

## PROJET DE RECHERCHE 2007 :

# PROFILS de METHYLATION de l'ADN : IMPACTS sur le DIAGNOSTIC et le PRONOSTIC des PATHOLOGIES MALIGNES.

Dr Sc. Pascal VANNUFFEL <sup>1</sup> et Dr Jean-Marc VERDEBOUT <sup>1, 2</sup>

<sup>1</sup> Département de Biologie Moléculaire – Onco-hématologie

<sup>2</sup> Département d'Anatomie Pathologique

### 1. INTRODUCTION

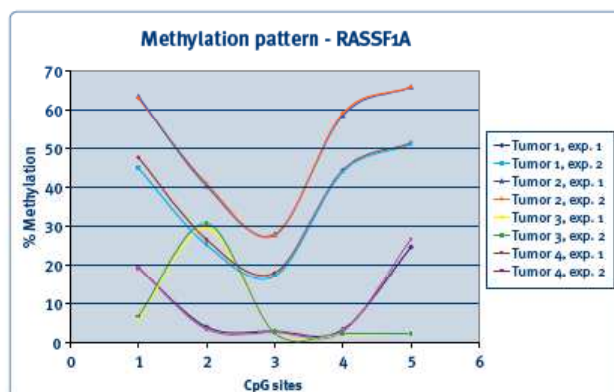
La méthylation de l'ADN au niveau des cytosines des îlots CpG est un régulateur important de l'expression dans le génome humain. Les changements de méthylation sont maintenant connus pour jouer un rôle fondamental dans une variété de tumeurs. Cela constitue un mécanisme fonctionnellement équivalent aux altérations génétiques classiques telles que les mutations, délétions ou pertes alléliques. Une mesure quantitative de la variation de méthylation au cours du temps et selon les tissus peut être corrélée avec d'autres phénomènes biologiques. Chaque tumeur pourrait ainsi être caractérisée par un profil spécifique de méthylation des îlots CpG de certains gènes (1).

Au niveau tumoral, le profil de méthylation du promoteur (hyper et hypométhylation) de certains gènes peut aussi être considéré comme un facteur pronostique dans la mesure où il permet de définir un (sous)-type clinique associé avec un bon ou mauvais pronostic. Des études ont montré que les niveaux de méthylation étaient corrélés avec la stadification et le grade tumoraux (2, 3).

#### *RASSF1A – variation in methylation levels among CpG sites*

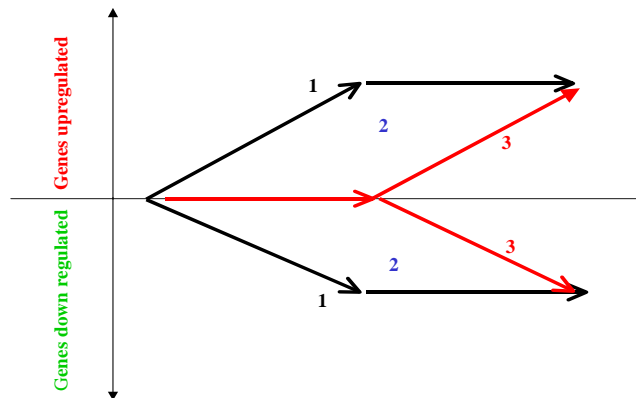
The Ras-associated domain family 1A (*RASSF1A*) is a tumor suppressor gene on chromosome 3p21.3. *RASSF1A* is inactivated in a variety of tumors by hypermethylation and/or allelic loss of its locus.

Quantification of methylation of CpGs in *RASSF1A* by Pyrosequencing demonstrates that methylation levels vary significantly among consecutive sites, and that these patterns may be different among tumors (Figure 1). This underlines the importance of individually quantifying a number of CpGs when a single site may not be representative.



*Figure 1. Methylation patterns in CpG sites in RASSF1A vary among neighboring CpG sites as well as among tumor samples. Legend: Tumor 1-4 are tumor samples from different individuals with the same tumor type; exp. 1 and exp. 2 are replicated measurements of each tumor sample made at separate occasions.*

Il a aussi été démontré que, lors de la progression tumorale, certains gènes (marqueurs) montrent des variations au niveau de leur expression, p. ex. : expression en augmentation constante, expression en augmentation à un moment précis ou expression en augmentation, puis en diminution,... Parmi les mécanismes responsables de ces variations, on retrouve les phénomènes de méthylation au niveau des îlots CpG



Versant hématologique, des méthylations du promoteur de certains gènes s’observent (par exemple, p15 et p21 dans les syndromes myélodysplasiques) et permettent un ciblage épigénétique de ces affections malignes (4, 5).

Des inhibiteurs (azacitidine/decitabine) de la DNA Methyl Transferase (enzyme méthylant les îlots CpG) permettent de déméthyliser ces promoteurs et donc de restituer la fonction de ces gènes. La détermination du degré de méthylation permet de mesurer la réponse hématologique au(x) traitement(s) de ces SMD et aussi de LMC résistant à l’Imatinib.

**Toutes ces variations peuvent être déterminées par une étude qualitative et/ou quantitative des profils de méthylation) des gènes et de leur promoteur.**

## **2. BUT DU PROJET**

Etudier les variations de méthylation (hypo ou hyperméthylation) en quantifiant les îlots CpG méthylés, soit de manière globale\* ou à partir de promoteurs ou de gènes spécifiques de différents types de pathologies malignes (« onco » et « hémato »).

Corréler les données obtenues avec les différents indications cliniques (diagnostiques, pronostiques, ...) disponibles.

## **3. METHODOLOGIE**

La méthodologie du projet repose sur une analyse quantitative de la méthylation dans de multiples îlots CpG par Pyrosequencing. La technique « Pyro Q-CpG » mesure de manière quantitative le degré de méthylation individuel des îlots CpG consécutifs.

Les îlots CpG de l’ADN génomique sont d’abord convertis par un traitement au bisulfite avant d’être amplifiés par PCR. Par ce procédé, C est converti en U, tandis que <sup>m</sup>C reste inchangé. Lors de l’amplification, U est amplifié en T et <sup>m</sup>C en C. Au niveau du pyrogramme, <sup>m</sup>C et C sont représentés comme des pics C et T, respectivement. La quantification repose sur le fait que les hauteurs des pics sont proportionnelles au nombre d’allèles méthylés à chaque îlot CpG.

Cette méthodologie est déjà utilisée (de façon qualitative seulement) dans le département de biologie moléculaire, entre autre pour identifier les gènes hMLH1 dont le promoteur est méthylé (HNPCC).

#### **4. ORGANISATION DU PROJET**

Le projet comprend une première phase de mise au point, principalement de la technique d'extraction de l'ADN à partir de tissu fixé au formol et enrobé en paraffine (FFPE) (a) et de la méthode de traitement au bisulfite (b).

(a) Différents « kits » existent pour extraire l'ADN de spécimens FFPE. Quelques kits seront testés afin de dégager celui qui donnera le meilleur compromis: quantité et qualité de d'ADN extrait, charge de travail et prix.

(b) Différents kits de traitement au bisulfite sont aussi commercialisés. De nouveau, une comparaison sera faite en terme de stabilité de l'ADN modifié, charge de travail et prix.

Il faut signaler que les kits (a et b) retenus pour la suite du projet seront ensuite implémentés pour les analyses de routine.

La seconde phase du projet sera consacrée à l'analyse des profils de méthylation dans un volet « onco » et dans un volet « hémato ».

(a) Pour le volet **onco**, 2 types de tumeurs (colo-rectale – prostatique – à discuter avec les pathologistes intéressés) – 50 spécimens / tumeur seront analysés, soit en ce qui concerne leur profil de méthylation globale (LINE-1\*), soit vis-à-vis de gènes ou promoteurs de gènes spécifiques : p16, GSTP1, RASSF1A, ....

(b) Pour le volet **hémato**, 50 spécimens de syndromes myélodysplasiques seront analysés pour leur profil de méthylation globale et vis-à-vis de certains gènes spécifiques : p15, p21, ...

Les 2 volets confondus, près de 150 spécimens seront analysés vis-à-vis de 3 à 4 systèmes, soit plus de 600 analyses (y compris les contrôles d'usage).

\* LINE-1 : éléments transposables dont la perte en méthylation de l'ADN des régions promotrices est un événement épigénétique commun dans les pathologies malignes, jouant ainsi un rôle dans la carcinogenèse.

#### **5. REFERENCES**

1. Paz MF *et al.* A systematic profile of DNA methylation in human cancer cell lines. *Cancer Res.* 2003 Mar 1;63(5):1114-21.
2. Lehmann U *et al.* Distinct methylation patterns of benign and malignant liver tumors revealed by quantitative methylation profiling. *Clin Cancer Res.* 2005 May 15;11(10):3654-60.
3. Jeronimo C *et al.* A quantitative promoter methylation profile of prostate cancer. *Clin Cancer Res.* 2004 Dec 15;10(24):8472-8.
4. Aggerholm A *et al.* Promoter hypermethylation of p15INK4B, HIC1, CDH1, and ER is frequent in myelodysplastic syndrome and predicts poor prognosis in early-stage patients. *Eur J Haematol.* 2006 Jan;76(1):23-32.
5. Takahashi T *et al.* DNA methylation profiles of lymphoid and hematopoietic malignancies. *Clin Cancer Res.* 2004 May 1;10(9):2928-35.