REGULATION EPIGENETIQUE DANS LES GLIOBLASTOMES

Véronique QUILLIEN

Département de biologie – Centre Régional de Lutte Contre le Cancer Eugène Marquis – Rennes – France.

La régulation épigénétique consiste en des modifications de l'expression des gènes qui ne sont pas liées à des changements de séquence de l'ADN et qui sont transmissibles. Ce mécanisme de régulation est notamment utilisé par les cellules lors des processus de développement ; il pourrait aussi intervenir dans les mécanismes régulant la longévité cellulaire. Il est maintenant bien établi que la cellule tumorale peut détourner à son profit cette régulation épigénétique. Les glioblastomes, ou astrocytomes de grade IV n'échappent pas à cette règle : de nombreux gènes, impliqués dans les principales voies dérégulées lors du processus tumoral subissent des modifications épigénétiques.

Le mécanisme épigénétique le plus étudié à l'heure actuelle est la méthylation de l'ADN. Trois enzymes DNA methyl-transférases (DNMT3A, DNMT3B et DNMT1) sont impliquées dans le transfert de groupements methyl au niveau des cytosines de l'ADN qui précèdent des guanines (dinucléotides CpGs). Les régions promotrices des gènes contiennent des zones riches en CpGs, qui sont généralement non méthylés dans les cellules normales. Dans les cellules cancéreuses l'hyperméthylation au niveau de promoteurs codant pour des gènes suppresseurs de tumeur est un mécanisme fréquent. Cette hyperméthylation, en coopération avec des modifications au niveau des histones (protéines autour desquelles est enroulée l'ADN) entraine généralement une absence de transcription du gène. Les histones peuvent subir différentes modifications au niveau de leurs résidus lysine, dont des acétylations et méthylations qui vont conditionner le degré de condensation de l'ADN (état condensé, pas de transcription possible et vice versa). Des phénomènes d'hypométhylation sont également

observés dans les cancers. Ceux-ci peuvent entrainer la ré-expression de gènes embryonnaires normalement méthylés chez l'adulte, tels les gènes de type CT (Cancer Testis). Ils peuvent aussi être à l'origine d'une instabilité génomique accrue et d'une activation ou ré-activation d'oncogènes.

La recherche des modifications épigénétiques peut se faire à priori, en étudiant par exemple la méthylation du promoteur de gènes ayant un rôle connu dans les processus tumoraux. Une autre approche consiste à étudier des gènes situés dans des zones fréquemment délétées (telles 6q, 9p, 10p, 13q, 14q, 15q, 17p, 18q, 19q, 22q et Y dans les GBMs) ; selon l'hypothèse d'une extinction génique impliquant une perte d'un allèle par délétion et la non expression du second allèle par méthylation. Une stratégie consiste par exemple à sélectionner des gènes dont l'expression est plus faible que celle attendue par l'analyse du nombre de copies des gènes et qui sont situés dans des zones de perte d'hétérozygotie (1). Il semble cependant que la majorité des zones méthylées ne soient pas situées dans des zones de délétion allélique (2), d'où l'intérêt de techniques moins restrictives comme le traitement de lignées cellulaires (lignées primaires issues de GBM ou lignées établies) par des agents pharmacologiques de déméthylation et/ou de deacetylation des histones (3-5). Il est également possible d'inhiber spécifiquement les DNMT1 et 3a, dont l'expression est augmentée dans les GBMs, par des siRNA (6). Une analyse globale de l'expression des gènes avant et après traitement, couplée à une analyse d'expression dans des cerveaux non tumoraux, permet de sélectionner les gènes dont l'expression est perdue dans les tumeurs et qui sont de nouveau exprimés suite au traitement. La méthylation du promoteur des gènes candidats doit ensuite être établie; la ré-expression pouvant provenir d'un mécanisme de régulation indirecte. La phase ultime consiste en la mise en évidence du phénomène épigénétique directement au niveau des tumeurs, afin d'exclure tout artéfact dû à la culture. Pour certains gènes il est possible d'observer une méthylation du promoteur dans les lignées, avec extinction génique, et re-

expression du gène après traitement, mais maintien de l'hyperméthylation au niveau du promoteur, signant des régulations au niveau des histones. L'adage « méthylation du promoteur = extinction génique » n'est donc pas toujours vérifié, du moins dans ces modèles de culture (5, 6). Dernièrement des techniques d'analyse de méthylation globale des zones promotrices sont apparues faisant appel aux technologies type puce ou MALDI-TOF-MS et celles-ci devraient permettre de découvrir de nombreux nouveaux gènes soumis aux processus de méthylation dans les GBMs (6).

De nombreux gènes, impliqués dans les principales voies dérégulées dans le GBM sont soumis à une régulation épigénétique. Les mécanismes de régulation du cycle cellulaire sont fréquemment altérés dans les GBMs. Dans plus de 90% des cas, on observe une dérégulation de la voie p16/CdK4/Rb qui contrôle la transition de la phase G1 à la phase S. La perte d'expression de la protéine p16 concerne de 50 à 70% des GBMs, suivant les études. Dans environ 10% des cas, l'événement causal pourrait être une méthylation du promoteur codant pour cette protéine. La voie p53/MDM2/$p14^{ARF}$, qui régule entre autres le cycle cellulaire et l'entrée en apoptose est perturbée dans plus de 80% des GBMs et dans 10 à 15% des tumeurs une méthylation de $p14^{ARF}$ peut être observée. *RASSF1* (Ras association domain family 1A) qui intervient notamment dans la voie RTK/PI3K, fréquemment dérégulée dans les GBMs, est trouvé méthylé dans 50 à plus de 80% des GBMs. Des gènes pro-apoptotiques tels que *BIK* (Bcl2-interacting killer) ou *TMS1/ASC* (Target of Methylation-induces Silencing-1) sont méthylés dans plus de 20% des cas, ce qui pourrait expliquer des résistances à l'apoptose. L'extinction par méthylation intéresse également des gènes impliqués dans la réparation de l'ADN et l'intégrité génomique tels *MGMT* et *MLH1*. Cette liste n'est bien évidemment pas exhaustive quant aux gènes régulés par ce mécanisme et aux voies touchées et les études en cours permettront de mieux appréhender la place de l'épigénétisme dans les GBMs.

Concernant les corrélations cliniques, il a été mis en évidence l'apparition d'une méthylation du gène codant pour la caspase 8 dans certains GBMs en rechute ; la non méthylation de *Casp8* associée à la méthylation du gène *BLU* étant corrélée à une survie sans progression plus longue (7). Les patients atteints d'une GBM et survivant au-delà de 3 ans présenteraient plus fréquemment une méthylation de *TMS1/ASC*, associée à une méthylation de *MGMT* et les GBMs secondaires présenteraient des taux de méthylation supérieurs pour MGMT et EMP3 (8). Ces constatations ont pour le moment été faites sur des cohortes réduites de patients et n'ont pas d'implication dans la prise en charge des patients. La méthylation de *MGMT*, gène codant pour une enzyme de réparation qui enlève les groupements alkyls trouvés au niveau de l'ADN a quant à elle fait l'objet de nombreuses études. Il est maintenant admis que les patients ayant un promoteur MGMT méthylé présentent une meilleure réponse au témozolomide, drogue alkylante qui fait partie du traitement standard des GBMs. Les patients avec un promoteur méthylé présentent une médiane de survie globale de 23.4 mois en cas de méthylation de MGMT contre 12.6 mois en cas d'absence de méthylation (9). Un essai multicentrique est actuellement en cours en France afin de comparer différentes techniques d'analyse de la MGMT. Il est fort probable que cette détermination devienne prochainement un standard dans la prise en charge des GBMs.

L'épigénétisme fait actuellement l'objet de nombreuses recherches qui devraient aboutir à une meilleure compréhension de la tumorigénèse des GBMs ainsi qu'à la découverte de nouveaux marqueurs pronostiques ou diagnostiques. Ceci devrait aussi ouvrir la voie pour de nouvelles approches thérapeutiques visant par exemple à la ré-expression de gènes éteints par épigénétisme. Des molécules de type inhibiteur de méthyl-transférase ou inhibiteur d'histone deacétylase sont déjà en essai chez l'homme.

1. Kotliarov Y, Kotliarova S, Charong N, Li A, Walling J, Aquilanti E, et al. Correlation analysis between single-nucleotide polymorphism and expression arrays in gliomas identifies potentially relevant target genes. *Cancer Res* 2009:69:1596-603

2. Mueller WC, von Deimling A. Gene regulation by methylation. *Recent Results Cancer Res* 2009:171:217-39

3. Mueller W, Nutt CL, Ehrich M, Riemenschneider MJ, von Deimling A, van den Boom D, et al. Downregulation of RUNX3 and TES by hypermethylation in glioblastoma. *Oncogene* 2007:26:583-93

4. Kim TY, Zhong S, Fields CR, Kim JH, Robertson KD. Epigenomic profiling reveals novel and frequent targets of aberrant DNA methylation-mediated silencing in malignant glioma. *Cancer Res* 2006:66:7490-501

5. Foltz G, Ryu GY, Yoon JG, Nelson T, Fahey J, Frakes A, et al. Genome-wide analysis of epigenetic silencing identifies BEX1 and BEX2 as candidate tumor suppressor genes in malignant glioma. *Cancer Res* 2006:66:6665-74

6. Foltz G, Yoon JG, Lee H, Ryken TC, Sibenaller Z, Ehrich M, et al. DNA methyltransferase-mediated transcriptional silencing in malignant glioma: a combined whole-genome microarray and promoter array analysis. *Oncogene* 2009

7. Martinez R, Setien F, Voelter C, Casado S, Quesada MP, Schackert G, et al. CpG island promoter hypermethylation of the pro-apoptotic gene caspase-8 is a common hallmark of relapsed glioblastoma multiforme. *Carcinogenesis* 2007

8. Martinez R, Schackert G. Epigenetic aberrations in malignant gliomas: an open door leading to better understanding and treatment. *Epigenetics* 2007:2:147-50

9. Stupp R, Hegi ME, Mason WP, van den Bent MJ, Taphoorn MJ, Janzer RC, et al. Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. *Lancet Oncol* 2009:10:459-66