

Des outils chimiques pour reprogrammer les cellules tumorales

Paola Arimondo est directrice de recherche au Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) au laboratoire EpiChBio de l'Institut Pasteur.

L'objectif de ce chapitre est de présenter le développement de nouveaux outils chimiques capables de reprogrammer les cellules cancéreuses (**Figure 1**).

Dans le domaine de la chimie biologique (« chemobiologie »), le développement des outils chimiques a deux objectifs (**Figure 2**) :

- trouver des sondes pour identifier et comprendre les mécanismes biologiques aberrants intervenant dans les pathologies comme le cancer ;
- moduler ces processus biologiques par des outils chimiques en vue d'en faire des outils thérapeutiques.

Nos recherches dans ce domaine ont commencé au Muséum National d'Histoire Naturelle, pour continuer en 2011 avec la création du

laboratoire mixte entre le CNRS et Pierre Fabre (**Figure 3**), dédié, côté recherche, à l'épigénétique¹ du cancer (ETaC, « *Epigenetic Targeting of Cancer* ») et situé sur l'Oncopôle de Toulouse dans le Centre de recherche Pierre Fabre.

1 Le ciblage chimique des cancers

Pour les chimistes, trois principaux gènes sont ciblés pour traiter les cancers (**Figure 4**) :

- les *oncogènes*², qui sont les accélérateurs des cellules

1. Épigénétique : étude des changements dans l'activité des gènes n'impliquant pas de modification de la séquence d'ADN et pouvant être transmis lors des divisions cellulaires.

2. Oncogène : qui favorise le développement des tumeurs.

Figure 1

Les « epidrugs », des outils chimiques pour reprogrammer les cellules tumorales ?

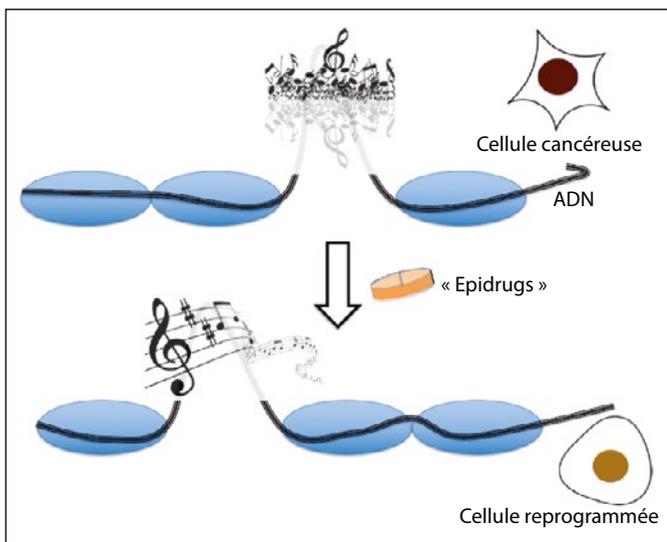


Figure 2

Le développement d'outils chimiques a deux buts : sonder et moduler les processus biologiques.

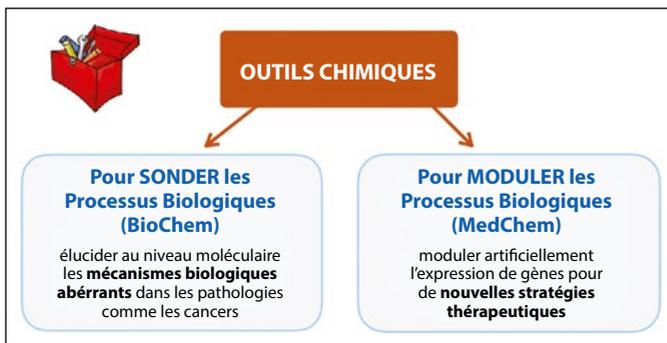


Figure 3

Le laboratoire ETaC situé sur l'Oncopôle de Toulouse.

en 2011 ...

ETaC
 Epigenetic Targeting of Cancer
 créé en 2011, 38 membres

Oncopôle, Toulouse

ONCOPÔLE
 TOLOUSE FRANCE



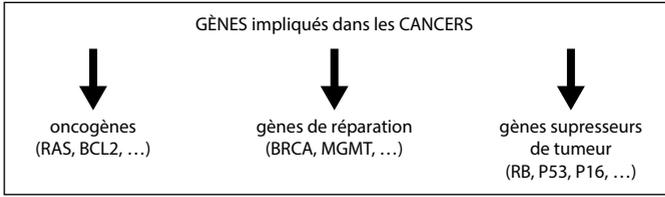


Figure 4

Trois principaux types de gènes impliqués dans les cancers.

tumorales³ induisant une prolifération non contrôlée ;

- les *gènes de réparation*, qui sont les mécaniciens de la cellule ; une cellule tumorale a des mauvais techniciens ;
- les gènes suppresseurs de tumeurs, qui sont les freins et normalement contrôlent la cellule. Une cellule cancéreuse n'utilise plus les freins et, comme une voiture sans freins, prolifère de façon incontrôlée.

Les stratégies anticancéreuses actuelles visent donc plusieurs objectifs possibles :

- inactiver les oncogènes, donc faire en sorte que les cellules cancéreuses ne prolifèrent plus de façon aberrante ;
- restaurer les mécaniciens, ou complètement les éliminer car si on les élimine les cellules meurent ;
- réactiver les gènes suppresseurs de tumeur : quand la cellule réacquiert les freins, elle est à nouveau capable de s'arrêter et retrouve son contrôle pour induire la mort cellulaire.

Nous nous sommes d'abord intéressés aux topoisomérases⁴ d'ADN afin d'inactiver les oncogènes, et plus récemment nous nous intéressons à la méthylation⁵ de l'ADN pour

3. Cellule tumorale : cellule se multipliant de manière anarchique.
 4. Topoisomérase : enzyme qui régule l'enroulement des molécules d'ADN.
 5. Méthylation : modification chimique consistant en l'ajout d'un groupe méthyle (-CH₃) sur un substrat.

réactiver les freins de la cellule, à savoir les gènes suppresseurs de tumeurs.

2 De la génétique à l'épigénétique

La méthylation de l'ADN fait partie de l'épigénétique. Étymologiquement épigénétique veut dire « sur la génétique ». Cette discipline a pris de l'essor depuis le séquençage⁶ du génome humain en 2001. On pensait alors que la génétique pourrait expliquer beaucoup de choses (**Figure 5**), en particulier dans les pathologies comme les cancers, et permettre de trouver ainsi de nouvelles thérapies. Le séquençage est important car il a ouvert la médecine personnalisée.

Mais il est très vite apparu que les séquençages du génome

6. Séquençage : le séquençage de l'ADN consiste à déterminer l'ordre d'enchaînement des nucléotides pour un fragment d'ADN donné.

Figure 5

Couvertures des revues scientifiques, *Nature* et *Science*, datant de 2001, illustrant l'importance du séquençage du génome humain.



n'expliquent pas tout. Ils n'expliquent notamment pas d'où vient la diversité et comment notre cellule intègre l'impact de l'environnement (Figure 6).

Toutes les cellules de notre corps ont reçu le même ADN, la même séquence ; c'est comme un manuel d'instruction où les mots seraient les bases de l'ADN. Mais une cellule du foie est très différente d'une cellule neuronale ; ces deux cellules utilisent le

même manuel, mais ne lisent pas les mêmes chapitres : chacune ne lit que 2 à 5 % de ce manuel d'instruction. Ainsi une cellule neuronale lit un chapitre différent de celui lu par la cellule du foie. L'épigénétique met un masque sur certains chapitres et participe à dire à la cellule quel chapitre elle doit lire.

2.1. L'épigénétique

Les modifications épigénétiques sont des modifications chimiques, soit de l'ADN, soit des histones⁷, protéines autour desquelles l'ADN (représentée par les fils bleus sur la Figure 7), est enroulée pour former la structure de base de la chromatine, le nucléosome⁸. En fonction de ces modifications chimiques, soit la chromatine peut être fermée, et on ne peut pas lire la séquence de base dans l'ADN, donc on ne peut pas lire le manuel d'instruction, soit elle peut être ouverte.

7. Histones : protéines basiques s'associant à l'ADN pour former la structure de base de la chromatine. Les histones jouent un rôle important dans l'empaquetage et le repliement de l'ADN.

Le génome humain est séquencé : mais d'où vient la diversité et la réponse à l'environnement?

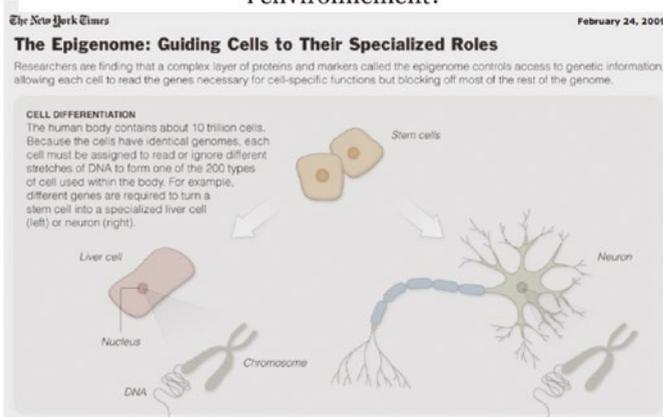
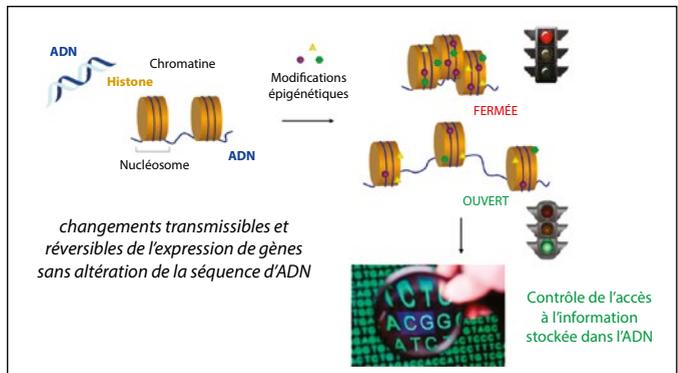


Figure 6

Article du New York Times sur la différenciation cellulaire, datant de 2009, illustrant la découverte de l'épigénome.

Figure 7

Schéma de l'impact des modifications épigénétiques sur l'ADN et les histones (les modifications chimiques de l'ADN et des histones sont réversibles). En fonction des modifications des histones et de la méthylation de l'ADN, les gènes présents sur cette partie de l'ADN peuvent être mis sous silence ou exprimés.



Ces modifications chimiques contrôlent en fait l'accès à l'information stockée dans l'ADN. Ce qui est encore plus intéressant est que ces modifications chimiques sont réversibles.

2.2. Épigénétique et environnement

Les modifications épigénétiques sont induites par l'environnement au sens large : la cellule reçoit en permanence toutes sortes de signaux l'informant sur son environnement, de manière à ce qu'elle se spécialise au cours de son développement ou ajuste son activité à la situation. Ces signaux, y compris ceux liés à nos comportements (alimentation, tabagisme, stress...), peuvent conduire à des modifications dans l'expression de nos gènes, sans affecter leur séquence. Le phénomène peut être transitoire, mais il existe des modifications épigénétiques pérennes, qui persistent lorsque le signal qui les a induites disparaît.

Concrètement, ces modifications sont matérialisées par des marques biochimiques, apposées par des enzymes spécialisées sur l'ADN ou sur les histones. Les marques les mieux caractérisées sont les groupements méthyle (-CH₃) apposés sur l'ADN, ainsi que diverses modifications chimiques des histones (méthylation, acétylation...).

Pour qu'un gène conduise à la synthèse d'une molécule, il doit être lisible, c'est-à-dire accessible à différents complexes protéiques intervenant dans ce processus. Les marques de méthylation localisées sur l'ADN vont le

plus souvent obstruer les aires d'arrivée de ces complexes protéiques, conduisant ainsi à l'inactivation des gènes concernés. Les marques apposées sur les histones modifient quant à elles l'état de compactage de la molécule d'ADN, favorisant ou au contraire limitant l'accessibilité aux gènes.

Des modifications chimiques différentes permettent ainsi de changer un phénotype⁸, puisque qu'à partir d'un seul génome, d'un seul manuel d'instruction, on peut aboutir à des phénotypes différents (Figure 8A), avec plein d'épigénomes⁹ différents.

8. Phénotype : ensemble des caractères apparents d'un individu.

9. Épigenome : état épigénétique de la cellule.

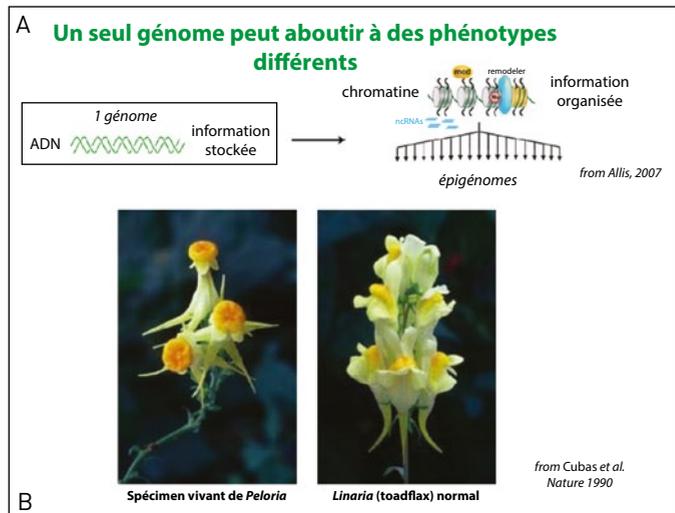


Figure 8

A) Différents épigénomes peuvent être obtenus à partir d'un seul génome, simplement à cause de ces modifications épigénétiques ; B) différents épigénomes de la *Linaria* : les deux fleurs de *Linaria* ont des aspects très différents à cause d'une différence de méthylation de l'ADN selon la température de croissance.

Source : Cubas P., Vincent C., Coen E. (1999). An epigenetic mutation responsible for natural variation in floral symmetry, *Nature*, 401 : 157-161.

Un bon exemple est la fleur Péloria (**Figure 8B**), qui présente deux aspects très différents selon sa température de croissance, si elle est cultivée dans le nord ou dans le sud de l'Europe. Juste avant les années 2000, on s'est aperçu que cette différence n'était pas génétique, mais liée à une différence de méthylation de l'ADN qui conduit à deux phénotypes différents, donc à deux fleurs très différentes.

Un autre exemple est celui des jumeaux monozygotes (**Figure 9**). Ces jumeaux

naissent de la même cellule, ils ont le même ADN, mais quand ils grandissent, l'un peut développer une maladie, pas l'autre, l'un peut devenir chauve, pas l'autre, etc.

Une équipe espagnole a étudié les différences épigénétiques des jumeaux monozygotes et a montré en 2005, à partir de marqueurs épigénétiques, qu'il y avait une différence au niveau de l'épigénome, alors qu'il n'y avait pas de différences majeures au niveau du génome (**Figure 10**). Ils ont étudié, entre trois et cinquante ans, la méthylation de l'ADN

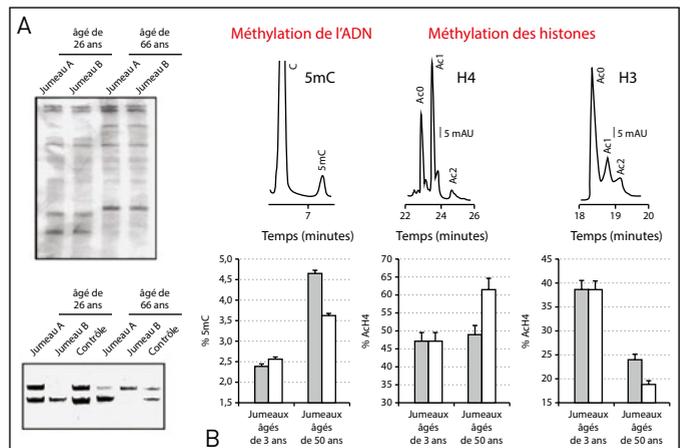
Figure 9

Des modifications génétiques sont observées durant la vie des jumeaux.



Figure 10

Différences épigénétiques dans les jumeaux monozygotes : A) résultats mettant en évidence une grande similarité entre les génomes de deux jumeaux homozygotes ; B) quantification de certains marqueurs épigénétiques entre deux jumeaux homozygotes à trois et à cinquante ans. La différenciation de ces marqueurs est de plus en plus significative au cours du temps.



et l'acétylation des histones (**Figure 10C**) de ces jumeaux. On peut voir, pour la méthylation de l'ADN, qu'à trois ans il n'y a pas encore beaucoup de différences, mais qu'il y a en revanche une énorme différence à cinquante ans. Il en est de même pour la méthylation des histones.

Ces deux modifications chimiques épigénétiques apparaissent donc avec l'âge. Plus les modes de vie sont différents (l'un vit à la ville, l'autre à la campagne, l'un fume et l'autre pas), plus ces modifications sont différentes.

Ainsi l'épigénétique intègre l'impact de l'environnement.

2.3. Épigénétique et plasticité cellulaire

L'épigénétique confère une plasticité cellulaire. Par exemple chez les abeilles, l'abeille reine (**Figure 11**) est plus grande, c'est la seule qui est capable de pondre, et elle mange la gelée royale. Un groupe de recherche australien a montré que la méthylation de l'ADN de la reine est différente.

Par des techniques dites d'ARN interférence, les chercheurs ont inhibé l'enzyme, responsable de la méthylation, la Dnmt3, et ont transformé des ouvrières en reines, et crée ainsi beaucoup plus de reines.

Mais l'épigénétique n'explique pas tout parce que ces nouvelles reines ne sont pas des vraies reines : il y a donc tout de même autre chose... Cette expérience montre néanmoins qu'on peut changer un

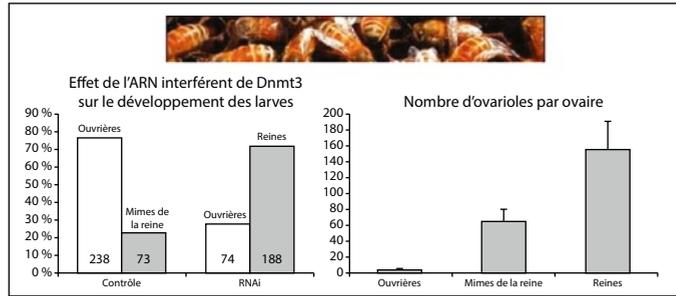


Figure 11

Résultats de l'inhibition de la Dnmt3 par ARN interférents chez les abeilles. Lorsque la Dnmt3 est inhibée, les abeilles ouvrières développent certaines caractéristiques habituellement réservées aux reines.

Source : Castillo-Aguilera O. (2017). *Biomolécules*, 7 : 3.

phénotype juste en inhibant la méthylation de l'ADN.

2.4. Epigénétique et cancer

De nombreux processus deviennent aberrants dans une cellule cancéreuse (**Figure 12**). Une cellule cancéreuse est capable d'échapper aux signaux d'arrêts, elle augmente sa vascularisation pour avoir plus d'oxygène et de nutriments parce qu'elle prolifère plus, elle devient invasive, agressive, immortelle, elle échappe à la réponse immunitaire¹⁰.

Les stratégies actuelles par les thérapies ciblées¹¹ visent une de ces cascades, mais

10. Réponse immunitaire : ensemble des mécanismes permettant à un organisme de se défendre contre une substance étrangère (antigène) menaçant son intégrité.

11. Thérapie ciblée : utilisation à un médicament sélectif qui s'attaque, dans le cas du cancer, aux cellules cancéreuses en repérant chez elles une cible précise (récepteur, gène ou protéine) et en épargnant au maximum les cellules saines.

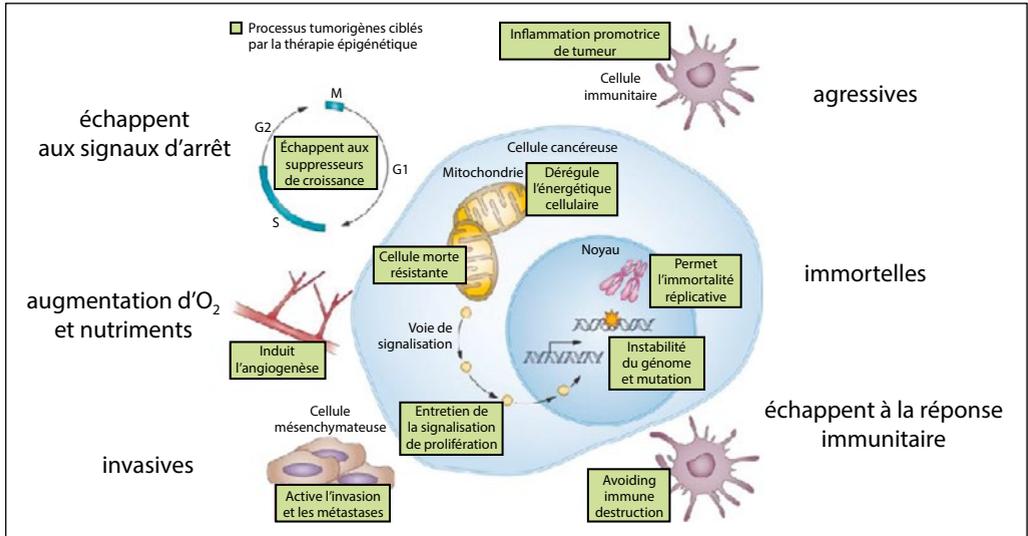


Figure 12

Processus aberrants dans une cellule cancéreuse : le rôle de la régulation épigénétique.

Source : adapté de Baylin S. B. (2013). *Nature Reviews Clinical Oncology*, 10 : 256-266.

pas toutes. On sait maintenant que l'épigénétique est impliquée dans toutes ces caractéristiques de la cellule cancéreuse, on décide donc de cibler chimiquement les acteurs épigénétiques.

Trois catégories des protéines impliquées sont ciblées (Figure 13) :

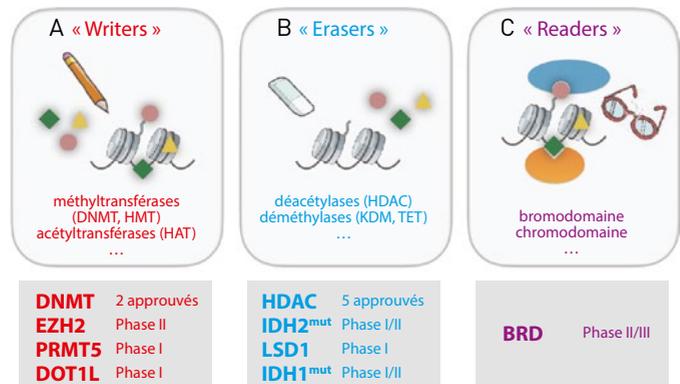
- les protéines « writer », qui ajoutent un groupement

chimique bloquant l'information, comme les méthyltransférases, qui transfèrent un méthyle (-CH₃), et les acétyltransférases, qui transfèrent un acétyle (CH₃CO-). Deux molécules sont approuvées contre les méthyltransférases d'ADN et plusieurs autres sont en phase d'essai clinique contre les histones ;

Figure 13

A) « Writers », protéines permettant d'ajouter un groupement chimique dans les processus épigénétiques ;
 B) « Erasers », protéines permettant d'enlever un groupement chimique ;
 C) « Readers », protéines permettant de lire un groupement chimique dans les processus épigénétiques.

En bas sont représentées les molécules actives actuellement sur le marché ou en essais cliniques ayant un impact sur ces protéines.



– les protéines « effaceurs », qui enlèvent un groupement chimique, les désacétylases d’histones, les HDAC et les diméthylases sont très connues ; cinq molécules sont aujourd’hui approuvées en clinique ;

– les protéines « readers » peuvent lire les modifications chimiques et transmettre le signal à la cellule. Les bromodomains, par exemple, sont de petites molécules qui ciblent ces readers. Des bromodomains de groupements acétyles sont aujourd’hui en phase II et III pour les cancers. Les épi-drugs utilisées dans les recherches cliniques ont pour but de reprogrammer globalement la cellule cancéreuse (Figure 14) et d’agir sur toutes ses caractéristiques

pour qu’elle devienne moins invasive, moins agressive, chimiosensible et immuno-sensible, et qu’elle soit à nouveau capable de mourir.

2.4. Exemple de la méthylation de l’ADN

La méthylation de l’ADN correspond à l’ajout d’un groupement méthyle sur le carbone 5 des résidus cytosines de l’ADN principalement au niveau de dinucléotides CpG (cytosine-phosphate-guanine) (Figure 15). Les dinucléotides CpG se regroupent en régions riches en CpG ; ce sont les îlots CpG (Figure 16). Cette modification chimique est catalysée par des enzymes, les méthyltransférases d’ADN ou DNMT, à partir d’un donneur de méthyle, la

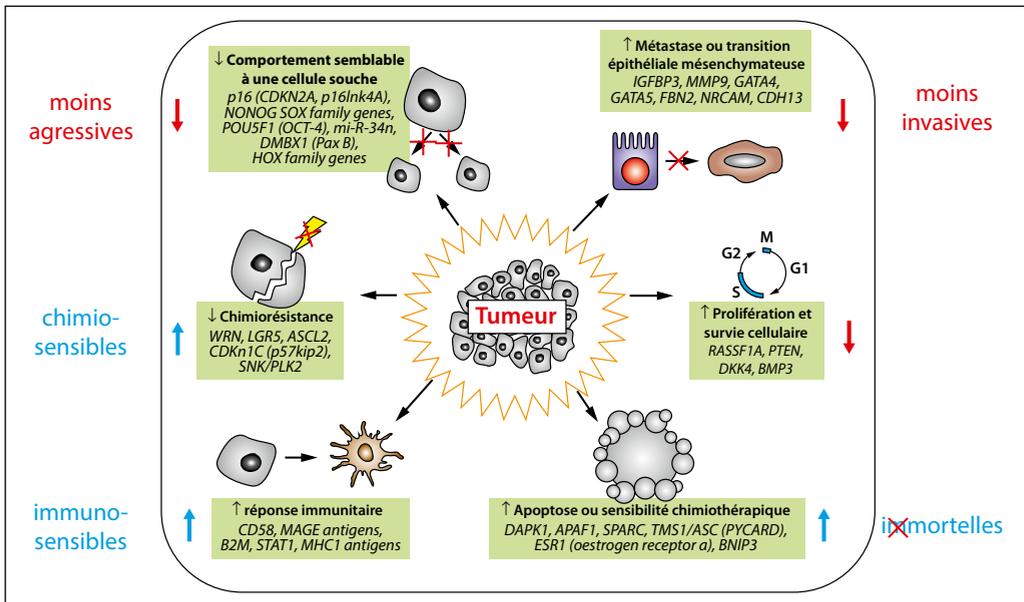


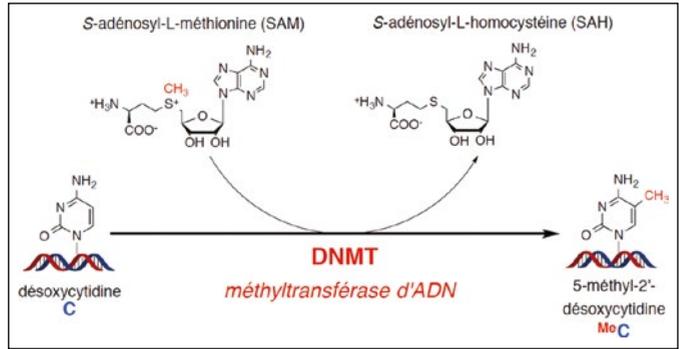
Figure 14

Les « epi-drugs » : un moyen de reprogrammer les cellules cancéreuses et de changer leurs caractéristiques. Il est possible de les rendre moins invasives, moins agressives, plus chimiosensibles, immuno sensibles et mortelles.

Source : adapté de Baylin S. B. (2013). *Nature Reviews Clinical Oncology*, 10 : 256-266.

Figure 15

Réaction de méthylation (ajout d'un groupe CH_3) de l'ADN catalysée par les DNMT.



S-adenosyl-L-méthionine (SAM).

Ces groupements méthyle forment ainsi un revêtement moléculaire, variable d'un gène à l'autre, d'un type cellulaire à un autre, et confèrent un caractère unique et transmissible à l'ADN. La structure moléculaire de l'ADN a donc sa composante génétique, qui est la même dans toutes les cellules, et sa composante épigénétique est variable suivant les types cellulaires.

Des changements épigénétiques majeurs sont associés à la cancérogenèse, notamment des méthylation aberrantes

de l'ADN (Figure 16). Si les îlots CpG sont fortement méthylés dans les régions promotrices de gènes, la méthylation inhibe leur expression. Le gène correspondant est éteint, c'est un cache qui ne permet plus de lire l'information.

En fait, les cancers utilisent ce mécanisme pour éteindre les gènes suppresseurs de tumeurs, qui sont les freins de la cellule. L'objectif a donc été d'inhiber l'enzyme responsable de la méthylation, la DNMT, pour déméthiler les promoteurs de gènes et ainsi réactiver les gènes

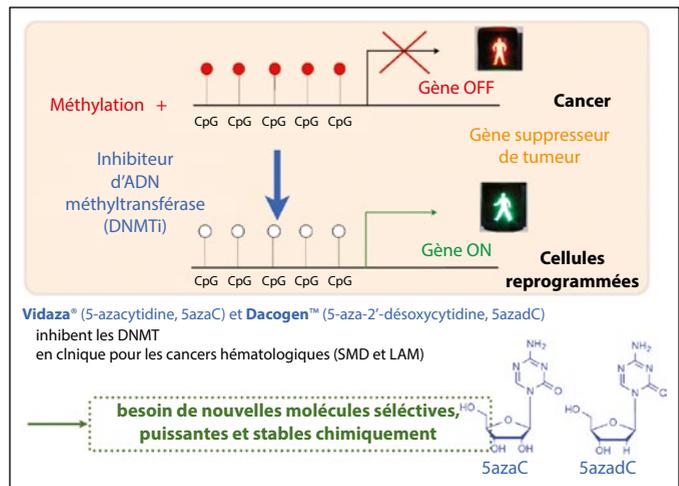


Figure 16

A) Influence de la méthylation de l'ADN des îlots CpG dans l'expression des gènes et stratégie anticancéreuse ; B) deux molécules approuvées pour traiter des cancers du sang.

suppresseurs de tumeurs, afin que la cellule cancéreuse récupère ses freins, et donc, comme une voiture, son contrôle. Deux molécules sont déjà approuvées (**Figure 16B**), la 5-azacytidine et la 5-aza-2'-désoxycytidine, qui inhibent la DNMT pour traiter des cancers du sang.

3 Nouvelles pistes de recherche de thérapie épigénétique

Quatre stratégies de synthèse chimique classique de la chimie médicinale ont été mises en œuvre pour trouver de nouvelles molécules, chimiquement stables, inhibitrices de DNMT :

- la pharmacomodulation d'inhibiteurs déjà existants ;
- la synthèse de conjugués inhibiteurs (ligand de l'ADN) ;
- l'approche bisubstrat ;
- mise au point des tests de criblage pour cribler de grands nombres de molécules

des chimiothèques¹² et des extractothèques¹³ de produits naturels.

3.1. La pharmacomodulation

La pharmacomodulation est une modification structurale permettant d'optimiser l'activité pharmacologique ou de modifier les propriétés physico-chimiques d'une molécule. La **Figure 17** représente la poche catalytique¹⁴ de l'enzyme ciblée (DNMT). Elle contient deux substrats : en orange, le SAM, qui, nous l'avons vu sur la **Figure 15**, donne le groupement méthyle à la cytidine (représentée en vert, sortie de la double-hélice d'ADN).

12. Chimiothèque : banque de données de molécules.
 13. Extractothèque : banque de données d'extrait naturels.
 14. Catalytique : se dit d'une substance qui augmente la vitesse d'une réaction chimique, sans apparaître dans le bilan réactionnel.

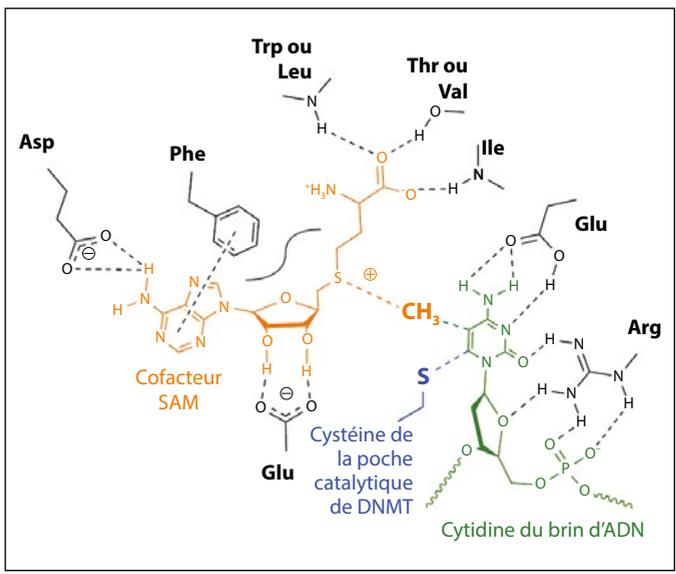


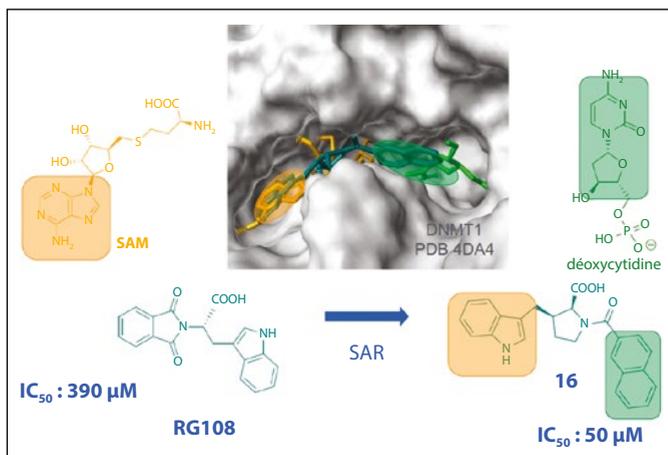
Figure 17

Site catalytique de la DNMT.

Figure 18

Modification de la RG108 dans le but d'en améliorer les propriétés. On modélise la poche catalytique de l'enzyme DNMT1.

Source : Asgatay J. (2015). *Med Chem.*



Pour synthétiser des analogues de SAM, l'équipe de recherche en collaboration avec le Dr Dominique Guianvarc'h (Sorbonne Université) a travaillé sur un composé de base appelé RG 108 (Figure 18), qui était décrit dans la littérature scientifique. La poche catalytique de l'enzyme DNMT1 a été modélisée. Le SAM (qui donne le groupement méthyle) et la cytidine (qui reçoit le groupement méthyle) y ont été positionnés. On y accroche ensuite la molécule RG108 (à la place de SAM), et il apparaît qu'elle n'occupe pas toute la poche. Donc il faut faire grossir la molécule pour occuper toute la place disponible et obtenir ainsi un composé dix fois plus efficace.

D'autres modifications chimiques basées sur la même stratégie ont été apportées pour récupérer à la fois l'interaction et l'affinité.

Simultanément l'équipe du Professeur Antonello Mai (La Sapienza, Rome) a appliqué une autre stratégie de chimie médicinale à partir d'un composé connu lui aussi dans la littérature, le

SGI 1027 (Figure 19). Celui-ci est découpé en quatre morceaux qui sont recombinaison de façon différente, de manière à optimiser l'efficacité de la molécule : c'est la version méta-méta qui est la plus puissante comparée aux autres combinaisons et à la version para-para de départ.

Des tests enzymatiques ont été mis au point pour comprendre le mode d'action de ces molécules, et l'interaction de SAM avec l'ADN a été mise en évidence. La température de décomposition de l'enzyme DNMT1 diminue quand elle interagit avec une autre molécule (Figure 20A) : donc le composé formé déstabilise la protéine. Quand on a l'inhibiteur DNMT1 (en rouge sur la Figure 20B) qui se fixe à l'ADN, il décroche le complexe DNMT, ADN et SAM, et il n'y a plus de méthylation.

3.2. L'approche bisubstrats

La poche de l'enzyme est représentée à gauche de la Figure 21, avec les deux substrats : les SAM (en rouge) et la cytidine (en bleu), qui va recevoir le

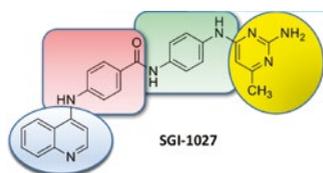


Figure 19

Pharmacomodulation du SGI 1027 : découpage.

Source : adapté de Valente. (2015), *J. Med Chem.*

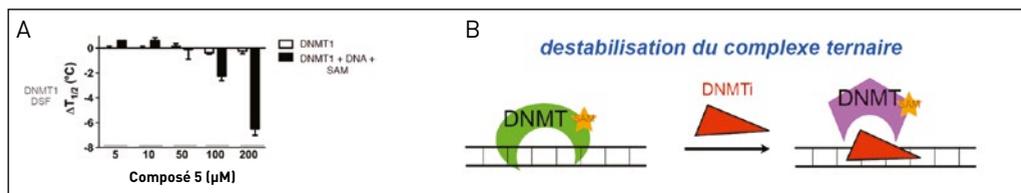


Figure 20

A) Température de désagrégation de l'enzyme DNMT1 en fonction de la concentration de différents composés avec lesquels elle interagit ; B) mécanisme d'action d'un inhibiteur de la DNMT.

Source : adapté de Gros et coll.(2014). *J. biol. Chem.*

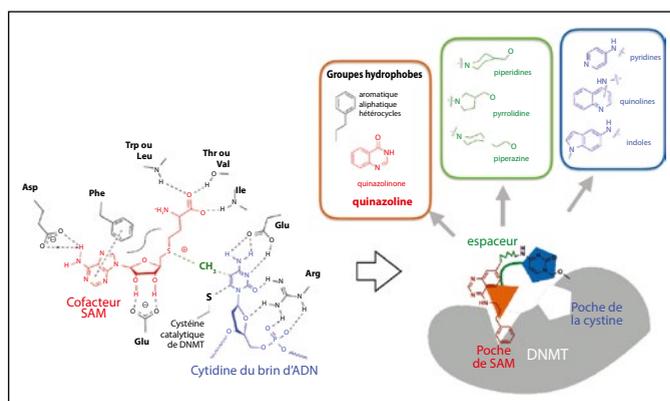


Figure 21

Représentation de la poche catalytique de l'enzyme et des différents groupes fonctionnels des composés ciblés. Différents composés hydrophobes, cycles aromatiques et liens ont été testés.

groupement méthyle (en vert). Dans cette approche, l'équipe de recherche a synthétisé des analogues du SAM et des analogues de la cytidine, qui ont été couplés de façon covalente : des centaines de dérivés ont ainsi été réalisés (schéma de droite).

La **Figure 22** est une modélisation de sites catalytiques de l'enzyme. On voit que l'inhibiteur de DNMT de type bisubstrat (en jaune) occupe bien les deux poches de deux substrats. Ces composés ont une bonne activité et certains sont spécifiques de la DNMT3 ou de la DNMT1, ce qui est très utile parce qu'aujourd'hui, les biologistes ne savent pas que ces deux enzymes sont

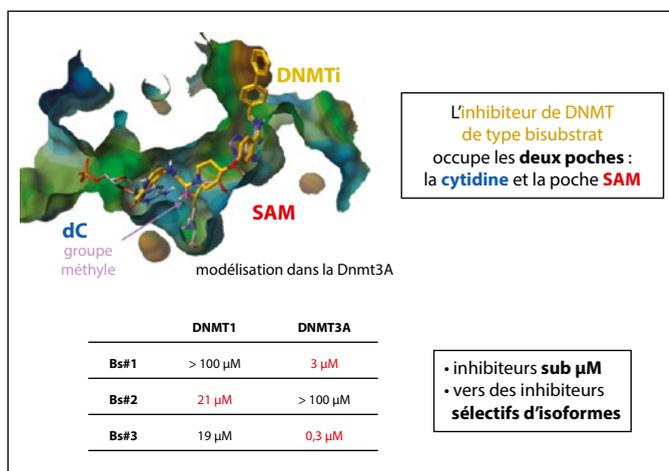


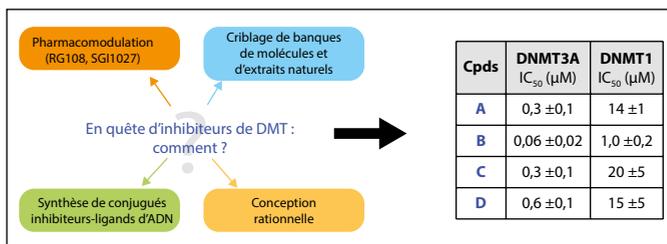
Figure 22

Modélisation des sites catalytiques de la Dnmt3A avec un inhibiteur de DNMT de type bisubstrat. Tableau de comparaison des concentrations efficaces d'inhibiteurs de DNMT.

Source : adapté de Halby et coll. (2017). *J. Med. Chem.*

Figure 23

IC₅₀ de quatre composés inhibiteurs des DNMT.



impliquées dans les cancers. Ces outils peuvent donc aider à comprendre cela.

La **Figure 23** montre que nous disposons aujourd'hui de quatre familles d'inhibiteurs, de l'ordre du submicromolaire pour la DNMT3 et micromolaire pour la DNMT1 3.1

4 Activité cellulaire et nouveaux concepts en pharmacologie

Les nouveaux objectifs sont non pas de tuer la cellule cancéreuse mais de lui remettre des freins, de la reprogrammer : il faut donc définir des doses de traitement qui ne soient pas cytotoxiques¹⁵ mais épigénétiques. Il faut aussi définir la durée du traitement pour que les cellules soient reprogrammées et pouvoir tester leur comportement ultérieur.

4.1. Reprogrammation des cellules cancéreuses

4.1.1. L'inhibition de l'enzyme DNMT par déméthylation passive. Un exemple : la réplication

Le principe est schématisé sur la **Figure 24** : à gauche, la double hélice d'ADN a été méthylée (point rouges). Si

on inhibe la méthylation, lors de la réplication de l'ADN on ne perd qu'une moitié de la méthylation, donc on n'est pas très efficace. Il faudra donc attendre plusieurs cycles de réplication pour démétyler efficacement.

Des cellules du cancer du côlon ont ainsi été traitées durant vingt-et-un jours, et l'on suit la déméthylation du gène suppresseur de tumeur P16 qui avait été méthylé (**Figure 25A**) en présence de quatre familles d'inhibiteur de DNMT. La comparaison est réalisée par rapport à la molécule approuvée, la 5-azadésoxycytidine (5azadC), qui diminue bien la méthylation de l'ADN. Ce composé n'est pas cytotoxique à la dose de 100 nM, et il inhibe la méthylation dès trois jours de traitement.

L'objectif une fois l'inhibition réalisée est de démétyler les freins, les promoteurs, pour les réactiver. Les gènes peuvent être réactivés : après sept jours de traitement, on retrouve les gènes déméthylés. Les quatre familles d'inhibiteurs testées sont toutes capables de démétyler et réactiver le gène suppresseur de tumeur P16 dans la lignée cellulaire de cancer de côlon (**Figure 25**).

Les nouveaux outils chimiques capables de démétyler des

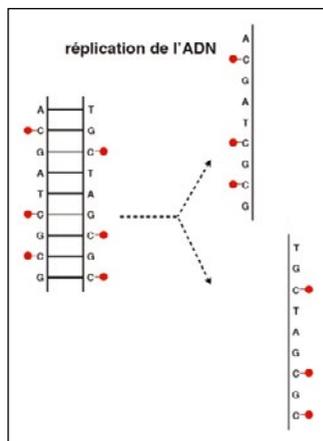


Figure 24

Exemple de déméthylation passive : inhiber la méthylation lors de la réplication de l'ADN.

15. Cytotoxique : toxique pour une espèce de cellule.

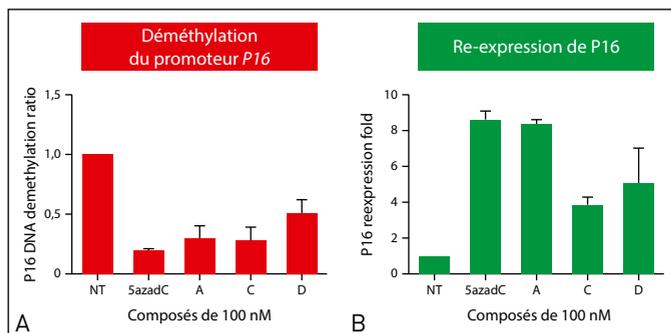


Figure 25

Déméthylation et réexpression du gène P16 dans la lignée cellulaire de cancer de côlon : A) déméthylation du promoteur de P16 pour quatre familles d'inhibiteurs ; B) réexpression du gène P16 pour quatre familles d'inhibiteurs.

promoteurs de gènes, dans ce cas des gènes suppresseurs de tumeurs, et de les réactiver, existent et sont capables d'avoir un effet sur les cellules tumorales. Des améliorations sont encore nécessaires en vue d'augmenter leur efficacité comparée à celle la 5-azadésoxycytidine (5azadC), connue dans la littérature. Le traitement est de sept à dix jours car on agit par la déméthylation passive.

Les quatre stratégies chimiques présentées peuvent être généralisées à toutes les méthyltransférases, en particulier la stratégie bisubstrat, qui consiste à créer des analogues du substrat SAM et du substrat qui est méthylé. Cette stratégie a été appliquée à des histones méthyltransférases, les PRMT (Figure 26). Différents dérivés mimant les SAM et

la cytosine ont été synthétisés soit en gardant des groupements chimiques (ici des acides aminés), soit en les enlevant, soit en changeant les points d'attachement de la position 5 à la position 6. Mais tous sont inactifs.

Des études sont en cours à partir d'un dérivé qui est un inhibiteur d'une histone méthyltransférase, la PRMT4 (Figure 26). Ainsi dans les cristaux de PRMT4 (collaboration avec le Professeur Jean Cavarelli, de l'Institut de génétique et de biologie moléculaire et cellulaire, Strasbourg), se trouvent quatre unités d'enzyme, dont fait partie l'inhibiteur. C'est un inhibiteur bisubstrats qui occupe les deux poches, celle du SAM et celle de l'arginine. Il sera testé sur beaucoup d'autres familles de méthyltransférases.

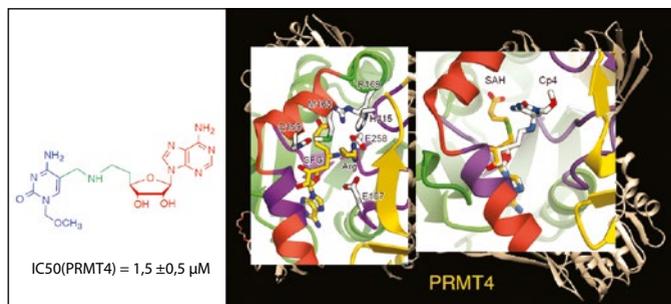


Figure 26

A) Structure tridimensionnelle de la PRMT4 ; B) formule de la PRMT4.

Source : adapté de Halby et coll. (2018). *Philosophical Transaction B*.