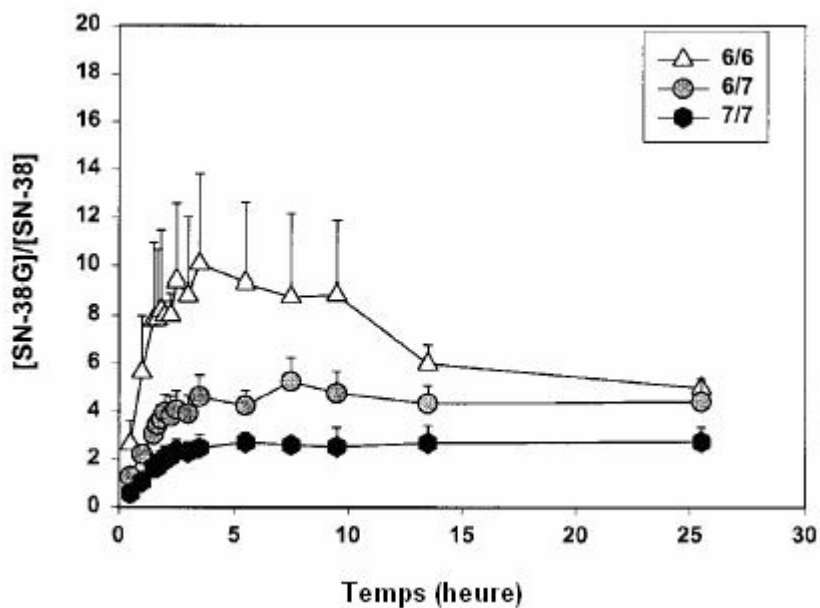


Figure 13 : Rapport aire sous la courbe (AUC) du SN-38G sur SN-38 pour le polymorphisme fonctionnel *UGT1A1*28* (7 répétitions de TA) dans la boîte TATA au lieu de 6 répétitions (*UGT1A1*1*). Les sujets homozygotes 7/7 ont un rapport beaucoup plus faible indiquant une capacité moindre à convertir le SN-38 en SN-38G (Iyer et al. 2002).

UGT1A1 est donc une enzyme qui est susceptible d'interférer avec l'efficacité de la thérapie puisqu'elle est impliquée dans le métabolisme de l'irinotécan et peut influencer les niveaux circulants du médicament. Aucune étude jusqu'à maintenant a démontré que la présence des polymorphismes fonctionnels pouvait prédire l'efficacité de la thérapie à l'irinotécan. De plus, le côlon est un tissu qui exprime UGT1A1 et qui, dans le cancer du côlon, est susceptible d'influencer la réponse au traitement. De façon intéressante, UGT1A1 est une enzyme plus faiblement exprimée dans le cancer gastro-intestinal comparativement au tissu normal péri-tumoral (Strassburg et al. 1998; Yu et al. 2005). De plus, Yu et al. a observé une grande variabilité dans l'expression du gène *UGT1A1* dans la tumeur primaire du côlon (Yu et al. 2005). Il semble donc qu'un mécanisme de répression de l'expression d'*UGT1A1* soit enclenché dans une proportion de patients atteints de ce cancer. Identifier le ou les mécanismes de régulation génique d'*UGT1A1* dans la tumeur du côlon permettrait peut-être de mieux prédire la réponse à la thérapie.

L'hyperméthylation des CpG dans la région promotrice des gènes est un mécanisme d'inactivation de la transcription des gènes. Ce mécanisme anormal de régulation épigénétique peut survenir dans plusieurs gènes différents dont les gènes suppresseurs de tumeur, les gènes régulateurs du cycle cellulaire, les gènes impliqués dans l'apoptose et également dans plusieurs autres gènes. Le mécanisme exact entraînant l'hyperméthylation n'est pas encore connu mais il semble qu'il soit largement impliqué dans le processus de formation tumorale et de sa progression. Ainsi, ce processus d'hyperméthylation toucherait le gène UGT1A1 mais pas dans toutes les tumeurs colorectales telles que suggérées par notre étude.

Ce mécanisme affecte également des gènes impliqués dans le métabolisme des médicaments. La catéchol O-méthyltransférase (COMT) est une enzyme impliquée dans la méthylation de plusieurs substances dont les catéchol-estrogènes. Le promoteur de la catéchol O-méthyltransférase membranaire (MB-COMT) est hyperméthylée dans plus de 78.3% des cas de cancer de l'endomètre, un cancer estrogène dépendant (Sasaki et al. 2003). Un autre exemple est la glutathione-S-transférase (GST), une enzyme qui métabolise différents carcinogènes environnementaux. L'hyperméthylation du promoteur de la

glutathione-S-transférase pi (GSTP1) est présente dans 91% des cas de cancer de la prostate (Lee et al. 1997). UGT1A1 est également impliqué dans le métabolisme des carcinogènes dont l'exposition est associée à un risque plus élevé du cancer du côlon (Butler et al. 2003). Comme UGT1A1 agit comme protecteur du cancer en prévenant l'exposition aux carcinogènes environnementaux, il est possible qu'*UGT1A1* soit également un gène ciblé par un mécanisme d'inactivation de l'expression comme la méthylation dans le processus de formation tumorale.

Comme l'expression d'UGT1A1 est plus faible dans la tumeur du côlon que dans le tissu normal péri-tumoral, nous voulons déterminer si la méthylation, un mécanisme épigénétique qui ne s'accompagne pas de changement de séquences nucléotidiques, peut jouer un rôle dans la régulation de l'expression d'UGT1A1 dans le cancer du côlon (Strassburg et al. 1998; Yu et al. 2005). Jusqu'à présent, aucune étude n'a étudié ce mécanisme pour les gènes UGT ni démontré que les UGT pouvaient être régulés par un mécanisme épigénétique comme la méthylation.

Le premier objectif est de déterminer l'expression basale d'UGT1A1 dans 6 lignées cellulaires cancéreuse du côlon par PCR quantitatif en temps réel (QRT-PCR) afin d'identifier les lignées cellulaires représentant les variations en terme d'expression du gène dans les tumeurs du côlon. Dans les lignées présentant un faible niveau d'*UGT1A1*, un traitement avec deux agents inhibiteurs de la voie de régulation épigénétique a été effectué. Le décitabine est un inhibiteur de la DNMT. Cette molécule inhibe le processus de méthylation ce qui empêche la liaison des facteurs de transcription avec la séquence cible de l'ADN. La deuxième molécule est la TSA un inhibiteur de l'HDAC. Elle empêche la condensation de la chromatine par la désacétylation des histones. La chromatine demeure décontractée et permet ainsi la liaison des facteurs de transcription. Ces molécules augmentent l'expression en ARNm d'un gène uniquement si ce gène est régulé par la méthylation de l'ADN. Si la présence de méthylation empêche la transcription en ARNm, les lignées cellulaires qui expriment peu ou pas *UGT1A1* en basal augmenteront l'expression en ARNm suite à ces traitements seulement si le mécanisme de méthylation est

impliqué. Afin d'étudier l'expression en ARNm, nous avons analysé l'expression d'*UGT1A1* par QRT-PCR dans chacune des lignées cellulaires du côlon.

Toutefois, ces molécules agissent sur l'ensemble du génome donc il nous est impossible de déterminer si les agents agissent directement sur le promoteur d'*UGT1A1* ou sur un facteur de transcription qui indirectement augmente son expression. Le deuxième objectif fût donc de déterminer si la méthylation affecte directement l'expression d'*UGT1A1*. Nous avons effectué la méthylation *in vitro* de quatre constructions de longueurs différentes du promoteur d'*UGT1A1* et nous les avons insérées dans un vecteur contenant le gène rapporteur luciférase. Nous avons vérifié la méthylation des plasmides par la digestion enzymatique de *HpaII*, une enzyme sensible à la méthylation qui coupe uniquement les sites CCGG non méthylés. Les quatre différentes constructions à l'état méthylé et non méthylé ont été transfectées dans les 6 lignées cellulaires du côlon à l'étude. Nous avons tout d'abord choisi le transfectant optimal pour chacune des lignées ainsi qu'optimisé les conditions de transfections afin d'obtenir des résultats optimaux. Nous avons finalement comparés l'expression de la luciférase entre les plasmides méthylés et les plasmides non méthylés.

Le troisième objectif consistait à identifier la localisation de chacun des dinucléotides CpG dans le promoteur et dans l'exon 1 du gène *UGT1A1* afin de déterminer le pourcentage de méthylation de chacun et d'élaborer un profil de méthylation de ce gène dans les lignées cellulaires. La détermination du profil de méthylation est effectuée par amplification PCR de l'ADN modifié au bisulfite de sodium, un agent qui modifie les bases cytosines non méthylés en thymine sans en affecter les cytosines méthylées. Le pH acide de la réaction au bisulfite de sodium nous limite à amplifier un maximum de 350 paires de base par PCR. Nous avons développé et optimisé 8 stratégies différentes afin de séquencer ces régions. Les données de séquences ont été compilées pour tous les CpG compris dans les 2000 premières paires de base du promoteur d'*UGT1A1* ainsi que dans tout l'exon 1 et également dans une région très riche en CpG à 5000 paires de bases dans le promoteur. Nous avons séparé en deux groupes les lignées cellulaires selon leur expression basale en *UGT1A1* (expression faible et forte) et fait la moyenne du pourcentage de méthylation pour

chacun des CpG. Nous avons finalement comparé chaque moyenne des pourcentages de méthylation entre les groupes.

Le quatrième objectif consistait à déterminer si la méthylation pouvait, en plus d'affecter l'expression en ARNm d'*UGT1A1*, affecter le niveau de protéine et ainsi moduler la formation de SN-38G par les cellules tumorales du côlon. Nous avons traité, avec les inhibiteurs de la voie de régulation épigénétique, les lignées cellulaires de cancer du côlon qui démontraient la meilleure réactivation de l'expression d'*UGT1A1*. Suite au traitement avec ces deux agents, nous avons extrait les microsomes. Nous avons ensuite comparé le niveau d'expression d'*UGT1A1* des microsomes non traités avec ceux traités par immunobuvardage pour la quantité de protéine *UGT1A1*. Nous avons par la suite évalué la formation de SN-38G à partir du SN-38 par essais enzymatiques avec les microsomes des cellules traitées et non traitées.

Le cinquième objectif fût d'étudier ce mécanisme dans les tumeurs primaires du côlon. Nous avons tout d'abord déterminé l'expression en ARNm d'*UGT1A1* par QRT-PCR dans 50 tumeurs primaires du côlon. À titre d'étude pilote, nous avons analysé le pourcentage de méthylation de chaque CpG de la région promotrice et de l'exon 1 dans 6 tumeurs primaires qui expriment faiblement *UGT1A1* et 6 tumeurs primaires qui expriment fortement *UGT1A1*. Nous avons ensuite comparé la moyenne du pourcentage de méthylation de chacun des CpG dans chaque groupe. Nous avons finalement comparé les deux groupes pour leur profil de méthylation dans le promoteur et l'exon 1 de tumeur primaire du côlon afin d'étudier la relation entre ces pourcentages de méthylation et les niveaux d'expression du gène. Si la méthylation est impliquée dans la répression génique d'*UGT1A1*, on s'attend à voir une corrélation significative entre l'expression et la méthylation.

Chapitre III : Résultats

Irinotecan inactivation is modulated by epigenetic silencing of UGT1A1 in colon cancer

Jean-François Gagnon, Lyne Villeneuve, Olivier Bernard, Bernard Têtu,
Chantal Guillemette

Soumis initialement dans le périodique Journal of Clinical Investigation

Irinotecan inactivation is modulated by epigenetic silencing of UGT1A1 in colon cancer

Jean-François Gagnon¹, Olivier Bernard¹, Lyne Villeneuve¹, Bernard Têtu² and Chantal Guillemette¹.

¹Canada Research Chair in Pharmacogenomics (CG), Oncology and Molecular Endocrinology Research Center, CHUQ Research Center, Faculty of Pharmacy, Laval University, Québec, Canada (OB, JFG, LV, CG), ²Department of Pathology, Hôtel-Dieu de Québec, Laval University, Québec, Canada. (BT).

Running title: Methylation of the *UGT1A1* gene in colon cancer.

Keywords: UGT, methylation, CpG, colon cancer, irinotecan

Footnotes:

This work was supported by the Canadian Institutes of Health Research (CIHR MOP-42392) and the Canada Research Chair program.

Authors to whom correspondence should be sent:

Chantal Guillemette, Canada Research Chair in Pharmacogenomics, Pharmacogenomics Laboratory, CHUQ Research Center, T3-67, 2705 Boul. Laurier, T3-48 Québec, G1V 4G2, Canada

Phone : 418-654-2296 Fax : 418-654-2761

Email: chantal.guillemette@crchul.ulaval.ca

The abbreviations used are: SN-38, 7-Ethyl-10-hydroxycamptothecin; SN-38G, 7-Ethyl-10-hydroxycamptothecin glucuronide; UGT, UDP-glucuronosyltransferase; 5-Aza-dC, 5-Aza-2'-deoxycytidine; TSA, Trichostatin A; QRT-PCR, quantitative real-time polymerase chain reaction.

Résumé

L'irinotécan est utilisé en première intention dans le traitement du cancer colorectal métastatique. UGT1A1, exprimée au foie et au côlon, joue un rôle prédominant dans l'inactivation de son métabolite actif, le SN-38. Nos travaux mettent en évidence le rôle de l'hyperméthylation de l'ADN en diminuant l'expression d'UGT1A1 ainsi que la détoxification du SN-38. L'ARN d'*UGT1A1* est diminué dans la majorité des tumeurs primaires du côlon (41/50; 82%) et dans 3 lignées cellulaires du côlon (HCT-116, HCT-15 et COLO320DM). Le séquençage au bisulfite révèle la méthylation aberrante d'îlots CpG spécifiques du gène *UGT1A1* dans les cellules ne l'exprimant pas. Également, nous avons observé une hypométhylation dans les lignées HT-29, HT-115 et LOVO qui surexprime *UGT1A1*. La méthylation directe du promoteur d'UGT1A1 résulte en une répression complète de l'activité transcriptionnelle. Le traitement avec des agents déméthylants et des agents inhibiteurs de l'histone déacétylase ont la capacité de renverser l'hyperméthylation pour remettre à son état initial l'expression d'UGT1A1 dans les cellules hyperméthylées UGT1A1 négative, mais pas dans les cellules hypométhylées. La perte de la méthylation du promoteur d'*UGT1A1* est associée avec une augmentation de la protéine UGT1A1 et a pour conséquent d'augmenter par 300 % l'inactivation du SN-38 dans les cellules HCT-116. Nos conclusions démontrent que la méthylation diminue l'expression d'UGT1A1 dans le cancer du côlon et que ce processus peut contribuer à influencer l'inactivation tumorale de l'agent anticancéreux SN-38, et potentiellement la réponse clinique.

Abstract

Irinotecan is used in the first line treatment of metastatic colorectal cancer. The UGT1A1 metabolizing enzyme, expressed in liver and colon, is involved in the inactivation of its active metabolite SN-38. Herein we present evidence of the role DNA hypermethylation in silencing *UGT1A1* expression and SN-38 detoxification in colon tumors. *UGT1A1* mRNA was repressed in a majority of primary tumors (41/50; 82%) and in three colon cancer cell lines (HCT-116, HCT-15 and COLO320DM). Bisulfite sequencing revealed the aberrant methylation of specific CpG islands of the *UGT1A1* gene in UGT1A1-negative cells. Conversely, hypomethylation was observed in HT-29, HT-115 and LOVO cells that overexpress UGT1A1. Direct methylation of the *UGT1A1* promoter resulted in the complete repression of transcriptional activity. Treatment with demethylating and histone deacetylase inhibitor agents had the capacity to reverse aberrant hypermethylation and to restore UGT1A1 expression in hypermethylated UGT1A1-negative cells, but not in hypomethylated cells. Loss of UGT1A1 methylation was further associated with an increase in UGT1A1 protein content and with an enhanced inactivation of SN-38 by 300% in HCT-116 cells. We conclude that DNA methylation represses *UGT1A1* expression in colon cancer and that this process may contribute to influence tumoral inactivation of the anticancer agent SN-38 and, potentially, clinical response.

Introduction

Colorectal cancer (CRC) is the third leading cause of cancer-related deaths worldwide. Of patients suffering from CRC, up to 60% already have overt metastases at the time of diagnosis (American Cancer Society, 2005). Irinotecan is the anticancer drug used in first-line treatment of metastatic colorectal cancer (Rothenberg 1998; Saltz 2000; Cunningham et al. 2001; Saltz et al. 2001). However, there is marked variability in response to therapy, as well as frequency and severity of toxicities. Its active metabolite 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin (SN-38) is primarily inactivated through glucuronidation, mediated mainly by the UDP-glucuronosyltransferase UGT1A1 enzyme (Iyer et al. 1999; Hanioka et al. 2001; Gagne et al. 2002). *UGT1A1* encodes an enzyme that acts as a drug detoxifier by catalyzing conjugation reactions with glucuronic acid. Interindividual differences in the inactivating pathway of SN-38 caused by common genetic polymorphisms in the glucuronidation pathway have been demonstrated as major determinants for irinotecan toxicity and clinical outcome (Ando et al. 2000; Iyer et al. 2002; Font et al. 2003; Rouits et al. 2004; Carlini et al. 2005). In particular, the UGT1A1*28 promoter allele, leading to a lower expression of the gene, was identified as clinically valuable for predicting severe irinotecan toxicity in cancer patients (Ando et al. 2000; Iyer et al. 2002; Rouits et al. 2004).

Another factor that needs to be considered when regarding a patient's response to an anticancer drug is the intrinsic susceptibility of cancer cells, defined by the expression of an array of genes that determine local tumor drug concentration. This includes activities of metabolic enzymes, such as UGT1A1, that likely establish local tissue drug concentration. It has been demonstrated that the metabolic capacities of tumor cells influence response outcome, such as the local formation of SN-38 from CPT-11 by carboxylesterases (Xu et al. 2002). Recently, glucuronidation has been identified as a mechanism of intrinsic drug resistance to SN-38 in human colon cancer cells (Cummings et al. 2002; Cummings et al. 2003; Cummings et al. 2004). In addition, clinical studies support the hypothesis that the individual glucuronidation capacity contributes to tumoral response, likely through the modulation of both plasma and tumoral concentrations of SN-38 (Font et al. 2003; Carlini et al. 2005). UGT1A1 is expressed with a large variability in primary colon tumors and during colon tumorigenesis, suggesting that the level of UGT1A1 expression may

contribute to the differential chemosensitivity of colon tumors (Strassburg et al. 1998; Lin et al. 2002; Yu et al. 2005). However, the mechanisms involved in the variability of UGT1A1 expression in colon tumors remain unknown.

It is well documented that colon cancer arises from a series of genetic alterations that includes a variety of mechanisms of gene silencing, such as point mutations, loss of heterozygosity and homozygous deletions. In addition to these genetic abnormalities, promoter DNA hypermethylation is an additional mechanism that plays a critical role in the progression of colorectal cancer. It has been shown that sporadic colorectal cancers are often associated with an abnormal methylation of CpG-rich sites (CpG islands) in promoter regions of multiple loci, including genes involved in the cell cycle, growth regulation, DNA repair, metabolism and apoptosis, whose silencing is a common and early event in human colon neoplasia mediated by epigenetic occurrences (Toyota et al. 2000; Jass et al. 2002; Jubb et al. 2003; Lofton-Day et al. 2003). Cytosine methylation results in transcriptional repression, either by interfering with transcription factor binding or by inducing a repressive chromatin structure (Jaenisch et al. 2003). While exploring the mechanisms involved in the variable expression of UGT1A1 in colon tumors, we hypothesized that, in addition to genetic polymorphisms such as the common UGT1A1*28 allele, silencing of the glucuronidation pathway by epigenetic mechanisms could have the potential to induce various effects at the systemic and tissue levels, including an enhanced intratumoral exposure to SN-38. Previous studies support that therapeutic efficacy of anticancer drugs can be predicted by epigenetic modifications (Plumb et al. 2000; Ferreri et al. 2004; Baker et al. 2005; Esteller 2005). A notable example is the O6-methylguanine-DNA methyltransferase (*MGMT*) gene, responsible for repairing DNA damage caused by alkylating chemotherapeutic drugs (Ludlum 1990). The extent of promoter methylation of the *MGMT* gene predicts a favourable response to antineoplastic therapy in cancer patients (Esteller et al. 2000).

Our study was thus designed to assess if promoter hypermethylation arises as a mechanism that modulates UGT1A1 expression in colon cancer cells and, consequently, that could

contribute to determine SN-38 inactivation in colon tumors. Results indicate that epigenetic modifications in the *UGT1A1* gene occur in colon tumors and that the consequence of UGT1A1 repression is a modulation of anticancer drug exposure in cancer cells.

Results

***UGT1A1* expression in primary colon tumors and colon cancer cell lines**

To confirm previous reports of variable expression of *UGT1A1* in colon tumor samples, its expression was analyzed by QRT-PCR in 50 primary colon tumor samples. Results showed a coefficient of variability of 350% with two groups of baseline levels of *UGT1A1* mRNA; tumors with high expression levels (18%; up to 12,112 arbitrary units) and those with undetectable or very low *UGT1A1* mRNA content (82%; expression level < 400 arbitrary units (1-382)). With the objective to study cellular models that represent this array of *UGT1A1* expression, we analyzed six human colon carcinoma cell lines. Of the cell lines investigated, half did not express *UGT1A1*. At baseline, expression of the *UGT1A1* mRNA transcript was undetectable in HCT-116 and COLO-320DM (relative units = 1) and very low in HCT-15 (108 relative units). In contrast, HT-29, LOVO and HT-115 cell lines were associated with high baseline expression of *UGT1A1* (Figure 1). The role of methylation in the silencing of *UGT1A1* gene expression in cell lines was then investigated.

Effects of 5-Aza-dC and TSA treatment on *UGT1A1* expression in colon cancer cell lines

To study the potential role of methylation in the silencing of *UGT1A1* gene expression, cell lines were treated with 5-Aza-dC and/or TSA, demethylating and histone deacetylating agents, respectively. QRT-PCR analysis revealed, upon treatment with 5-Aza-dC alone, a significant increase in the *UGT1A1* mRNA (up to 19-fold) for cells with a very low expression of the gene (HCT-116, COLO-320DM and HCT-15) (Figure 2). The combination of 5-Aza-dC and TSA treatment increased the expression of *UGT1A1* by 13-fold for the HCT-15 cell line and up to 75- to 128-fold for the COLO-320DM and HCT-116 cell lines, respectively (Figure 2), compared to a modest increase (up to 3-fold) for cells with high basal *UGT1A1* expression (data not shown). For all cell lines, TSA alone failed to increase significantly *UGT1A1* expression. These results suggest that demethylation by 5-Aza-dC restored the expression of the *UGT1A1* gene, supporting that methylation is a mechanism affecting the transcription of *UGT1A1* mRNA in various colon cancer cell lines with very low basal expression of this gene.

***In vitro* methylation of the *UGT1A1* promoter represses transcriptional activity**

To assess if the methylation of CpG in the promoter region of *UGT1A1* affects directly the transcription activity of the gene, we studied various lengths of methylated and unmethylated *UGT1A1* promoters. Four promoter constructions were analyzed for luciferase activity after *in vitro* methylation (Figure 3A). For methylated promoter constructions, a plasmid digestion was performed with the *HpaII* restriction enzyme to ensure that methylation was complete. *HpaII* cuts only unmethylated CCGG sites (Figure 3B). Luciferase expression of unmethylated plasmids (Figure 3C to E) varied from 5- to 25-fold over the pGL3 basic vector and *UGT1A1* expression was almost completely abolished for the methylated plasmids. Significant promoter activity in cell lines expressing undetectable or very low *UGT1A1* mRNA levels indicated the presence of transcription factors required for *UGT1A1* expression. These results demonstrate that methylation of the *UGT1A1* promoter directly affects the transcriptional level of the gene.

Methylation profiles of colon cancer cell lines correlate with *UGT1A1* expression

The methylation profiles of all six colon cancer cell lines was determined for CpG +15 to -21 in the proximal promoter and first exon, and for CpG -65 to -49 in the distal promoter (Figure 4A). Correlation analyses were then performed between gene expression and methylation levels. Five CpG regions covering the promoter and the first exon of the *UGT1A1* gene showed significant differences between high and low *UGT1A1* expression cell lines (Figure 4B). Regions including CpG -16 to -13 (region D), -5 to -1 (region B) and +3 to +6 (region A) exhibited the most significant correlations with *UGT1A1* mRNA expression ($P < 0.01$). Two other regions, including CpG -21 to -18 (region E) and -9 to -7 (region C), were also found in the promoter ($P < 0.05$). All other CpG islands analyzed (CpG +8 to +15 and CpG -65 to -49) were found to be fully methylated in all cell lines (data not shown). Three of these regions were predicted as CpG islands by the CpGPlot program (<http://www.ebi.ac.uk/emboss/cpgplot/>) and include CpG regions A, D and F. Regions A and D exhibited the highest differences in methylation profiles between high and low *UGT1A1* expression cell lines. In contrast, the third region (F) predicted by CpGPlot, from -47 to -56, was fully methylated for all CpG sites. These results suggest that

the extent of methylation of specific CpG regions in the *UGT1A1* gene predicts its expression in colon cancer cell lines.

Demethylating treatment increases the inactivation of the anticancer agent SN-38 in HCT-116 cells

Compared to the SN-38 sensitive HCT-116 cell line, HT-29 cells were previously reported to exhibit intrinsic resistance to SN-38, owing to enhanced drug clearance via glucuronidation (Cummings et al. 2002; Cummings et al. 2003). *UGT1A1* is undetectable in HCT-116 cells but is abundant in HT-29 cells. These data suggest that the extent of promoter methylation could determine *UGT1A1* expression and, ultimately, local SN-38 tumor concentrations. In order to ascertain this hypothesis, we assessed the capacity of 5-Aza-dC and TSA treatment to modulate *UGT1A1* protein levels and SN-38 glucuronidation in HCT-116 cells. Western blotting and SN-38 glucuronidation activities were performed with microsomal subcellular fractions, where UGTs are localized. In treated cells, *UGT1A1* protein levels were significantly higher compared to control cells (Figure 5A). In parallel, SN-38 glucuronide formation was increased by 300% in treated HCT-116 cells compared to untreated cells (Figure 5B). The analysis of the *UGT1A1* genomic regions by bisulfite treatment followed by sequencing confirmed the absence of methylated CpG in treated cells. These results demonstrate that the absence of a high percentage of methylation in the *UGT1A1* promoter is associated with a significantly higher SN-38 glucuronidation capacity of tumor cells.

Discussion

Transcriptional silencing by CpG island hypermethylation is a crucial event in colon carcinogenesis. This epigenetic mechanism has also been identified as a predictor of therapeutic efficiency for anticancer drugs used to treat various neoplasia (Plumb et al. 2000; Ferreri et al. 2004; Baker et al. 2005; Esteller 2005). In this study, we demonstrated that DNA methylation governs the expression of *UGT1A1* in colon cancer and that this mechanism may contribute to the differential chemosensitivity of colon tumors to irinotecan by influencing cellular inactivation of its active metabolite SN-38.

UGT1A1 is expressed in normal colon but its expression is lost in a majority of colon tumors (Strassburg et al. 1998; Tukey et al. 2000; Tukey et al. 2001; Lin et al. 2002; Yu et al. 2005). However, the mechanism underlying the inactivation of *UGT1A1* expression in a large proportion of colon tumors and the extent of its role in determining tumoral response to anticancer drugs remain unknown. Of the 50 colon tumors investigated for *UGT1A1* expression, over 82% showed undetectable or extremely low levels of *UGT1A1* mRNA content. However, more than 18% of tumors overexpressed *UGT1A1*, a characteristic recently associated with a resistance phenotype to SN-38 in colon cancer cells (Cummings et al. 2003). In addition, using a global gene expression profiling DNA array technology, a recent study revealed that the level of *UGT1A1* expression varies significantly during colon tumorigenesis, supporting that mechanisms other than genetic polymorphisms may contribute to the differential expression of the *UGT1A1* metabolic pathway in colon tumors (Lin et al. 2002).

Transcriptional regulation of drug metabolizing genes could occur through a variety of mechanisms and DNA methylation constitutes a well documented process for regulating gene transcription, especially in cancer (Toyota et al. 2000; Jass et al. 2002; Jubb et al. 2003; Lofton-Day et al. 2003). The role of epigenetics has never been reported previously for *UGT* genes. In order to investigate on the role of methylation in silencing *UGT1A1* gene expression, *UGT1A1*-negative adenocarcinoma colon cell lines were selected as *in vitro* models representing a large proportion of primary colon tumor samples that do not express *UGT1A1*. In these colon cancer cells lacking basal *UGT1A1* expression, hypermethylation

of CpG islands were observed. Treatment of *UGT1A1*-negative colon cell lines with the DNA methyltransferase inhibitor 5-aza-2'-deoxycytidine restored *UGT1A1* expression, supporting that this gene is regulated by methylation. Besides, the drastic repression of reporter gene expression in the presence of methylated *UGT1A1* promoters compared to unmethylated constructs in colon cell lines is consistent with a direct impact of DNA methylation on *UGT1A1* gene expression. Additionally, the significant luciferase activity induced by unmethylated *UGT1A1* promoter in colon cell lines that do not express basal *UGT1A1* mRNA indicates that the loss of *UGT1A1* expression in these cells is not caused by a lack of transcription factors required for *UGT1A1* expression. Furthermore, recent studies have established a link between two important epigenetic modifications, DNA methylation and histone acetylation, in the regulation of gene expression and silencing. In addition to DNA methylation, histone acetylation mediates changes in the nucleosomal and chromatin structure of promoters, presumably affecting the accessibility of transcription factors to their *cis*-regulatory elements (Loo et al. 1995). In our experiments, a remarkable synergic increase of *UGT1A1* expression was shown for the combined treatment of 5-Aza-dC and TSA. Results support that this combined treatment is more active on methylation status and chromatin conformation to increase *UGT1A1* mRNA expression, as observed for other hypermethylated genes (Yang et al. 2001; Nakajima et al. 2003). Altogether, results designate DNA hypermethylation as one of the mechanisms responsible for *UGT1A1* repression in colon cancer tumors.

Analyses of *UGT1A1* promoter methylation status in cell lines revealed that the extent of methylation in specific regions of the promoter predicts *UGT1A1* gene expression. Several dinucleotide CpG sequences are located within the core motif of putative sites for transcription factors. *In vitro* experiments with variable lengths of *UGT1A1* promoters were also valuable in defining the potential CpG sites involved in transcriptional silencing. Data suggest that *UGT1A1* is silenced as a result of CpG hypermethylation within a minimal region encompassing 260 bp upstream of the start codon. A previous study reported that *UGT1A1* is regulated by HNF1 α and HNF1 β through a putative HNF1 site in the proximal promoter (Bernard et al. 1999). The localization of CpG islands in this study reveals that the HNF1 site is located in the methylated region B, between CpG -1 and -4. Additional

analyses are needed to determine if methylation prevents the binding of HNF1 α and HNF1 β or other transcriptional factors on these putative binding sites in colon tissues.

The exact role of UGT1A1 in colon carcinogenesis remains unknown but there are potential consequences to the repression of this metabolic pathway in relation to cancer treatment. The large family of UGT enzymes, broadly expressed in human tissues, belongs to the phase II drug metabolizing enzymes involved in approximately 35% of phase II metabolizing reactions for therapeutic drugs, including a number of anticancer drugs (Evans et al. 1999). Similar to other cytotoxic drugs, response to irinotecan in colon cancer patients may be determined by alterations in the metabolism of active metabolites. SN-38 is largely metabolized in human by glucuronidation and mostly by UGT1A1 (Iyer et al. 1999; Hanioka et al. 2001; Gagne et al. 2002). An important consequence associated with positive *UGT1A1* methylation, and subsequent repression of the UGT1A1-mediated metabolic pathway, is the prospect that colon tumors associated with lower rates of SN-38 glucuronidation would retain higher levels of the compound. This could lead to a higher sensitivity to irinotecan. Conversely, tumor cells that overexpress UGT1A1 have the ability to inactivate a large proportion of the active drug that reaches the tumor. The presence of high levels of UGT activity and expression represents a characteristic recently associated with a resistance phenotype to SN-38 in colon cancer cells (Cummings et al. 2003). In our study, treatment with 5-Aza-dC and TSA had the capacity to restore UGT1A1 protein expression in HCT-116 cells, lacking basal UGT1A1 expression, and resulted in cells that efficiently inactivate SN-38 through glucuronidation. These results support that exposure to SN-38 and the intrinsic susceptibility of cancer cells may be partially defined by *UGT1A1* promoter methylation status and expression.

A number of studies recently exposed the clinical importance of variable UGT1A1 activity governed by genetic polymorphisms in response to irinotecan-based chemotherapy (Ando et al. 2000; Iyer et al. 2002; Font et al. 2003; Rouits et al. 2004; Carlini et al. 2005). These investigations were focused on the role of constitutive variations of the *UGT1A1* gene and demonstrated that UGT1A1-deficient patients are at higher risk for severe haematological and gastrointestinal toxicities. However, another important finding is the link between

glucuronidation genotypes and variable response of cancer patients to irinotecan (Font et al. 2003; Carlini et al. 2005). These observations further support that impaired glucuronidation may determine chemotherapeutic response by influencing drug concentration in tumors. Consequently, a contribution of the epigenetic silencing of UGT1A1 to irinotecan resistance in colon tumors is expected.

In conclusion, the present findings support the notion that methylation of *UGT1A1*, in addition to common genetic polymorphisms, may contribute to define tumors likely to respond to irinotecan in opposition to tumors that overexpress UGT1A1. The impact on irinotecan therapy outcome of aberrant *UGT1A1* hypermethylation in colon cancer deserves further attention.

Methods

Colon cell lines and primary colon tumor samples

Colon cancer cells HT-29, HCT-116, COLO-320DM, HCT-15 and LOVO were obtained from American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, Va). HT-115 cells were obtained from European Collection of Cell Culture (ECACC, Salisbury, UK). All cell lines were grown in the medium recommended by ATCC and ECACC. HCT-116 and HT-29 were kept in McCoy's 5A medium with 1.0 mM sodium pyruvate (Sigma, Oakville, Ontario, Canada). HT-115 cells were kept in DMEM with 2 mM L-glutamine (All from Wisent, St-Bruno, Quebec, Canada). LOVO cells were kept in F-12K medium with 2 mM L-glutamine. COLO-320DM and HCT-15 were kept in a modified RPMI 1640 medium in order to obtain a final concentration of 2 mM L-glutamine, 1.5 g/L sodium bicarbonate, 4.5 g/L glucose, 10 mM HEPES and 1.0 mM sodium pyruvate (Sigma, Oakville, Ontario, Canada). All medium were added with 100 IU/ml of penicillin, 50 µg/ml of streptomycin and 10% fetal bovine serum, except for the HT-115 cell line which required 15% fetal bovine serum (Wisent, St-Bruno, Quebec, Canada). All cells were incubated at 37°C in a humidified incubator with 5% carbon dioxide as specified by the supplier.

Primary tumor specimens were obtained from 50 patients who underwent surgery at hospital Hotel-Dieu de Québec. All patients provided an informed consent and the project

was approved by the institutional human research review board. All specimens were quick-frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until processing.

Re-expression of UGT1A1 by 5-aza-2'-deoxycytidine and Trichostatin A treatment of colon carcinoma cell lines.

5-Aza-dC (Sigma, Oakville, ON, Canada) and TSA (New England Biolabs, Beverly, MA) were resuspended in sterile PBS 1X and 100% DMSO, respectively. Treatments with both reagents resulted in final concentrations of 0.1% of DMSO or PBS in the culture medium. The treatment groups consisted of TSA alone, 5-Aza-dC alone or combined TSA and 5-Aza-dC. The control group consisted of medium with 0.1% PBS for the groups treated with 5-Aza-dC alone, and medium with 0.1% DMSO for groups treated with TSA alone or in combination with 5-Aza-dC. Cells were seeded 24 hours before treatment in 100 mm² dishes in order to obtain 95% confluence of the control cells after 4 days of culture. For the 5-Aza-dC treated groups, cells were cultured with 5 μM of 5-Aza-dC for 72 hours, while TSA-treated groups were incubated for 72 hours in culture medium before adding 300 nM of TSA for 16 hours. The groups treated with both agents were incubated with 5 μM of 5-Aza-dC for 72 hours followed by TSA treatment (300nM) for 16 hours. All treatments with 5-Aza-dC and TSA were performed as described previously (Kondo et al. 2003).

Expression analysis of UGT1A1 by quantitative real-time PCR (QRT-PCR)

RNA from primary tumor samples and cancer cell lines was extracted with Tri-Reagent (Molecular Research Center Inc., USA) as described in the manufacturer's protocol. RNA was resuspended in RNaseq water (Ambion, Austin, TX) and concentrations were determined by spectrophotometric reading. One μg of RNA was converted to cDNA with Superscript II Rnase H- (Invitrogen, Burlington, Ontario, Canada) using the manufacturer's protocol. Relative expression of *UGT1A1* was measured by quantitative real-time PCR (QRT-PCR) using the ABI Prism 7000 Sequence Detector. Analyses were performed in 25 μl reaction volumes using 1 μl of cDNA template, 12.5 μl of 2x Taqman universal PCR master mix (Applied Biosystems, CA), 850 nM of each primer and 200 nM *UGT1A1* probe. The primers and probes for *UGT1A1* were designed with the Primer Express Software (Applied Biosystems, CA). All primer sequences are shown in Table I and were designed

in order to be exon-exon so that none amplified genomic DNA (data not shown). PCR amplification began with a 95°C, 10-min step to activate the AmpliTaq Gold DNA polymerase, followed by 40 cycles at 95°C for 15 s and 60°C for 1 min. The housekeeping genes used were eukaryotic endogenous 18S rRNA and human endogenous beta-2-microglobulin (B2M) control (Applied Biosystem, CA), quantified according to the manufacturer's protocols. Relative gene expression data was calculated using the delta(delta) Ct method, previously described by K. Livak (PE-ABI; Sequence Detector User Bulletin 2). This method uses a single sample, termed "calibrator sample", for comparison with samples of unknown gene expression level. The calibrator sample is analyzed on every assay plate with the unknown samples of interest. Results are obtained with the following formula: $\text{Fold induction} = 2^{-(\Delta\Delta\text{Ct})}$; $\Delta\Delta\text{Ct}$ is defined as $(\text{Ct}_{\text{GI(unknown sample)}} - \text{Ct}_{\text{B2M(unknown sample)}}) - (\text{Ct}_{\text{GI(calibrator sample)}} - \text{Ct}_{\text{B2M(calibrator sample)}})$ where GI is the gene of interest. The calibrator sample can be any sample chosen to represent 1-fold expression of the gene of interest; in this study, untreated cells.

Transient transfection of *UGT1A1* promoter constructs in colon cell lines

Variable length sequences of the *UGT1A1* promoter (269 bp, 540 bp, 1316 bp and 2218 bp) were amplified from genomic DNA using the primers listed in Table 1 and were directionally cloned into the *MluI* / *XhoI* sites for 540 bp, 1316 bp, 2218 bp constructs and the *SacI* / *XhoI* sites for 269 bp constructs of the pGL3 basic vector (Promega, Madison, Wis). All constructs were sequenced before functional analysis. Each plasmid was methylated and mock methylated (without S-adenosylmethionine) with *SssI* methylase (New England Biolabs, Beverly, MA) using the manufacturer's protocol. Confirmation of complete methylation was assessed by digestion with the *HpaII* restriction enzyme that cuts only the unmethylated CCGG restriction sites in the plasmid (Figure 3A). DNA was purified with Qiaex II (Qiagen, Hilden, Germany) and resuspended in Tris-HCl pH 7.9 buffer for subsequent transfection. Cells were plated in 24-wells at 70 percent of confluence in growth medium. For each well, 0.7 µg of reporter construct was cotransfected with 0.1 µg of Renilla luciferase plasmid and 3 µL of Exgen 500 (Promega, Madison, WI) into HCT-116, HCT-15, COLO-320DM, LOVO and HT-115 cells using Exgen-500

transfection reagent (MBI Fermentas, Burlington, Ontario, Canada), according to the manufacturer's protocol. For the cell line HT-29, transfections were performed with Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Burlington, Ontario, Canada) as described by the manufacturer. Briefly, cells were plated in 24-wells at 90 percent of confluence in growth medium. 0.6 μg of reporter construct was cotransfected with 0.2 μg of Renilla luciferase plasmid (Promega, Madison, WI) using 3 μL of Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Burlington, Ontario, Canada) per well. Cells were harvested 24 hours after transfection and assayed for promoter activity by use of the Dual-Luciferase Reporter Assay System, according to the manufacturer's recommendations (Promega, Madison, WI). Luciferase activity was measured by using 40 μL of cell lysate in a 96-well plate on an LB96V microplate luminometer (EG&G Berthold, Bad Wildbad, Germany).

Sodium Bisulfite Genomic DNA Modification and DNA Sequencing

To analyze CpG methylation of the *UGT1A1* 5' region, genomic DNA was extracted from colon cell lines and primary colon tumor samples with Tri-Reagent, as described in the manufacturer's protocol. The bisulfite reaction, converting all unmethylated but not methylated cytosines to uracil, was done as follow. One μg of DNA was modified by sodium bisulfite using the CpGenome DNA Modification Kit (Intergen, Purchase, NY), according to the manufacturer's instructions. Amplification primers used for bisulfite sequencing are described in Table 1 and amplicons are illustrated in Figure 1. Modified DNA (100 ng) was amplified with the following conditions for each primer pairs: 95°C, 10-min step to activate the AmpliTaq Gold DNA polymerase, followed by 40 cycles at 95°C for 30 s, 58°C for 30 s. and 72°C for 1 min. PCR products were purified with the QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden, Germany) and eluted in 30 μL of nuclease-free water. DNA cycle sequencing was carried out in 20 μL reactions on a Perkin Elmer GenAmp PCR system 9700 (Perkin Elmer, Foster City, CA) using 6 μL of purified PCR product, 3.2 pmol of primer, and the ABI Prism BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit (Perkin Elmer) as described by the manufacturer. The methylation percentage corresponds to the fluorescence peaks area values of cytosine divided by the addition of the fluorescence peaks area values of cytosine and thymidine.

Western blot analyses

Western blot analyses of UGT1A1 protein were performed on microsomal preparations isolated from the HCT-116 cell line after treatment with 5-Aza-dC alone or in combination with TSA as described previously (Villeneuve et al. 2003). Commercial microsomal preparations of liver and ileum (n = 5 subjects pools; Tissue Transformation Technologies, Edison, NJ), in addition to a preparation of HEK293-UGT1A1 (BD Gentest, Woburn, MA), were used as comparative models. Briefly, 90 µg microsomal proteins were separated by 10% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. The separated proteins were transferred onto nitrocellulose membranes and probed with a specific anti-human UGT1A1 antiserum (1:2,500 dilution) as previously described (Duguay et al. 2004).

SN-38 glucuronidation assays

SN-38 was generated from irinotecan hydrochloride (McKesson, ON, CA) as follows: 1.25 ml of NaOH 6M was added to 2.5 ml of irinotecan hydrochloride (20 mg/ml) and incubated overnight at 55°C in the dark. The solution was neutralized with 1.25 ml of HCL 6M and 150 µl of HCL 6M was added in order to obtain a pH equal or under 3. The solution was incubated for 3 hours at room temperature in the dark. The pH was readjusted to 3 with 1M NaOH and the solution was centrifuged at 3000 rpm for ten minutes. The supernatant was removed and the pellet washed twice with 2.5 ml of ultra pure water. The product was frozen in a bath of dry ice/ethanol and placed in a lyophilisator. The product was certified by high performance liquid chromatography (HPLC) with mass spectrometry and ultraviolet detection analysis for purity $\geq 97\%$. SN-38G was produced from enzymatic assays with human liver microsomes, isolated and quantified on an SN-38 calibration curve. The enzymatic assays with human colon cancer cell lines were performed as described previously (Villeneuve et al. 2003). Briefly, 120 µg of the microsomal fractions was added to the reaction mixture containing alamethicin (60 µg/mg of protein) and 10 µM of SN-38 in a final volume of 100 µl. The assays were incubated at 37°C in a shaking water bath for 4 hours. The reaction was stopped in 200 µL of MeOH + 1% HCl (2N), followed by centrifugation at 14,000g for 10 minutes. The supernatant was evaporated under nitrogen at 35°C and resuspended in a solution of methanol and water (1:1) and 0.5% HCl (2M).

Detection of SN-38 and SN-38 glucuronide was performed by HPLC coupled with fluorescence detection as described previously (Villeneuve et al. 2003).

Statistic analyses

All statistical analyses were performed using the JMP V4.0.2 software (SAS Institute, Cary, NC). All P-values shown were obtained with rank sums of the Wilcoxon/Kruskal-Wallis test.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the Canadian Institutes of Health Research (CIHR; MOP-42392) and Canada Research Chair Program (C.G.). We thank Patrick Caron for technical assistance. J.F.G. and O.B. are the recipients of graduate studentship awards from the Fonds de l'enseignement et de la recherche, Université Laval and Fonds de la Recherche en Santé du Québec, respectively. C.G. is the chair holder of the Canadian Research Chair in Pharmacogenomics. The authors thank Dr Olivier Barbier for helpful discussion.

Table 1: Primers sequences and probes

Name	Primer Sequence
Constructs primers	
Common primer(R)	5'TGG CAG GAG CAA AGG CGC CGC TCG AGC GG 3'
P-269bp (F)	5'CGA GCT CGG AGG TTC TGG AAG TAC TTG GC 3'
P-540bp (F)	5'CGA CGC GTG TGC TGG ACT CAA TAA AT A TTG 3'
P-1316bp (F)	5'CGA CGC GTG GAT CTT GGG CCA GTG GAA TG 3'
P-2218bp (F)	5'CGA CGC GTG GCC TAG TTC CTA GCA TAG TG 3'
Bisulfite Sequencing	
1(F)	5'ATT AGG GAG TTA TAG TTT TTG G 3'
(R)	5'CAA CTA ACC CTT TAC TTA CTA CA 3'
2(R)	5'GGG GAA GAT TTT TGT TTA TAT G 3'
(F)	5'AAT ACC CAC TCC ACA ACT CC 3'
3(F)	5'TGT GAG TTT GGT TTA TTT TAT GG 3'
(R)	5'TAC TTC CAA AAC CTC AAA ATC C 3'
4(F)	5'TTG GTG TAT (CT)GA TTG GTT TTT G 3'
(R)	5'CAA TAA CTA CCA TCC ACT AAA ATC 3'
5(F)	5'GGT TTT GGA AGT ATT TTG TTG TG 3'
(R)	5'CAA CCA TAA C(AG)C CTT TAC TCC TA 3'
6(F)	5'GGG TTT AGT GGT GTT TTA TGT T 3'
(R)	5'ATA ACA TCA AAA CTA CTT TCT ACC 3'
7(F)	5'GAT TTT GTT ATG TTT TTG TTT GG 3'
(R)	5'CAA AAC TCA ATA AAT CCT AAA CA 3'
8(F)	5'GTA GGT TTT AGT TAT TTG TTT GAA 3'
(R)	5'CAA TCC CAA AAA CAC TAC ATC 3'
Primer for automatic sequencing	
1(F)	5'GTA ATG AAG GTG AGT TTT ATA G 3'
1(R)	5'CTA AAT ATC CTA AAA ACC TAT AC 3'
2(R)	5'ATA CTA CCT ACT CAC TTA TAT C 3'
3(F)	5'TGT GAG TTT GGT TTA TTT TAT GG 3'
4(R)	5'CAA TAA CTA CCA TCC ACT AAA ATC 3'
5(F)	5'GGT TTT GGA AGT ATT TTG TTG TG 3'
6(F)	5'GGG TTT AGT GGT GTT TTA TGT T 3'
7(R)	5'5'CAA AAC TCA ATA AAT CCT AAA CA 3'
8(R)	5'CAA TCC CAA AAA CAC TAC ATC 3'
QRT-PCR UGT1A1	
QRT-PCR(F)	5'GAC TGT CCA GGA CCT ATT GAG CTC 3'
QRT-PCR(R)	5'CAT TAA TGT AGG CTT CAA ATT CCT GG 3'
QRT-PCR(P)	5'(FAM)ATC ATG CCC AAT ATG GTT (MGB)3'

F, Forward; R, Reverse; P, Probe; FAM, carboxyfluorescein; MGB, minor groove binder.

Figure 1 Relative expression of *UGT1A1* mRNA in colon cancer cell lines. Data are presented as the mean of relative expression of *UGT1A1* (arbitrary units) determined by QRT-PCR. The housekeeping gene was used as an endogenous control and showed a coefficient of variation of 15%.

Figure 2 *UGT1A1* expression following 5-Aza-dC (5 μ M) and/or TSA (300nM) treatments in colon cancer cell lines. Results are shown for all three low *UGT1A1* mRNA expression cell lines, (A) HCT-116, (B) COLO-320DM and (C) HCT-15. All expression results were assessed by QRT-PCR using β -2-Microglobulin as an endogenous control. DMSO and PBS did not modify *UGT1A1* mRNA expression. (D) Relative *UGT1A1* expression compared to the control group for each cell line. Cells were treated as described in Materials and methods with 5-Aza-dC alone (5 μ M) or in combination with TSA (300nM). Results are expressed as the mean \pm SD of two separated experiments performed in triplicate. *, $P < 0.05$

Figure3 Repression of *UGT1A1* promoter activity by DNA methylation in luciferase constructs. (A) *UGT1A1* promoter constructs of variable lengths and their associated CpG are shown. (B) Digestion of plasmidic DNA with the methylation sensitive restriction enzyme *HpaII*, which cuts CCGG but not C^mCGG sites. Luciferase activity in fully methylated (black) and unmethylated (white) promoter constructs is shown for all three low *UGT1A1* mRNA expression cell lines (C) HCT-116, (D) COLO-320DM and (E) HCT-15. Results are expressed as the mean \pm SD of two separated experiments performed in triplicate. LUC, Luciferase; M, methylated; U, unmethylated. **, $P < 0.01$.

Figure 4 Schematic representation of the *UGT1A1* gene methylation profile. (A) Schematic map of the CpG-rich regions (Regions A to F) in *UGT1A1*. CpG sites are indicated by vertical ticks on the expanded axis. Amplicons 1 to 8 produced by PCR for bisulfite sequencing are also indicated. For each amplicon, an arrow indicates the direction of the bisulfite sequencing.

(B) Methylation profiles of colon cancer cell lines in regions A to E. Methylation profiles are represented as the mean of the methylation percentages for low and high *UGT1A1* mRNA expression cell lines in all CpG of each expression group. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$.

Figure 5 Demethylation treatment increases protein levels and inactivation of SN-38 through glucuronidation. (A) Western blot analysis of UGT1A1 protein after treatment with 5-Aza-dC alone or in combination with TSA for the HCT-116 cell line. (B) Enzymatic assays for SN-38 glucuronidation with the isolated microsomal preparations from cells treated with both 5-Aza-dC and TSA. Results are shown in percentage of SN-38G formation.

References

1. Society, A.C. 2005. Colorectal Cancer Facts & Figures Special edition 2005, Atlanta: American Cancer Society.
2. Saltz, L. 2000. Irinotecan-based combinations for the adjuvant treatment of stage III colon cancer. *Oncology (Huntingt)* 14:47-50.
3. Saltz, L.B., Douillard, J.Y., Pirota, N., Alakl, M., Gruia, G., Awad, L., Elfring, G.L., Locker, P.K., and Miller, L.L. 2001. Irinotecan plus fluorouracil/leucovorin for metastatic colorectal cancer: a new survival standard. *Oncologist* 6:81-91.
4. Cunningham, D., Maroun, J., Vanhoefer, U., and Van Cutsem, E. 2001. Optimizing the use of irinotecan in colorectal cancer. *Oncologist* 6:17-23.
5. Rothenberg, M.L. 1998. Efficacy and toxicity of irinotecan in patients with colorectal cancer. *Semin Oncol* 25:39-46.
6. Iyer, L., Hall, D., Das, S., Mortell, M.A., Ramirez, J., Kim, S., Di Rienzo, A., and Ratain, M.J. 1999. Phenotype-genotype correlation of in vitro SN-38 (active metabolite of irinotecan) and bilirubin glucuronidation in human liver tissue with UGT1A1 promoter polymorphism. *Clin Pharmacol Ther* 65:576-582.
7. Gagne, J.F., Montminy, V., Belanger, P., Journault, K., Gaucher, G., and Guillemette, C. 2002. Common human UGT1A polymorphisms and the altered metabolism of irinotecan active metabolite 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin (SN-38). *Mol Pharmacol* 62:608-617.
8. Hanioka, N., Ozawa, S., Jinno, H., Ando, M., Saito, Y., and Sawada, J. 2001. Human liver UDP-glucuronosyltransferase isoforms involved in the glucuronidation of 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin. *Xenobiotica* 31:687-699.
9. Ando, Y., Saka, H., Ando, M., Sawa, T., Muro, K., Ueoka, H., Yokoyama, A., Saitoh, S., Shimokata, K., and Hasegawa, Y. 2000. Polymorphisms of UDP-glucuronosyltransferase gene and irinotecan toxicity: a pharmacogenetic analysis. *Cancer Res* 60:6921-6926.
10. Iyer, L., Das, S., Janisch, L., Wen, M., Ramirez, J., Karrison, T., Fleming, G.F., Vokes, E.E., Schilsky, R.L., and Ratain, M.J. 2002. UGT1A1*28 polymorphism as a determinant of irinotecan disposition and toxicity. *Pharmacogenomics J* 2:43-47.
11. Carlini, L.E., Meropol, N.J., Bever, J., Andria, M.L., Hill, T., Gold, P., Rogatko, A., Wang, H., and Blanchard, R.L. 2005. UGT1A7 and UGT1A9 polymorphisms predict response and toxicity in colorectal cancer patients treated with capecitabine/irinotecan. *Clin Cancer Res* 11:1226-1236.
12. Rouits, E., Boisdrion-Celle, M., Dumont, A., Guerin, O., Morel, A., and Gamelin, E. 2004. Relevance of different UGT1A1 polymorphisms in irinotecan-induced toxicity: a molecular and clinical study of 75 patients. *Clin Cancer Res* 10:5151-5159.
13. Font, A., Sanchez, J.M., Taron, M., Martinez-Balibrea, E., Sanchez, J.J., Manzano, J.L., Margeli, M., Richardet, M., Barnadas, A., Abad, A., et al. 2003. Weekly regimen of irinotecan/docetaxel in previously treated non-small cell lung cancer patients and correlation with uridine diphosphate glucuronosyltransferase 1A1 (UGT1A1) polymorphism. *Invest New Drugs* 21:435-443.

14. Xu, G., Zhang, W., Ma, M.K., and McLeod, H.L. 2002. Human carboxylesterase 2 is commonly expressed in tumor tissue and is correlated with activation of irinotecan. *Clin Cancer Res* 8:2605-2611.
15. Cummings, J., Ethell, B.T., Jardine, L., Boyd, G., Macpherson, J.S., Burchell, B., Smyth, J.F., and Jodrell, D.I. 2003. Glucuronidation as a mechanism of intrinsic drug resistance in human colon cancer: reversal of resistance by food additives. *Cancer Res* 63:8443-8450.
16. Cummings, J., Zelcer, N., Allen, J.D., Yao, D., Boyd, G., Maliepaard, M., Friedberg, T.H., Smyth, J.F., and Jodrell, D.I. 2004. Glucuronidation as a mechanism of intrinsic drug resistance in colon cancer cells: contribution of drug transport proteins. *Biochem Pharmacol* 67:31-39.
17. Cummings, J., Boyd, G., Ethell, B.T., Macpherson, J.S., Burchell, B., Smyth, J.F., and Jodrell, D.I. 2002. Enhanced clearance of topoisomerase I inhibitors from human colon cancer cells by glucuronidation. *Biochem Pharmacol* 63:607-613.
18. Lin, Y.M., Furukawa, Y., Tsunoda, T., Yue, C.T., Yang, K.C., and Nakamura, Y. 2002. Molecular diagnosis of colorectal tumors by expression profiles of 50 genes expressed differentially in adenomas and carcinomas. *Oncogene* 21:4120-4128.
19. Yu, J., Shannon, W.D., Watson, M.A., and McLeod, H.L. 2005. Gene expression profiling of the irinotecan pathway in colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 11:2053-2062.
20. Strassburg, C.P., Nguyen, N., Manns, M.P., and Tukey, R.H. 1998. Polymorphic expression of the UDP-glucuronosyltransferase UGT1A gene locus in human gastric epithelium. *Mol Pharmacol* 54:647-654.
21. Jubb, A.M., Quirke, P., and Oates, A.J. 2003. DNA methylation, a biomarker for colorectal cancer: implications for screening and pathological utility. *Ann N Y Acad Sci* 983:251-267.
22. Lofton-Day, C., and Lesche, R. 2003. DNA methylation markers in patients with gastrointestinal cancers. Current understanding, potential applications for disease management and development of diagnostic tools. *Dig Dis* 21:299-308.
23. Toyota, M., Itoh, F., and Imai, K. 2000. DNA methylation and gastrointestinal malignancies: functional consequences and clinical implications. *J Gastroenterol* 35:727-734.
24. Jass, J.R., Whitehall, V.L., Young, J., and Leggett, B.A. 2002. Emerging concepts in colorectal neoplasia. *Gastroenterology* 123:862-876.
25. Jaenisch, R., and Bird, A. 2003. Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nat Genet* 33:245-254.
26. Plumb, J.A., Strathdee, G., Sludden, J., Kaye, S.B., and Brown, R. 2000. Reversal of drug resistance in human tumor xenografts by 2'-deoxy-5-azacytidine-induced demethylation of the hMLH1 gene promoter. *Cancer Res* 60:6039-6044.
27. Ferreri, A.J., Dell'Oro, S., Capello, D., Ponzoni, M., Iuzzolino, P., Rossi, D., Pasini, F., Ambrosetti, A., Orvieto, E., Ferrarese, F., et al. 2004. Aberrant methylation in the promoter region of the reduced folate carrier gene is a potential mechanism of resistance to methotrexate in primary central nervous system lymphomas. *Br J Haematol* 126:657-664.
28. Esteller, M. 2005. DNA methylation and cancer therapy: new developments and expectations. *Curr Opin Oncol* 17:55-60.

29. Baker, E.K., Johnstone, R.W., Zalberg, J.R., and El-Osta, A. 2005. Epigenetic changes to the MDR1 locus in response to chemotherapeutic drugs. *Oncogene* 8:8.
30. Ludlum, D.B. 1990. DNA alkylation by the haloethylnitrosoureas: nature of modifications produced and their enzymatic repair or removal. *Mutat Res* 233:117-126.
31. Esteller, M., Garcia-Foncillas, J., Andion, E., Goodman, S.N., Hidalgo, O.F., Vanaclocha, V., Baylin, S.B., and Herman, J.G. 2000. Inactivation of the DNA-repair gene MGMT and the clinical response of gliomas to alkylating agents. *N Engl J Med* 343:1350-1354.
32. Kondo, Y., Shen, L., and Issa, J.P. 2003. Critical role of histone methylation in tumor suppressor gene silencing in colorectal cancer. *Mol Cell Biol* 23:206-215.
33. Villeneuve, L., Girard, H., Fortier, L.C., Gagne, J.F., and Guillemette, C. 2003. Novel functional polymorphisms in the UGT1A7 and UGT1A9 glucuronidating enzymes in Caucasian and African-American subjects and their impact on the metabolism of 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin and flavopiridol anticancer drugs. *J Pharmacol Exp Ther* 307:117-128.
34. Duguay, Y., McGrath, M., Lepine, J., Gagne, J.F., Hankinson, S.E., Colditz, G.A., Hunter, D.J., Plante, M., Tetu, B., Belanger, A., et al. 2004. The functional UGT1A1 promoter polymorphism decreases endometrial cancer risk. *Cancer Res* 64:1202-1207.
35. Esteller, M. 2005. Dormant hypermethylated tumour suppressor genes: questions and answers. *J Pathol* 205:172-180.
36. Tukey, R.H., and Strassburg, C.P. 2000. Human UDP-glucuronosyltransferases: metabolism, expression, and disease. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 40:581-616.
37. Tukey, R.H., and Strassburg, C.P. 2001. Genetic multiplicity of the human UDP-glucuronosyltransferases and regulation in the gastrointestinal tract. *Mol Pharmacol* 59:405-414.
38. Strassburg, C.P., Manns, M.P., and Tukey, R.H. 1998. Expression of the UDP-glucuronosyltransferase 1A locus in human colon. Identification and characterization of the novel extrahepatic UGT1A8. *J Biol Chem* 273:8719-8726.
39. Loo, S., and Rine, J. 1995. Silencing and heritable domains of gene expression. *Annu Rev Cell Dev Biol* 11:519-548.
40. Yang, X., Phillips, D.L., Ferguson, A.T., Nelson, W.G., Herman, J.G., and Davidson, N.E. 2001. Synergistic activation of functional estrogen receptor (ER)-alpha by DNA methyltransferase and histone deacetylase inhibition in human ER-alpha-negative breast cancer cells. *Cancer Res* 61:7025-7029.
41. Nakajima, M., Iwanari, M., and Yokoi, T. 2003. Effects of histone deacetylation and DNA methylation on the constitutive and TCDD-inducible expressions of the human CYP1 family in MCF-7 and HeLa cells. *Toxicol Lett* 144:247-256.
42. Bernard, P., Goudonnet, H., Artur, Y., Desvergne, B., and Wahli, W. 1999. Activation of the mouse TATA-less and human TATA-containing UDP-glucuronosyltransferase 1A1 promoters by hepatocyte nuclear factor 1. *Mol Pharmacol* 56:526-536.
43. Evans, W.E., and Relling, M.V. 1999. Pharmacogenomics: translating functional genomics into rational therapeutics. *Science* 286:487-491.

Figure 1

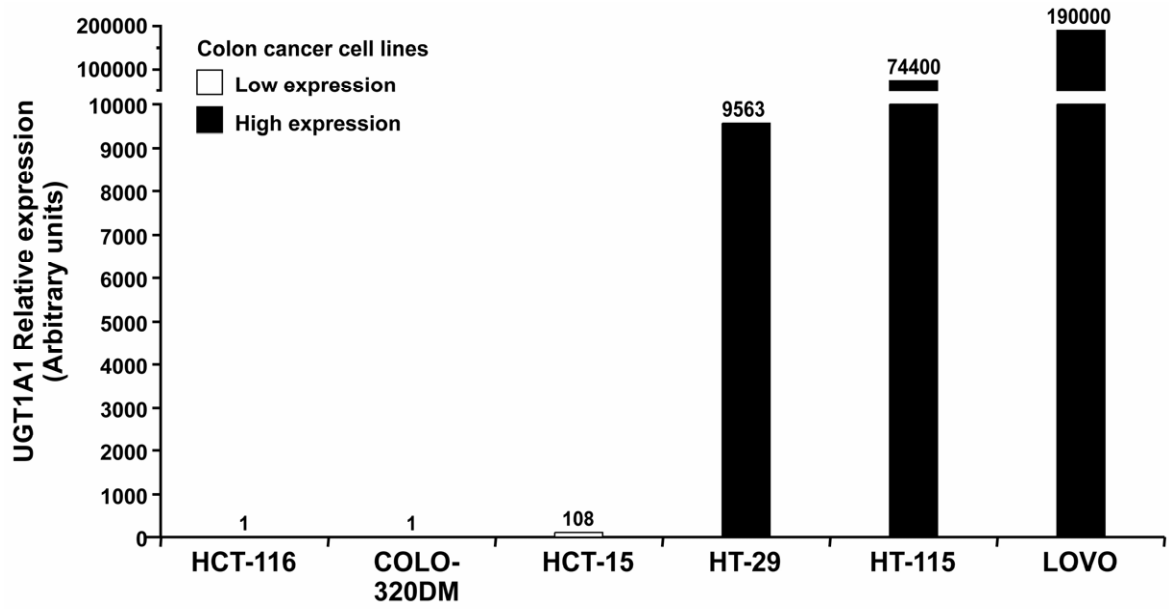
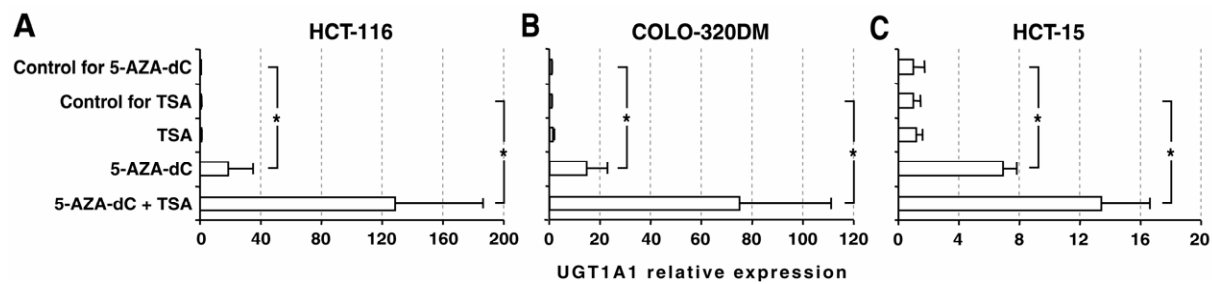


Figure 2



D

Colon adenocarcinoma cell lines	Control for 5-Aza-dC (PBS)	Control for TSA (DMSO)	5-Aza-dC (fold increased)	TSA (fold increased)	5-Aza-dC + TSA (fold increased)
HCT-116	1	1	19 (19)	1 (1)	128 (128)
COLO-320DM	1	1	15 (15)	1 (1)	75 (75)
HCT-15	309	244	2,132 (7)	293 (1)	4,075 (13)

Figure 3

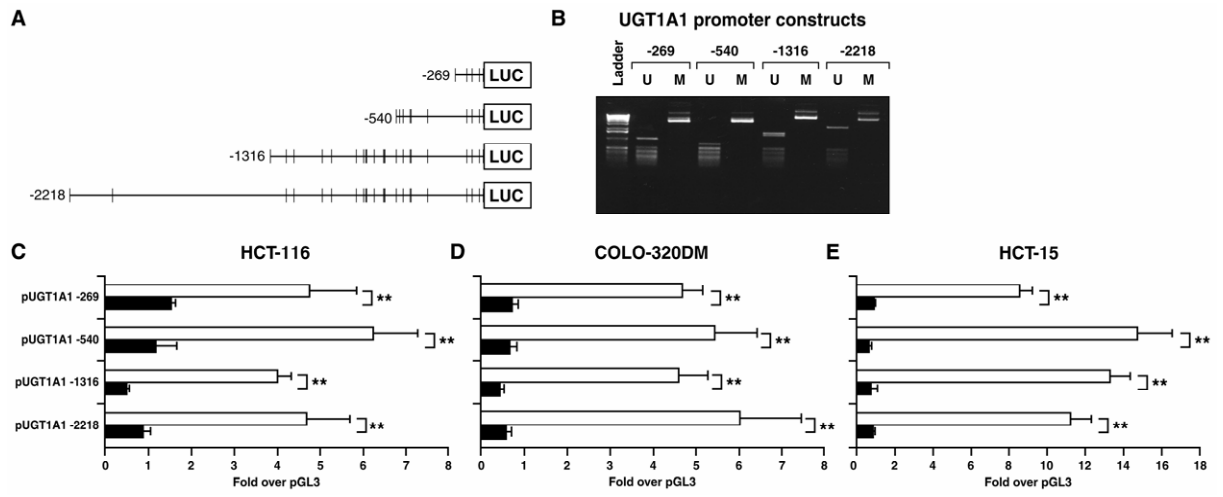


Figure 4

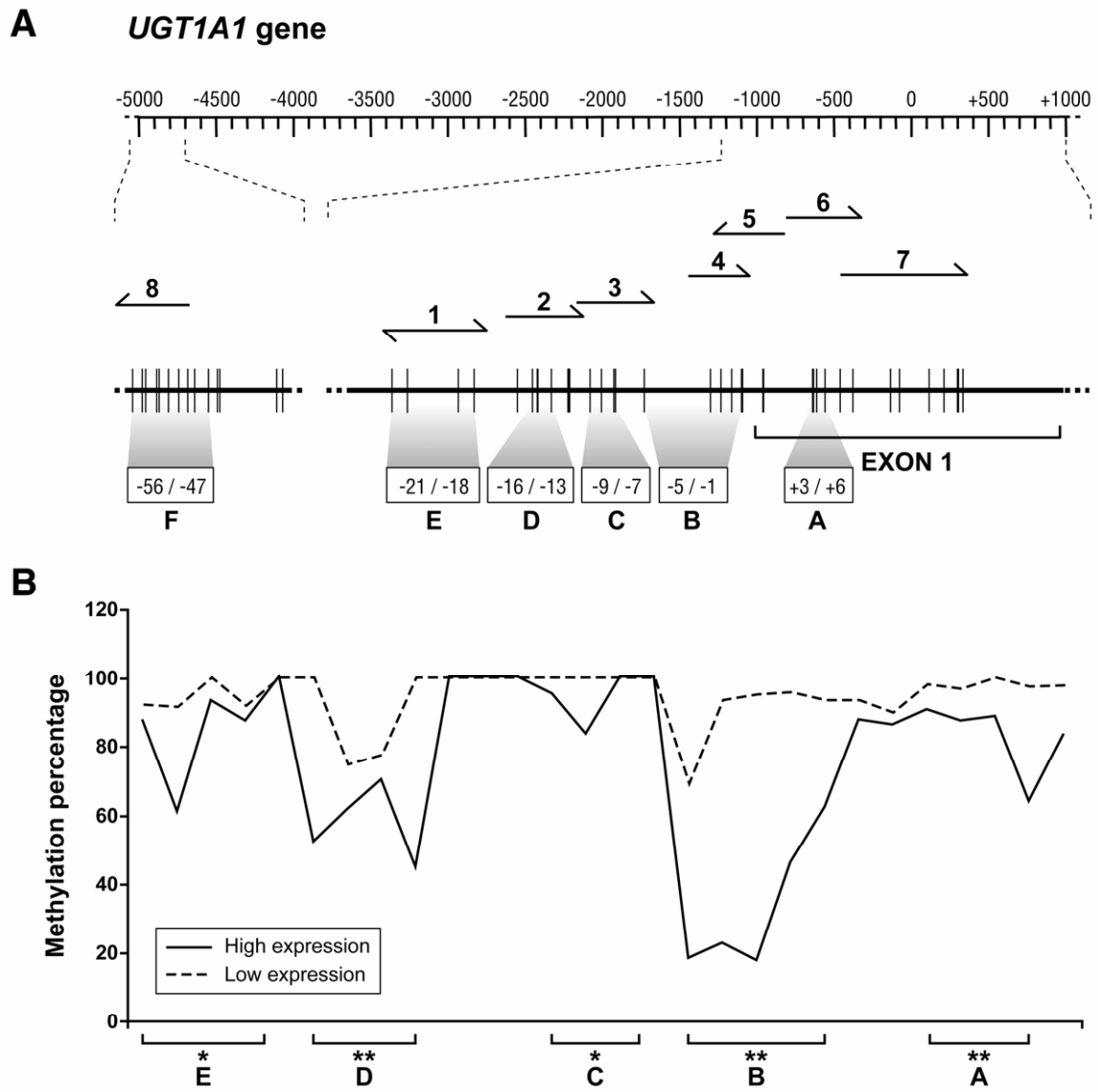
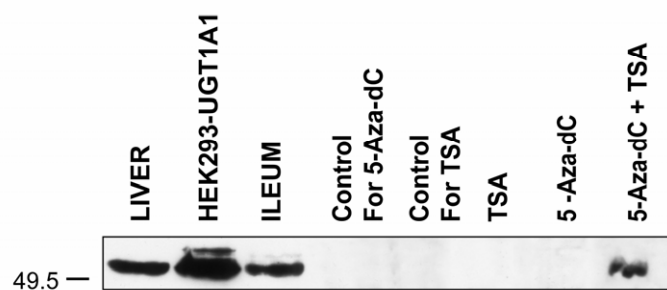
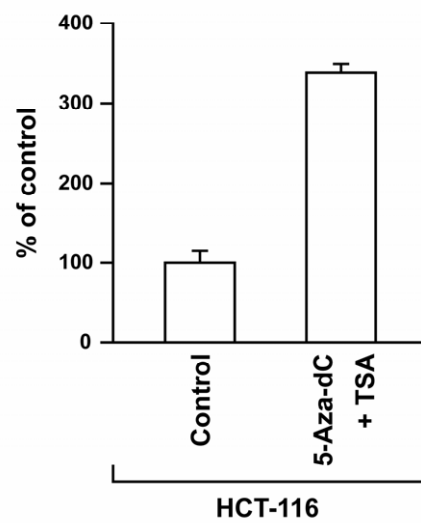


Figure 5

A UGT1A1 protein expression**B** SN-38 inactivation

Chapitre IV : Conclusion

L'irinotécan a été autorisée en 1996 par la Food and drug administration (FDA) et Santé Canada dans le traitement du cancer colorectal comme agent de seconde ligne et en 2000 comme agent de première ligne dans le traitement de ce cancer (Saltz et al. 2000; Wilkes 2005). Plusieurs études ont démontré des variations dans l'efficacité du traitement pour une même dose donnée à deux patients souffrant d'un cancer colorectal de grade comparable (Stoehlmacher et al. 2003; Yu et al. 2005). De plus, l'irinotécan est un anticancéreux où certains patients peuvent développer des résistances (Bates et al. 2004). (J'ai éliminer les paragraphes 2,3,4)

Aucune étude n'a permis de démontrer l'impact d'UGT1A1 sur la réponse à la thérapie à l'irinotécan. La réponse au médicament implique deux aspects importants, la quantité de médicament actif qui atteint la tumeur dans le tissu cible, c'est-à-dire le côlon et également la quantité de médicament actif qui agit dans la cellule tumorale. Deux facteurs importants peuvent jouer dans ce mécanisme. Premièrement, des polymorphismes dans l'ADN constitutifs qui affectent toutes les cellules du corps et qui vont moduler la quantité de médicament actif qui atteint le tissu cible. Le foie est l'organe de prédilection pour le métabolisme de l'irinotécan. Les polymorphismes comme UGT1A1*28 affectent la quantité de SN-38 actif circulant donc par conséquent, la quantité qui se rend au tissu cible (Ando et al. 2002; Toffoli et al. 2004).

Une fois que le SN-38 est au tissu cible, un autre facteur peut jouer dans l'efficacité de la thérapie. Ce sont tous les changements moléculaires que subit la tumeur cancéreuse dans son développement qui peuvent modifier l'efficacité du SN-38 à agir dans la régression de la lésion tumorale. Le côlon est un tissu qui exprime *UGT1A1* et qui peut donc interférer dans la capacité à conjuguer le SN-38 et donc, à agir dans la cellule tumorale. Ainsi, l'expression de l'enzyme UGT1A1 dans la tumeur aurait un impact direct sur la quantité de SN-38 actif qui permettra d'inhiber la prolifération cellulaire. Quelques études ont démontré que l'expression d'UGT1A1 dans la tumeur du côlon est plus faible que dans le tissu normal péri-tumoral (Strassburg et al. 1998; Yu et al. 2005). Cependant, il semble que la tumeur présente des niveaux très variables d'UGT1A1 ce qui suggère une possible variation dans l'efficacité de la thérapie (Yu et al. 2005). Nous avons également démontré

une variation considérable (347%) d'*UGT1A1* dans les 50 tumeurs étudiées. Nous sommes les premiers à démontrer qu'un des mécanismes impliqués dans les variations interindividuelles de l'expression d'*UGT1A1* serait la méthylation des îlots CpG spécifiquement ceux de la région proximale du gène *UGT1A1*.

La première étape de notre projet fût de déterminer si *UGT1A1* pouvait être réactivé par des inhibiteurs de la voie de régulation épigénétique. La quantification relative de l'ARNm d'*UGT1A1* démontre qu'il est possible d'augmenter jusqu'à 128 fois l'expression par le traitement avec ces agents, ce qui suggère qu'*UGT1A1* est régulé par la méthylation dans les lignées cellulaires du cancer du côlon. Plus l'expression basale d'*UGT1A1* est faible, plus les agents ont une action importante sur la réactivation de l'expression d'*UGT1A1*. Ces résultats supportent notre hypothèse puisque l'absence d'expression du gène *UGT1A1* dans ces lignées cellulaires semble faire intervenir la méthylation.

Par la suite, nous avons voulu déterminer l'impact direct de la méthylation sur le promoteur d'*UGT1A1*, puisque les agents utilisés affectent le génome dans son ensemble. Il est possible qu'*UGT1A1* soit indirectement réactivé par la modulation de facteurs de transcription sensibles à la méthylation et impliqués dans l'expression de cette enzyme. Les expériences avec les constructions luciférase démontrent clairement que la méthylation du promoteur d'*UGT1A1* diminue drastiquement son expression et ce dans toutes les lignées cellulaires. Cette expérience nous permet également d'affirmer que les lignées cancéreuses qui n'expriment pas de façon basale *UGT1A1* semblent posséder les facteurs de transcription nécessaire à son expression élevée puisqu'un signal luciférase est obtenu pour les promoteurs non méthylés dans les lignées cellulaires avec des niveaux non détectables d'*UGT1A1*.

L'étape suivante fût d'établir les profils de méthylation des CpG situés dans la région proximale du promoteur d'*UGT1A1* ainsi que dans l'exon 1. La comparaison des profils de méthylation nous montre qu'il y a plusieurs régions significativement hyperméthylées dans les lignées qui expriment faiblement *UGT1A1* que dans celle qui expriment fortement *UGT1A1*. Une ou plusieurs de ces régions sont susceptibles d'être la cible de facteurs de transcription impliquées dans la régulation d'*UGT1A1*. Un faible pourcentage de

méthylation permet une plus grande liaison de ces facteurs de transcription dans ces régions et augmentent ainsi la transcription en ARNm. Des études ont démontré que deux facteurs de transcription, facteur nucléaire hépatique 1α et β (*HNF1 α* et *HNF1 β*) sont impliqués dans la transcription d'*UGT1A1* (Bernard et al. 1999). Ces facteurs de transcription se lient dans une des régions qui semblent avoir un impact dans la régulation d'*UGT1A1*. C'est-à-dire la région B comprise entre le CpG -4 et -3 (Figure 4).

Nous avons ensuite déterminé si le niveau d'ARN, affecté par la méthylation, pouvait se refléter au niveau de l'expression protéique d'UGT1A1 ainsi que de son activité de glucurono-conjugaison du SN-38. La protéine UGT1A1 ainsi que l'activité de glucurono-conjugaison sont augmentées suite au traitement avec les inhibiteurs de la voie de régulation épigénétique. Cela démontre que la présence de méthylation dans le promoteur d'*UGT1A1* inhibe la transcription en ARNm et a pour conséquent de diminuer la formation de protéine et diminuer la capacité de glucurono-conjugaison du SN-38 *in vitro*.

Finalement, nous avons étudié l'expression basale d'UGT1A1 dans 50 tumeurs primaires du côlon. L'expression est très variable d'un échantillon à l'autre ce qui confirme les données obtenues par une publication récente (Yu et al. 2005). Cela démontre qu'il est possible que l'efficacité de la thérapie varie en fonction de l'expression d'*UGT1A1* dans la tumeur du côlon. La détermination du profil de méthylation dans 6 tumeurs primaires qui expriment fortement et 6 tumeurs primaires qui expriment faiblement confirme un lien entre le niveau d'expression et le taux de méthylation dans les tumeurs primaires du côlon. Plusieurs régions ont également été identifiées et ces régions correspondent à ce que nous avons obtenu dans les lignées cellulaires cancéreuses du côlon.

Mon projet démontre plusieurs aspects importants dans la compréhension de la régulation d'UGT1A1 dans le cancer du côlon. Nous avons démontré une corrélation significative entre l'expression en ARNm d'UGT1A1 ainsi le profil de méthylation dans plusieurs régions du promoteur et de l'exon 1. Nous pouvons donc évoquer la possibilité de déterminer le profil de méthylation d'une tumeur par l'analyse du profil de méthylation sur l'ADN au lieu de l'expression en ARNm. L'ADN est beaucoup plus avantageux que l'ARNm par sa stabilité. En clinique, il n'est pas toujours possible d'obtenir de bonnes

quantités ainsi que de bonne qualité d'ARNm. La fixation des tissus et l'inclusion à la paraffine rendent difficile la possibilité d'extraire de l'ARNm (Lehmann et al. 2001).

Le deuxième avantage que procure l'analyse du profil de méthylation est la possibilité que de l'ADN de la tumeur se retrouve en circulation et soit détectable (Herman 2004). Il existe une corrélation entre la quantité d'ADN que l'on peut extraire du plasma et la présence ou l'absence de tumeur cancéreuse chez un patient (Anker et al. 2000). Cette ADN provient majoritairement de la tumeur donc elle peut servir pour analyser le profil de méthylation de la tumeur. De plus elle est beaucoup moins invasive qu'une biopsie ou une chirurgie (Ramirez et al. 2003). Il est même possible par l'analyse plasmatique du profil de méthylation d'un gène impliqué dans le métabolisme d'un agent anticancéreux comme la MGMT, de prédire l'efficacité de la thérapie de l'anticancéreux 1,3-Bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea (BCNU) dans le glioblastome multiforme (Balana et al. 2003). Finalement, la détermination du profil de méthylation permet de détecter un allèle méthylé sur mille non méthylé, procurant ainsi la capacité de détecter une cellule cancéreuse parmi de nombreuses cellules normales (Herman et al. 1996).

L'ensemble de ces résultats permet de mettre en lumière l'existence d'un mécanisme épigénétique de régulation de l'expression d'*UGT1A1* dans les tumeurs primaires du côlon. Ce mécanisme est la méthylation des CpG dans le promoteur proximal d'*UGT1A1* et l'exon 1 et serait impliqué dans la diminution de la capacité tumorale à glucurono-conjugué le SN-38. L'efficacité de la thérapie avec ce médicament pourrait éventuellement être partiellement prédite par l'analyse du profil de méthylation du promoteur et de l'exon 1 du gène *UGT1A1*.

D'autres enzymes UGT sont impliqués dans le métabolisme de l'irinotecan dont UGT1A9, UGT1A7 (Gagne et al. 2002). Le côlon exprime UGT1A9 et UGT1A7 mais ce dernier est présent seulement dans la partie proximale du tractus gastrointestinal (Strassburg et al. 1998). Il semble qu'UGT1A9 soit, après UGT1A1, l'enzyme la plus importante dans la glucurono-conjugaison du SN-38 et qu'un des polymorphismes de cet enzyme (*UGT1A9*3*), démontre une forte diminution de la capacité de conjugaison du SN-38 (Villeneuve et al. 2003). Cinq polymorphismes d'UGT1A7 sont associés avec une

diminution de l'activité de glucurono-conjugaison du SN-38 ont été rapporté (Gagne et al. 2002; Villeneuve et al. 2003). Aucune étude ne parle de la modulation des enzymes UGT1A9 et UGT1A7 dans le cancer du côlon. Il est possible que la méthylation des promoteurs affecte d'autres UGT dans ce cancer et contribue, tout comme UGT1A1, dans les variations interindividuelles de la réponse à l'agent irinotecan.

Les perspectives futures du projet peuvent se séparer en deux volets. Le premier volet consistera à déterminer s'il y a une corrélation entre l'expression d'UGT1A1 dans la tumeur du côlon et l'efficacité de la thérapie. Le deuxième volet consistera à déterminer s'il est possible de prédire l'efficacité d'une thérapie à l'irinotecan par l'analyse du profil de méthylation de la tumeur du côlon par une étude clinique. Mon projet est le commencement d'une éventuelle application clinique concrète dans la détermination de l'efficacité de la thérapie à l'irinotecan dans le cancer du côlon.

Bibliographie

- Albert, C., M. Vallee, G. Beaudry, A. Belanger and D. W. Hum (1999). "The monkey and human uridine diphosphate-glucuronosyltransferase UGT1A9, expressed in steroid target tissues, are estrogen-conjugating enzymes." *Endocrinology* **140**(7): 3292-302.
- Al-Tassan, N., N. H. Chmiel, J. Maynard, N. Fleming, A. L. Livingston, G. T. Williams, A. K. Hodges, D. R. Davies, S. S. David, J. R. Sampson and J. P. Cheadle (2002). "Inherited variants of MYH associated with somatic G:C-->T:A mutations in colorectal tumors." *Nat Genet* **30**(2): 227-32.
- Ando, Y., H. Saka, M. Ando, T. Sawa, K. Muro, H. Ueoka, A. Yokoyama, S. Saitoh, K. Shimokata and Y. Hasegawa (2000). "Polymorphisms of UDP-glucuronosyltransferase gene and irinotecan toxicity: a pharmacogenetic analysis." *Cancer Res* **60**(24): 6921-6.
- Ando, Y., H. Ueoka, T. Sugiyama, M. Ichiki, K. Shimokata and Y. Hasegawa (2002). "Polymorphisms of UDP-glucuronosyltransferase and pharmacokinetics of irinotecan." *Ther Drug Monit* **24**(1): 111-6.
- Anker, P. and M. Stroun (2000). "Circulating DNA in plasma or serum." *Medicina (B Aires)* **60**(5 Pt 2): 699-702.
- Attadia, V. (1993). "Effects of 5-aza-2'-deoxycytidine on differentiation and oncogene expression in the human monoblastic leukemia cell line U-937." *Leukemia* **7 Suppl 1**: 9-16.
- Attwood, J. T., R. L. Yung and B. C. Richardson (2002). "DNA methylation and the regulation of gene transcription." *Cell Mol Life Sci* **59**(2): 241-57.
- Baglioni, S. and M. Genuardi (2004). "Simple and complex genetics of colorectal cancer susceptibility." *Am J Med Genet* **129C**(1): 35-43.
- Baker, E. K., R. W. Johnstone, J. R. Zalcborg and A. El-Osta (2005). "Epigenetic changes to the MDR1 locus in response to chemotherapeutic drugs." *Oncogene* **8**: 8.
- Bakin, A. V. and T. Curran (1999). "Role of DNA 5-methylcytosine transferase in cell transformation by fos." *Science* **283**(5400): 387-90.
- Balana, C., J. L. Ramirez, M. Taron, Y. Roussos, A. Ariza, R. Ballester, C. Sarries, P. Mendez, J. J. Sanchez and R. Rosell (2003). "O6-methyl-guanine-DNA methyltransferase methylation in serum and tumor DNA predicts response to 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea but not to temozolamide plus cisplatin in glioblastoma multiforme." *Clin Cancer Res* **9**(4): 1461-8.
- Bates, S. E., W. Y. Medina-Perez, G. Kohlhagen, S. Antony, T. Nadjem, R. W. Robey and Y. Pommier (2004). "ABCG2 mediates differential resistance to SN-38 (7-ethyl-10-hydroxycamptothecin) and homocamptothecins." *J Pharmacol Exp Ther* **310**(2): 836-42.
- Belanger, A., D. W. Hum, M. Beaulieu, E. Levesque, C. Guillemette, A. Tchernof, G. Belanger, D. Turgeon and S. Dubois (1998). "Characterization and regulation of UDP-glucuronosyltransferases in steroid target tissues." *J Steroid Biochem Mol Biol* **65**(1-6): 301-10.
- Belanger, A., G. Pelletier, F. Labrie, O. Barbier and S. Chouinard (2003). "Inactivation of androgens by UDP-glucuronosyltransferase enzymes in humans." *Trends Endocrinol Metab* **14**(10): 473-9.

- Bernard, P., H. Goudonnet, Y. Artur, B. Desvergne and W. Wahli (1999). "Activation of the mouse TATA-less and human TATA-containing UDP-glucuronosyltransferase 1A1 promoters by hepatocyte nuclear factor 1." Mol Pharmacol **56**(3): 526-36.
- Bestor, T. H. (2000). "The DNA methyltransferases of mammals." Hum Mol Genet **9**(16): 2395-402.
- Beutler, E., T. Gelbart and A. Demina (1998). "Racial variability in the UDP-glucuronosyltransferase 1 (UGT1A1) promoter: a balanced polymorphism for regulation of bilirubin metabolism?" Proc Natl Acad Sci U S A **95**(14): 8170-4.
- Bosma, P. J., J. R. Chowdhury, C. Bakker, S. Gantla, A. de Boer, B. A. Oostra, D. Lindhout, G. N. Tytgat, P. L. Jansen, R. P. Oude Elferink and et al. (1995). "The genetic basis of the reduced expression of bilirubin UDP-glucuronosyltransferase 1 in Gilbert's syndrome." N Engl J Med **333**(18): 1171-5.
- Bourc'his, D., G. L. Xu, C. S. Lin, B. Bollman and T. H. Bestor (2001). "Dnmt3L and the establishment of maternal genomic imprints." Science **294**(5551): 2536-9.
- Boyle, P. and J. S. Langman (2000). "ABC of colorectal cancer: Epidemiology." Bmj **321**(7264): 805-8.
- Butler, L. M., R. Sinha, R. C. Millikan, C. F. Martin, B. Newman, M. D. Gammon, A. S. Ammerman and R. S. Sandler (2003). "Heterocyclic amines, meat intake, and association with colon cancer in a population-based study." Am J Epidemiol **157**(5): 434-45.
- Carlini, L. E., N. J. Meropol, J. Bever, M. L. Andria, T. Hill, P. Gold, A. Rogatko, H. Wang and R. L. Blanchard (2005). "UGT1A7 and UGT1A9 polymorphisms predict response and toxicity in colorectal cancer patients treated with capecitabine/irinotecan." Clin Cancer Res **11**(3): 1226-36.
- Chan, M. F., R. van Amerongen, T. Nijjar, E. Cuppen, P. A. Jones and P. W. Laird (2001). "Reduced rates of gene loss, gene silencing, and gene mutation in Dnmt1-deficient embryonic stem cells." Mol Cell Biol **21**(22): 7587-600.
- Chedin, F., M. R. Lieber and C. L. Hsieh (2002). "The DNA methyltransferase-like protein DNMT3L stimulates de novo methylation by Dnmt3a." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(26): 16916-21.
- Chouinard, S., G. Pelletier, A. Belanger and O. Barbier (2004). "Cellular specific expression of the androgen-conjugating enzymes UGT2B15 and UGT2B17 in the human prostate epithelium." Endocr Res **30**(4): 717-25.
- Chow, E., C. Thirlwell, F. Macrae and L. Lipton (2004). "Colorectal cancer and inherited mutations in base-excision repair." Lancet Oncol **5**(10): 600-6.
- Coffman, B. L., G. R. Rios, C. D. King and T. R. Tephly (1997). "Human UGT2B7 catalyzes morphine glucuronidation." Drug Metab Dispos **25**(1): 1-4.
- Costello, J. F., M. C. Fruhwald, D. J. Smiraglia, L. J. Rush, G. P. Robertson, X. Gao, F. A. Wright, J. D. Feramisco, P. Peltomaki, J. C. Lang, D. E. Schuller, L. Yu, C. D. Bloomfield, M. A. Caligiuri, A. Yates, R. Nishikawa, H. Su Huang, N. J. Petrelli, X. Zhang, M. S. O'Dorisio, W. A. Held, W. K. Cavenee and C. Plass (2000). "Aberrant CpG-island methylation has non-random and tumour-type-specific patterns." Nat Genet **24**(2): 132-8.
- Costello, J. F. and C. Plass (2001). "Methylation matters." J Med Genet **38**(5): 285-303.
- Cottrell, S. E. and P. W. Laird (2003). "Sensitive detection of DNA methylation." Ann N Y Acad Sci **983**: 120-30.

- Cummings, J., G. Boyd, B. T. Ethell, J. S. Macpherson, B. Burchell, J. F. Smyth and D. I. Jodrell (2002). "Enhanced clearance of topoisomerase I inhibitors from human colon cancer cells by glucuronidation." Biochem Pharmacol **63**(4): 607-13.
- Cummings, J., B. T. Ethell, L. Jardine, G. Boyd, J. S. Macpherson, B. Burchell, J. F. Smyth and D. I. Jodrell (2003). "Glucuronidation as a mechanism of intrinsic drug resistance in human colon cancer: reversal of resistance by food additives." Cancer Res **63**(23): 8443-50.
- Cummings, J., N. Zelcer, J. D. Allen, D. Yao, G. Boyd, M. Maliepaard, T. H. Friedberg, J. F. Smyth and D. I. Jodrell (2004). "Glucuronidation as a mechanism of intrinsic drug resistance in colon cancer cells: contribution of drug transport proteins." Biochem Pharmacol **67**(1): 31-9.
- Cunningham, D., J. Maroun, U. Vanhoefer and E. Van Cutsem (2001). "Optimizing the use of irinotecan in colorectal cancer." Oncologist **6**(Suppl 4): 17-23.
- de la Chapelle, A. (2004). "Genetic predisposition to colorectal cancer." Nat Rev Cancer **4**(10): 769-80.
- Deplus, R., C. Brenner, W. A. Burgers, P. Putmans, T. Kouzarides, Y. de Launoit and F. Fuks (2002). "Dnmt3L is a transcriptional repressor that recruits histone deacetylase." Nucleic Acids Res **30**(17): 3831-8.
- Desai, A. A., F. Innocenti and M. J. Ratain (2003). "UGT pharmacogenomics: implications for cancer risk and cancer therapeutics." Pharmacogenetics **13**(8): 517-23.
- Diergaarde, B., H. Braam, G. N. van Muijen, M. J. Ligtenberg, F. J. Kok and E. Kampman (2003). "Dietary factors and microsatellite instability in sporadic colon carcinomas." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **12**(11 Pt 1): 1130-6.
- Dobosy, J. R. and E. U. Selker (2001). "Emerging connections between DNA methylation and histone acetylation." Cell Mol Life Sci **58**(5-6): 721-7.
- Douglas, E. J., H. Fiegler, A. Rowan, S. Halford, D. C. Bicknell, W. Bodmer, I. P. Tomlinson and N. P. Carter (2004). "Array comparative genomic hybridization analysis of colorectal cancer cell lines and primary carcinomas." Cancer Res **64**(14): 4817-25.
- Duguay, Y., M. McGrath, J. Lepine, J. F. Gagne, S. E. Hankinson, G. A. Colditz, D. J. Hunter, M. Plante, B. Tetu, A. Belanger, C. Guillemette and I. De Vivo (2004). "The functional UGT1A1 promoter polymorphism decreases endometrial cancer risk." Cancer Res **64**(3): 1202-7.
- Esteller, M. (2005). "DNA methylation and cancer therapy: new developments and expectations." Curr Opin Oncol **17**(1): 55-60.
- Esteller, M. (2005). "Dormant hypermethylated tumour suppressor genes: questions and answers." J Pathol **205**(2): 172-80.
- Esteller, M., P. G. Corn, S. B. Baylin and J. G. Herman (2001). "A gene hypermethylation profile of human cancer." Cancer Res **61**(8): 3225-9.
- Esteller, M., G. Gaidano, S. N. Goodman, V. Zagonel, D. Capello, B. Botto, D. Rossi, A. Glohini, U. Vitolo, A. Carbone, S. B. Baylin and J. G. Herman (2002). "Hypermethylation of the DNA repair gene O(6)-methylguanine DNA methyltransferase and survival of patients with diffuse large B-cell lymphoma." J Natl Cancer Inst **94**(1): 26-32.
- Esteller, M., J. Garcia-Foncillas, E. Andion, S. N. Goodman, O. F. Hidalgo, V. Vanaclocha, S. B. Baylin and J. G. Herman (2000). "Inactivation of the DNA-repair gene

- MGMT and the clinical response of gliomas to alkylating agents." N Engl J Med **343**(19): 1350-4.
- Esteller, M. and J. G. Herman (2004). "Generating mutations but providing chemosensitivity: the role of O6-methylguanine DNA methyltransferase in human cancer." Oncogene **23**(1): 1-8.
- Evans, W. E. and M. V. Relling (1999). "Pharmacogenomics: translating functional genomics into rational therapeutics." Science **286**(5439): 487-91.
- Fallik, D., F. Borrini, V. Boige, J. Viguier, S. Jacob, C. Miquel, J. C. Sabourin, M. Ducreux and F. Praz (2003). "Microsatellite instability is a predictive factor of the tumor response to irinotecan in patients with advanced colorectal cancer." Cancer Res **63**(18): 5738-44.
- Fallik, D., J. C. Sabourin, F. Borrini, S. Jacob, V. Boige, F. Praz and M. Ducreux (2000). "[Response of metastatic colorectal cancers to treatment with CPT11 (irinotecan): implications of the mismatched base repair system]." Gastroenterol Clin Biol **24**(10): 917-22.
- Falnes, P. O. and T. Rognes (2003). "DNA repair by bacterial AlkB proteins." Res Microbiol **154**(8): 531-8.
- Fearon, E. R. and B. Vogelstein (1990). "A genetic model for colorectal tumorigenesis." Cell **61**(5): 759-67.
- Ferreri, A. J., S. Dell'Oro, D. Capello, M. Ponzoni, P. Iuzzolino, D. Rossi, F. Pasini, A. Ambrosetti, E. Orvieto, F. Ferrarese, G. Arrigoni, M. Foppoli, M. Reni and G. Gaidano (2004). "Aberrant methylation in the promoter region of the reduced folate carrier gene is a potential mechanism of resistance to methotrexate in primary central nervous system lymphomas." Br J Haematol **126**(5): 657-64.
- Font, A., J. M. Sanchez, M. Taron, E. Martinez-Balibrea, J. J. Sanchez, J. L. Manzano, M. Margeli, M. Richardet, A. Barnadas, A. Abad and R. Rosell (2003). "Weekly regimen of irinotecan/docetaxel in previously treated non-small cell lung cancer patients and correlation with uridine diphosphate glucuronosyltransferase 1A1 (UGT1A1) polymorphism." Invest New Drugs **21**(4): 435-43.
- Fotsis, T., Y. Zhang, M. S. Pepper, H. Adlercreutz, R. Montesano, P. P. Nawroth and L. Schweigerer (1994). "The endogenous oestrogen metabolite 2-methoxyoestradiol inhibits angiogenesis and suppresses tumour growth." Nature **368**(6468): 237-9.
- Gagne, J. F., V. Montminy, P. Belanger, K. Journault, G. Gaucher and C. Guillemette (2002). "Common human UGT1A polymorphisms and the altered metabolism of irinotecan active metabolite 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin (SN-38)." Mol Pharmacol **62**(3): 608-17.
- Giardiello, F. M., G. M. Petersen, S. Piantadosi, S. B. Gruber, E. I. Traboulsi, G. J. Offerhaus, K. Muro, A. J. Krush, S. V. Booker, M. C. Luce, S. J. Laken, K. W. Kinzler, B. Vogelstein and S. R. Hamilton (1997). "APC gene mutations and extraintestinal phenotype of familial adenomatous polyposis." Gut **40**(4): 521-5.
- Gibbons, R. J., S. Bachoo, D. J. Picketts, S. Aftimos, B. Asenbauer, J. Bergoffen, S. A. Berry, N. Dahl, A. Fryer, K. Keppler, K. Kurosawa, M. L. Levin, M. Masuno, G. Neri, M. E. Pierpont, S. F. Slaney and D. R. Higgs (1997). "Mutations in transcriptional regulator ATRX establish the functional significance of a PHD-like domain." Nat Genet **17**(2): 146-8.

- Giovannucci, E. and B. Goldin (1997). "The role of fat, fatty acids, and total energy intake in the etiology of human colon cancer." Am J Clin Nutr **66**(6 Suppl): 1564S-1571S.
- Goel, A., C. N. Arnold, D. Niedzwiecki, D. K. Chang, L. Ricciardiello, J. M. Carethers, J. M. Dowell, L. Wasserman, C. Compton, R. J. Mayer, M. M. Bertagnolli and C. R. Boland (2003). "Characterization of sporadic colon cancer by patterns of genomic instability." Cancer Res **63**(7): 1608-14.
- Gong, Q. H., J. W. Cho, T. Huang, C. Potter, N. Gholami, N. K. Basu, S. Kubota, S. Carvalho, M. W. Pennington, I. S. Owens and N. C. Popescu (2001). "Thirteen UDPglucuronosyltransferase genes are encoded at the human UGT1 gene complex locus." Pharmacogenetics **11**(4): 357-68.
- Gordon, A. (1992). "APC mutations." Nature **358**(6384): 288.
- Grady, W. M. (2004). "Genomic instability and colon cancer." Cancer Metastasis Rev **23**(1-2): 11-27.
- Grady, W. M., A. Rajput, J. D. Lutterbaugh and S. D. Markowitz (2001). "Detection of aberrantly methylated hMLH1 promoter DNA in the serum of patients with microsatellite unstable colon cancer." Cancer Res **61**(3): 900-2.
- Greenstein, A. J. (2000). "Cancer in inflammatory bowel disease." Mt Sinai J Med **67**(3): 227-40.
- Gregory, P. A., R. H. Lewinsky, D. A. Gardner-Stephen and P. I. Mackenzie (2004). "Regulation of UDP glucuronosyltransferases in the gastrointestinal tract." Toxicol Appl Pharmacol **199**(3): 354-63.
- Guillemette, C. (2003). "Pharmacogenomics of human UDP-glucuronosyltransferase enzymes." Pharmacogenomics J **3**(3): 136-58.
- Guillemette, C., A. Belanger and J. Lepine (2004). "Metabolic inactivation of estrogens in breast tissue by UDP-glucuronosyltransferase enzymes: an overview." Breast Cancer Res **6**(6): 246-54.
- Guillemette, C., R. C. Millikan, B. Newman and D. E. Housman (2000). "Genetic polymorphisms in uridine diphospho-glucuronosyltransferase 1A1 and association with breast cancer among African Americans." Cancer Res **60**(4): 950-6.
- Hajdinjak, T. and B. Zagradisnik (2004). "Prostate cancer and polymorphism D85Y in gene for dihydrotestosterone degrading enzyme UGT2B15: Frequency of DD homozygotes increases with Gleason Score." Prostate **59**(4): 436-9.
- Hanioka, N., S. Ozawa, H. Jinno, M. Ando, Y. Saito and J. Sawada (2001). "Human liver UDP-glucuronosyltransferase isoforms involved in the glucuronidation of 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin." Xenobiotica **31**(10): 687-99.
- Hata, K., M. Okano, H. Lei and E. Li (2002). "Dnmt3L cooperates with the Dnmt3 family of de novo DNA methyltransferases to establish maternal imprints in mice." Development **129**(8): 1983-93.
- Heavey, P. M., D. McKenna and I. R. Rowland (2004). "Colorectal cancer and the relationship between genes and the environment." Nutr Cancer **48**(2): 124-41.
- Herman, J. G. (2004). "Circulating methylated DNA." Ann N Y Acad Sci **1022**: 33-9.
- Herman, J. G. and S. B. Baylin (2003). "Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation." N Engl J Med **349**(21): 2042-54.
- Herman, J. G., J. R. Graff, S. Myohanen, B. D. Nelkin and S. B. Baylin (1996). "Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(18): 9821-6.

- Hisamuddin, I. M. and V. W. Yang (2004). "Genetics of colorectal cancer." MedGenMed **6**(3): 13.
- Innocenti, F. and M. J. Ratain (2003). "Irinotecan treatment in cancer patients with UGT1A1 polymorphisms." Oncology (Huntingt) **17**(5 Suppl 5): 52-5.
- Issa, J. P., P. M. Vertino, J. Wu, S. Sazawal, P. Celano, B. D. Nelkin, S. R. Hamilton and S. B. Baylin (1993). "Increased cytosine DNA-methyltransferase activity during colon cancer progression." J Natl Cancer Inst **85**(15): 1235-40.
- Itzkowitz, S. H. (1997). "Inflammatory bowel disease and cancer." Gastroenterol Clin North Am **26**(1): 129-39.
- Iyer, L., S. Das, L. Janisch, M. Wen, J. Ramirez, T. Karrison, G. F. Fleming, E. E. Vokes, R. L. Schilsky and M. J. Ratain (2002). "UGT1A1*28 polymorphism as a determinant of irinotecan disposition and toxicity." Pharmacogenomics J **2**(1): 43-7.
- Iyer, L., D. Hall, S. Das, M. A. Mortell, J. Ramirez, S. Kim, A. Di Rienzo and M. J. Ratain (1999). "Phenotype-genotype correlation of in vitro SN-38 (active metabolite of irinotecan) and bilirubin glucuronidation in human liver tissue with UGT1A1 promoter polymorphism." Clin Pharmacol Ther **65**(5): 576-82.
- Jackson, M. R., T. Nilsson and P. A. Peterson (1990). "Identification of a consensus motif for retention of transmembrane proteins in the endoplasmic reticulum." Embo J **9**(10): 3153-62.
- Jacob, S., M. Aguado, D. Fallik and F. Praz (2001). "The role of the DNA mismatch repair system in the cytotoxicity of the topoisomerase inhibitors camptothecin and etoposide to human colorectal cancer cells." Cancer Res **61**(17): 6555-62.
- Jaenisch, R. and A. Bird (2003). "Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals." Nat Genet **33**(Suppl): 245-54.
- Jain, S. K. and M. A. Peppercorn (1997). "Inflammatory bowel disease and colon cancer: a review." Dig Dis **15**(4-5): 243-52.
- Jass, J. R., V. L. Whitehall, J. Young and B. A. Leggett (2002). "Emerging concepts in colorectal neoplasia." Gastroenterology **123**(3): 862-76.
- Jedlitschky, G., A. J. Cassidy, M. Sales, N. Pratt and B. Burchell (1999). "Cloning and characterization of a novel human olfactory UDP-glucuronosyltransferase." Biochem J **340** (Pt 3): 837-43.
- Jones, P. L., G. J. Veenstra, P. A. Wade, D. Vermaak, S. U. Kass, N. Landsberger, J. Strouboulis and A. P. Wolffe (1998). "Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription." Nat Genet **19**(2): 187-91.
- Jubb, A. M., S. M. Bell and P. Quirke (2005). "Methylation and colorectal cancer." J Pathol **195**(1): 111-134.
- Jubb, A. M., P. Quirke and A. J. Oates (2003). "DNA methylation, a biomarker for colorectal cancer: implications for screening and pathological utility." Ann N Y Acad Sci **983**: 251-67.
- Juttermann, R., E. Li and R. Jaenisch (1994). "Toxicity of 5-aza-2'-deoxycytidine to mammalian cells is mediated primarily by covalent trapping of DNA methyltransferase rather than DNA demethylation." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(25): 11797-801.
- Kanai, Y., S. Ushijima, Y. Kondo, Y. Nakanishi and S. Hirohashi (2001). "DNA methyltransferase expression and DNA methylation of CPG islands and peri-

- centromeric satellite regions in human colorectal and stomach cancers." Int J Cancer **91**(2): 205-12.
- Kawato, Y., M. Aonuma, Y. Hirota, H. Kuga and K. Sato (1991). "Intracellular roles of SN-38, a metabolite of the camptothecin derivative CPT-11, in the antitumor effect of CPT-11." Cancer Res **51**(16): 4187-91.
- Kemp, Z., C. Thirlwell, O. Sieber, A. Silver and I. Tomlinson (2004). "An update on the genetics of colorectal cancer." Hum Mol Genet **13 Spec No 2**: R177-85.
- Kiang, T. K., M. H. Ensom and T. K. Chang (2005). "UDP-glucuronosyltransferases and clinical drug-drug interactions." Pharmacol Ther **106**(1): 97-132.
- Kinosaki, M., T. Masuko, K. Sogawa, T. Iyanagi, T. Yamamoto, Y. Hashimoto and Y. Fujii-Kuriyama (1993). "Intracellular localization of UDP-glucuronosyltransferase expressed from the transfected cDNA in cultured cells." Cell Struct Funct **18**(1): 41-51.
- Kinzler, K. W., M. C. Nilbert, B. Vogelstein, T. M. Bryan, D. B. Levy, K. J. Smith, A. C. Preisinger, S. R. Hamilton, P. Hedge, A. Markham and et al. (1991). "Identification of a gene located at chromosome 5q21 that is mutated in colorectal cancers." Science **251**(4999): 1366-70.
- Kondo, Y. and J. P. Issa (2004). "Epigenetic changes in colorectal cancer." Cancer Metastasis Rev **23**(1-2): 29-39.
- Kondo, Y., L. Shen and J. P. Issa (2003). "Critical role of histone methylation in tumor suppressor gene silencing in colorectal cancer." Mol Cell Biol **23**(1): 206-15.
- Lander, E. S., L. M. Linton, B. Birren, C. Nusbaum, M. C. Zody, J. Baldwin, K. Devon, K. Dewar, M. Doyle, W. FitzHugh, R. Funke, D. Gage, K. Harris, A. Heaford, J. Howland, L. Kann, J. Lehoczy, R. LeVine, P. McEwan, K. McKernan, J. Meldrim, J. P. Mesirov, C. Miranda, W. Morris, J. Naylor, C. Raymond, M. Rosetti, R. Santos, A. Sheridan, C. Sougnez, N. Stange-Thomann, N. Stojanovic, A. Subramanian, D. Wyman, J. Rogers, J. Sulston, R. Ainscough, S. Beck, D. Bentley, J. Burton, C. Clee, N. Carter, A. Coulson, R. Deadman, P. Deloukas, A. Dunham, I. Dunham, R. Durbin, L. French, D. Grafham, S. Gregory, T. Hubbard, S. Humphray, A. Hunt, M. Jones, C. Lloyd, A. McMurray, L. Matthews, S. Mercer, S. Milne, J. C. Mullikin, A. Mungall, R. Plumb, M. Ross, R. Shownkeen, S. Sims, R. H. Waterston, R. K. Wilson, L. W. Hillier, J. D. McPherson, M. A. Marra, E. R. Mardis, L. A. Fulton, A. T. Chinwalla, K. H. Pepin, W. R. Gish, S. L. Chisoe, M. C. Wendl, K. D. Delehaunty, T. L. Miner, A. Delehaunty, J. B. Kramer, L. L. Cook, R. S. Fulton, D. L. Johnson, P. J. Minx, S. W. Clifton, T. Hawkins, E. Branscomb, P. Predki, P. Richardson, S. Wenning, T. Slezak, N. Doggett, J. F. Cheng, A. Olsen, S. Lucas, C. Elkin, E. Uberbacher, M. Frazier, R. A. Gibbs, D. M. Muzny, S. E. Scherer, J. B. Bouck, E. J. Sodergren, K. C. Worley, C. M. Rives, J. H. Gorrell, M. L. Metzker, S. L. Naylor, R. S. Kucherlapati, D. L. Nelson, G. M. Weinstock, Y. Sakaki, A. Fujiyama, M. Hattori, T. Yada, A. Toyoda, T. Itoh, C. Kawagoe, H. Watanabe, Y. Totoki, T. Taylor, J. Weissenbach, R. Heilig, W. Saurin, F. Artiguenave, P. Brottier, T. Bruls, E. Pelletier, C. Robert, P. Wincker, D. R. Smith, L. Doucette-Stamm, M. Rubenfield, K. Weinstock, H. M. Lee, J. Dubois, A. Rosenthal, M. Platzer, G. Nyakatura, S. Taudien, A. Rump, H. Yang, J. Yu, J. Wang, G. Huang, J. Gu, L. Hood, L. Rowen, A. Madan, S. Qin, R. W. Davis, N. A. Federspiel, A. P. Abola, M. J. Proctor, R. M. Myers, J. Schmutz, M. Dickson, J.

- Grimwood, D. R. Cox, M. V. Olson, R. Kaul, N. Shimizu, K. Kawasaki, S. Minoshima, G. A. Evans, M. Athanasiou, R. Schultz, B. A. Roe, F. Chen, H. Pan, J. Ramser, H. Lehrach, R. Reinhardt, W. R. McCombie, M. de la Bastide, N. Dedhia, H. Blocker, K. Hornischer, G. Nordsieck, R. Agarwala, L. Aravind, J. A. Bailey, A. Bateman, S. Batzoglou, E. Birney, P. Bork, D. G. Brown, C. B. Burge, L. Cerutti, H. C. Chen, D. Church, M. Clamp, R. R. Copley, T. Doerks, S. R. Eddy, E. E. Eichler, T. S. Furey, J. Galagan, J. G. Gilbert, C. Harmon, Y. Hayashizaki, D. Haussler, H. Hermjakob, K. Hokamp, W. Jang, L. S. Johnson, T. A. Jones, S. Kasif, A. Kasprzyk, S. Kennedy, W. J. Kent, P. Kitts, E. V. Koonin, I. Korf, D. Kulp, D. Lancet, T. M. Lowe, A. McLysaght, T. Mikkelsen, J. V. Moran, N. Mulder, V. J. Pollara, C. P. Ponting, G. Schuler, J. Schultz, G. Slater, A. F. Smit, E. Stupka, J. Szustakowski, D. Thierry-Mieg, J. Thierry-Mieg, L. Wagner, J. Wallis, R. Wheeler, A. Williams, Y. I. Wolf, K. H. Wolfe, S. P. Yang, R. F. Yeh, F. Collins, M. S. Guyer, J. Peterson, A. Felsenfeld, K. A. Wetterstrand, A. Patrinos, M. J. Morgan, P. de Jong, J. J. Catanese, K. Osoegawa, H. Shizuya, S. Choi and Y. J. Chen (2001). "Initial sequencing and analysis of the human genome." *Nature* **409**(6822): 860-921.
- Larsson, S. C., J. Rafter, L. Holmberg, L. Bergkvist and A. Wolk (2005). "Red meat consumption and risk of cancers of the proximal colon, distal colon and rectum: the Swedish Mammography Cohort." *Int J Cancer* **113**(5): 829-34.
- Laso, N., M. J. Lafuente, S. Mas, M. Trias, C. Ascaso, R. Molina, A. Ballesta, F. Rodriguez and A. Lafuente (2002). "Glutathione S-transferase (GSTM1 and GSTT1)-dependent risk for colorectal cancer." *Anticancer Res* **22**(6A): 3399-403.
- Lawes, D. A., S. SenGupta and P. B. Boulos (2003). "The clinical importance and prognostic implications of microsatellite instability in sporadic cancer." *Eur J Surg Oncol* **29**(3): 201-12.
- Lee, W., A. C. Lockhart, R. B. Kim and M. L. Rothenberg (2005). "Cancer pharmacogenomics: powerful tools in cancer chemotherapy and drug development." *Oncologist* **10**(2): 104-11.
- Lee, W. H., W. B. Isaacs, G. S. Bova and W. G. Nelson (1997). "CG island methylation changes near the GSTP1 gene in prostatic carcinoma cells detected using the polymerase chain reaction: a new prostate cancer biomarker." *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **6**(6): 443-50.
- Lehmann, U. and H. Kreipe (2001). "Real-time PCR analysis of DNA and RNA extracted from formalin-fixed and paraffin-embedded biopsies." *Methods* **25**(4): 409-18.
- Lentz, F., A. Tran, E. Rey, G. Pons and J. M. Treluyer (2005). "Pharmacogenomics of fluorouracil, irinotecan, and oxaliplatin in hepatic metastases of colorectal cancer: clinical implications." *Am J Pharmacogenomics* **5**(1): 21-33.
- Leu, Y. W., F. Rahmatpanah, H. Shi, S. H. Wei, J. C. Liu, P. S. Yan and T. H. Huang (2003). "Double RNA interference of DNMT3b and DNMT1 enhances DNA demethylation and gene reactivation." *Cancer Res* **63**(19): 6110-5.
- Levesque, E., M. Beaulieu, M. D. Green, T. R. Tephly, A. Belanger and D. W. Hum (1997). "Isolation and characterization of UGT2B15(Y85): a UDP-glucuronosyltransferase encoded by a polymorphic gene." *Pharmacogenetics* **7**(4): 317-25.

- Lin, Y. M., Y. Furukawa, T. Tsunoda, C. T. Yue, K. C. Yang and Y. Nakamura (2002). "Molecular diagnosis of colorectal tumors by expression profiles of 50 genes expressed differentially in adenomas and carcinomas." *Oncogene* **21**(26): 4120-8.
- Lofton-Day, C. and R. Lesche (2003). "DNA methylation markers in patients with gastrointestinal cancers. Current understanding, potential applications for disease management and development of diagnostic tools." *Dig Dis* **21**(4): 299-308.
- Loo, S. and J. Rine (1995). "Silencing and heritable domains of gene expression." *Annu Rev Cell Dev Biol* **11**: 519-48.
- Ludlum, D. B. (1990). "DNA alkylation by the haloethylnitrosoureas: nature of modifications produced and their enzymatic repair or removal." *Mutat Res* **233**(1-2): 117-26.
- Mackenzie, P. I., I. S. Owens, B. Burchell, K. W. Bock, A. Bairoch, A. Belanger, S. Fournel-Gigleux, M. Green, D. W. Hum, T. Iyanagi, D. Lancet, P. Louisot, J. Magdalou, J. R. Chowdhury, J. K. Ritter, H. Schachter, T. R. Tephly, K. F. Tipton and D. W. Nebert (1997). "The UDP glycosyltransferase gene superfamily: recommended nomenclature update based on evolutionary divergence." *Pharmacogenetics* **7**(4): 255-69.
- MacLeod, S. L., S. Nowell, J. Plaxco and N. P. Lang (2000). "An allele-specific polymerase chain reaction method for the determination of the D85Y polymorphism in the human UDP-glucuronosyltransferase 2B15 gene in a case-control study of prostate cancer." *Ann Surg Oncol* **7**(10): 777-82.
- Maraschio, P., O. Zuffardi, T. Dalla Fior and L. Tiepolo (1988). "Immunodeficiency, centromeric heterochromatin instability of chromosomes 1, 9, and 16, and facial anomalies: the ICF syndrome." *J Med Genet* **25**(3): 173-80.
- Marmorstein, R. (2001). "Structure and function of histone acetyltransferases." *Cell Mol Life Sci* **58**(5-6): 693-703.
- Marsh, S. and H. L. McLeod (2004). "Pharmacogenetics of irinotecan toxicity." *Pharmacogenomics* **5**(7): 835-43.
- Meech, R. and P. I. Mackenzie (1997). "Structure and function of uridine diphosphate glucuronosyltransferases." *Clin Exp Pharmacol Physiol* **24**(12): 907-15.
- Meech, R., G. Yogalingam and P. I. Mackenzie (1996). "Mutational analysis of the carboxy-terminal region of UDP-glucuronosyltransferase 2B1." *DNA Cell Biol* **15**(6): 489-94.
- Miyaki, M. and T. Kuroki (2003). "Role of Smad4 (DPC4) inactivation in human cancer." *Biochem Biophys Res Commun* **306**(4): 799-804.
- Monneret, C. (2005). "Histone deacetylase inhibitors." *Eur J Med Chem* **40**(1): 1-13.
- Nakajima, M., M. Iwanari and T. Yokoi (2003). "Effects of histone deacetylation and DNA methylation on the constitutive and TCDD-inducible expressions of the human CYP1 family in MCF-7 and HeLa cells." *Toxicol Lett* **144**(2): 247-56.
- Nakao, M. (2001). "Epigenetics: interaction of DNA methylation and chromatin." *Gene* **278**(1-2): 25-31.
- Nakayama, H., K. Hibi, M. Taguchi, T. Takase, T. Yamazaki, Y. Kasai, K. Ito, S. Akiyama and A. Nakao (2002). "Molecular detection of p16 promoter methylation in the serum of colorectal cancer patients." *Cancer Lett* **188**(1-2): 115-9.
- Nan, X. and A. Bird (2001). "The biological functions of the methyl-CpG-binding protein MeCP2 and its implication in Rett syndrome." *Brain Dev* **23 Suppl 1**: S32-7.

- Nephew, K. P. and T. H. Huang (2003). "Epigenetic gene silencing in cancer initiation and progression." *Cancer Lett* **190**(2): 125-33.
- Nowell, S. A., J. S. Massengill, S. Williams, A. Radominska-Pandya, T. R. Tephly, Z. Cheng, C. P. Strassburg, R. H. Tukey, S. L. MacLeod, N. P. Lang and F. F. Kadlubar (1999). "Glucuronidation of 2-hydroxyamino-1-methyl-6-phenylimidazo[4, 5-b]pyridine by human microsomal UDP-glucuronosyltransferases: identification of specific UGT1A family isoforms involved." *Carcinogenesis* **20**(6): 1107-14.
- Ockenga, J., A. Vogel, N. Teich, V. Keim, M. P. Manns and C. P. Strassburg (2003). "UDP glucuronosyltransferase (UGT1A7) gene polymorphisms increase the risk of chronic pancreatitis and pancreatic cancer." *Gastroenterology* **124**(7): 1802-8.
- Ohe, Y. (2004). "Chemoradiotherapy for lung cancer: current status and perspectives." *Int J Clin Oncol* **9**(6): 435-43.
- Okano, M., D. W. Bell, D. A. Haber and E. Li (1999). "DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development." *Cell* **99**(3): 247-57.
- Olsson, L. and A. Lindblom (2003). "Family history of colorectal cancer in a Sweden county." *Fam Cancer* **2**(2): 87-93.
- Papa, C. M., N. M. Springer, M. G. Muszynski, R. Meeley and S. M. Kaeppler (2001). "Maize chromomethylase Zea methyltransferase2 is required for CpNpG methylation." *Plant Cell* **13**(8): 1919-28.
- Papas, M. A., E. Giovannucci and E. A. Platz (2004). "Fiber from fruit and colorectal neoplasia." *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **13**(8): 1267-70.
- Paradiso, A., J. Xu, A. Mangia, A. Chiriatti, G. Simone, A. Zito, S. Montemurro, F. Giuliani, E. Maiello and G. Colucci (2004). "Topoisomerase-I, thymidylate synthase primary tumour expression and clinical efficacy of 5-FU/CPT-11 chemotherapy in advanced colorectal cancer patients." *Int J Cancer* **111**(2): 252-8.
- Park, J., L. Chen, K. Shade, P. Lazarus, J. Seigne, S. Patterson, M. Helal and J. Pow-Sang (2004). "Asp85tyr polymorphism in the udp-glucuronosyltransferase (UGT) 2B15 gene and the risk of prostate cancer." *J Urol* **171**(6 Pt 1): 2484-8.
- Pasche, B., P. Kolachana, K. Nafa, J. Satagopan, Y. G. Chen, R. S. Lo, D. Brener, D. Yang, L. Kirstein, C. Oddoux, H. Ostrer, P. Vineis, L. Varesco, S. Jhanwar, L. Luzzatto, J. Massague and K. Offit (1999). "TbetaR-I(6A) is a candidate tumor susceptibility allele." *Cancer Res* **59**(22): 5678-82.
- Paulsen, M. and A. C. Ferguson-Smith (2001). "DNA methylation in genomic imprinting, development, and disease." *J Pathol* **195**(1): 97-110.
- Pavillard, V., V. Charasson, A. Laroche-Clary, I. Soubeyran and J. Robert (2004). "Cellular parameters predictive of the clinical response of colorectal cancers to irinotecan. A preliminary study." *Anticancer Res* **24**(2B): 579-85.
- Paz, M. F., R. Yaya-Tur, I. Rojas-Marcos, G. Reynes, M. Pollan, L. Aguirre-Cruz, J. L. Garcia-Lopez, J. Piquer, M. J. Safont, C. Balana, M. Sanchez-Cespedes, M. Garcia-Villanueva, L. Arribas and M. Esteller (2004). "CpG island hypermethylation of the DNA repair enzyme methyltransferase predicts response to temozolomide in primary gliomas." *Clin Cancer Res* **10**(15): 4933-8.

- Plumb, J. A., G. Strathdee, J. Sludden, S. B. Kaye and R. Brown (2000). "Reversal of drug resistance in human tumor xenografts by 2'-deoxy-5-azacytidine-induced demethylation of the hMLH1 gene promoter." Cancer Res **60**(21): 6039-44.
- Polakis, P. (2000). "Wnt signaling and cancer." Genes Dev **14**(15): 1837-51.
- Pradhan, S. and P. O. Esteve (2003). "Mammalian DNA (cytosine-5) methyltransferases and their expression." Clin Immunol **109**(1): 6-16.
- Radomska-Pandya, A., P. J. Czernik, J. M. Little, E. Battaglia and P. I. Mackenzie (1999). "Structural and functional studies of UDP-glucuronosyltransferases." Drug Metab Rev **31**(4): 817-99.
- Ramirez, J. L., M. Taron, C. Balana, C. Sarries, P. Mendez, I. de Aguirre, L. Nunez, B. Roig, C. Queralt, M. Botia and R. Rosell (2003). "Serum DNA as a tool for cancer patient management." Rocz Akad Med Bialymst **48**: 34-41.
- Randolph, T. R. (2005). "Chronic myelocytic leukemia--Part I: History, clinical presentation, and molecular biology." Clin Lab Sci **18**(1): 38-48.
- Reid, G. K., J. M. Besterman and A. R. MacLeod (2002). "Selective inhibition of DNA methyltransferase enzymes as a novel strategy for cancer treatment." Curr Opin Mol Ther **4**(2): 130-7.
- Riedy, M., J. Y. Wang, A. P. Miller, A. Buckler, J. Hall and M. Guida (2000). "Genomic organization of the UGT2b gene cluster on human chromosome 4q13." Pharmacogenetics **10**(3): 251-60.
- Riggs, A. D. (2002). "X chromosome inactivation, differentiation, and DNA methylation revisited, with a tribute to Susumu Ohno." Cytogenet Genome Res **99**(1-4): 17-24.
- Robert, M. F., S. Morin, N. Beaulieu, F. Gauthier, I. C. Chute, A. Barsalou and A. R. MacLeod (2003). "DNMT1 is required to maintain CpG methylation and aberrant gene silencing in human cancer cells." Nat Genet **33**(1): 61-5.
- Robertson, K. D. (2002). "DNA methylation and chromatin - unraveling the tangled web." Oncogene **21**(35): 5361-79.
- Robertson, K. D. and P. A. Jones (2000). "DNA methylation: past, present and future directions." Carcinogenesis **21**(3): 461-7.
- Robertson, K. D., E. Uzvolgyi, G. Liang, C. Talmadge, J. Sumegi, F. A. Gonzales and P. A. Jones (1999). "The human DNA methyltransferases (DNMTs) 1, 3a and 3b: coordinate mRNA expression in normal tissues and overexpression in tumors." Nucleic Acids Res **27**(11): 2291-8.
- Rothenberg, M. L. (1998). "Efficacy and toxicity of irinotecan in patients with colorectal cancer." Semin Oncol **25**(5 Suppl 11): 39-46.
- Rouits, E., M. Boisdron-Celle, A. Dumont, O. Guerin, A. Morel and E. Gamelin (2004). "Relevance of different UGT1A1 polymorphisms in irinotecan-induced toxicity: a molecular and clinical study of 75 patients." Clin Cancer Res **10**(15): 5151-9.
- Saito, Y., Y. Kanai, M. Sakamoto, H. Saito, H. Ishii and S. Hirohashi (2001). "Expression of mRNA for DNA methyltransferases and methyl-CpG-binding proteins and DNA methylation status on CpG islands and pericentromeric satellite regions during human hepatocarcinogenesis." Hepatology **33**(3): 561-8.
- Saltz, L. (2000). "Irinotecan-based combinations for the adjuvant treatment of stage III colon cancer." Oncology (Huntingt) **14**(12 Suppl 14): 47-50.
- Saltz, L. B., J. V. Cox, C. Blanke, L. S. Rosen, L. Fehrenbacher, M. J. Moore, J. A. Maroun, S. P. Ackland, P. K. Locker, N. Pirota, G. L. Elfring and L. L. Miller

- (2000). "Irinotecan plus fluorouracil and leucovorin for metastatic colorectal cancer. Irinotecan Study Group." *N Engl J Med* **343**(13): 905-14.
- Saltz, L. B., J. Y. Douillard, N. Pirota, M. Alakl, G. Gruia, L. Awad, G. L. Elfring, P. K. Locker and L. L. Miller (2001). "Irinotecan plus fluorouracil/leucovorin for metastatic colorectal cancer: a new survival standard." *Oncologist* **6**(1): 81-91.
- Sandhu, M. S., R. Luben and K. T. Khaw (2001). "Self reported non-insulin dependent diabetes, family history, and risk of prevalent colorectal cancer: population based, cross sectional study." *J Epidemiol Community Health* **55**(11): 804-5.
- Sanghani, S. P., S. K. Quinney, T. B. Fredenburg, Z. Sun, W. I. Davis, D. J. Murry, O. W. Cummings, D. E. Seitz and W. F. Bosron (2003). "Carboxylesterases expressed in human colon tumor tissue and their role in CPT-11 hydrolysis." *Clin Cancer Res* **9**(13): 4983-91.
- Santini, V., H. M. Kantarjian and J. P. Issa (2001). "Changes in DNA methylation in neoplasia: pathophysiology and therapeutic implications." *Ann Intern Med* **134**(7): 573-86.
- Sasaki, M., M. Kaneuchi, N. Sakuragi and R. Dahiya (2003). "Multiple promoters of catechol-O-methyltransferase gene are selectively inactivated by CpG hypermethylation in endometrial cancer." *Cancer Res* **63**(12): 3101-6.
- Slatter, J. G., L. J. Schaaf, J. P. Sams, K. L. Feenstra, M. G. Johnson, P. A. Bombardt, K. S. Cathcart, M. T. Verburg, L. K. Pearson, L. D. Compton, L. L. Miller, D. S. Baker, C. V. Pesheck and R. S. Lord, 3rd (2000). "Pharmacokinetics, metabolism, and excretion of irinotecan (CPT-11) following I.V. infusion of [(14)C]CPT-11 in cancer patients." *Drug Metab Dispos* **28**(4): 423-33.
- Slattery, M. L., J. D. Potter, D. M. Duncan and T. D. Berry (1997). "Dietary fats and colon cancer: assessment of risk associated with specific fatty acids." *Int J Cancer* **73**(5): 670-7.
- Slattery, M. L., J. D. Potter, K. N. Ma, B. J. Caan, M. Leppert and W. Samowitz (2000). "Western diet, family history of colorectal cancer, NAT2, GSTM-1 and risk of colon cancer." *Cancer Causes Control* **11**(1): 1-8.
- Slattery, M. L., W. Samowitz, K. Ma, M. Murtaugh, C. Sweeney, T. R. Levin and S. Neuhausen (2004). "CYP1A1, cigarette smoking, and colon and rectal cancer." *Am J Epidemiol* **160**(9): 842-52.
- Society, A. C. (2005). *Colorectal Cancer Facts & Figures Special edition 2005*, Atlanta: American Cancer Society.
- Steuber, C. P., J. Krischer, T. Holbrook, B. Camitta, V. Land, C. Sexauer, D. Mahoney and H. Weinstein (1996). "Therapy of refractory or recurrent childhood acute myeloid leukemia using amsacrine and etoposide with or without azacitidine: a Pediatric Oncology Group randomized phase II study." *J Clin Oncol* **14**(5): 1521-5.
- Stoehlmacher, J. and H. J. Lenz (2003). "Implications of genetic testing in the management of colorectal cancer." *Am J Pharmacogenomics* **3**(2): 73-88.
- Strassburg, C. P., M. P. Manns and R. H. Tukey (1998). "Expression of the UDP-glucuronosyltransferase 1A locus in human colon. Identification and characterization of the novel extrahepatic UGT1A8." *J Biol Chem* **273**(15): 8719-26.

- Strassburg, C. P., N. Nguyen, M. P. Manns and R. H. Tukey (1998). "Polymorphic expression of the UDP-glucuronosyltransferase UGT1A gene locus in human gastric epithelium." *Mol Pharmacol* **54**(4): 647-54.
- Strassburg, C. P., N. Nguyen, M. P. Manns and R. H. Tukey (1999). "UDP-glucuronosyltransferase activity in human liver and colon." *Gastroenterology* **116**(1): 149-60.
- Strassburg, C. P., K. Oldhafer, M. P. Manns and R. H. Tukey (1997). "Differential expression of the UGT1A locus in human liver, biliary, and gastric tissue: identification of UGT1A7 and UGT1A10 transcripts in extrahepatic tissue." *Mol Pharmacol* **52**(2): 212-20.
- Strassburg, C. P., A. Vogel, S. Kneip, R. H. Tukey and M. P. Manns (2002). "Polymorphisms of the human UDP-glucuronosyltransferase (UGT) 1A7 gene in colorectal cancer." *Gut* **50**(6): 851-6.
- Suetake, I., F. Shinozaki, J. Miyagawa, H. Takeshima and S. Tajima (2004). "DNMT3L stimulates the DNA methylation activity of Dnmt3a and Dnmt3b through a direct interaction." *J Biol Chem* **279**(26): 27816-23.
- Taback, B. and D. S. Hoon (2004). "Circulating nucleic acids in plasma and serum: past, present and future." *Curr Opin Mol Ther* **6**(3): 273-8.
- Terdiman, J. P., P. G. Conrad and M. H. Sleisenger (1999). "Genetic testing in hereditary colorectal cancer: indications and procedures." *Am J Gastroenterol* **94**(9): 2344-56.
- Toffoli, G. and E. Cecchin (2004). "Uridine diphosphoglucuronosyl transferase and methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms as genomic predictors of toxicity and response to irinotecan-, antifolate- and fluoropyrimidine-based chemotherapy." *J Chemother* **16 Suppl 4**: 31-5.
- Toffoli, G., E. Cecchin, G. Corona and M. Boiocchi (2003). "Pharmacogenetics of irinotecan." *Curr Med Chem Anti-Canc Agents* **3**(3): 225-37.
- Tong, J. K., C. A. Hassig, G. R. Schnitzler, R. E. Kingston and S. L. Schreiber (1998). "Chromatin deacetylation by an ATP-dependent nucleosome remodelling complex." *Nature* **395**(6705): 917-21.
- Toyota, M., F. Itoh and K. Imai (2000). "DNA methylation and gastrointestinal malignancies: functional consequences and clinical implications." *J Gastroenterol* **35**(10): 727-34.
- Tukey, R. H. and C. P. Strassburg (2000). "Human UDP-glucuronosyltransferases: metabolism, expression, and disease." *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **40**: 581-616.
- Tukey, R. H. and C. P. Strassburg (2001). "Genetic multiplicity of the human UDP-glucuronosyltransferases and regulation in the gastrointestinal tract." *Mol Pharmacol* **59**(3): 405-14.
- Turner, F., G. Smith, C. Sachse, T. Lightfoot, R. C. Garner, C. R. Wolf, D. Forman, D. T. Bishop and J. H. Barrett (2004). "Vegetable, fruit and meat consumption and potential risk modifying genes in relation to colorectal cancer." *Int J Cancer* **112**(2): 259-64.
- van den Bosch, J., M. Lubbert, G. Verhoef and P. W. Wijermans (2004). "The effects of 5-aza-2'-deoxycytidine (Decitabine) on the platelet count in patients with intermediate and high-risk myelodysplastic syndromes." *Leuk Res* **28**(8): 785-90.

- Vanhaecke, T., T. Henkens, G. E. Kass and V. Rogiers (2004). "Effect of the histone deacetylase inhibitor trichostatin A on spontaneous apoptosis in various types of adult rat hepatocyte cultures." Biochem Pharmacol **68**(4): 753-60.
- Villeneuve, L., H. Girard, L. C. Fortier, J. F. Gagne and C. Guillemette (2003). "Novel functional polymorphisms in the UGT1A7 and UGT1A9 glucuronidating enzymes in Caucasian and African-American subjects and their impact on the metabolism of 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin and flavopiridol anticancer drugs." J Pharmacol Exp Ther **307**(1): 117-28.
- Vogel, A., J. Ockenga, U. Ehmer, A. Barut, F. J. Kramer, R. H. Tukey, M. P. Manns and C. P. Strassburg (2002). "Polymorphisms of the carcinogen detoxifying UDP-glucuronosyltransferase UGT1A7 in proximal digestive tract cancer." Z Gastroenterol **40**(7): 497-502.
- Wiesner, G. L., D. Daley, S. Lewis, C. Ticknor, P. Platzer, J. Lutterbaugh, M. MacMillen, B. Baliner, J. Willis, R. C. Elston and S. D. Markowitz (2003). "A subset of familial colorectal neoplasia kindreds linked to chromosome 9q22.2-31.2." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(22): 12961-5.
- Wilkes, G. M. (2005). "Therapeutic options in the management of colon cancer: 2005 update." Clin J Oncol Nurs **9**(1): 31-44.
- Willemze, R., S. Suci, E. Archimbaud, P. Muus, P. Stryckmans, E. A. Louwagie, Z. Berneman, M. Tjean, P. Wijermans, H. Dohner, U. Jehn, B. Labar, B. Jaksic, M. Dardenne and R. Zittoun (1997). "A randomized phase II study on the effects of 5-Aza-2'-deoxycytidine combined with either amsacrine or idarubicin in patients with relapsed acute leukemia: an EORTC Leukemia Cooperative Group phase II study (06893)." Leukemia **11 Suppl 1**: S24-7.
- Wu, M. H., B. Yan, R. Humerickhouse and M. E. Dolan (2002). "Irinotecan activation by human carboxylesterases in colorectal adenocarcinoma cells." Clin Cancer Res **8**(8): 2696-700.
- Xu, G., W. Zhang, M. K. Ma and H. L. McLeod (2002). "Human carboxylesterase 2 is commonly expressed in tumor tissue and is correlated with activation of irinotecan." Clin Cancer Res **8**(8): 2605-11.
- Xu, X. L., J. Yu, H. Y. Zhang, M. H. Sun, J. Gu, X. Du, D. R. Shi, P. Wang, Z. H. Yang and J. D. Zhu (2004). "Methylation profile of the promoter CpG islands of 31 genes that may contribute to colorectal carcinogenesis." World J Gastroenterol **10**(23): 3441-54.
- Yang, X., D. L. Phillips, A. T. Ferguson, W. G. Nelson, J. G. Herman and N. E. Davidson (2001). "Synergistic activation of functional estrogen receptor (ER)-alpha by DNA methyltransferase and histone deacetylase inhibition in human ER-alpha-negative breast cancer cells." Cancer Res **61**(19): 7025-9.
- Yokochi, T. and K. D. Robertson (2002). "Preferential methylation of unmethylated DNA by Mammalian de novo DNA methyltransferase Dnmt3a." J Biol Chem **277**(14): 11735-45.
- Yu, F., J. Thiesen and W. H. Stratling (2000). "Histone deacetylase-independent transcriptional repression by methyl-CpG-binding protein 2." Nucleic Acids Res **28**(10): 2201-6.

Yu, J., W. D. Shannon, M. A. Watson and H. L. McLeod (2005). "Gene expression profiling of the irinotecan pathway in colorectal cancer." Clin Cancer Res **11**(5): 2053-62.