



HAL
open science

Spécificité de liaison et de répression de la “ Methyl-CpG-Binding Domain protein 2 ” (MBD2) : identification de gènes cibles impliqués dans les cancers

Amandine Masquelet Chatagnon

► **To cite this version:**

Amandine Masquelet Chatagnon. Spécificité de liaison et de répression de la “ Methyl-CpG-Binding Domain protein 2 ” (MBD2) : identification de gènes cibles impliqués dans les cancers. Médecine humaine et pathologie. Université Claude Bernard - Lyon I, 2009. Français. NNT : 2009LYO10270 . tel-00603777

HAL Id: tel-00603777

<https://theses.hal.science/tel-00603777>

Submitted on 27 Jun 2011

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE
présentée
devant l'UNIVERSITÉ CLAUDE BERNARD - LYON 1
pour l'obtention
du DIPLOME DE DOCTORAT
(Arrêté du 7 aout 2006)

présentée et soutenue publiquement le 15 décembre 2009

par

Mme Amandine CHATAGNON (née MASQUELET)

**Spécificité de liaison et de répression de la
« Methyl-CpG-Binding Domain protein 2 » (MBD2) :
Identification de gènes cibles impliqués dans les cancers**

Directeur de thèse : Dr Robert DANTE

JURY :	Mr Alain Puisieux	Président
	Mme Marie-Christine Rio	Rapporteur
	Mr Pierre-Antoine Défossez	Rapporteur
	Mr Gérard Benoît	Examineur
	Mr Michael Weber	Examineur
	Mr Robert Dante	Directeur de thèse

THÈSE
présentée
devant l'UNIVERSITÉ CLAUDE BERNARD - LYON 1
pour l'obtention
du DIPLOME DE DOCTORAT
(Arrêté du 7 aout 2006)

présentée et soutenue publiquement le 15 décembre 2009

par

Mme Amandine CHATAGNON (née MASQUELET)

**Spécificité de liaison et de répression de la
« Methyl-CpG-Binding Domain protein 2 » (MBD2) :
Identification de gènes cibles impliqués dans les cancers**

Directeur de thèse : Dr Robert DANTE

JURY :	Mr Alain Puisieux	Président
	Mme Marie-Christine Rio	Rapporteur
	Mr Pierre-Antoine Défossez	Rapporteur
	Mr Gérard Benoît	Examineur
	Mr Michael Weber	Examineur
	Mr Robert Dante	Directeur de thèse

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

Président de l'Université

Vice-président du Conseil Scientifique

Vice-président du Conseil d'Administration

Vice-président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire

Secrétaire Général

M. le Professeur L. Collet

M. le Professeur J-F. Mornex

M. le Professeur G. Annat

M. le Professeur D. Simon

M. G. Gay

COMPOSANTES SANTE

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard

Faculté de Médecine Lyon Sud – Charles Mérieux

UFR d'Odontologie

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Institut des Sciences et Techniques de Réadaptation

Département de Formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine

Directeur : M. le Professeur J. Etienne

Directeur : M. le Professeur F-N. Gilly

Directeur : M. le Professeur D. Bourgeois

Directeur : M. le Professeur F. Locher

Directeur : M. le Professeur Y. Matillon

Directeur : M. le Professeur P. Farge

COMPOSANTES SCIENCES ET TECHNOLOGIE

Faculté des Sciences et Technologies

UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives

Observatoire de Lyon

Institut des Sciences et des Techniques de l'Ingénieur de Lyon

Institut Universitaire de Technologie A

Institut Universitaire de Technologie B

Institut de Science Financière et d'Assurance

Institut Universitaire de Formation des Maîtres

Directeur : M. Le Professeur F. Gieres

Directeur : M. C. Collignon

Directeur : M. B. Guiderdoni

Directeur : M. le Professeur J. Lieto

Directeur : M. le Professeur C. Coulet

Directeur : M. le Professeur R. Lamartine

Directeur : M. le Professeur J-C. Augros

Directeur : M R. Bernard

RÉSUMÉ

De nombreux gènes suppresseurs de tumeurs sont inactivés par hyperméthylation dans les cancers. Cette inactivation serait en partie initiée par la protéine, MBD2 (Methyl-CpG-Binding Domain protein 2). Cette protéine recrute au niveau de séquences méthylées des complexes enzymatiques capables de modifier la structure chromatinienne et crée ainsi des régions fonctionnellement inactives. Dès lors, ce répresseur apparaît être une cible potentielle pour combattre le cancer. Dans cette perspective, rechercher les cibles de MBD2 et comprendre sa capacité à contrôler l'expression génique semblent cruciales. Au cours de deux études gènes candidats, nous avons pu démontrer (i) une réelle spécificité de cible du répresseur méthylation-dépendant MBD2 pour les loci *hTERT* et *pS2/TFF1* ; et (ii) un nouveau rôle de la protéine MBD2 en tant que modulateur de l'expression génique. De plus, les actions antagonistes entre le répresseur MBD2 et le trans-activateur naturel du gène *pS2*, le récepteur aux œstrogènes α , ont été explorées. Puis, l'analyse globale des profils de distribution de MBD2, de la méthylation de l'ADN, ainsi que de l'ARN polymérase II, sur puce promoteur a montré que MBD2 possède toutes les caractéristiques d'un répresseur transcriptionnel méthylation-dépendant. En effet, 74% des promoteurs fixés par MBD2 sont méthylés et cette liaison est associée dans 65% des cas à une répression transcriptionnelle.

The Methyl-CpG-Binding Domain Protein 2 (MBD2), a specific interpret of methylated loci in cancer cells

ABSTRACT

In the past few years, several clinical trials have shown that targeting DNA methylation machinery might be of interest in cancer therapy to restore tumor suppressor genes expression and inhibit tumor growth. The Methyl-CpG-Binding Domain protein 2 (MBD2) is an important constituent of the DNA methylation machinery since this protein is directly involved in the mediation of the epigenetic signal. Moreover, MBD2 seems to show some gene specificity, its inhibition reactivate a limited number of genes. Taken together these data suggest that MBD2 represents potential new target in cancer therapy and, therefore, new insights on MBD2 specificities are, in this context, of importance. To this end, we have developed two different approaches: a candidate genes analysis and a genome-wide analysis, using ChIP-on-chip method, in order to map MBD2 binding sites. The candidate gene approaches are strongly in favour of the "one gene - one MBD" hypothesis, at least for the genes analyzed. Indeed, our results indicate that MBD2 is specifically and directly involved in the transcriptional repression of *hTERT* and *pS2/TFF1* genes. Furthermore, a new role of MBD2 in the fine-scale modulation of these genes was demonstrated, and the antagonist actions between MBD2 and the natural trans-activator of *pS2* gene, the estrogen receptor α , were explored. Genome wide distribution of MBD2 binding sites, DNA Methylation profiles, and silencing potential, showed that the MBD2 is a real methylation-dependant transcriptional repressor: 74% of the MBD2 binding promoters are methylated and 65% silenced.

DISCIPLINE : Epigénétique et cancer

MOTS-CLÉS : Méthylation de l'ADN, MBD2, répression transcriptionnelle, cancer, ChIP-on-chip

INTITULÉ ET ADRESSE DU LABORATOIRE :

Laboratoire d'Oncogénèse et Progression Tumorale - Unité Mixte INSERM 590
Centre Léon Bérard - 28 rue Laennec - 69373 Lyon Cedex 08 FRANCE

*A ma famille,
A mes amis et
A mes deux amours, Capucine et Paul.*

Ce fut long, 10 ans, mais me voilà enfin arrivée au bout de mes études.

Je vous dédie cet événement marquant de ma vie.



REMERCIEMENTS

REMERCIEMENTS

Comme une thèse ne s'effectue jamais seule...

Je remercie tout particulièrement mon directeur de thèse, **Robert Dante**. Robert, merci de m'avoir accueillie dans ton équipe il y a maintenant plus de cinq ans lors de mon stage de Master 2 et de m'avoir permis d'y effectuer également ma thèse. Au cours de ces années, j'ai appris à gérer un projet de recherche, à le valoriser par les publications mais également au cours de congrès, à établir des collaborations, à encadrer et former des étudiants... et ce grâce à toi. Merci pour la liberté et la confiance que tu m'as accordée. Merci de ta persévérance envers la publication de nos travaux sur la régulation du gène *pS2* par MBD2 et RE α . J'espère qu'on pourra bientôt fêter ce papier. Merci également de m'avoir fait beaucoup voyager : Il Ciocco, Madrid, Boston..., et beaucoup déménager !!! Cela a parait-il porté chance à une de tes anciennes étudiantes, nous verrons si cela se confirme pour moi. Enfin, merci pour nos enrichissantes discussions, tu m'as permis de m'épanouir sur ce sujet que nous affectionnons tant.

PS : comme tu l'auras remarqué je me suis permis de te tutoyer, je crois que j'y arriverai maintenant !!!!

Je remercie **Alain Puisieux**, directeur de l'unité INSERM U590, ainsi que **Charles Dumontet**, responsable de l'équipe « Pharmacocinétique et Chimiorésistance », pour m'avoir accueillie au sein du laboratoire, et pour les conseils que j'ai eu l'honneur de recevoir de leur part. Merci Alain d'avoir également accepté la présidence de ma thèse.

Je remercie **Marie-Christine Rio** et **Pierre-Antoine Defossez**, qui m'ont fait l'honneur d'examiner et de juger ce travail en tant que rapporteurs. Merci à **Gérard Benoit** et à **Michael Weber** d'avoir accepté d'évaluer ce travail. Veuillez recevoir ici ma sincère reconnaissance pour votre participation à ce jury de thèse.

Gérard, je profite également de ce moment pour te remercier de m'avoir acceptée dans ton équipe pour mon stage post-doctoral. Merci de ta confiance. J'espère que je serai à la hauteur de tes attentes.

Je remercie les membres de mon comité de suivi de thèse, **Saadi Khochbin** et **Caroline Moyret-Lalle**. Par vos remarques et suggestions, vous aurez permis d'améliorer la qualité de ce travail, je vous en suis très reconnaissante.

Je remercie les personnes avec lesquelles j'ai collaboré au cours de ma thèse :

Jean Benhattar et **Stéphanie Bougel** pour notre collaboration sur la régulation du gène *hTERT* par la méthylation de l'ADN et MBD2. Merci également pour nos enrichissantes discussions scientifiques lors de nos réunions franco-suisse biannuelles.

Manel Esteller et **Esteban Ballestar** pour nos échanges scientifiques, matériels..., sur divers projets mais en particulier sur la régulation du gène *pS2* par MBD2 et RE α et sur la régulation des miRNAs par la méthylation de l'ADN et les protéines à MBD dans les cancers. J'espère que nos collaborations aboutiront très prochainement. Merci également de m'avoir accueillie dans votre laboratoire pour une semaine de manip.

Joël Lachuer, **Séverine Croze** et **Nicolas Nazaret**, de la plateforme ProfilExpert, qui ont accepté de partir avec nous dans la « folle aventure » des CHIP- et MeDP-on-chip. Joël, merci de nous avoir fait part de ta très grande expérience en microarray et de tes précieux conseils. Séverine, merci pour les mises aux points et les réalisations des amplifications à partir d'échantillons issus de CHIP. Enfin, merci à toi, Nicolas, de nous avoir permis de nous « dépatouiller » dans l'analyse bio-informatique. Nous vous avons beaucoup demandé mais vous avez su relever le défi.

Patrick Mehlen, **Agnès Bernet**, **Julien Fitamant** et **Marie-May Coissieux** pour notre étroite collaboration sur les récepteurs à dépendance qui a débuté à la fin de ma thèse.

Je remercie la **ligue contre le cancer** et l'**association pour la recherche sur le cancer** qui ont financé ces travaux de thèse, respectivement pour trois ans et 8 mois.

Je remercie tous les membres de l'équipe, dont en particulier :

Lucien Frappart, pour m'avoir transmis un peu de ses connaissances en anatomie-pathologie des cancers du sein et du col de l'utérus.

Les « Bob's Girls » :

Emilie et Delphine qui ont guidé mes premiers pas dans l'équipe. Vous êtes pour moi une mine inestimable de conseils et un soutien en toute occasion.

Emilie, merci également d'avoir contribué par tes remarques et suggestions à améliorer la qualité de ce mémoire, je t'en suis très reconnaissante. Et, un grand merci de m'avoir introduit dans le monde de l'enseignement.

Delphine, bonne chance à toi dans la recherche, comme dans la vie.

Laury, Houda et la petite dernière, **Magali**.

Laury, ma plus longue voisine de paillasse. Trois ans d'étroite collaboration. J'ai vu tes débuts et te voici maintenant presque à la fin de thèse. Ne sois pas trop exigeante envers toi-même, ménage toi et tu verras ce ne sont pas quelques mois de plus de thèse qui changeront tout. Bonne chance à toi pour la dernière ligne droite. Merci également pour tes corrections orthographiques apportées à ce manuscrit. Enfin, merci pour tes macarons, mendiants et autres petits gâteaux, qui ont su nous remonter le moral dans les moments difficiles.

Houda, bonne chance à toi pour cette nouvelle expérience, la thèse, qui débute, car aux vues de tes qualités, j'ai la certitude que tu trouveras un financement. Garde confiance. Je suis sûre que tu t'en sortiras brillamment.

Magali, la dernière arrivée dans l'équipe. Nous ne nous serons côtoyées que quelques mois mais ta bonne humeur communicative m'a permis de faire « redescendre la pression » dans certains moments difficiles. J'ai remarqué que tu sais déjà vraiment ce que tu veux et c'est une grande qualité dans ce métier. Tu iras loin petite !!!

Merci à toutes pour votre bonne humeur et nos moments partagés de fous rires et de désespoirs !!! Chacune à votre façon, vous avez participé à la réalisation de ce travail et j'ai été ravie de travailler avec vous.

Merci à tous ceux que j'ai pu rencontrer au cours de ces années de laboratoire. A mes **collègues du 5^{ème} et 4^{ème} étage du Cheney A et du 2^{ème} étage du Cheney D** dont **Elodie, Julie, Bastien, Stéphane, Erika, Gaetan, Kamel, Muriel, Stéphanie, Claude, Jessica....** Une mention particulière à mes **collègues de bureau Benjamin et Kader**. Benjamin, cela risque d'être dur pour toi de quitter le Centre, la sœur de Mitch... Mais fais-moi savoir quand tu soutiendras ta thèse. Je ne voudrai pas manquer ce moment. Kader, le collègue de la galère de fin de thèse. J'ai été heureuse de partager ce moment avec toi. Je me suis sentie moins seule. Merci pour ton soutien et je m'excuse de t'avoir embêtée avec mes innombrables questions existentielles. Et merci également à **Gaël**, notre expert en mode et coiffure des repas du midi (non des repas de 11h30 !!!).

Je remercie **Ingrid**, qui était déjà là pour moi lors des corrections des rapports de stage de Master 2. Nous n'avons pas perdu contact. Et c'est un peu grâce à toi si j'ai trouvé mon post-doc. Merci pour toute ton aide.

Je remercie **Nicole Dalla Venezia** qui m'a également apportée son aide lors de mon stage de Master 2 et qui m'a initiée à la production de protéines recombinantes dans les bactéries.

Je remercie deux de mes maîtres de stages qui ont marqué mon parcours **Domique Bozon** et **Luisa Dandolo**. Domique Bozon, qui fut ma première maître de stage. Il y a maintenant 8 ans, j'étais à l'IUT. Merci de m'avoir donné le goût de la recherche et encouragée à poursuivre mes études. Luisa Dandolo, merci de m'avoir initiée à l'épigénétique. De là, j'y ai « consacré 5 ans de ma vie ».

Je profite de l'occasion pour remercier également tous les **membres de ma famille de sang ou de cœur** et mes **amis** qui m'ont soutenue tout au long de ces études auxquelles ils ne comprennent pas encore tout. Un merci tout particulier à vous, **Maman** et **Papa**, pour votre irremplaçable et inconditionnel soutien moral et financier. Merci pour votre amour, pour tous vos sacrifices, pour tous les enseignements que vous m'avez transmis. Sans vous je n'en serai pas là.

Un dernier merci, et non pas des moindres à **Paul** et **Capucine**, mon mari et ma fille. Paul tu as toujours été présent, notamment dans les moments difficiles. Merci d'avoir toujours été à mon écoute, de m'avoir continuellement encouragée et supportée, même lorsque mon travail affectait mon humeur, particulièrement ces derniers temps. Merci pour ta patience. Merci infiniment pour cet amour sans conditions et de m'avoir suivie et soutenue dans cette aventure. Et merci à Capucine, qui est venue égayer cette dernière année de thèse.

On a conscience avant, on prend conscience après.

Oscar Wilde



SOMMAIRES

SOMMAIRE

INTRODUCTION ~ REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	Pages 1 à 101
AVANT-PROPOS	Pages 1 à 3
CHAPITRE 1 : LA METHYLATION DE L'ADN, DE SA MISE EN PLACE A SES IMPORTANTES FONCTIONS BIOLOGIQUES	Pages 4 à 34
1- SURVOL HISTORIQUE, SUR LES SENTIERS DE LA METHYLATION DE L'ADN...	Page 4
2- LES PROFILS DE METHYLATION DE L'ADN	Page 5
2.1- La méthylation de l'ADN, un phénomène universel mais avec une diversité de motifs et de profils	Page 5
2.2- Distribution des dinucléotides CpG, les cibles de la méthylation de l'ADN des génomes de mammifères	Page 7
3- MISE EN PLACE ET MAINTIEN DES PROFILS DE METHYLATION DE L'ADN PAR LES ADN METHYLTRANSFERASES	Page 8
3.1- Reprogrammation et mise en place de la distribution des groupements méthyles au cours du développement embryonnaire	Page 8
3.2- La réaction biochimique de méthylation de l'ADN	Page 10
3.3- Les ADN méthyltransférases	Page 11
3.3.1- Similarités et différences entre les différents membres de la famille des ADN méthyltransférases	Page 11
3.3.2- La famille DNMT1 et son rôle dans la maintenance (mais pas seulement) des profils de méthylation de l'ADN au cours des divisions cellulaires	Page 12
3.3.3- La famille DNMT3 et son rôle dans la méthylation de l'ADN <i>de novo</i> ou plus	Page 14
3.3.3.1- DNMT3A et DNMT3B, les « membres actifs » de la famille DNMT3	Page 15
3.3.3.2- DNMT3L, un facteur régulateur de la méthylation de l'ADN <i>de novo</i>	Page 16
3.3.4- L'énigmatique DNMT2	Page 17
3.3.5- Conclusion, une coopération des DNMT pour une spécificité fonctionnelle	Page 18
3.4- La déméthylation de l'ADN	Page 18
3.4.1- Processus de réparation par excision de nucléotides	Page 19
3.4.2- les ADN glycosylases, des enzymes déméthylantes ?	Page 19
3.4.3- les ADN déméthylases	Page 21

4- LES CAPACITES REPRESSIVES DE LA METHYLATION DE L'ADN AU CENTRE DE SES ROLES BIOLOGIQUES	Page 22
4.1- La méthylation de l'ADN verrouille l'expression génique	Page 22
4.1.1- Inhibition de la fixation des facteurs de transcription par la méthylation de leurs séquences cibles – implication directe de la méthylation de l'ADN dans la répression transcriptionnelle	Page 22
4.1.2- Couplage entre méthylation de l'ADN et compaction chromatinienne – implication indirecte de la méthylation de l'ADN dans la répression transcriptionnelle	Page 23
4.2- Régulation de gènes essentiels au développement par la méthylation de l'ADN	Page 24
4.2.1- l'empreinte parentale : une méthylation allèle spécifique nécessaire aussi bien au cours du développement embryonnaire que pendant la vie adulte	Page 24
4.2.2- Inactivation du chromosome X	Page 27
4.2.3- La méthylation de l'ADN, un acteur clé de la différenciation cellulaire	Page 30
4.3- Fonction essentielle de la méthylation de l'ADN dans la défense et l'intégrité structurale du génome	Page 32
5- CONCLUSION	Page 34
CHAPITRE 2 : LES PROTEINES A MBD, LES PRINCIPAUX INTERPRETES DE LA METHYLATION DE L'ADN	Pages 35 à 72
1- DIFFERENTES FAMILLES DE PROTEINES POSSEDANT UNE AFFINITE POUR LA METHYLATION DE L'ADN EXISTENT	Pages 35
1.1- Les protéines à MBD, l'objet de toutes les attentions	Page 35
1.2- D'autres interprètes du signal méthylation ont été caractérisés	Page 36
1.2.1- La famille des protéines apparentées à Kaiso	Page 36
1.2.2- Les protéines à domaine SRA	Page 37
2- CARACTERISTIQUES STRUCTURALES ET BIOCHIMIQUES DES PROTEINES A MBD	Page 38
2.1- Identification et descriptif des gènes codant les protéines à MBD et des différents isoformes et variants transcrits et traduits	Page 39
2.2- Expression tissulaire des différentes protéines à MBD	Page 40
2.3- Propriétés de liaison à l'ADN des protéines à MBD	Page 41
2.3.1- Liaison à l'ADN méthylé <i>via</i> le domaine MBD	Page 41
2.3.1.1- Co-localisation nucléaire des protéines à MBD avec les 5-méthylcytosines	Page 41
2.3.1.2- Propriétés de liaison à l'ADN du domaine MBD	Page 42
2.3.1.3- Structure protéique du domaine MBD	Page 42
2.3.2- Liaison de la protéine MBD1 à l'ADN non-méthylé <i>via</i> ses domaines CXXC	Page 43
2.4- Le domaine fonctionnel de répression transcriptionnelle TRD	Page 44
3- ACTIVITE REPRESSIVE DES PROTEINES A MBD	Page 44
3.1- MeCP2, le premier répresseur méthylation-dépendant caractérisé	Page 44

3.1.1- MeCP2 recrute des complexes capables de modifier post-traductionnellement les histones et de compacter la chromatine	Page 45
3.1.1.1- Répression HDAC-dépendante	Page 45
3.1.1.2- Répression HMT-dépendante	Page 47
3.1.2- MeCP2 réprime la transcription en modifiant l'architecture chromatinienne	Page 48
3.1.2.1- MeCP2 « déplace » les nucléosomes	Page 48
3.1.2.2- Implication de MeCP2 dans l'établissement de structures secondaires de la chromatine	Page 49
3.1.3- MeCP2 peut interférer directement avec la machinerie transcriptionnelle en séquestrant TFIIB	Page 51
3.1.4- Intervention de MeCP2 dans l'épissage alternatif	Page 52
3.1.5- Conclusion : MeCP2 un répresseur transcriptionnel mais aussi une protéine nucléaire architecturale	Page 52
3.2- MBD2 initie une répression transcriptionnelle majoritairement HDAC-dépendante	Page 53
3.2.1- MBD2 et MBD3 coopère au sein du complexe MeCP1	Page 53
3.2.2- MBD2, tout comme MeCP2, est capable de s'associer à Sin3A	Page 55
3.2.3- Interaction entre MBD2b et MIZF	Page 56
3.2.4- Fonctions antithétiques de MBD2 dans la régulation transcriptionnelle	Page 56
3.3- MBD1, un répresseur transcriptionnel majoritairement HMT-dépendant	Page 58
3.3.1- HDAC3, l'unique lien direct entre MBD1 et la répression transcriptionnelle HDAC-dépendante	Page 58
3.3.2- MBD1 et les histones méthyltransférases	Page 59
3.3.2.1- MBD1 et Suv39H1	Page 59
3.3.2.2- MBD1 et SETDB1	Page 59
3.4- Quelques données sur MBD4	Page 61
3.5- Régulation de l'inhibition transcriptionnelle MBD-dépendante par des modifications post-traductionnelles des MBD	Page 62
3.5.1- Régulation de l'activité de MeCP2 par phosphorylation	Page 63
3.5.2- MBD2 et la méthylation de ses arginines	Page 64
3.5.3- SUMOylation de MBD1	Page 64
3.6- Conclusion : Les protéines à MBD, les chaînons entre méthylation de l'ADN, compaction chromatinienne et répression transcriptionnelle	Page 65
4- LES AUTRES FONCTIONS DES PROTEINES A MBD	Page 66
4.1- Les protéines à MBD et héritabilité des modifications épigénétiques des cellules somatiques	Page 66
4.1.1- Interactions spécifiques de la phase de réplication de l'ADN entre les protéines à MBD et l'ADN méthyltransférase DNMT1	Page 66
4.1.2- Complexe spécifiques de la phase S : CAF-1/MBD1/SETDB1	Page 67
4.2- Rôle de MBD3 dans la régulation de la progression du cycle cellulaire	Page 68
4.3- MBD4, MBD1 et maintien de l'intégrité du génome	Page 69
4.3.1- MBD4, une ADN glycosylase	Page 69
4.3.1.1- MBD4 minimise l'hypermutabilité des dinucléotides CpG méthylés	Page 69
4.3.1.2- MBD4 est impliquée dans la réponse apoptotique aux dommages à l'ADN	Page 70
4.3.2- MBD1, réparation et stabilité génomique	Page 71

5- CONCLUSION	Page 72
CHAPITRE 3 : IMPLICATION DE LA METHYLATION DE L'ADN ET DES PROTEINES A MBD DANS LA CANCEROGENESE	Page 73 à 101
1- LE CANCER, UNE MALADIE EPIGENETIQUE	Page 73
1.1- Généralités sur le cancer	Page 73
1.2- Altération des profils de méthylation de l'ADN dans les cancers	Page 74
1.2.1- Hypométhylation globale du génome	Page 75
1.2.2- Hyperméthylation régionale au niveau des îlots de CpG	Page 76
1.2.3- Hyperméthylation et mutations de l'ADN	Page 78
1.2.4- Perte de l'empreinte parentale	Page 78
1.2.5- Conclusion : hypométhylation globale <i>versus</i> hyperméthylation locale, le paradoxe de la méthylation dans les cellules cancéreuses	Page 78
1.3- Mise en place de ces altérations	Page 79
1.4- « MéthyloTYPE » ou profil de méthylation de l'ADN : Marqueur diagnostique et/ou pronostique	Page 79
1.5- Mutations épigénétiques <i>versus</i> mutations génétiques : pronostic et espoirs thérapeutiques	Page 80
1.6- Thérapies épigénétiques anti-cancéreuses visant la méthylation de l'ADN	Page 81
2- IMPLICATION DES PROTEINES A MBD DANS LA CANCEROGENESE	Page 82
2.1- Dérégulation de l'expression des protéines à MBD dans les cancers	Page 82
2.2- Les gènes à îlots de CpG hyperméthylés réprimés par les protéines à MBD dans les cancers	Page 84
2.2.1- Association des protéines à MBD aux îlots de CpG hyperméthylés : démonstration d'une certaine spécificité de cible et spécificité cellulaire	Page 84
2.2.2- Inactivation des gènes hyperméthylés par les protéines à MBD	Page 85
2.3- Possible implications des protéines à MBD dans l'établissement des profils aberrants de méthylation dans les cellules cancéreuses	Page 86
2.4- La génétique, polymorphismes et mutations, des gènes codant les protéines à MBD dans les cancers	Page 87
2.4.1- Polymorphismes des gènes codant les protéines à MBD, des prédispositions au cancer ?	Page 87
2.4.2- Analyses des mutations <i>MBD4</i> dans les cancers : <i>MBD4</i> , un gène suppresseur de tumeur ?	Page 88
3- MBD2 ET TUMORIGENESE	Page 89
4- LES PROTEINES A MBD, DIAGNOSTIC ET THERAPIE	Page 92
4.1- Les protéines à MBD, un outil pour identifier de nouveaux gènes hyperméthylés dans les cellules cancéreuses	Page 92
4.2- Les protéines à MBD, des cibles prometteuses pour des thérapies anti-cancéreuses	Page 92
4.2.1- Pourquoi cibler spécifiquement MBD2 ? Leçons tirées des souris invalidées pour les gènes codant les protéines à Mbd	Page 92
4.2.2- Avantages de l'inactivation spécifique de MBD2 par rapport aux traitements hypométhylants	Page 94

5- BILAN DE SPECIFICITE DES PROTEINES A MBD	Page 95
5.1- Spécificité de séquences	Page 95
5.2- Spécificités de cibles	Page 95
5.2.1- Plusieurs protéines sur un même locus : Redondance pour une inactivation transcriptionnelle totale ?	Page 95
5.2.2- Une seule et unique protéine à MBD pour un locus spécifique	Page 97
5.3- Comment expliquer les spécificités de cibles ?	Page 97
5.3.1- Effets de concentration	Page 97
5.3.2- Facteurs de ciblage	Page 98
5.4- Bilan de spécificité	Page 99
6- CONCLUSION	Page 100
OBJECTIFS DE TRAVAIL	Page 102 à 103
RÉSULTATS	Page 104 à 117
ARTICLE 1 : MBD2 SE FIXE ET REPRIME DIRECTEMENT ET SPECIFIQUEMENT LE GENE <i>hTERT</i> HYPERMETHYLE DANS LES CELLULES CANCEREUSES	Page 104 à 106
1- INTRODUCTION	Page 104
2- RESULTATS	Page 105
3- CONCLUSION	Page 106
+ MANUSCRIT DE L'ARTICLE : <i>Specific association between the methyl-CpG-binding domain protein 2 and the hypermethylated region of the human telomerase reverse transcriptase promoter in cancers cells</i>	
ARTICLE 2 : LA PROTEINE MBD2 MODULE SPECIFIQUEMENT LA REPONSE ŒSTROGENO-DEPENDANTE DU GENE <i>pS2/TFF1</i>	Page 107 à 111
1- INTRODUCTION	Page 107
2- RESULTATS	Page 108
3- CONCLUSION	Page 111
+ MANUSCRIT DE L'ARTICLE : <i>Cancer epigenetics: a role for the methyl-CpG-binding domain protein 2 in the modulation of the estrogen response of the pS2/TFF1 gene</i>	
ARTICLE 3 : ROLE PREPONDERANT DE MBD2 DANS LA REPRESSION TRANSCRIPTIONNELLE METHYLATION-DEPENDANTE DES CELLULES CANCEREUSES HELA	Page 112 à 117
1- INTRODUCTION	Page 112

2- RESULTATS	Page 113
3- CONCLUSION	Page 117
+ MANUSCRIT DE L'ARTICLE : <i>Genome wide distribution of MBD2 binding sites, DNA methylation profiles and silencing potential</i>	
DISCUSSION	Page 118 à 135
1- CHOIX DES MODELES GENIQUES POUR L'ANALYSE DE L'IMPLICATION DES PROTEINES A MBD DANS LA REPRESSION TRANSCRIPTIONNELLE	Page 118
1.1- <i>hTERT</i> , un modèle d'îlot de CpG hyperméthylé mais régionalement non-méthylé	Page 118
1.2- <i>pS2</i> , un modèle de gène non à îlot de CpG dit CpG pauvre	Page 119
2- SPECIFICITE DE LIAISON DE LA PROTEINE MBD2 AUX PROMOTEURS METHYLES <i>hTERT</i> ET <i>PS2</i>	Page 120
3- MBD2, UN REPRESSEUR MAIS AUSSI UN MODULATEUR DE LA TRANSCRIPTION	Page 122
3.1- MBD2 exerce une répression transcriptionnelle directe, spécifique et dépendante de la méthylation sur les gènes <i>hTERT</i> et <i>pS2</i> endogènes	Page 122
3.2- Impact de l'absence prolongée du répresseur MBD2 sur les profils de méthylation de l'ADN et de compaction de la chromatine	Page 124
3.3- La force de répression de MBD2 dépend de la densité en CpG	Page 126
4- ACTIONS ANTAGONISTES ENTRE UN REPRESSEUR A MBD, LA PROTEINE MBD2, ET UN ACTIVATEUR, LE REα	Page 127
4.1- La méthylation de l'ADN inhibe indirectement l'association des RE α à leur séquence cible, les ERE	Page 127
4.2- Le trans-activateur RE α co-existe sur la région 5' régulatrice <i>pS2</i> avec le répresseur méthylation dépendant MBD2 pour pallier partiellement son effet inhibiteur	Page 128
5- LA PROTEINE MBD2 POSSEDE TOUTES LES CARACTERISTIQUES D'UN REPRESSEUR METHYLATION-DEPENDANT	Page 130
5.1- La région de -700 pb à +200 pb autour du site d'initiation de la transcription semble importante pour la régulation de l'expression génique	Page 131
5.2- Etat de méthylation des promoteurs à îlot de CpG <i>versus</i> non à îlot de CpG	Page 131
5.3- La méthylation de l'ADN inhibe la transcription et ce en grande partie <i>via</i> MBD2	Page 132
5.4- La répression génique <i>via</i> MBD2 n'est pas spécifique des gènes à îlots de CpG	Page 134
5.5- MBD2 est très majoritairement associées aux promoteurs méthylés et silencieux	Page 135
5.6- Identification de nouveaux gènes cibles du répresseur MBD2 dans les cellules cancéreuses	Page 135

CONCLUSIONS & PERSPECTIVES	Page 136 à 139
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	Page 140 à 176
PUBLICATIONS & CONGRÈS	Page 177 à 178
PUBLICATIONS	Page 177
CONGRES	Page 178

TABLE DES ILLUSTRATIONS

<u>Figure 1.</u> Différents niveaux d'organisation de la chromatine et principales modifications épigénétiques.	Page 1
<u>Figure 2.</u> Mise en évidence de l'épi-cytosine par Hotchkiss en 1948 (HOTCHKISS, 1948).	Page 4
<u>Tableau 1.</u> Descriptif de la méthylation de l'ADN dans la plupart des grands groupes biologiques.	Page 6
<u>Figure 3.</u> Profil de méthylation de l'ADN dans les cellules somatiques de mammifères.	Page 8
<u>Figure 4.</u> Reprogrammation de la méthylation dans les différentes lignées cellulaires au cours du développement embryonnaire (adaptée de Jaenisch, 1997 (Jaenisch, 1997)).	Page 9
<u>Figure 5.</u> Catalyse de la méthylation de l'ADN par les ADN méthyltransférases (DNMT) (adaptée de Prahan et Esteve, 2003 (Pradhan and Esteve, 2003)).	Page 11
<u>Figure 6.</u> Structure fonctionnelle des DNMT de mammifères (adaptée de Cheng et Blumenthal, 2008 (Cheng and Blumenthal, 2008)).	Page 12
<u>Figure 7.</u> Processus de réparation par excision de nucléotides pouvant permettre l'excision de cytosines méthylées de l'ADN et donc participer à la déméthylation active du génome.	Page 19
<u>Figure 8.</u> Processus de réparation par excision de bases pouvant permettre l'excision de cytosines méthylées de l'ADN et donc participer à la déméthylation active du génome.	Page 19
<u>Figure 9.</u> Mécanismes de déméthylation active de l'ADN par les déméthylases. (adaptée de Grange et Thomassin, 1999 (Grange and Thomassin, 1999) et Ooi et Bestor, 2008 (Ooi and Bestor, 2008)).	Page 21
<u>Figure 10.</u> Inhibition directe de la fixation d'un facteur de transcription (FT) sur sa séquence cible par la méthylation de celle-ci.	Page 22
<u>Tableau 2.</u> Facteurs de transcription, chez les vertébrés, affectés par la méthylation des cytosines (adaptée de Zing et Jones, 1997 (Zingg and Jones, 1997)).	Page 22
<u>Figure 11.</u> Implication indirecte de la méthylation de l'ADN dans la répression transcriptionnelle.	Page 23

<u>Figure 12.</u> Régulation en cluster de l'expression monoallélique des gènes soumis à empreinte (adaptée de Gabory et Dandolo, 2005 (Gabory and Dandolo, 2005)).	Page 25
<u>Figure 13.</u> Cycle de l'empreinte parentale (adaptée de Gabory et Dandolo, 2005 (Gabory and Dandolo, 2005)).	Page 26
<u>Figure 14.</u> Inactivation du chromosome X.	Page 28
<u>Figure 15.</u> Récapitulatif de la cinétique de l'inactivation et réactivation du chromosome X chez la souris (adaptée des travaux du Dr Heard).	Page 29
<u>Figure 16.</u> Bilan des fonctions associées à la méthylation de l'ADN.	Page 34
<u>Figure 17.</u> Organisation des protéines apparentées à Kaiso : Kaiso, ZBTB4 et ZBTB38 (adaptée de Filion <i>et al.</i> , 2006 (Filion <i>et al.</i> , 2006)).	Page 36
<u>Figure 18.</u> Organisation des protéines SRA.	Page 38
<u>Tableau 3.</u> Localisation chromosomique et structure des gènes humains codant les protéines à MBD (Hendrich <i>et al.</i> , 1999a;Kriaucionis and Bird, 2004).	Page 39
<u>Figure 19.</u> Les différentes isoformes des protéines à MBD de mammifères.	Page 39
<u>Figure 20.</u> Le domaine de fixation à l'ADN méthylé (MBD).	Page 43
<u>Figure 21.</u> Principe du système de transcription GAL4.	Page 44
<u>Figure 22.</u> Activité répressive HDAC-dépendante de MeCP2.	Page 45
<u>Figure 23.</u> Activité répressive HMT-dépendante de MeCP2.	Page 47
<u>Figure 24.</u> Activité répressive ATPase-dépendante de MeCP2.	Page 48
<u>Figure 25.</u> MeCP2 forme des boucles répressives (adaptée de Horike <i>et al.</i> , 2005 (Horike <i>et al.</i> , 2005)).	Page 49
<u>Figure 26.</u> Séquestration de TFIIB par MeCP2.	Page 51
<u>Figure 27.</u> MeCP2 interagit avec YB-1 et régule l'épissage alternatif des transcrits cibles (adaptée de Chahrour et Zoghbi, 2007 (Chahrour and Zoghbi, 2007)).	Page 52
<u>Figure 28.</u> Représentation chronologique des fonctions connues de MeCP2 (adaptée de Hite <i>et al.</i> , 2009 (Hite <i>et al.</i> , 2009)).	Page 53
<u>Figure 29.</u> Recrutement du complexe MeCP1 par MBD2 au niveau de portions d'ADN.	Page 54
<u>Figure 30.</u> Compétition entre MBD3L1 et MBD3 pour l'association à MBD2 et compétition entre MBD2 et MBD3L2 pour le recrutement du complexe NuRD.	Page 55
<u>Figure 31.</u> MBD2 régulateur de l'expression génique.	Page 56

<u>Figure 32.</u> Répression transcriptionnelle initiée par MBD1.	Page 58
<u>Figure 33.</u> Répression transcriptionnelle initiée par MBD4.	Page 61
<u>Figure 34.</u> Modèle de régulation de l'activité de MeCP2 par phosphorylation/déphosphorylation dans les neurones (adaptée de Tao <i>et al.</i> , 2009 et Chao et Zoghbi, 2009 (Tao <i>et al.</i> , 2009;Chao and Zoghbi, 2009)).	Page 63
<u>Figure 35.</u> Régulation de l'activité répressive de MBD2 par la méthylation de ses arginines.	Page 64
<u>Figure 36.</u> Effets opposés des conjugaisons de SUMO1 et SUNO2/3 à MBD1 sur son activité répressive.	Page 65
<u>Figure 37.</u> Bilan des mécanismes répressionnels impliquant les protéines à MBD.	Page 66
<u>Figure 38.</u> Répression méthylation-dépendante indépendante des protéines à MBD.	Page 66
<u>Figure 39.</u> Représentation schématique d'un mécanisme moléculaire d'héritabilité via MeCP2 des modifications épigénétiques au cours de la division cellulaire de cellules somatiques (adaptée de Kimura <i>et al.</i> , 2003 (Kimura and Shiota, 2003)).	Page 67
<u>Figure 40.</u> Rôle de MBD3 dans la transition G2/M.	Page 68
<u>Figure 41.</u> Modélisation du rôle de MBD4 dans la surveillance et la réparation des sites CpG méthylés (adaptée de Bellacosa, 2001 (Bellacosa, 2001)).	Page 70
<u>Figure 42.</u> MBD4 et la réponse apoptotique aux dommages à l'ADN.	Page 70
<u>Figure 43.</u> La protéine MBD1, réservoir de MPG et capteur de l'alkylation des bases de l'ADN.	Page 71
<u>Figure 44.</u> L'altération des profils de méthylation de l'ADN perturbe les patrons d'expression génique dans les cancers.	Page 74
<u>Tableau 4.</u> Liste des gènes suppresseurs de tumeurs les plus souvent inactivés par l'hyperméthylation des CpG situés dans leur région promotrice lors de la tumorigenèse, ainsi que les principaux types de cancers associés à ces inactivations (Mulero-Navarro and Esteller, 2008).	Page 77
<u>Figure 45.</u> Fréquence d'hyperméthylation des îlots de CpG de certains gènes dans plusieurs types de cancer (adaptée de Esteller <i>et al.</i> , 2001 (Esteller <i>et al.</i> , 2001)).	Page 79
<u>Tableau 5.</u> Applications cliniques des marqueurs épigénétiques (adaptée de Mulero-Navarro et Esteller, 2008 (Mulero-Navarro <i>et al.</i> , 2008)).	Page 80
<u>Tableau 6.</u> Agents de déméthylation de l'ADN (adaptée de Muelro-Navarro et Esteller, 2008 (Mulero-Navarro <i>et al.</i> , 2008)).	Page 81

Tableau 7. Fixation des protéines à MBD sur les promoteurs à îlot de CpG hyperméthylés des gènes suppresseurs de tumeurs dans les cancers (adaptée de Lopez-Serra et Esteller, 2008 (Lopez-Serra *et al.*, 2008)). Page 84

Figure 46. Modèle des processus séquentiels menant à l'hyperméthylation de l'îlot de CpG du gène *GSTP1* (adaptée de Stirzaker *et al.*, 2004 (Stirzaker *et al.*, 2004)). Page 87

LISTE DES PRINCIPALES ABRÉVIATIONS

ADN : Acide désoxyribonucléique

ARN : Acide ribonucléique

ARNm : ARN messenger

ARN polIII : ARN polymérase II

5azadC : 5-aza-2'-désoxycytidine

ChIP : *Chromatin Immunoprecipitation*, immunopécipitation de chromatine

ChIP-on-chip : Hybridation sur puce (chip) de séquences génomiques immunoprécipitées par ChIP

CpG : Dinucléotide 5'-cytosine-guanine-3'

DNMT : *DNA methyltransferase*, ADN méthyltransférase

HDAC : *Histone deacetylase complexe*, complexe de désacétylation des histones

H3-K9 : Lysine 9 des histones H3

HMT : *Histone methyltransferase*, histone méthyltransférase

Kb : Kilobase

KDa : Kilodalton

5mC : 5-méthylcytosine

MBD : *Methyl-CpG-binding domain*, domaine protéique de fixation à l'ADN méthylé

MBD_{1,2,3,4} : *Methyl-CpG-binding domain proteins*, protéines à domaine MBD

MeCP1 : *Methyl-CpG-binding protein 1*, complexe protéique liant les CpG méthylés

MeCP2 : *Methyl-CpG-binding protein 2*, protéine liant les CpG méthylés

nt : Nucléotides

NuRD : *Nucleosome remodelling and histone deacetylation complex*, complexe de remodelage de la chromatine et de désacétylation des histones

pb : Paire de base

RE : Récepteurs aux oestrogènes

RNAi : *RNA interference*, interférence à l'ARN

RTT : Syndrome neurodéveloppemental de Rett

siRNA : Petits ARN interférents

TRD : *Transcriptional repression domain*, domaine protéique de répression transcriptionnelle

TSA : Trichostatine A



**INTRODUCTION ~
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE**

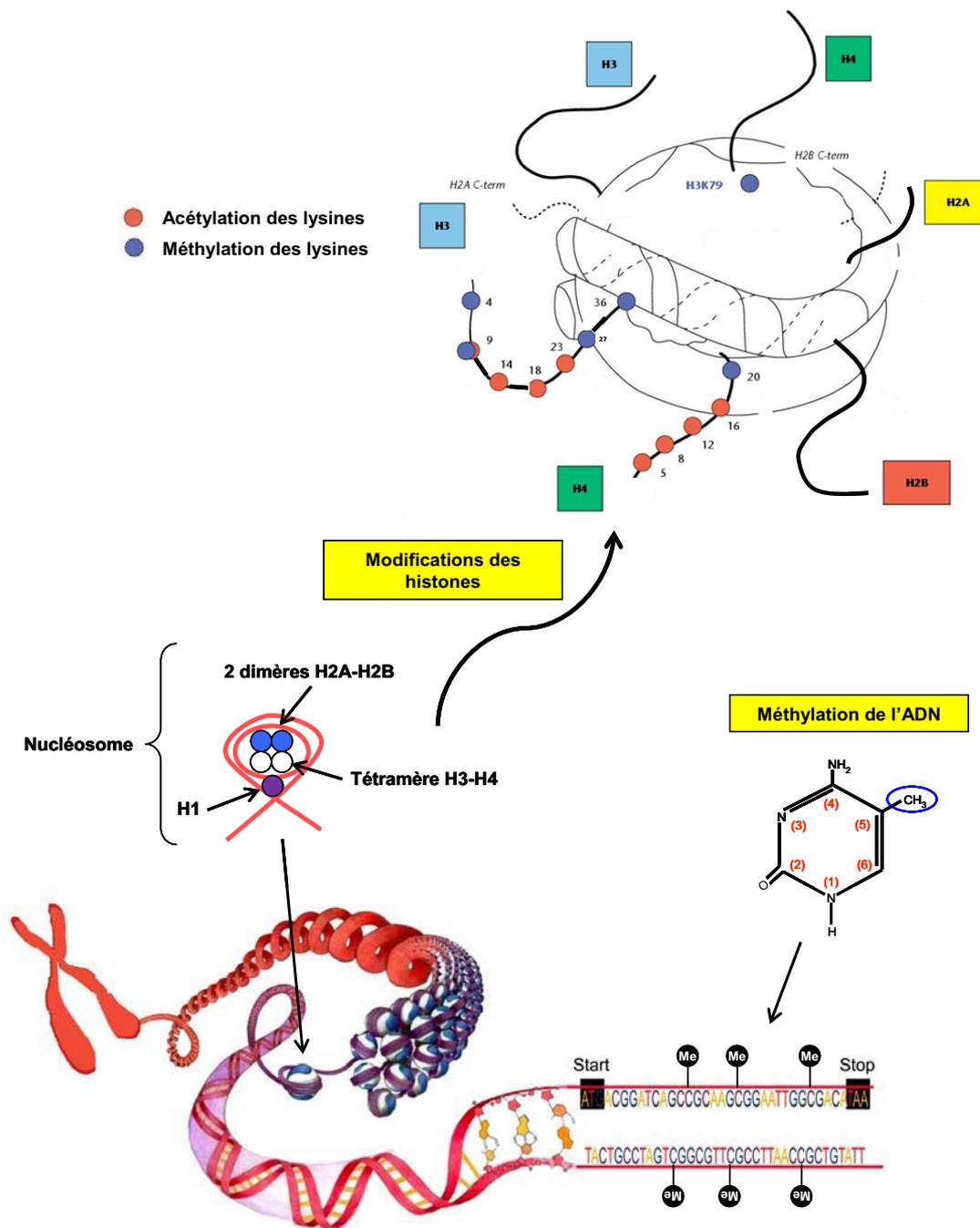


Figure 1. Différents niveaux d'organisation de la chromatine et principales modifications épigénétiques.

Les différents niveaux de compaction de l'ADN sont représentés de la forme la moins condensée qu'est la double hélice d'ADN libre, à droite, à sa forme la plus condensée qu'est le chromosome métaphasique, à gauche. Figurent aussi sur ce schéma, les principales modifications épigénétiques. La méthylation des dinucléotides CpG de l'ADN est ainsi décrite à droite de la figure. Un détail de la 5-méthylcytosine est donné. Le groupement méthyle CH₃ ajouté à la cytosine est entouré en bleu. Les principales modifications post-traductionnelles des histones conduisant à la compaction ou à la décompaction de la chromatine sont également présentées. Les différents sites d'acétylation et de méthylation des lysines des queues N-terminales des histones sont ainsi symbolisés par des ronds respectivement rouges et bleus.

AVANT PROPOS

L'identité de chaque individu est contenue dans son génome. L'être humain possède un patrimoine d'environ 35 000 gènes, hérité de ses parents et porté par l'ADN. De ce génome qui est propre à chacun, est issu un organisme complexe composé de multiples tissus aux particularités uniques. Ainsi si nos quelques 10 000 milliards de cellules possèdent toutes le même patrimoine génétique, la transcription d'un répertoire de gènes particulier à chaque type cellulaire leur donne leur spécialisation phénotypique. C'est l'épigénome qui permet à une cellule d'adapter son programme génétique de manière appropriée. Et, tout comme le matériel génétique, l'information épigénétique doit être préservée ; son altération peut compromettre le développement d'un organisme ou participer à l'apparition de cancers.

Le génome se présente sous la forme d'une double hélice d'ADN (WATSON and CRICK, 1953), dont la taille à l'état déroulé est de deux mètres (**Figure 1**). Dans l'espace tridimensionnel du noyau des cellules eucaryotes, l'ADN n'est jamais nu mais est organisé sous la forme d'un complexe nucléoprotéique appelé chromatine. L'unité fondamentale de la chromatine, le nucléosome, est formé d'un cœur protéique comprenant un octamère de protéines structurales, les histones, (2 copies de chacune des histones H2A, H2B, H3 et H4), autour duquel s'enroulent 146 pb de la double hélice d'ADN (Kornberg and Lorch, 1999) (**Figure 1**). C'est ensuite avec le concours, entre autres, d'une autre protéine histone, l'histone de liaison H1, que des états chromatiniens encore plus condensés peuvent se former (Woodcock *et al.*, 2006) (**Figure 1**). Cette fibre chromatinienne est ainsi plus ou moins compactée et classiquement compartimentée en euchromatine transcriptionnellement active, et en hétérochromatine condensée et silencieuse (Khorasanizadeh, 2004). Ces deux états sont le résultat de nombreuses interactions protéine/protéine et ADN/protéine, qui dépendent pour la plupart de marques dites « épigénétiques » (**Figure 1**). Il s'agit par exemple de la méthylation de l'ADN au niveau de dinucléotides CpG et de certaines modifications post-traductionnelles des histones (acétylation et méthylation par exemple). Ainsi, il est maintenant bien établi que l'acétylation des queues N-

terminales des histones H3 et H4 catalysées par des histones acétyltransférases (HAT) et la méthylation des résidus lysines 4, 36 et 79 des histones H3 par des histones méthyltransférases (HMT) sont associées à une chromatine décondensée (Khorasanizadeh, 2004) (**Figure 1**). A l'opposé, la désacétylation des histones H3 et H4 par des histones désacétylases (HDAC), la méthylation des lysines 9 et 27 des histones H3 et des lysines 20 des histones H4, ainsi que la méthylation de l'ADN conduisent à la compaction de la chromatine (Khorasanizadeh, 2004) (**Figure 1**). Ces différentes modifications ont donc des effets variables sur la structure chromatinienne en modulant les interactions histones-ADN et entre nucléosomes mais elles forment aussi un module de reconnaissance pour divers facteurs régulateurs (Luger *et al.*, 1997).

Le conditionnement de notre génome, à la fois physique et fonctionnel fournit donc un répertoire d'informations, l'épigénome, qui complète l'information génétique. On peut ainsi attribuer deux fonctions à l'épigénome : (i) d'une part, une fonction que l'on peut qualifier de « globale », de structuration des grands domaines chromatiniens ; (ii) et d'autre part, une fonction plus localisée, de régulation spécifique d'un locus donné.

La première modification épigénétique identifiée a été la méthylation de l'ADN (HOTCHKISS, 1948). La méthylation de l'ADN désigne l'ajout, par des ADN méthyltransférases, de groupements méthyles aux bases de l'ADN et plus particulièrement aux cytosines localisées dans des dinucléotides CpG chez les mammifères (Bird, 2002) (**Figure 1**). En d'autre terme, cette modification covalente n'affecte pas la séquence primaire de l'ADN mais se surimpose à l'information génétique. La méthylation de l'ADN est un phénomène réversible et transmissible. En effet, les profils de méthylation des génomes eucaryotes sont établis durant le développement embryonnaire et sont maintenus au cours des divisions cellulaires (Bird, 2002). Toutefois, une minorité de ces marques semble héritée au cours des générations (Morgan *et al.*, 1999).

La méthylation de l'ADN est impliquée dans de nombreuses fonctions biologiques liées notamment au développement et au maintien de l'intégrité du génome, mais elle possède aussi un rôle majeur dans la répression transcriptionnelle (Bird, 2002). En effet, la méthylation de l'ADN intervient dans un vaste processus de répression de la transcription affectant soit un gène spécifique, soit une région précise du génome. Cette répression transcriptionnelle fait principalement appel aux protéines capables d'interpréter le signal de méthylation de l'ADN, qui couplent cette méthylation à une structure chromatinienne condensée et inactive.

La méthylation de l'ADN, tout comme les marques épigénétiques en général, réfère donc à « un changement héritable mais réversible de l'activité du génome qui est dû à un mécanisme autre que l'altération dans la séquence primaire de l'ADN ».

Des altérations des profils de méthylation de l'ADN ont des répercussions sur la régulation d'acteurs géniques clés, participant ainsi au développement de pathologies humaines sévères. De tels cas ont été décrits dans de nombreux types de cancers, où la surexpression d'oncogène et/ou l'inhibition de gène suppresseur entraînent des perturbations de la prolifération et la différenciation cellulaire entre autres (Das and Singal, 2004).

Au cours de cette introduction, nous allons donc discuter des différents rôles physiologiques de la méthylation de l'ADN et de ses interprètes et enfin de leur implication dans la cancérogenèse.

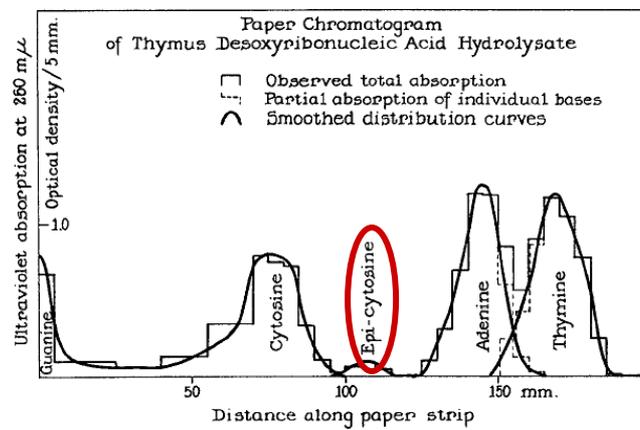


Figure 2. Mise en évidence de l'épi-cytosine par Hotchkiss en 1948 (HOTCHKISS, 1948).

Analyse de la distribution en bases de l'ADN extrait de thymus de veau par chromatographie sur papier après hydrolyse acide.

CHAPITRE 1

**LA METHYLATION DE L'ADN,
DE SA MISE EN PLACE A SES IMPORTANTES FONCTIONS BIOLOGIQUES**

1- SURVOL HISTORIQUE, SUR LES SENTIERS DE LA METHYLATION DE L'ADN...

Il y a plus d'un demi-siècle, à une époque où la structure et la fonction de l'ADN en tant que matériel héréditaire n'avaient pas encore été découvertes, Rollin Hotchkiss mettait en évidence par hydrolyse acide prolongée, l'existence de bases azotées méthylées, alors appelées « épi-cytosines », au sein d'ADN extrait de thymus de veau (HOTCHKISS, 1948) (**Figure 2**). Il faudra cependant attendre la découverte de la double hélice (WATSON and CRICK, 1953), puis les années 60s et le déchiffrement du code génétique (NIRENBERG and MATTHAEI, 1961) pour que la biologie moderne voit le jour et que les recherches sur la méthylation de l'ADN débutent réellement.

Les premiers travaux démontrant un rôle biologique de la méthylation de l'ADN remontent à la découverte et à la compréhension des systèmes de défense bactériens dits de restriction/modification. En effet, pour se protéger des infections par des bactériophages, les bactéries tirent profit de la méthylation séquence-spécifique de leur propre ADN. Les endonucléases bactériennes distinguent ainsi l'ADN de bactériophage et le dégradent rapidement, empêchant toute intégration d'ADN étranger dans le génome bactérien (Kuhnlein *et al.*, 1969). Ces études ont permis par ailleurs d'identifier, chez *E. coli*, les premières méthylases de l'ADN, aujourd'hui appelées ADN méthyltransférases (GOLD and HURWITZ, 1964; Kuhnlein *et al.*, 1969).

A cette même période, des ADN méthyltransférases furent aussi détectées au sein de fractions chromatiniennes murines (Burdon *et al.*, 1967) et d'extraits nucléaires de foie de rat (Sheid *et al.*, 1968; Kalousek and Morris, 1968; Kerr and Borek, 1973). En 1975, pour la première fois, Roy et Weissbach purifient et caractérisent une ADN méthyltransférase humaine à partir de noyaux cellulaires de HeLa (Roy and Weissbach, 1975). La première méthyltransférase murine de l'ADN a été clonée par le laboratoire de Bestor en 1988 (Bestor, 1988). Par recherche d'homologies de

séquences, plusieurs ADN méthyltransférases ont été par la suite identifiées et purifiées chez tous les vertébrés.

Une dizaine d'années après la mise en évidence du rôle protecteur de la méthylation de l'ADN face à l'introduction d'un ADN étranger dans le patrimoine génétique bactérien, l'existence d'un potentiel rôle biologique de la méthylation de l'ADN chez les eucaryotes fut pour la première fois suggérée. En 1979, les observations de Mandel et Chambon montrent que des profils de méthylation différentiels, dans les régions contenant le gène codant l'ovalbumine de poulet, sont associés à des niveaux d'expression variables du gène dans différents tissus (Mandel and Chambon, 1979). Dès lors, ces résultats suggèrent un rôle de la méthylation de l'ADN dans la répression génique chez les eucaryotes.

Ces importantes avancées seront suivies par la mise en évidence au cours des dernières années, du rôle essentiel joué par la méthylation de l'ADN dans divers processus biologiques associés au développement, comme l'inactivation du chromosome X chez les mammifères femelles, l'empreinte parentale ou encore l'expression de gènes spécifiques de tissus (Jones and Takai, 2001). En outre, il semble de plus en plus clair qu'une méthylation aberrante tient un rôle primordial dans la cancérogenèse.

Bien qu'identifiée dès 1948, la méthylation de l'ADN fut longtemps considérée par la communauté scientifique comme un épiphénomène biologique. Toutefois depuis la caractérisation des enzymes responsables de la méthylation, d'énormes progrès ont été réalisés et ont permis de découvrir l'importante implication de la méthylation de l'ADN dans la régulation génique et les mécanismes de cancérogenèse. Au préalable de toute discussion sur les liens entre méthylation de l'ADN et cancer, qui fera l'objet du troisième chapitre de cette introduction, il semble important de définir la distribution générale de la méthylation dans les génomes ainsi que ses rôles biologiques.

2- LES PROFILS DE METHYLATION DE L'ADN

2.1- LA METHYLATION DE L'ADN, UN PHENOMENE UNIVERSEL MAIS AVEC UNE DIVERSITE DE MOTIFS ET DE PROFILS

Comme précédemment évoqué, le terme « méthylation de l'ADN » désigne l'ajout, par des ADN méthyltransférases, de groupements méthyles aux bases de l'ADN. La méthylation de l'ADN est ainsi considérée comme une modification épigénétique. En d'autre terme, cette modification

Tableau 1. Descriptif de la méthylation de l'ADN dans la plupart des grands groupes biologiques.

Organismes Vivants	Règnes	Cibles de la méthylation de l'ADN	Contexte de séquence	Répartition au sein du génome
Procaryotes (Palmer and Marinus, 1994)		adénines (en N6) et cytosines (en N4 et C5)		Répartition homogène. Chez les bactéries, tous les sites méthylables sont méthylés.
Eucaryotes	Protistes tels que <i>Tetrahymena</i> , <i>Chlamydomonas</i> et <i>Trypanosoma</i> (White <i>et al.</i> , 1986; Umen and Goodenough, 2001)	adénines et cytosines		
	Végétaux (Finnegan <i>et al.</i> , 2000)	cytosines (en C5)	5'-CpG-3', 5'-CpNpG-3' (<i>N</i> représentant ici une base azotée quelconque), 5'-CpApT-3', 5'-CpTpT-3'	Répartition homogène. Chez angiosperme, 25% des cytosines du génome sont méthylées.
	Champignons : (i) ascomycète <i>Neurospora crassa</i> (Selker <i>et al.</i> , 2003) (ii) Levures, <i>Saccharomyces cerevisiae</i> et <i>pombe</i>	cytosines	5'-CpG-3', 5'-CpNpG-3', 5'-CpApT-3', 5'-CpTpT-3'	
		Pas de méthylation de l'ADN		
	Animaux (Lyko <i>et al.</i> , 2000; Ramsahoye <i>et al.</i> , 2000; Malone <i>et al.</i> , 2001)	Cytosines (C5)	5'-CpG-3' et dans quelques rares cas : 5'-CpA-3' ou 5'-CpT-3'	<u>Invertébrés</u> : au maximum 50% des CpG sont méthylés. Répartition en domaines. (Bird and Taggart, 1980; Tweedie <i>et al.</i> , 1997). <i>Exceptions</i> : Arthropodes et némathelminthes : méthylation de l'ADN très faible (ex. <i>Drosophila</i>) voir absente chez le nématode <i>Caenorhabditis elegans</i> . (Lyko <i>et al.</i> , 2000; Mandrioli and Volpi, 2003). <u>Vertébrés</u> : 70-80% des CpG méthylés, distributions non uniformes (Ehrlich <i>et al.</i> , 1982)

covalente n'affecte pas la séquence primaire de l'ADN mais se surimpose à l'information génétique. La méthylation de l'ADN est un phénomène transmissible, c'est à dire hérité au cours des divisions cellulaires mitotiques et méiotiques pour certaines séquences, et réversible.

La méthylation de l'ADN est présente dans la plupart des grands groupes biologiques. En revanche, les profils de méthylation de ces différents génomes varient considérablement tant de part la nature des cibles de la méthylation, leur contexte de séquence, que part leur répartition au sein du génome (**Tableau 1**).

Chez les procaryotes, la méthylation concerne les adénines (en N6 (Azote 6)) et les cytosines (en N4 (Azote 4) et C5 (Carbone 5)) (Palmer and Marinus, 1994). Ces bases méthylées sont réparties de manière homogène dans les génomes procaryotes.

Chez les eucaryotes, la méthylation est essentiellement imposée sur les cytosines (en N4 et C5) (Buryanov and Shevchuk, 2005;Goll and Bestor, 2005). Au sein du règne animal, cette marque se restreint majoritairement aux cytosines présentes dans des séquences symétriques 5'-CpG-3', appelées doublets CpG. Quelques rares cas de méthylation de dinucléotides CpA ou CpT existent, mais leur fréquence reste négligeable (Lyko *et al.*, 2000;Ramsahoye *et al.*, 2000;Malone *et al.*, 2001). Selon les espèces, les taux et les profils de méthylation de l'ADN sont très hétérogènes. Aucune méthylation de bases azotées n'est détectable dans le génome du nématode *Caenorhabditis elegans* (Bird, 2002). L'insecte *Drosophila melanogaster*, a lui aussi été longtemps considéré comme dépourvu de toute méthylation de l'ADN. Cependant, depuis qu'un homologue de l'ADN méthyltransférase 2 de mammifère a été caractérisé chez cet invertébré (Hung *et al.*, 1999;Tweedie *et al.*, 1999), il a été montré, par chromatographie haute sensibilité, qu'un très faible taux, ~ 0,05 à 0,1%, de cytosines totales, majoritairement localisées dans des dinucléotides CpT, était tout de même méthylé dans son génome (Lyko *et al.*, 2000;Gowher *et al.*, 2000). En revanche, la majorité des autres génomes d'invertébrés ont des niveaux de cytosines méthylés intermédiaires qui concernent au maximum 50% des CpG. Au contraire des procaryotes, ces cibles méthylables suivent une distribution non-uniforme : les cytosines méthylées sont concentrées en de larges domaines séparés par des domaines équivalents non-méthylés (Bird *et al.*, 1979;Tweedie *et al.*, 1997). Enfin, à l'extrême opposé de *C. elegans*, le génome des vertébrés possède le niveau le plus élevé de cytosines méthylées trouvé dans le règne animal.

Ainsi, il apparaît que la méthylation de l'ADN est retrouvée des procaryotes aux mammifères, en passant par les végétaux. Il est néanmoins à noter qu'en association avec la taille du génome des organismes et de leur place dans l'échelle de l'évolution, une spécificité de cible de la méthylation pour les cytosines situées dans des dinucléotides CpG, une augmentation du taux global de méthylation ainsi qu'une complexification de sa répartition au sein des génomes sont observés. Nous focaliserons désormais notre étude sur la description des mécanismes de mise en place de la méthylation de l'ADN ainsi qu'à l'analyse de ses fonctions chez les mammifères.

2.2- DISTRIBUTION DES DINUCLEOTIDES CpG, LES CIBLES DE LA METHYLATION DE L'ADN DES GENOMES DE MAMMIFERES

Chez les humains et les autres mammifères, la méthylation de l'ADN se produit spécifiquement sur le carbone 5 (C5) des cytosines situées en 5' de guanines. Les résidus 5-méthylcytosines se retrouvent donc principalement localisés dans les dinucléotides CpG. Le génome de mammifère contient environ 3.10^7 cytosines méthylées, ce qui représente 3 à 8% des résidus cytosines. Dans une cellule somatique humaine, les 5-méthylcytosines représentent environ 1% de la totalité des bases de l'ADN et la méthylation affecte 70 à 80% des dinucléotides CpG du génome (Ehrlich *et al.*, 1982). Il existe toutefois, entre les différents tissus adultes, des écarts autour de ces valeurs. Les ADN de sperme et de placenta apparaissent être les moins méthylés alors qu'à l'opposé ceux du thymus et du cerveau sont les plus méthylés (Ehrlich *et al.*, 1982).

Les sites méthylables des génomes de vertébrés suivent une distribution non-uniforme. La fréquence générale des dinucléotides CpG dans le génome des mammifères est considérablement inférieure à sa probabilité théorique (Bird, 1980). Chez l'homme, seulement 1/5 de la fréquence attendue en dinucléotides CpG est observée (Russell *et al.*, 1976). La méthylation de l'ADN a probablement conduit au cours de l'évolution à la perte de beaucoup de dinucléotides CpG du génome. Cette « élimination » est liée à la sensibilité des cytosines méthylées à perdre spontanément un groupement amine et ainsi à se transformer en thymidine. Si cette mutation de désamination n'est pas réparée, le changement cytosine/thymidine persiste. En effet, dans le génome, cette transition nucléotidique est retrouvée aux sites de déplétion des dinucléotides CpG. Ce changement de base constitue également le plus commun des polymorphismes génétiques dans la population humaine (Rideout, *et al.*, 1990). A cause de l'activité mutationnelle des cytosines méthylées, les dinucléotides CpG sont donc sous-représentés dans le génome. Toutefois, il existe dans le génome de mammifère des domaines, appelés îlots de CpG, où ce dinucléotide est plus

Cellules somatiques normales: 70-80% des CpG sont méthylés

♀ CpG sous-représentés → $CpG_{obs}/CpG_{théo} = 0,2$

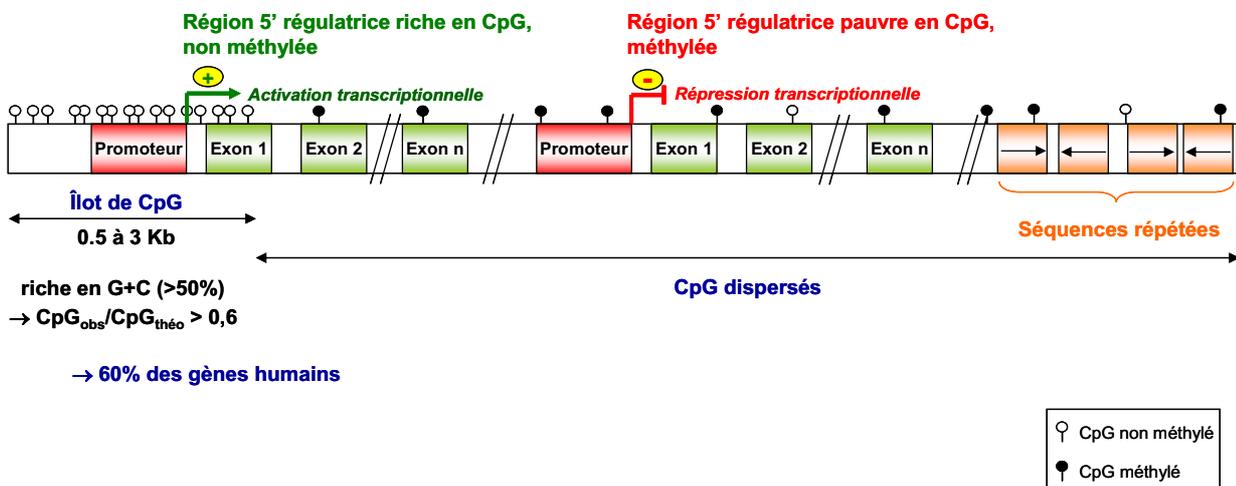


Figure 3. Profil de méthylation de l'ADN dans les cellules somatiques de mammifères.

Chez les mammifères, la méthylation de l'ADN touche les résidus cytosines localisés dans des dinucléotides CpG. Ces derniers sont dispersés dans le génome ou regroupés dans des régions appelées îlots de CpG. Dans les cellules somatiques, les dinucléotides CpG dispersés sont majoritairement méthylés alors que ceux inclus dans les îlots de CpG ne le sont pas, hormis quelques rares exceptions telles ceux des gènes du chromosome X inactif et des gènes soumis à l'empreinte parentale.

fortement concentré. Les îlots de CpG sont des séquences de 0,5 à 3 Kb, ayant un contenu en G+C supérieur à 50% et un rapport CpG observé / CpG attendu supérieur ou égale à 0,6 (Aerts *et al.*, 2004). Ces îlots sont fréquemment retrouvés en amont, dans le promoteur et le premier exon, de gènes. En effet, pratiquement tous les gènes de « ménage » et environ 40% des gènes tissu-spécifiques possèdent un îlot de CpG à leur extrémité 5' (Ehrlich *et al.*, 1982; Bird, 1986). Soixante pourcent des promoteurs des gènes humains sont ainsi inclus dans un îlot de CpG (Antequera and Bird, 1993). Les analyses bioinformatiques du séquençage du génome humain ont permis de détecter 29,000 îlot de CpG au sein de ce génome (Lander *et al.*, 2001; Venter *et al.*, 2001). Paradoxalement, dans les cellules saines, les îlots de CpG ne sont pas méthylés hormis quelques rares exceptions. En effet, la méthylation des îlots de CpG intervient dans la maintenance et l'irréversibilité de l'inactivation de l'un des 2 chromosomes X chez les mammifères femelles mais aussi dans l'empreinte parentale, processus par lequel l'expression de certains gènes est restreinte à un allèle, paternel ou maternel (Constancia *et al.*, 1998; Surani, 1998; Huber *et al.*, 1999). Les mécanismes précis par lesquels les îlots de CpG sont protégés de la méthylation ne sont pas élucidés, mais cette absence de méthylation apparaît être un prérequis pour une transcription active.

Les profils de méthylation des mammifères sont, par conséquent, établis de façon précise (**Figure 3**) : on observe une absence de méthylation des îlots de CpG et une méthylation plus générale des autres dinucléotides CpG dispersés sur les séquences codantes et non-codantes.

3- MISE EN PLACE ET MAINTIEN DES PROFILS DE METHYLATION DE L'ADN PAR LES ADN METHYLTRANSFERASES

3.1- REPROGRAMMATION ET MISE EN PLACE DE LA DISTRIBUTION DES GROUPEMENTS METHYLES AU COURS DU DEVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE

Les profils de méthylation des génomes eucaryotes sont établis durant le développement embryonnaire. Chez les mammifères placentaires (euthériens), bien que la cinétique précise varie en fonction de l'espèce considérée, la mise en place des profils de méthylation au cours du développement apparaît être spécifique et ordonnée faisant intervenir trois mécanismes en particulier (Reik *et al.*, 2001; Dean *et al.*, 2001) (**Figure 4**).

Suite à la fécondation, les marques épigénétiques héritées des parents sont en grande partie effacées pour permettre la mise en place d'un nouveau patron propre à l'embryon (Reik *et al.*,

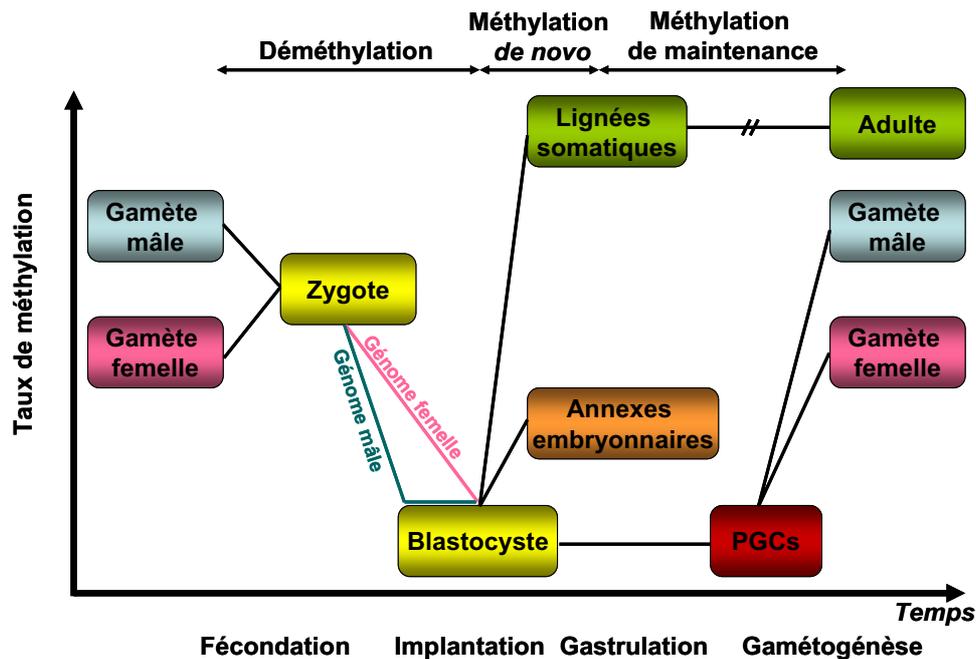


Figure 4. Reprogrammation de la méthylation dans les différentes lignées cellulaires au cours du développement embryonnaire (adaptée de Jaenisch, 1997 (Jaenisch, 1997)).

Après la fécondation, le zygote va subir une vague de déméthylation globale. Le génome paternel subit une déméthylation active très tôt, avant les premières réplifications de l'ADN alors que le génome maternel se déméthyle passivement au cours de la duplication de l'ADN. Puis, au stade du blastocyste, le génome du zygote est reméthylé par une vague de méthylation *de novo*. Une fois établis, les profils de méthylation propres à l'embryon seront maintenus durant l'organogénèse et la différenciation cellulaire grâce à la méthylation de maintenance. L'établissement des profils de méthylation est tissu-spécifique. Les annexes embryonnaires (placenta) restent largement sous-méthylées. Les cellules germinales primordiales (PGCs) restent déméthylées jusqu'au moment de la gamétogénèse où se met en place une méthylation différente entre le mâle et la femelle.

2001) (**Figure 4**). C'est ce que l'on appelle l'étape de déméthylation globale. En effet, à la formation du zygote, au cours du développement préimplantatoire et de paire avec l'acquisition de la totipotence caractéristique des blastomères, une vague de déméthylation massive affecte le génome (Howlett, 1991a). Dans le génome paternel, c'est-à-dire celui contribué par le spermatozoïde, cette vague de déméthylation est un processus actif. En effet, la déméthylation du pronoyau paternel se produit en quelques heures et est indépendante de toutes étapes de réplication de l'ADN (Mayer *et al.*, 2000;Oswald *et al.*, 2000;Santos *et al.*, 2002). Le génome maternel, contribué par l'ovocyte, subit lui une déméthylation passive au cours des divisions cellulaires en raison de l'absence d'activité de maintenance de la méthylation jusqu'au stade blastocyste (Monk *et al.*, 1987;Howlett and Reik, 1991b;Carlson *et al.*, 1992;Rougier *et al.*, 1998;Bestor, 2000). Certaines séquences ne semblent cependant pas subir cette déméthylation qu'elle soit active ou passive. En effet, les séquences répétées « Intracisternal A Particle » (IAP) (Lane *et al.*, 2003;Kim *et al.*, 2004), l'hétérochromatine centromérique (Rougier *et al.*, 1998;Santos *et al.*, 2002) et les séquences portant l'empreinte parentale (Olek and Walter, 1997;Howell *et al.*, 2001) ont la capacité de résister à cette vague de déméthylation et conservent leur profil de méthylation gamétique au cours du développement. Ce phénomène permettrait d'assurer respectivement la suppression d'une transposition des séquences IAP, une meilleure stabilité chromosomique et le maintien des marques distinctes entre les génomes parentaux, dites de l'empreinte parentale (Morgan *et al.*, 2005).

Après l'implantation et en phase avec les processus de différenciation cellulaire, l'embryon procède à l'établissement de sa propre carte de méthylation, par un mouvement de méthylation *de novo* (**Figure 4**). A partir du stade blastocyste, le génome des tissus embryonnaires devient donc de nouveau méthylé (Jaenisch, 1997). L'établissement de ces nouveaux profils de méthylation étant cellules- et tissus-spécifiques, il existe des différences globales de la méthylation de l'ADN entre les différentes lignées cellulaires. En effet, l'ADN des tissus extra-embryonnaires (placenta) reste largement sous-méthylé (Chapman *et al.*, 1984;Santos *et al.*, 2002). De plus à ce stade de développement, les cellules germinales primordiales (Primordial Germ cell ou PGCs) échappent à la vague de reméthylation. A l'opposé, ces cellules subissent une nouvelle vague de déméthylation active lors de leur migration dans les crêtes génitales (Monk *et al.*, 1987;Kafri *et al.*, 1992;Brandeis *et al.*, 1993a;Surani, 1998). Ainsi, la méthylation des gènes soumis à l'empreinte et de certaines séquences répétées comme les LINE-1 (L1) et les IAPs est effacée. La reprogrammation des profils de méthylation de ces cellules se produira durant la gamétogénèse et s'effectuera de manière différente et spécifique selon qu'il s'agit de la spermatogénèse ou de l'ovogénèse. Les lignées

germinales mâles voient leur génome se reméthylé en période prénatale, dans les spermatogonies quiescentes. Leurs profils de méthylation sont complétés après la naissance dans les spermatocytes I en division méiotique (Kafri *et al.*, 1992; Brandeis *et al.*, 1993a; Coffigny *et al.*, 1999). Dans la lignée germinale femelle, la méthylation *de novo* a lieu après la naissance, dans les ovocytes primaires en croissance (Mertineit *et al.*, 1998; Howell *et al.*, 2001). Toutes les séquences d'ADN des gamètes ne sont pas méthylées de manière équivalente. Chez la souris, les ADN satellites des gamètes mâles et femelles ne sont pas méthylés (Sanford *et al.*, 1987) tandis que les autres éléments répétés tels que les éléments IAP sont fortement méthylés dans les spermatozoïdes et les ovocytes. Les séquences L1 sont, elles, plus fortement méthylés dans les spermatozoïdes que dans les ovocytes (Sanford *et al.*, 1987; Howlett and Reik, 1991b; Razin and Kafri, 1994; Razin and Shemer, 1995; Lane *et al.*, 2003). Par ailleurs, le taux de méthylation des cellules germinales est inférieur à celui des cellules somatiques et l'analyse du niveau de méthylation globale des lignées germinales a indiqué que les gamètes mâles étaient plus fortement méthylés que les gamètes femelles (Gama-Sosa *et al.*, 1983; Monk *et al.*, 1987). Cette reprogrammation au sein des cellules germinales est donc nécessaire pour rétablir les empreintes génomiques caractéristiques des deux types de gamètes.

Enfin, lorsque le schéma de méthylation d'un type cellulaire est établi, il est fidèlement reproduit par une activité de méthylation dite de maintenance (**Figure 4**). Toutefois, la reprogrammation de marques déjà établies peut se produire au niveau de certaines régions du génome, comme l'inactivation aléatoire du chromosome X (Okamoto *et al.*, 2004) et certaines régions soumises à l'empreinte (Lewis *et al.*, 2004; Umlauf *et al.*, 2004).

3.2- LA REACTION BIOCHIMIQUE DE METHYLATION DE L'ADN

La méthylation de l'ADN est catalysée par des enzymes spécifiques appelées ADN méthyltransférases ou DNMT (DNA MethylTransférases). Alors que plus de 700 DNMT procaryotes sont connues, chez les mammifères, la famille des DNMT est divisée en seulement trois classes: DNMT1, DNMT2 et DNMT3. Toutes ces enzymes utilisent un mécanisme catalytique commun permettant le transfert d'un groupement méthyle (CH₃) sur le carbone 5 d'un résidu cytosine et emploient le cofacteur S-Adénosyl L-Méthionine (AdoMet) comme principale source de groupement méthyle (Eden *et al.*, 2003; Villar-Garea *et al.*, 2003) (**Figure 5**). Pour que la catalyse se produise, l'enzyme DNMT doit se lier à la fois à sa cible, une cytosine de l'ADN, et au

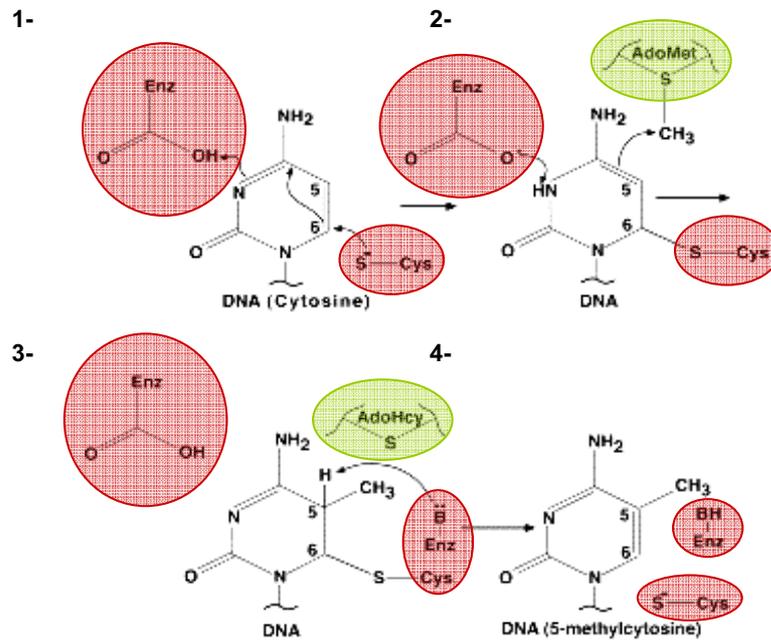


Figure 5. Catalyse de la méthylation de l'ADN par les ADN méthyltransférases (DNMT) (adaptée de Prahan et Esteve, 2003 (Pradhan and Esteve, 2003)).

1- Attaque nucléophile du carbone 6 (C6) d'une cytosine par le groupement thiol (-SH) d'une DNMT. 2- Protonation transitoire de l'azote 3 (N3) de la cytosine par l'enzyme et formation d'une cytosine-4,5-énamine capable d'attaquer le groupement méthyle de la S-adénosyl-L-méthionine (AdoMet). 3- Transfert du groupement méthyle sur le carbone 5 de la cytosine et libération du proton présent, qui est capté par un groupement basique de l'enzyme (B:). 4- Séparation de la DNMT de la 5-méthylcytosine ainsi formée.

donneur de méthyle, AdoMet. La réaction débute lorsque la cytosine cible est « extraite » de la double hélice d'ADN par un phénomène de renversement et est insérée dans le domaine catalytique de la DNMT (Cheng and Roberts, 2001). Le carbone 5 d'une cytosine représente une position relativement peu réactive pour l'addition covalente d'un groupement méthyle. C'est pourquoi les ADN méthyltransférases utilisent un mécanisme catalytique semblable à celui des thymidylates synthétases. Ainsi, dans le site actif de l'enzyme, le groupement thiol (-SH) d'une cystéine catalyse l'attaque nucléophile du carbone 6 de la cytosine. Un complexe covalent intermédiaire entre l'enzyme et l'ADN est ainsi formé. Cette attaque est facilitée par la protonation transitoire de l'azote N3 de la cytosine. Une cytosine 4-5 énamine réactive est ainsi créée et va à son tour attaquer le groupement méthyle apporté par le cofacteur AdoMet. Suite à la perte de son groupement méthyle, l'AdoMet devient une S-adénosyl-L-homocystéine (AdoHcy). Le transfert du groupement méthyle en position C5 réalisé, le proton présent est libéré et capté par un groupement basique de l'enzyme et la double liaison entre les carbones 5 et 6 se reforme. L'enzyme est finalement libérée par β -élimination (Santi *et al.*, 1983; Bestor and Verdine, 1994). Cette réaction mène ainsi à la formation de la cinquième base de l'ADN, la 5-méthylcytosine (**Figure 5**).

3.3- LES ADN METHYLTRANSFERASES

3.3.1- SIMILARITES ET DIFFERENCES ENTRE LES DIFFERENTS MEMBRES DE LA FAMILLE DES ADN METHYLTRANSFERASES

Les ADN méthyltransférases eucaryotes sont des protéines monomériques généralement composées de deux domaines : un domaine amino-terminal (N-terminal) régulateur et un domaine carboxy-terminal (C-terminal) catalytique (**Figure 6A**).

Le domaine N-terminal est le domaine « régulateur ». Il diffère énormément entre les différents membres de la famille DNMT mais c'est dans cette partie que les nombreuses régions d'interactions sont contenues (**Figure 6A**).

La région C-terminale est définie comme la région catalytique (**Figure 6A**). Toutes les enzymes participant au transfert catalytique du groupement méthyle sur l'ADN utilisent le même mécanisme enzymatique, comme décrit dans le paragraphe précédent. Cette activité catalytique spécifique est déterminée par de nombreux motifs homologues très conservés présent dans le domaine C-terminal. Les ADN méthyltransférases possèdent dix motifs séquentiels conservés et caractéristiques. Six d'entre eux (I, IV, VI, VII, IX et X) sont hautement conservés et présents dans presque toutes les

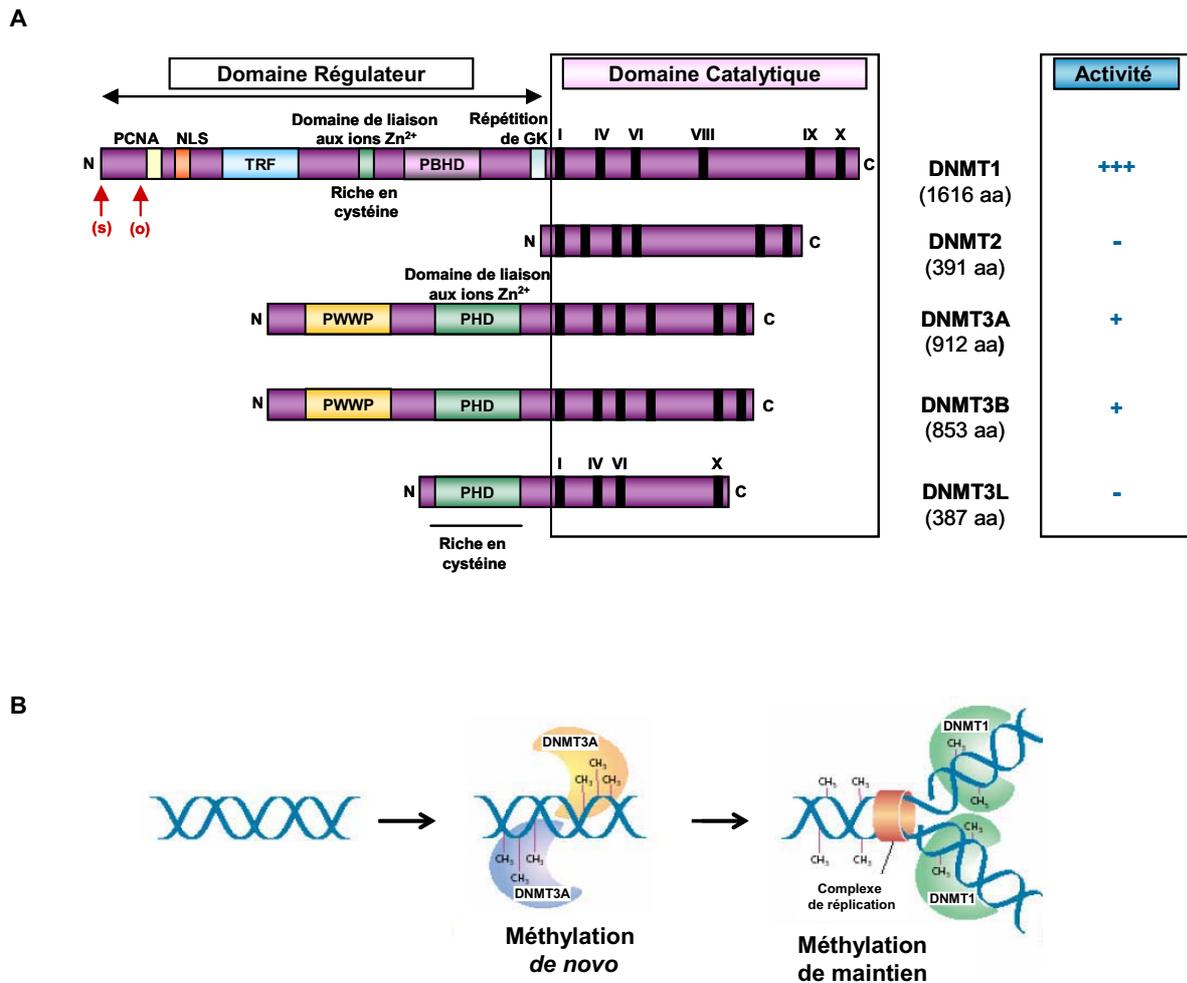


Figure 6. Structure fonctionnelle des DNMT de mammifères (adaptée de Cheng et Blumenthal, 2008 (Cheng and Blumenthal, 2008)).

(A) Conservation de la région catalytique (encadrée) entre les trois familles de DNMT : DNMT1, DNMT2 et DNMT3. Cette région contient 6 domaines hautement conservés : I, IV, VI, IX et X, et des régions variables. C et N sont les extrémités C-terminale et N-terminale des enzymes, respectivement. A l'opposé, le domaine régulateur diffère d'une DNMT à une autre. Chez DNMT1, le domaine catalytique et le domaine régulateur sont reliés par une répétition de deux aminoacides Gly-Lys (GK). Le domaine régulateur comprend un domaine de liaison au PCNA (Prolifération Cellular Nuclear Antigen), un signal de localisation nucléaire (NLS, Nuclear Localization Signal), un domaine de ciblage aux foci de réplication (TRF, Targeting Replication Foci), un motif riche en cystéine de liaison aux ions Zn^{2+} et un domaine identique à la protéine polybromo-1 (PBHD, PolyBromo-1 Homology Domain). (s) représente l'emplacement de l'ATG (site d'initiation de la traduction) de la forme somatique et (o) l'ATG de la forme ovocytaire. DNMT2 n'a pas de domaine N-terminal, elle ne comprend que le domaine catalytique, plus petit que celui de DNMT1. DNMT3A et DNMT3B possèdent des domaines catalytique et régulateur plus petits que ceux de DNMT1. Le domaine régulateur contient un domaine riche en cystéine, PHD (Plant HomoDomain), de liaison aux ions Zn^{2+} et un domaine PWWP (Pro-Trp-Trp-Pro) qui est retrouvé dans plusieurs protéines impliquées dans la réparation de l'ADN et la régulation de la transcription. Les DNMT peuvent se lier entre elles grâce à ce domaine PWWP. DNMT3L est beaucoup plus petite que DNMT3A et DNMT3B et ne présente pas d'activité méthyltransférase, mais serait capable de stimuler la méthylation *de novo* en interagissant avec DNMT3A et DNMT3B. (B) Méthylation *de novo* et méthylation de maintenance. DNMT3A et DNMT3B ont la propriété de méthyler des sites CpG non méthylés et donc d'établir la méthylation *de novo* de l'ADN. DNMT1 cible principalement les sites CpG hémi-méthylés, au niveau des fourches de réplication de l'ADN, et maintien la méthylation de ces sites au cours des divisions cellulaires.

ADN méthyltransférases eucaryotes et procaryotes (Santi *et al.*, 1983; Posfai *et al.*, 1989). Ces motifs sont généralement décrits et définis en fonction de leur rôle (Lauster *et al.*, 1989). Les motifs I à III forment la poche de liaison au cofacteur, l'AdoMet. Le motif IV possède le groupement thiol lié au dipeptide proline-cystéine responsable de l'initiation de la réaction de transfert du groupement méthyle. Les motifs VI, VIII et X forment la poche de liaison au substrat, la cytosine. Et finalement, les motifs V et VII sont responsables de la préservation du repliement du domaine de reconnaissance de la cible.

Les DNMT forment une famille d'enzymes structurellement assez hétérogènes ; elles n'ont en commun que le domaine catalytique. Cette hétérogénéité est probablement due à une divergence survenue assez tôt dans l'évolution des eucaryotes. En revanche, les gènes codant pour ces enzymes sont eux assez bien conservés entre les diverses espèces eucaryotes possédant des génomes méthylés (ex. mammifères, *Arabidopsi thaliana*, *Xenopus laevis*). Chez les mammifères, les profils de méthylation de l'ADN sont établis et maintenus par 3 classes de DNMT dont 2 principales, DNMT1 et DNMT3, et une moins bien caractérisée, DNMT2 (**Figure 6A**) (Bestor, 2000; Li, 2002). Ces enzymes régulent toutes des processus distincts. Toutefois comme plusieurs études l'indiquent, il existe un niveau considérable de coopération et une certaine redondance fonctionnelle entre ces dernières. La vision selon laquelle les différentes activités méthylases de maintenance et *de novo* sont effectuées spécifiquement et respectivement par DNMT1 et DNMT3 semble maintenant bien réductrice (Lyko *et al.*, 1999; Freitag and Selker, 2005).

3.3.2- LA FAMILLE DNMT1 ET SON ROLE DANS LA MAINTENANCE (MAIS PAS SEULEMENT) DES PROFILS DE METHYLATION DE L'ADN AU COURS DES DIVISIONS CELLULAIRES

DNMT1 fut la première ADN méthyltransférase à avoir été décrite chez la souris (Bestor, 1988) puis chez l'homme (Yen *et al.*, 1992). C'est l'enzyme DNMT la plus abondante dans les cellules somatiques de mammifères (Robertson *et al.*, 1999).

Les analyses fonctionnelles *in vitro* de DNMT1 montrent que cette enzyme manifeste une activité méthyltransférase optimale sur l'ADN hémi-méthylé. En effet, l'enzyme Dnmt1 murine méthyle préférentiellement les dinucléotides CpG hémi-méthylés du génome (Bestor and Ingram, 1983). De plus, chez l'homme, cette enzyme est 7 à 20 fois plus active *in vitro* sur l'ADN hémi-méthylé que sur l'ADN non-méthylé (Pradhan *et al.*, 1999). Des expériences de délétion du

domaine N-terminal de DNMT1 de mammifères (Bestor, 1992), ainsi que la construction de protéines DNMT1 hybrides contenant le domaine N-terminal de Dnmt1 murine fusionné au domaine C-terminal de DNMT procaryotes (Pradhan and Roberts, 2000), ont suggéré que la forte affinité de DNMT1 pour les sites hémi-méthylés lui est conférée par son domaine N-terminal. DNMT1 est ainsi souvent considérée comme la méthyltransférase de maintien qui permet de garder le même profil de méthylation au fil des divisions cellulaires (**Figure 6B**) (Bestor, 1992). Effectivement, lors de la réplication cellulaire, DNMT1, qui est généralement répartie de façon diffuse dans le noyau, se lie à PCNA (Prolifération Cellulaire Nuclear Antigen) et se concentre dans les foci de réplication dès le début de la phase S (Leonhardt *et al.*, 1992;Chuang *et al.*, 1997).

Comme la présence de DNMT1 n'est pas restreinte aux cellules en prolifération mais qu'elle est également localisée dans des tissus ayant un faible taux de prolifération (comme le cœur et le cerveau), il est fort probable que DNMT1 puisse également intervenir dans d'autres mécanismes biologiques et dans la méthylation *de novo* (Robertson *et al.*, 1999). Par ailleurs, dans des thymocytes en culture, DNMT1 est recrutée sur des régions en cours de méthylation *de novo* (Makar *et al.*, 2003). *In vitro*, il a été démontré que l'activité méthylase *de novo* de DNMT1 est stimulée par la présence environnante d'ADN méthylé (Christman *et al.*, 1995;Bacolla *et al.*, 1999;Fatemi *et al.*, 2001).

L'expression de DNMT1 se fait à partir de plusieurs promoteurs dont des promoteurs sexe-spécifiques et donne naissance à trois isoformes : DNMT1, DNMT1o et DNMT1p (**Figure 6A**).

DNMT1 est la forme somatique la plus répandue. Elle est retrouvée dans toutes les cellules en division. L'ARN messager (ARNm) *DNMT1* présente plusieurs points d'initiation de traduction. Il existe donc plusieurs isoformes de DNMT1 provenant d'initiations alternatives de la traduction: DNMT1a et DNMT1b (Hsu *et al.*, 1999;Bonfils *et al.*, 2000). Le variant DNMT1a est la forme majoritaire de DNMT1 dans les cellules somatiques des vertébrés (Hsu *et al.*, 1999). Le variant DNMT1b, isoforme mineur dans les cellules humaines, représente seulement 2 à 5% du taux de protéines DNMT1 dans les cellules somatiques (Bonfils *et al.*, 2000). DNMT1b diffère de l'isoforme a par une incorporation de 48 nucléotides dans le cadre de lecture entre les exons 4 et 5. Les propriétés enzymatiques de ces deux isoformes sont les mêmes mais la fonction biologique de DNMT1b n'est pas encore connue.

L'expression de Dnmt1o commence à partir du promoteur et de l'exon 1o et donne lieu à une protéine Dnmt1 dépourvue des 118 premiers acides aminés mais totalement fonctionnelle au point de vue activité méthyltransférase de l'ADN. L'expression de Dnmt1o est restreinte à l'ovocyte jusqu'à l'embryon préimplantatoire (Mertineit *et al.*, 1998). Pendant cette période, Dnmt1o effectue

plusieurs allers-retours entre le noyau et le cytoplasme mais son rôle précis dans ce stade précoce du développement n'est pas encore tout à fait compris (Doherty *et al.*, 2002). Toutefois, chez la souris, des expériences d'inactivation de cet isoforme, par délétion du promoteur ovocyte-spécifique et de l'exon 1o du gène *Dnmt1*, ont suggéré que Dnmt1o serait responsable du maintien des profils de méthylation des gènes soumis à l'empreinte (Howell *et al.*, 2001). De plus, l'absence de Dnmt1o dans le noyau lors de la fécondation et jusqu'au stade huit cellules pourrait être à l'origine de la déméthylation passive du génome maternel (Carlson *et al.*, 1992).

Enfin, l'expression de Dnmt1 à partir du promoteur et de l'exon 1p se produit uniquement au stade pachytène de la spermatogenèse. Toutefois ce transcrit ne code aucune protéine (Doherty *et al.*, 2002).

L'inactivation du gène *Dnmt1* chez la souris entraîne une létalité embryonnaire précoce associée à une hypométhylation génomique sévère (jusqu'à 70% de perte de la méthylation du génome) avec une dérégulation des gènes d'empreinte et une activation ectopique du chromosome X, soulignant son importance pendant le développement embryonnaire précoce (Li *et al.*, 1992; Bestor, 2000). Cependant, il est à remarquer que cette forte baisse de la méthylation du génome due à l'inactivation du gène *Dnmt1* n'a pas d'effets détectables sur la viabilité et la prolifération des cellules souches embryonnaires (ES) en culture. En revanche, ces cellules perdent leur capacité à se différencier. Ces observations suggèrent donc que la méthylation de l'ADN ne serait pas un facteur clé dans la croissance cellulaire mais interviendrait plutôt dans la différenciation (Li *et al.*, 1992).

La persistance d'un taux non-négligeable de méthylation de l'ADN dans les cellules *Dnmt1*^{-/-} ainsi que la capacité des cellules ES privées de Dnmt1 à effectuer une méthylation *de novo* de l'ADN rétroviral ont conduit à la recherche de nouvelles ADN méthyltransférases (Lei *et al.*, 1996).

3.3.3- LA FAMILLE DNMT3 ET SON ROLE DANS LA METHYLATION DE L'ADN DE NOVO OU PLUS

Plus récemment la famille des ADN méthyltransférases DNMT3 a été décrite. Cette famille est composée de trois enzymes très homologues exprimées à partir de trois gènes distincts localisés sur des chromosomes différents (Bestor, 2000). Deux de ces DNMT, DNMT3A et DNMT3B, sont enzymatiquement actifs, contrairement au troisième membre non-fonctionnel, DNMT3-Like (DNMT3L), qui est un facteur régulateur de la méthylation de l'ADN (**Figure 6A**).

3.3.3.1- DNMT3A ET DNMT3B, LES « MEMBRES ACTIFS » DE LA FAMILLE DNMT3

Les enzymes DNMT3A et DNMT3B ont été identifiées par homologie de séquence avec le domaine catalytique DNMT1 (Okano *et al.*, 1998b; Xie *et al.*, 1999). Ces deux DNMT sont classiquement appelées les méthyltransférases *de novo* car, contrairement à DNMT1, elles sont capables *in vitro* de méthyler avec une affinité équivalente aussi bien l'ADN non-méthylé que l'ADN hémi-méthylé (Okano *et al.*, 1998b). De plus, il a été démontré que ces enzymes sont responsables de l'établissement des profils de méthylation du génome au cours du développement (Okano *et al.*, 1999). En effet, c'est au cours des stades précoces du développement quand l'embryon procède à l'établissement de sa propre carte de méthylation, par un mouvement de méthylation *de novo*, que Dnmt3a et Dnmt3b sont fortement exprimées. L'expression de ces deux Dnmt3 est donc observée dans les embryons précoces, les cellules ES, et les cellules germinales en développement. En revanche, leur expression est quasi absente dans les cellules somatiques différenciées (Pradhan and Esteve, 2003), renforçant ainsi l'idée que ces enzymes ont plutôt un rôle dans l'établissement que dans le maintien des profils de méthylation.

Comme pour DNMT1, différents isoformes de DNMT3A (deux) et DNMT3B (Cinq pour l'humain et huit pour la souris) ont été identifiées (Okano *et al.*, 1998b; Chen *et al.*, 2002). Les propriétés biochimiques et les fonctions biologiques des différentes isoformes sont peu connues. Toutefois, l'expression différentielle de ces diverses isoformes au cours du développement, et dans les différents tissus, leur localisation nucléaire spécifique, ainsi que structure protéique, laissent supposer qu'elles possèdent des fonctions différentes au cours du développement (Okano *et al.*, 1998b; Robertson *et al.*, 1999; Aoki *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2002; Qiu *et al.*, 2002).

Lorsque les gènes *Dnmt3a* ou *Dnmt3b* sont invalidés chez la souris, celles-ci ne sont pas viables. Les souris *Dnmt3a*^{-/-} meurent 4 semaines après la naissance tandis que les souris *Dnmt3b*^{-/-} meurent *in utero* au jour embryonnaire 9,5 au moment où la gastrulation se met en place (Okano *et al.*, 1999). L'utilisation de souris ayant une invalidation conditionnelle dans les cellules germinales de *Dnmt3a* a permis de montrer que Dnmt3a joue un rôle essentiel dans l'établissement de l'empreinte génétique aussi bien maternelle que paternelle (Kaneda *et al.*, 2004). Dnmt3b semble être responsable, au moins en partie, de la méthylation des régions péri-centromériques satellites mineures (Bachman *et al.*, 2001). La mutation de la forme humaine DNMT3B est d'ailleurs associée au syndrome ICF (Immunodéficience, instabilité Centromérique, anomalies Faciales),

caractérisé par une hypométhylation de séquences satellites et une forte instabilité centromérique (Okano *et al.*, 1999; Xu *et al.*, 1999).

Une invalidation des gènes *Dnmt3a* ou *Dnmt3b* dans des cellules ES n'engendre pas de phénotype spécifique. En revanche, lorsque les deux gènes *Dnmt3a* et *Dnmt3b* sont inactivés simultanément, la méthylation *de novo* de séquences provirales infectées n'est pas observée (Okano *et al.*, 1999; Chen *et al.*, 2003). De plus, une perte progressive de la méthylation globale de l'ADN a été rapportée, suggérant que ces deux enzymes ont non seulement un rôle dans la méthylation *de novo* mais également dans le maintien des profils de méthylation du génome (Okano *et al.*, 1999; Chen *et al.*, 2003).

Actuellement, quelques études ont montré que DNMT3A et DNMT3B participent également à la maintenance des profils de méthylation en coopération avec DNMT1 (Liang *et al.*, 2002; Rhee *et al.*, 2002). En effet, dans des cellules humaines de carcinome colorectal (HCT116) l'invalidation de *DNMT1* par recombinaison homologue entraîne une réduction de seulement 20% de la méthylation globale du génome (Rhee *et al.*, 2000) alors que la double inactivation avec *DNMT3B* conduit à une perte de plus de 95% de cette méthylation (Rhee *et al.*, 2002). De plus, des expériences de co-immunoprécipitation et d'immunocytochimie ont respectivement montré que DNMT1 forme un complexe avec DNMT3A et DNMT3B et que ces trois DNMT co-localisent dans le noyau (Kim *et al.*, 2002). Par ailleurs, il a été montré que les trois DNMT sont capables de se lier entre elles *via* leur domaine N-terminal (Liang *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2002; Rhee *et al.*, 2002).

3.3.3.2- DNMT3L, UN FACTEUR REGULATEUR DE LA METHYLATION DE L'ADN

DE NOVO

En 2000, un nouveau membre de la famille DNMT3 fut caractérisé, DNMT3L (Aapola *et al.*, 2000). Cette protéine est spécifiquement exprimée dans les cellules germinales et est structurellement proche de DNMT3A et DNMT3B (Aapola *et al.*, 2000). Toutefois, DNMT3L est dépourvue d'une grande partie de son domaine catalytique (**Figure 6A**) et n'est ainsi plus capable de méthyler l'ADN (Aapola *et al.*, 2000). En revanche, cette DNMT semble influencer de façon indirecte la méthylation de l'ADN. En effet, l'invalidation du gène *Dnmt3l* chez la souris conduit à une absence de l'empreinte maternelle chez les femelles homozygotes dont la progéniture hétérozygote n'est pas viable et se traduit chez les mâles par une stérilité (Bourc'his *et al.*, 2001; Hata *et al.*, 2002). Le phénotype obtenu par cette invalidation est similaire à celui obtenu par une invalidation conditionnelle du gène *Dnmt3a* qui conduit à une absence d'empreinte maternelle

(Hata *et al.*, 2002). Récemment, il a été montré que Dnmt3l joue également un rôle dans l’empreinte paternelle et plus précisément au moment de la naissance des souriceaux mâles quand il y a méthylation *de novo* des séquences répétées isolées dans les cellules germinales mâles (Bourc’his and Bestor, 2004; Webster *et al.*, 2005).

En définitive, DNMT3L influence la méthylation de l’ADN dans le cadre de l’établissement de l’empreinte génétique, notamment en augmentant l’activité méthyltransférase de Dnmt3a et Dnmt3b avec lesquels il interagit directement (Hata *et al.*, 2002; Chedin *et al.*, 2002; Suetake *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2005).

3.3.4- L’ENIGMATIQUE DNMT2

La protéine DNMT2 est la DNMT la moins bien connue. Bien que cette enzyme fut comme les autres identifiée par homologie de séquence avec le domaine catalytique des DNMT, elle ne semble pas présenter d’activité ADN méthyltransférase (Yoder and Bestor, 1998; Okano *et al.*, 1998a). Toutefois, cette enzyme semble être la DNMT la plus conservée. En effet, sa séquence est très similaire aux autres DNMT procaryotes et eucaryotes. De plus, DNMT2 possède de proches homologues chez les bactéries, les plantes, les insectes..., mais également dans des organismes ne présentant pas de méthylation dans leur génome, comme *Schizosaccharomyces pombe* (Dong *et al.*, 2001). L’enzyme DNMT2 humaine est une petite protéine dépourvue de domaine N-terminal (**Figure 6A**). Sa structure est fortement identique à la DNMT bactérienne *M. HhaI* (Dong *et al.*, 2001).

Les ARNm *DNMT2* sont exprimés de façon ubiquitaire à un faible niveau dans la plupart des tissus adultes humains et murins et dans les cellules ES de souris (Okano *et al.*, 1998a). L’inactivation du gène *Dnmt2* chez la souris ne semble conduire à aucun phénotype particulier. Ces souris sont viables et les profils de méthylation de l’ADN ne semblent pas être modifiés (Okano *et al.*, 1998a). La cellule est par ailleurs toujours capable de méthyler une séquence provirale infectée (Okano *et al.*, 1998a). Dès lors aucun rôle biologique n’avait pu être attribué à DNMT2 jusqu’à présent. Néanmoins, il semble que cette protéine ait une fonction plus spécifique que les autres DNMT. Des études de surexpression ou de purification de DNMT2 ont pu mettre en évidence que cette enzyme possède tout de même une activité résiduelle de méthyltransférase de l’ADN qui semble être reliée à une certaine spécificité de séquence (Hermann *et al.*, 2003; Tang *et al.*, 2003). De plus, le groupe de T. Bestor spécule que DNMT2 a un rôle dans la fonction des centromères car

des homologues de Dnmt2 sont retrouvés uniquement chez les espèces possédant une fonction et une structure des centromères semblables (Bestor, 2000). Par ailleurs, cette équipe a récemment montré que les enzymes purifiées DNMT2 humaines et de *Drosophila melanogaster* sont capables de méthyle les cytosines de l'ARN de transfert de l'acide aminé acide aspartique (tRNA^{Asp}). Ces observations suggèrent que DNMT2 serait aussi une ARN méthyltransférase (Goll *et al.*, 2006).

Malgré de nombreuses études, la fonction exacte de DNMT2 reste toutefois encore énigmatique et continue d'être un challenge pour la communauté scientifique.

3.3.5- CONCLUSION, UNE COOPERATION DES DNMT POUR UNE SPECIFICITE FONCTIONNELLE

Les DNMT ont tout d'abord été subdivisées en ADN méthyltransférases de maintien (DNMT1) et ADN méthyltransférases *de novo* (DNMT3). Cependant de plus en plus de résultats, comme il l'a été évoqué dans les paragraphes précédents, indiquent que les DNMT coopèrent pour établir et maintenir les profils de méthylation *in vivo* (Kim *et al.*, 2002; Rhee *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 2003). Il est donc fortement probable que ces enzymes possèdent aussi bien une activité ADN méthyltransférases de maintien que *de novo* mais que, suivant leurs interactions avec d'autres protéines nucléaires ou avec des facteurs de liaison à l'ADN, leur activité et leur ciblage génomique diffèrent (Rountree *et al.*, 2000; Bachman *et al.*, 2001).

3.4- LA DEMETHYLATION DE L'ADN

La méthylation de l'ADN est une modification réversible. Alors que les enzymes impliquées dans l'établissement des profils de méthylation sont bien caractérisées, les processus de déméthylation sont encore aujourd'hui peu connus. Toutefois, il apparaît que l'effacement de méthylation de l'ADN est un mécanisme tout aussi important pour l'organisme que son établissement. L'un des exemples les plus frappants est la vague de déméthylation massive qui affecte le génome lors du développement embryonnaire. Bien que les mécanismes de déméthylation soient assez bien compris chez les plantes (Ikeda and Kinoshita, 2009), ils font l'objet d'incessants travaux et débats chez les mammifères. Comme nous avons pu le voir dans le paragraphe 3.1, la déméthylation de l'ADN peut être passive, c'est-à-dire perdue au cours des réplifications cellulaires. Mais elle peut aussi être active, soit indépendante de toute réplification de l'ADN. Plusieurs processus ont été proposés pour expliquer la déméthylation active qui reste à ce jour le processus de

DEMETHYLATION ACTIVE PAR EXCISION-REPARATION DE NUCLEOTIDES

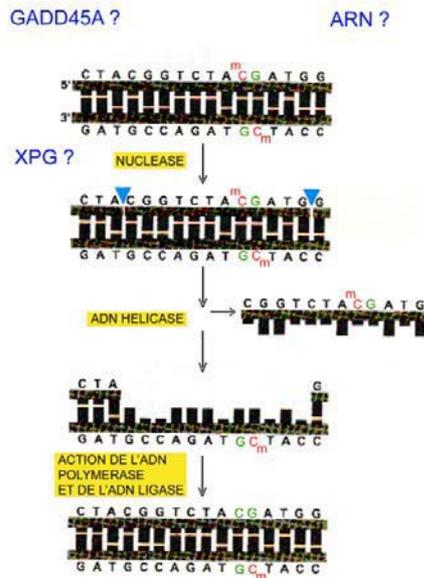


Figure 7. Processus de réparation par excision de nucléotides pouvant permettre l'excision de cytosines méthylées de l'ADN et donc participer à la déméthylation active du génome.

DEMETHYLATION ACTIVE PAR EXCISION-REPARATION DE BASES

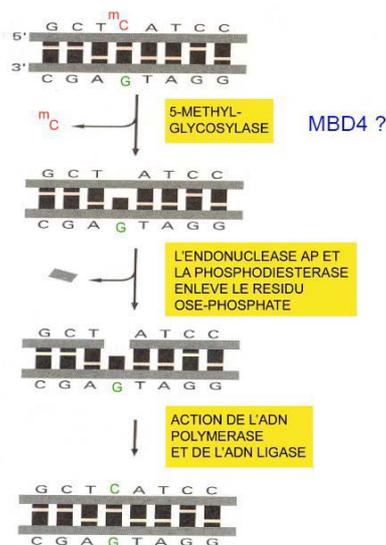


Figure 8. Processus de réparation par excision de bases pouvant permettre l'excision de cytosines méthylées de l'ADN et donc participer à la déméthylation active du génome.

déméthylation le plus énigmatique : le premier repose sur la substitution de la base méthylée lors de la réparation de l'ADN par excision de nucléotides, le second sur une activité ADN glycosylase et le troisième mettrait en jeu une ou des enzyme(s) déméthylase(s).

3.4.1- PROCESSUS DE REPARATION PAR EXCISION DE NUCLEOTIDES

La réparation par excision de nucléotides est un mécanisme par lequel une cellule est capable de repérer, d'exciser et de remplacer des dommages causés à l'ADN. Cette réparation s'opère souvent par excision de 2 à 30 nucléotides du brin portant l'erreur. L'ADN polymérase assure ensuite le remplacement du fragment endommagé par un fragment correct. Ce mécanisme fut le premier à être décrit comme capable d'exciser des cytosines méthylées de l'ADN, donc ayant un rôle potentiel dans la déméthylation active (**Figure 7**) (Weiss *et al.*, 1996). Il a été tout d'abord proposé que ce mécanisme soit ARN-dépendant. En effet, lors de ces expériences, cette réaction de déméthylation était insensible à la protéinase K mais sensible à un traitement à la RNase (Weiss *et al.*, 1996). En revanche, l'implication d'ARN dans la déméthylation fut par la suite démentie (Swisher *et al.*, 1998). Récemment, une étude a montré que la protéine Gadd45a (Growth arrest and DNA-damage-inducible protein 45 alpha) et l'endonucléase de réparation de l'ADN, XPG (Xeroderma pigmentosum, complementary group G), sont impliquées dans la déméthylation active par excision de nucléotides (Barreto *et al.*, 2007). Au cours du développement, le gène *Oct4* est activé par la déméthylation de son promoteur. Dans des ovocytes de *Xenopus* bloquées, Gadd45a interagit avec l'endonucléase XPG et est recrutée spécifiquement sur le promoteur *Oct4* pour induire sa déméthylation (Barreto *et al.*, 2007). Toutefois, une étude ultérieure fut dans l'incapacité de prouver le rôle fonctionnelle de Gadd45a dans la déméthylation active de l'ADN de mammifère (Jin *et al.*, 2008).

3.4.2- LES ADN GLYCOSYLASES, DES ENZYMES DEMETHYLANTES ?

A l'inverse de la réparation de l'ADN par excision de nucléotides qui reconnaît et remplace toute une partie de séquence génomique, la réparation par excision de bases implique uniquement le remplacement de la base mutée ou chimiquement altérée (**Figure 8**). La réparation par excision de bases fait intervenir une ADN glycosylase qui reconnaît l'altération et élimine la base en scindant la liaison glycosydique qui l'unit au désoxyribose. Un site apurinique ou apyrimidique (AP) est ainsi créé. Ce site est par la suite reconnu par des AP lyases ou AP endonucléases et des ADN phosphodiesterases 3'-5'. Les ADN polymérases et ADN ligases finissent alors la réaction en

comblant le site vacant laissé par l'excision de base. Comme il l'a été mentionné précédemment, les 5-méthylcytosines ont tendance à perdre spontanément leur groupement amine et à donc se désaminer en thymine avec une fréquence beaucoup plus élevée, de 10 à 50 fois, que pour les autres bases. Des mésappariements 5mCpG-TpG sont ainsi produits. Si ces mésappariements ne sont pas réparés, des transitions mutationnelles de C:G à T:A se produisent après une étape de réplication de l'ADN. Chez les mammifères, les mésappariements 5mCpG-TpG sont spécifiquement reconnus par deux protéines : (i) la protéine thymidine ADN glycosylase, TDG, ou (ii) la protéine MBD4 (Methyl-CpG-Binding Domain protein 4), aussi connu sous le nom MED1 (Methyl-CpG-binding Endonuclease 1), qui possède également une activité ADN glycosylase (Hendrich *et al.*, 1999b; Petronzelli *et al.*, 2000). Ces enzymes sont capables d'exciser la thymidine du mésappariement 5mCpG-TpG, sans toucher au squelette sucre-phosphate, et de la remplacer par une cytosine non-méthylée. Il a été montré que TDG peut interagir avec l'ADN méthyltransférase DNMT3a (Hendrich *et al.*, 1999b; Li *et al.*, 2007). Cette interaction permettrait de reméthyliser la cytosine nouvellement incorporée. Toutefois, le mécanisme de réparation de l'ADN par excision de base impliquant MBD4 ne permettrait pas cette reméthylation.

De façon identique, une activité 5-méthylglycosylase pourrait être à l'origine d'une déméthylation (**Figure 8**). Des enzymes ayant une telle activité ont été identifiées dans des cellules HeLa (Vairapandi and Duker, 1993) et dans des embryons de poulet (Jost, 1993; Jost *et al.*, 1995b; Jost and Jost, 1995a; Weiss *et al.*, 1996; Fremont *et al.*, 1997; Jost *et al.*, 1997). MBD4 posséderait une telle activité 5-méthylglycosylase (Zhu *et al.*, 2000). Toutefois, cette activité serait trente fois plus faible que son activité thymidine ADN glycosylase et son interprétation biologique n'a pas été encore élucidée.

Bien que l'excision de cytosines méthylées par excision de nucléotides ou de bases puisse être considérée comme des mécanismes de déméthylation, un grand nombre de données met en doute leur implication dans la déméthylation active. Premièrement, l'excision de nucléotides ne peut être considérée comme le mécanisme de déméthylation active lors de la vague de déméthylation massive du génome paternel au cours du développement embryonnaire. En effet, un tel mécanisme mettrait sévèrement en danger l'intégrité du génome (Oswald *et al.*, 2000). Deuxièmement, les cinétiques de déméthylation des enzymes impliquées dans ces processus d'excision sont trop lentes pour expliquer les déméthylations observées lors du développement ou de la différenciation (Cortazar *et al.*, 2007). Ainsi, la découverte d'enzymes catalysant spécifiquement l'excision du groupement méthyle directement à partir de la cytosine serait une solution à ce dilemme.

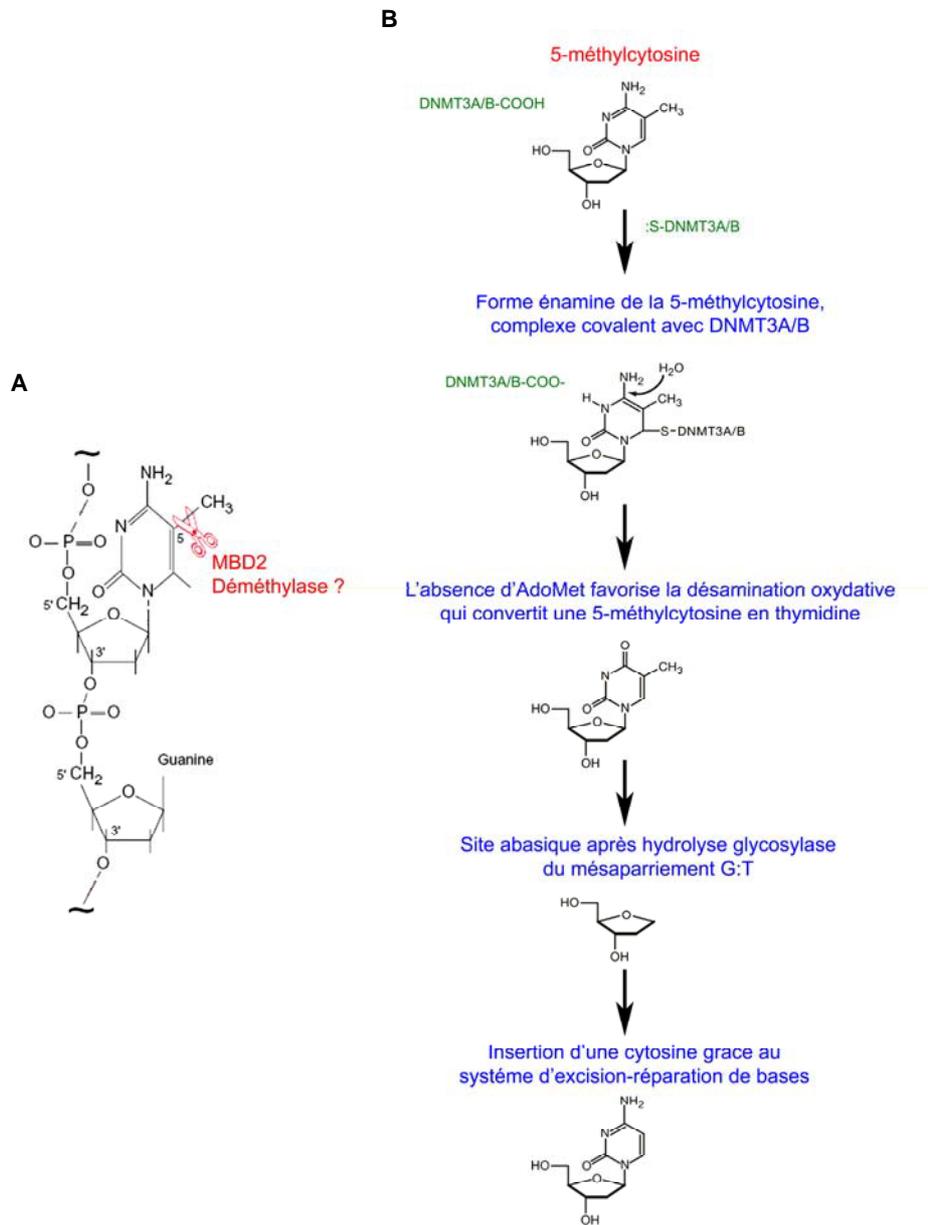


Figure 9. Mécanismes de déméthylation active de l'ADN par les déméthylases. (adaptée de Grange et Thomassin, 1999 (Grange and Thomassin, 1999) et Ooi et Bestor, 2008 (Ooi and Bestor, 2008)).

(A) MBD2, une déméthylase ? Cette protéine déméthylerait de la manière la plus simple qui soit, en enlevant le groupe méthyle de la base. (B) Métivier *et al.* (2008) (Metivier *et al.*, 2008) proposent que les ADN méthyltransférases DNMT3A et DNMT3B participent à la désamination oxydative des 5-méthylcytosines (en C4) en absence de donneur de groupements méthyles, AdoMet. La cytosine méthylée est ainsi convertit en thymidine. Le mésappariement guanine : thymidine est reconnu et réparé par le système d'excision-réparation de bases. La thymidine est ainsi remplacée par une cytosine. Des cytosines méthylées seraient par ce mécanisme éliminées de l'ADN.

3.4.3- LES ADN DEMETHYLASES

L'excision directe du groupement méthyle d'une base cytosine est considérée comme chimiquement impossible. En effet, la cassure de la liaison reliant le carbone du groupement méthyle au carbone du cycle de la cytosine nécessite une grande énergie thermodynamique (Cedar and Verdine, 1999). Néanmoins, une protéine connue comme possédant un domaine de liaison à l'ADN méthylé, la protéine MBD2 (Methyl-CpG-Binding Domain protein 2), a été montré comme possédant la capacité de catalyser *in vitro* comme *in vivo* l'hydrolyse du résidu méthyle des cytosines méthylées et ce uniquement en présence d'eau (Bhattacharya *et al.*, 1999) (**Figure 9A**). Cette hypothèse reste tout de même très controversée. En effet, les souris nullizygotés *Mbd2* sont viables (Hendrich *et al.*, 2001). Il semble donc peu probable que cette protéine puisse être à l'origine de la déméthylation massive du génome paternel au cours du développement embryonnaire. Par ailleurs, d'autres groupes furent dans l'impossibilité de reproduire les résultats obtenus par Bhattacharya *et al.* (Zhang *et al.*, 1999). Récemment, il a été proposé que les enzymes impliquées dans l'établissement des profils de méthylation, DNMT3A et DNMT3B, participeraient également au processus de déméthylation (Metivier *et al.*, 2008; Kangaspeska *et al.*, 2008). Ces études montrent que les deux enzymes interviennent dans un phénomène cyclique de méthylation/déméthylation qui s'opère au niveau du promoteur *pS2/TFF1*, cible des récepteurs aux œstrogènes. Les auteurs suggèrent que ces deux enzymes posséderaient une activité désaminase qui leur permettrait de participer au processus actif de déméthylation (**Figure 9B**). En absence de la principale source de groupement méthyle, l'AdoMet, DNMT3A et DNMT3B induiraient la déméthylation. Toutefois, rien n'indique que l'AdoMet puisse être limitant *in vivo*. De plus, la cinétique de méthylation/déméthylation est trop rapide (~ 2 heures) pour qu'un tel mécanisme soit à ce jour envisagé. L'hypothèse selon laquelle DNMT3A et DNMT3B seraient des déméthylases fait donc à ce jour l'objet d'un vif débat (Ooi and Bestor, 2008). Reste donc à savoir si les déméthylases existent chez les mammifères.

La méthylation de l'ADN est donc un mécanisme épigénétique maintenu au cours de l'évolution. La mise en place et le maintien des profils de méthylation nécessitent les DNMT, enzymes fortement conservées, des procaryotes aux mammifères. Mais quelles sont donc les fonctions de la méthylation de l'ADN au sein du génome pour expliquer la conservation et l'importance physiologique d'un tel mécanisme ?

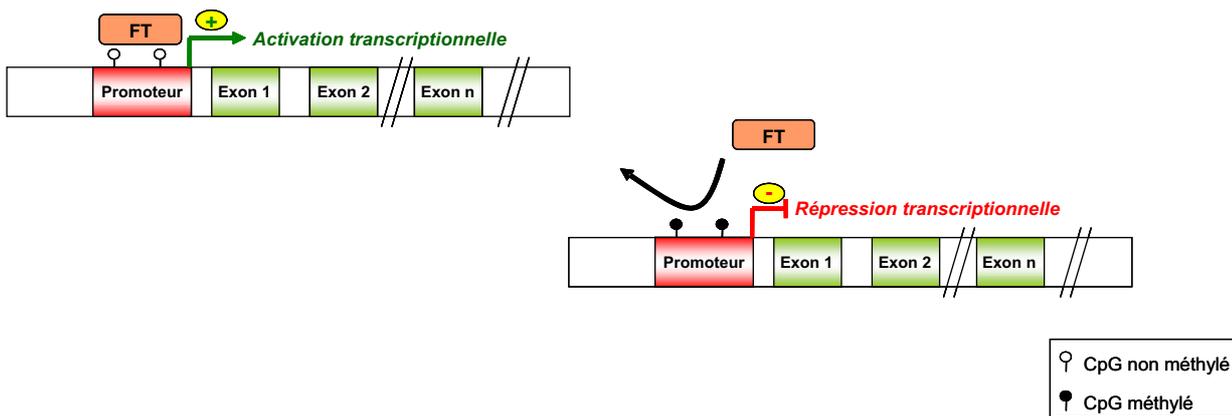


Figure 10. Inhibition directe de la fixation d'un facteur de transcription (FT) sur sa séquence cible par la méthylation de celle-ci.

Tableau 2. Facteurs de transcription, chez les vertébrés, affectés par la méthylation des cytosines (adaptée de Zing et Jones, 1997 (Zing and Jones, 1997)).

Protéines	Séquences cibles
AP-2	CCCG CG GCG
AP-2	CTC CG GGG(C/T)TG
récepteur Ah	TTG CG TG
CREB/ATF	TGA CG TCA
CREB/ATF	CTG CG TCA
E2F	TTTTCG CG C
EBP-80	ATCTG CG CATATGCC
Ets	CG GAAG
MLTF	GGCC CG TGACC
MTF-1	TG CG CC CG
c-Myc, c-Myn	CA CG TG
GABP	TT CG GGC
NF-κB	GGACTTT CG
HiNF-P	CG GTTTTCAATCTGGT CG
MSPF	AT CG NNNN CG CCT

4- LES CAPACITES REPRESSIVES DE LA METHYLATION DE L'ADN AU CENTRE DE SES ROLES BIOLOGIQUES

Chez les mammifères, la méthylation de l'ADN possède plusieurs fonctions essentielles à l'intégrité du génome, de la cellule et de l'organisme. L'importance de la méthylation de l'ADN dans ces nombreux processus biologiques est probablement à rapprocher de son rôle important dans la répression et le verrouillage de la transcription de certaines régions spécifiques du génome.

4.1- LA METHYLATION DE L'ADN VERROUILLE L'EXPRESSION GENIQUE

Chez les vertébrés, la connexion étroite entre méthylation des CpG et répression transcriptionnelle est connue depuis environ 30 ans. Les premières observations montrant une corrélation entre le profil de méthylation de gènes et leur expression, ont été réalisées parallèlement sur le gène de l'ovalbumine de poulet (Mandel *et al.*, 1979) et les gènes de globines animales (McGhee and Ginder, 1979) et humaines (van der Ploeg and Flavell, 1980). Par la suite, l'association méthylation/répression transcriptionnelle s'est vérifiée pour de nombreux gènes et modèles expérimentaux. Les mécanismes par lesquels la méthylation de l'ADN peut intervenir sur le niveau de transcription des gènes reposent sur la modulation des interactions ADN-protéines.

4.1.1- INHIBITION DE LA FIXATION DES FACTEURS DE TRANSCRIPTION PAR LA METHYLATION DE LEURS SEQUENCES CIBLES - IMPLICATION DIRECTE DE LA METHYLATION DE L'ADN DANS LA REPRESSION TRANSCRIPTIONNELLE

Il a été tout d'abord proposé que l'ajout d'un groupement méthyle sur l'ADN puisse empêcher la fixation de protéines essentielles à la transcription génique, comme les facteurs de transcription, sur leurs séquences cibles (**Figure 10**). En effet, en 1988, Watt et Molloy ont montré par des expériences de retard sur gel que la méthylation du CpG situé en position centrale de la séquence promotrice *AdMLP* (Adenovirus Major Late Promoter) (TAGGCCACGTCATCAAGCTAG) inhibe la liaison du facteur de trans-activation MLTF-USF et conduit *in vivo* à une baisse de la transcription (Watt and Molloy, 1988). Depuis, cette inhibition directe de la fixation des facteurs de transcription par la méthylation de leurs séquences cibles a été démontré pour d'autres trans-activateurs (**Tableau 2**), tels que AP2, c-Myc/myn, E2F, CREB/ATF et NF-κB (Tate and Bird,

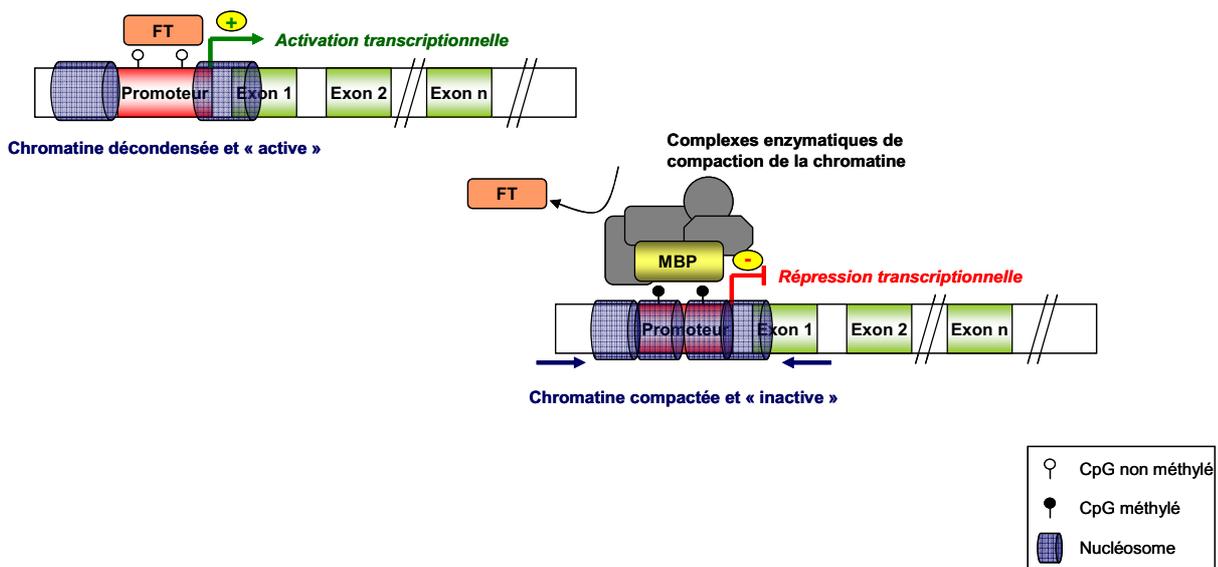


Figure 11. Implication indirecte de la méthylation de l'ADN dans la répression transcriptionnelle.

Les cytosines méthylées sont reconnues par des protéines liant l'ADN méthylé (MBP, Methyl-CpG-Binding Protein). Ces protéines, une fois liées à l'ADN méthylé, vont recruter des complexes enzymatiques capables de modifier de façon covalente les composants chromatinien. Ces différentes modifications entraînent un remodelage de la chromatine d'une structure décondensée vers une structure compactée. Des régions fonctionnellement inactives et inaccessibles aux facteurs de transcription (FT) sont ainsi créées.

1993). Toutefois, ce mécanisme direct est jugé peu fréquent *in vivo* et de nombreux facteurs de transcription comme Sp1 (Watt *et al.*, 1988; Iguchi-Arigo and Schaffner, 1989; Kudo, 1998), CTF (Ben Hattar *et al.*, 1989) et NF1 (Rhodes *et al.*, 1994) sont insensibles à la seule méthylation de l'ADN, suggérant l'implication d'autres mécanismes.

4.1.2- COUPLAGE ENTRE METHYLATION DE L'ADN ET COMPACTION CHROMATINIENNE - IMPLICATION INDIRECTE DE LA METHYLATION DE L'ADN DANS LA REPRESSION TRANSCRIPTIONNELLE

Un autre mécanisme, beaucoup plus général que le premier, se base sur la coopération de la méthylation de l'ADN avec d'autres modifications épigénétiques pour atteindre un état chromatinien plus compact et transcriptionnellement inactif (Khorasanizadeh, 2004). En effet, les nombreuses études portant sur la méthylation de l'ADN et la répression génique ont montré que la méthylation de l'ADN représente un signal interprétable par des protéines capables de reconnaître les séquences méthylées. Ces protéines sont généralement dénommées MBP pour « Methyl-CpG-Binding Protein » ou protéines ayant une forte affinité pour l'ADN méthylé. L'association de ces protéines aux zones méthylées conduit au recrutement de complexes enzymatiques capables de modifier de façon covalente les composants chromatinien (Figure 11). Ces différentes modifications entraînent un remodelage de la chromatine d'une structure décondensée vers une structure compactée. Des régions fonctionnellement inactives et inaccessibles aux facteurs de transcription sont ainsi créées.

Les caractéristiques moléculaires de ce mécanisme ainsi que la description de la famille de protéines participant à l'établissement de cette structure chromatinienne feront l'objet du deuxième chapitre de cette introduction.

Il est communément admis que la régulation transcriptionnelle des gènes eucaryotes est régie au niveau génique par les séquences promotrices et cis-régulatrices, telles que les séquences « enhancer » ou activatrices et les séquences « silencer » ou inhibitrices. Toutefois, comme nous venons de le voir dans ce paragraphe, à cette régulation génique, un second niveau de régulation d'ordre épigénétique se superpose. En effet, la méthylation de l'ADN est à l'origine d'un vaste processus de répression transcriptionnelle faisant principalement appel à l'établissement d'une structure compactée de la chromatine. Ce mécanisme souligne donc l'importance de la principale

modification covalente de l'ADN mais aussi de l'état d'« empaquetage » de l'ADN pour son expression.

Les sites méthylés de l'ADN marquent de façon non-aléatoire de vastes régions chromosomiques, telles l'hétérochromatine, comme des zones plus restreintes du génome, dont les îlots de CpG situés dans des régions promotrices spécifiques. Ainsi la méthylation de l'ADN participe à la compartimentation des domaines fonctionnels spécialisés dans le génome. Mais quelles sont précisément les cibles de cette répression méthylation-dépendante ? Et quelles importances fonctionnelles existe-t-il à maintenir cette répression ?

4.2- REGULATION DE GENES ESSENTIELS AU DEVELOPPEMENT PAR LA METHYLATION DE L'ADN

La première mise en évidence de l'importance de la méthylation de l'ADN dans le développement est venue de l'analyse des souris invalidées pour les gènes *Dnmt1* ou *Dnmt3a* et/ou *Dnmt3b*. Ces invalidations entraînent une hypométhylation sévère conduisant à une létalité embryonnaire. Nous nous attarderons dans ce paragraphe à détailler certaines régions génomiques dont le maintien de méthylation semble indispensable à un développement normal.

4.2.1- L'EMPREINTE PARENTALE : UNE METHYLATION ALLELE SPECIFIQUE NECESSAIRE AUSSI BIEN AU COURS DU DEVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE QUE PENDANT LA VIE ADULTE

Dans les années 80, deux séries d'expériences ont conduit à conclure que les génomes parentaux ne contribuent pas de manière identique au développement de l'embryon. En effet, les tentatives de création d'embryons murins constitués de deux génomes mâles (individus androgénotes) ou femelles (individus gynogénotes) (McGrath and Solter, 1984; Surani *et al.*, 1984) ainsi que des études d'unidisomies uniparentales spécifiques (c'est-à-dire ayant hérité de deux copies d'une portion de chromosome du même parent) sur des embryons de souris (Cattanach and Kirk, 1985) ont mis en évidence de graves anomalies de développement chez ces individus conduisant à une mort prématurée. Ces expériences ont montré, par ailleurs, que les diploïdies ou unidisomies ont des effets opposés sur le développement embryonnaire selon qu'elles sont héritées du père ou de la mère (McGrath *et al.*, 1984; Surani *et al.*, 1984; Cattanach *et al.*, 1985). Ces travaux suggéraient donc une complémentarité fonctionnelle des deux génomes parentaux. Cette hypothèse fut par la

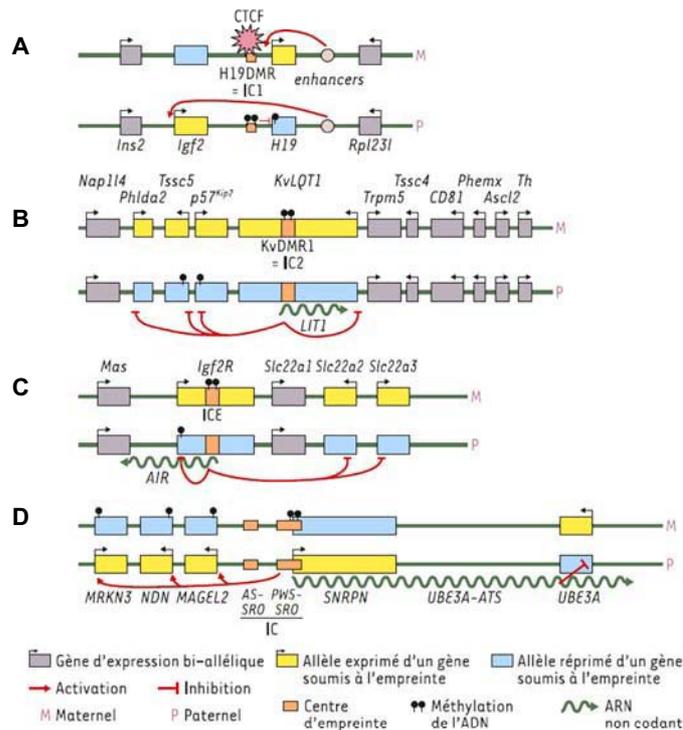


Figure 12. Régulation en cluster de l'expression monoallélique des gènes soumis à empreinte (adaptée de Gabory et Dandolo, 2005 (Gabory and Dandolo, 2005)).

La région distale du chromosome 7 murin comporte deux domaines et deux centres d'empreinte indépendants (IC1 et IC2). **(A)** Domaine 1: les *enhancers* situés en aval du gène *H19* interagissent avec le promoteur maternel du gène *H19*, mais ne peuvent pas activer l'allèle maternel du gène *Igf2* en raison de la frontière produite par la protéine insulatrice CTCF, fixée sur la DMR maternelle (IC1) non méthylée. La DMR paternelle hyperméthylée réprime quant à elle l'allèle paternel du gène *H19*, en agissant comme un *silencer*. **(B)** Le domaine 2 comporte une dizaine de gènes, dont certains sont soumis à empreinte seulement dans le placenta chez la souris (*Nap114*, *Tssc4*, *CD81*, *Ascl2*). L'IC2 (ou KvDMR), localisée dans l'intron 10 de *KvLQT1*, est une DMR méthylée sur l'allèle maternel et non méthylée sur l'allèle paternel. *LIT1* (*LQT intronic transcript 1*) est un ARN non codant antisens du gène *KvLQT1*, exprimé à partir de la DMR paternelle, et qui permettrait la répression paternelle des gènes *Phlda2*, *Tssc5*, *p57kip2*, *KvLQT1*. **(C)** Locus *Igf2R*: dans l'intron 2 du gène *Igf2R* se trouve le centre d'empreinte (ICE, Impringing Control Element), qui est une DMR méthylée sur l'allèle maternel. À partir de ce promoteur paternel non méthylé s'exprime l'ARN antisens *AIR*, qui serait responsable de la répression *in cis* des gènes *Igf2R*, *Slc22a2* et *Slc22a3*. **(D)** Locus 7C murin ou PWS-AS humain: le centre d'empreinte du locus PWS-AS comporte deux modules, AS-SRO et PWS-SRO (IC). Ce dernier est une DMR méthylée sur l'allèle maternel. Par son action *in cis*, elle permettrait d'activer l'expression des gènes *MRKN3*, *NDN* et *MAGEL2*, et de réprimer le gène *UBE3A*, grâce à l'expression de l'ARN non codant *UBE3A-ATS*.

suite démontrée avec la mise en évidence chez les mammifères de l'existence de gènes soumis à empreinte génomique parentale (DeChiara *et al.*, 1990; Barlow *et al.*, 1991).

On parle de gènes soumis à empreinte parentale lorsque celui-ci ne s'exprime qu'à partir d'un seul des deux allèles en fonction de son origine parentale. L'expression de ces gènes est donc mono-allélique et dépend de l'origine parentale. Alors qu'ils sont identiques au niveau de leur séquence nucléotidique, les deux allèles d'un gène soumis à empreinte portent des marques épigénétiques différentes qui vont permettre de les distinguer et de s'exprimer de manière différente. Les premières analyses des quelques gènes identifiés comme clairement soumis à l'empreinte parentale ont montré que l'expression différentielle est accompagnée d'une méthylation différente des deux allèles dans les cellules somatiques (Sasaki *et al.*, 1992; Ferguson-Smith *et al.*, 1993; Bartolomei *et al.*, 1993; Brandeis *et al.*, 1993b). Ces observations furent étendues à d'autres gènes et très rapidement, la méthylation de l'ADN a été considérée comme la marque épigénétique majeure impliquée dans l'empreinte génomique parentale chez les mammifères. Les gènes soumis à empreinte sont très rarement isolés dans le génome mais présentent la caractéristique remarquable d'être regroupés au sein de larges domaines chromosomiques pouvant couvrir jusqu'à 4 méga bases. Ces domaines comportent plusieurs gènes aussi bien exprimés maternellement que paternellement, le plus souvent co-régulés par un même et unique centre d'empreinte commun ou ICE (Imprinting Control Element). La méthylation touche essentiellement ces ICE qui sont majoritairement localisés dans des îlots de CpG. On parle alors de régions différentiellement méthylées ou DMR pour « Differentially Methylated Regions ». Contrairement aux autres gènes, l'allèle ayant un ICE méthylé n'est pas obligatoirement l'allèle réprimé. Toutefois, les expériences de Li *et al.* sur des embryons murins déficients en activité ADN méthyltransférase, montrent que l'expression de ces gènes est étroitement liée à un profil de méthylation déterminé : les allèles méthylés, normalement silencieux ou actifs sont hypométhylés dans leur modèle murin et s'expriment ou sont réprimés respectivement (Li *et al.*, 1993). La méthylation de l'ADN peut en effet réguler l'expression des gènes soumis à empreinte par différents mécanismes (**Figure 12**). Le plus classique est que le promoteur du gène est réprimé par la méthylation de l'ADN. La méthylation peut aussi réguler la fixation d'un répresseur protéique agissant en *cis* ou l'activité de protéines insulatrices, c'est-à-dire capables de constituer des barrières au sein d'une unité transcriptionnelle, telles que le facteur CTCF. Quelques exemples de ces mécanismes sont représentés en Figure 12. D'autres caractéristiques épigénétiques ont été associées à l'empreinte parentale chez les mammifères. En effet, comme le montrent des expériences de sensibilité aux nucléases réalisées chez la souris sur les gènes *H19* (Ferguson-Smith *et al.*, 1993; Bartolomei *et al.*,

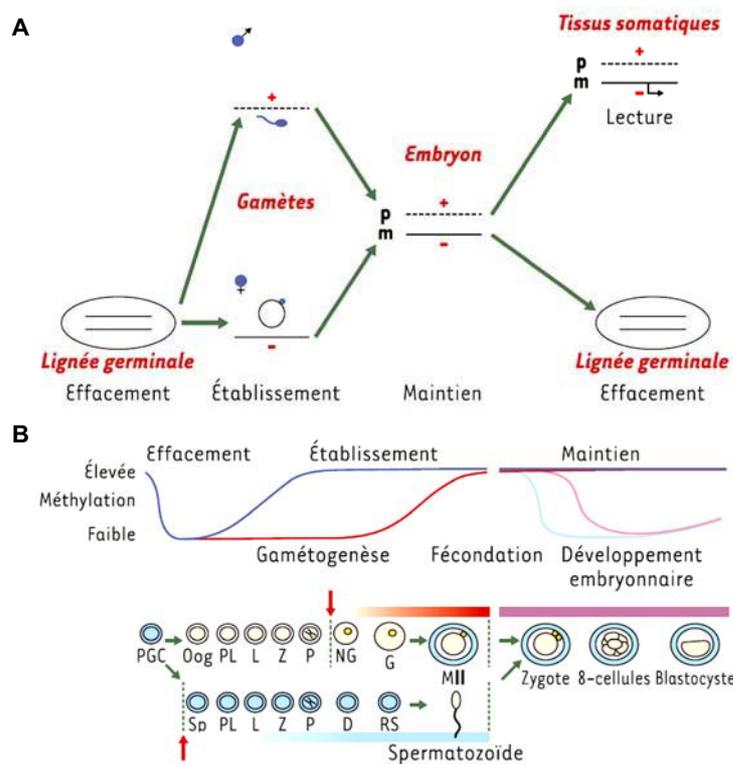


Figure 13. Cycle de l'empreinte parentale (adaptée de Gabory et Dandolo, 2005 (Gabory *et al.*, 2005)).

(A) Les étapes de la mise en place de l'empreinte parentale sont l'effacement de l'empreinte sur les deux chromosomes parentaux dans la nouvelle lignée germinale, l'établissement d'une nouvelle empreinte au cours de la gaméto-genèse, suivant le sexe de l'embryon, le maintien de l'empreinte au cours des divisions cellulaires et, enfin, la lecture de l'empreinte dans les tissus somatiques, se traduisant par une expression mono-allélique des gènes soumis à empreinte. (B) Méthylation et déméthylation programmées du génome des ovocytes, des spermatozoïdes et des embryons. En haut: état de méthylation des gènes soumis à l'empreinte maternelle (rouge) et paternelle (bleu). La méthylation des gènes non soumis à empreinte suit ce même profil pendant la gaméto-genèse, mais décline après la fécondation (maternels en rose et paternels en bleu clair). En bas: établissement de l'empreinte pendant l'ovogenèse et la spermatogenèse. La méthylation est ensuite maintenue sur les gènes soumis à empreinte dans l'embryon pré-implantatoire. Les deux flèches rouges indiquent le moment de la naissance par rapport à la gaméto-genèse.

1993;Hark and Tilghman, 1998;Szabo *et al.*, 1998;Khosla *et al.*, 1999;Kanduri *et al.*, 2000;Umlauf *et al.*, 2004), *U2af1-rs1* (Shibata *et al.*, 1996;Feil and Kelsey, 1997;Umlauf *et al.*, 2004) ou *Snprn* (Schweizer *et al.*, 1999), la méthylation de l'ADN s'accompagne également d'un changement de conformation de la chromatine, en raison des modifications post-traductionnelles des histones. Il semble, par ailleurs, dans certains cas, que la modification des histones puisse, à elle seule, constituer une marque épigénétique suffisante pour contrôler l'empreinte. Mais la méthylation de l'ADN intervient probablement dans un second temps pour imposer une marque différentielle qui joue un rôle de verrouillage de la structure chromatinienne (Lewis *et al.*, 2004;Umlauf *et al.*, 2004). Pour finir, on notera que l'allèle réprimé d'un certain nombre de gènes soumis à empreinte peut être réactivé par l'utilisation d'inhibiteurs de la méthylation de l'ADN, mais par l'utilisation d'inhibiteurs de modifications-post-traductionnelles de compaction des histones seule (Saitoh and Wada, 2000;El Kharroubi *et al.*, 2001;Fulmer-Smentek and Francke, 2001;Grandjean *et al.*, 2001;Lynch *et al.*, 2002). Ces données suggèrent que la méthylation de l'ADN constitue la marque épigénétique dominante aux locus soumis à empreinte.

Le gène *Igf2* (Insulin-like growth factor 2), qui s'exprime uniquement à partir de l'allèle paternel (DeChiara *et al.*, 1991) et les gènes *Igf2R* (*Igf2* receptor) et *H19*, qui s'expriment uniquement à partir de l'allèle maternel (Barlow *et al.*, 1991;Bartolomei *et al.*, 1991) furent les trois premiers gènes soumis à empreinte parentale à être identifiés chez la souris. Depuis, une soixantaine de gènes soumis à l'empreinte ont été décrits chez l'homme et la souris (<http://igc.otago.ac.nz/home.html>), et l'importance accordée à l'empreinte génomique parentale dans le domaine de la biologie du développement n'a cessé de croître. L'empreinte génomique parentale est établie dans les lignées germinales mâle et femelle, puis est maintenue au cours des divisions cellulaires dans l'embryon et pendant la vie adulte (**Figure 13**). Lors du développement embryonnaire, les régions soumises à empreinte sont résistantes à la vague de déméthylation. Ce phénomène permet la conservation des marques distinctes entre les génomes parentaux. L'empreinte parentale de nombreux gènes est perdue dans les embryons mutants *Dnmt1* non viables (Li *et al.*, 1993;Caspary *et al.*, 1998). Inversement, la surexpression de *Dnmt1*, qui induit également une létalité embryonnaire, entraîne la perte d'empreinte de certains gènes suite à la méthylation biallélique de séquences régulatrices (Biniszkiwicz *et al.*, 2002). Ces pertes d'empreinte, dues à l'hypométhylation ou à l'hyperméthylation du génome, sont associées à la perturbation de l'expression des gènes. Par exemple, chez les embryons *Dnmt1*^{-/-}, le gène *H19*, normalement exprimé à partir de l'allèle maternel et possédant une DMR méthylée sur l'allèle paternel, est totalement déméthylé et exprimé de façon bi-allélique tandis que chez les embryons surexprimant

Dnmt1, l'allèle maternel de ce gène est hyperméthylé et ce gène ne s'exprime plus (Li *et al.*, 1993; Biniszkiwicz *et al.*, 2002). Le dérèglement de ce mécanisme d'expression mono-allélique est donc corrélé avec des perturbations dans l'expression des gènes concernés et peut conduire à certaines pathologies chez l'Homme (Verona *et al.*, 2003). Ces maladies sont souvent associées à des pertes d'hétérozygotie résultant de duplications maternelle ou paternelle d'une région à empreinte parentale, entraînant soit l'extinction, soit la surexpression des gènes concernés. C'est le cas par exemple du locus 15q11-q13 associé aux syndromes de Prader-Willi et d'Angelman, ou de la région 11p15 associée au syndrome de Beckwith-Wiedemann (Jiang *et al.*, 2004). Les syndromes d'Angelman (AS) et de Prader-Willi (PWS) sont essentiellement caractérisés par des retards mentaux. Le PWS serait causé par la perte d'expression des gènes *SNPRN*, etc., par unidysomie maternelle ou délétion paternelle et l'AS à l'absence de protéine UBE3A fonctionnelle par unidysomie paternelle, délétion maternelle ou mutation. Le syndrome de Beckwith-Wiedemann est, quant à lui, caractérisé par un ensemble de malformations congénitales ainsi que d'une prédisposition à certaines tumeurs. Certains gènes à empreinte parentale ont aussi été impliqués dans différents cancers ; parmi ceux-ci, les gènes codant pour le facteur de croissance IGF2 (tumeurs de la vessie, du poumon, de l'ovaire, etc.), son récepteur IGF2R (tumeurs du sein, du côlon, du poumon, etc.) ou la Neuronatine (leucémie) (Feinberg, 2004). Le rôle de l'empreinte parentale semble par ailleurs déterminant dans la genèse de pathologies gestationnelles trophoblastiques (placentaires) du premier trimestre de grossesse (Fisher and Hodges, 2003). Chez l'homme la présence de deux génomes paternels lors de fécondations anormales d'ovocytes entraîne d'importantes anomalies de développement du placenta. De telles anomalies avaient aussi été observées chez les embryons de souris gynogénètes et androgénètes (McGrath *et al.*, 1984; Surani *et al.*, 1984).

Les gènes soumis à l'empreinte parentale ont donc des fonctions majeures dans la croissance et le développement embryonnaire, fœtal et placentaire, ainsi des défauts d'empreinte entraînent de multiples anomalies de croissance à ce stade. Par ailleurs, une perte de l'empreinte durant la vie adulte peut aussi être la cause de plusieurs maladies humaines, dont le cancer.

4.2.2- INACTIVATION DU CHROMOSOME X

Chez les mammifères, les femelles possèdent deux chromosomes X et le mâle uniquement un. Un mécanisme est donc requis pour s'assurer de l'équivalence du niveau d'expression des gènes des chromosomes sexuels. Chez la femelle eutherienne, cette compensation de dosage est achevée par

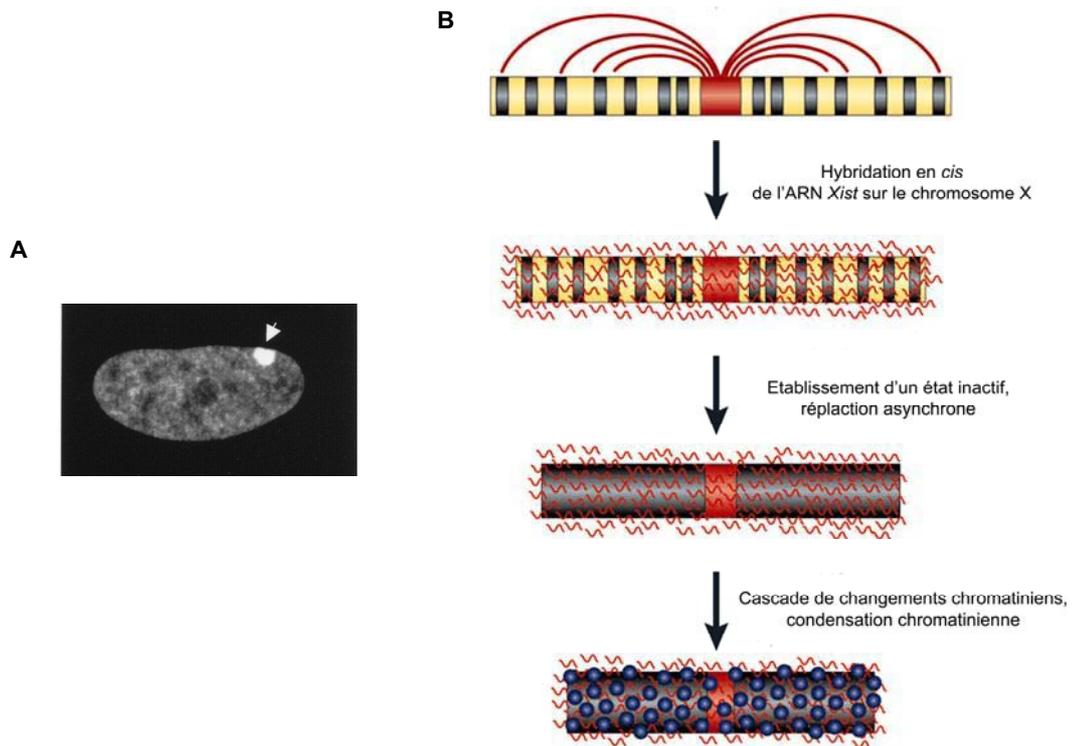


Figure 14. Inactivation du chromosome X.

(A) Détection du corpuscule de Barr par immunofluorescence dans des cellules fibroblastiques humaines diploïdes (Hong *et al.*, 2001). La flèche pointe sur le corpuscule de Barr. (B) Inactivation du chromosome X par synthèse et hybridation d'ARN *Xist* puis par recrutement de différents facteurs impliqués dans la condensation chromatinienne (DNMT, HDAC, HMT, Polycomb, MacroH2A) (Avner and Heard, 2001).

la permanente mise sous silence transcriptionnel des gènes de l'un des deux chromosomes X (LYON, 1961). Chez l'Homme, cette inactivation concerne 90% des gènes portés par l'un des deux X. Il est à noter que les rares gènes (environ une centaine) exprimés à partir du chromosome X inactif possèdent pour la plupart un homologue sur le chromosome Y. Leurs produits (ARN et protéines) sont ainsi présents en quantité égale chez les mâles et les femelles.

L'inactivation de l'un des deux chromosomes X est établie très tôt au cours de l'embryogénèse précoce et est vitale au développement de l'organisme. En effet, chez la souris, son absence conduit à une létalité embryonnaire (Takagi and Abe, 1990). Cette inactivation est régie par un phénomène épigénétique qui conduit au changement de l'un des deux chromosomes X présents d'un état euchromatique (décondensé), actif, à un état hétérochromatique (compacté), inactif. Les chromosomes X actifs et inactifs sont donc structurellement différents. Du fait de sa structure hétérochromatinienne, le chromosome X inactif (Xi) se présente souvent comme un chromocentre particulier situé à la périphérie du noyau (**Figure 14A**). Il est appelé corpuscule de Barr, du nom du chercheur canadien qui le mit en évidence en 1949. Cet état de condensation reflète le fait que son ADN est répliqué au cours de la phase S, ultérieurement par rapport à celui des autres chromosomes. L'inactivation de l'X représente le seul exemple connu d'extinction génique à l'échelle de (presque) tout un chromosome et l'un des cas les plus frappants de contrôle épigénétique au cours de la différenciation.

L'initiation de ce processus durant l'embryogénèse précoce est contrôlée par le centre d'inactivation du chromosome X (X-inactivation center ou Xic), qui détermine le nombre et quel chromosome X va être inactivé. Le locus *Xic* produit un ARN régulateur non-codant appelé *Xist* (X inactive specific transcript), qui s'hybride en *cis*, « recouvre » le chromosome X qui lui a donné naissance et entraîne son inactivation (**Figure 14B**) (Plath *et al.*, 2002). Le gène *Xist* est donc transcrit uniquement à partir du chromosome X inactif et son expression précède l'inactivation. L'ARN *Xist* induit une cascade de changements chromatinien sur le chromosome X, entraînant des phénomènes de condensation chromatinienne (Boggs *et al.*, 2002; Chadwick and Willard, 2003). Ces changements mènent à l'inactivation du chromosome X qui est initialement instable mais qui sera par la suite stabilisé et renforcé par d'autres marques épigénétiques, telle que la méthylation de l'ADN (Csankovszki *et al.*, 2001). La méthylation de l'ADN semble donc plutôt jouer un rôle dans la maintenance et l'irréversibilité de l'inactivation du chromosome X (Heard, 2004).

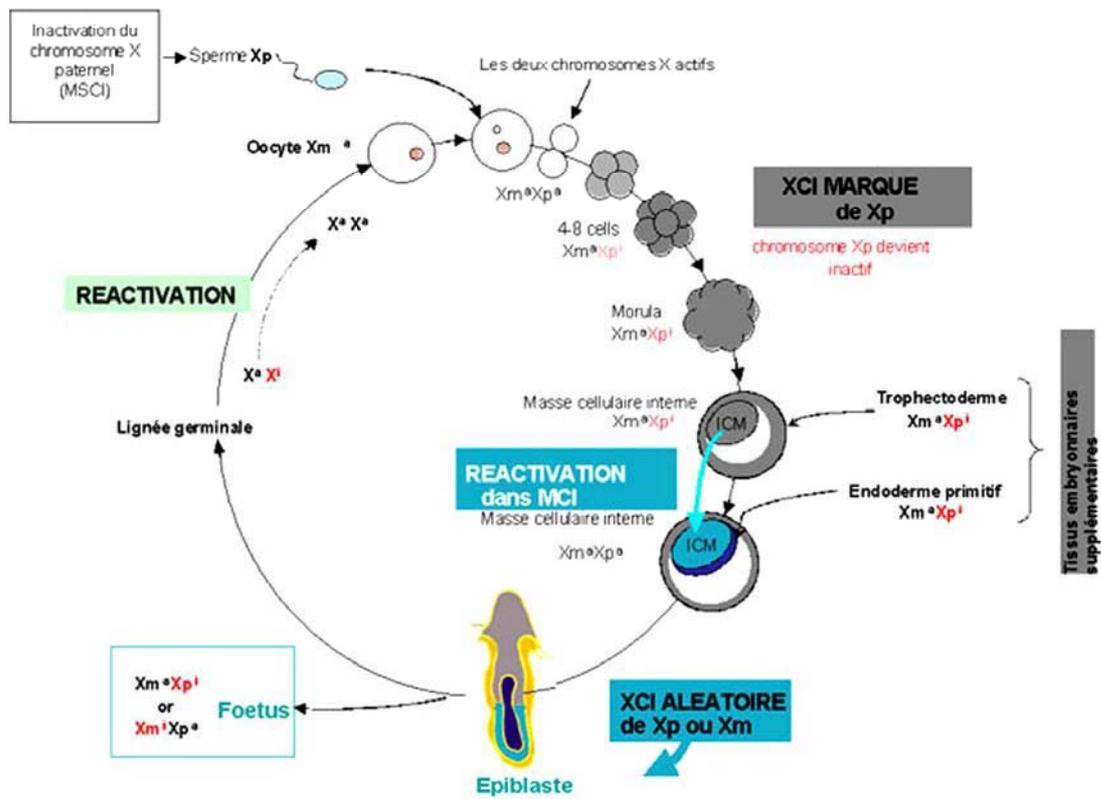


Figure 15. Récapitulatif de la cinétique de l'inactivation et réactivation du chromosome X chez la souris (adaptée des travaux du Dr Heard).

Chez la souris, l'étude de l'inactivation du chromosome X a montré que cet événement est dynamique au cours de l'embryogenèse précoce (**Figure 15**). Une première étape d'inactivation du chromosome X paternel (Xp) a lieu très tôt au stade préimplantatoire et est maintenu jusqu'au stade blastocyste précoce. Il a été suggéré que le chromosome Xp porte une marque à l'origine de son inactivation préférentielle. En effet, Okamoto *et al* ont montré que cette inactivation du chromosome Xp est soumise à empreinte parentale et est due à une marque du locus *Xic* (expression soumise à empreinte parentale de *Xist*) (Okamoto *et al.*, 2004). Le Xp, uniquement et sélectivement, va par la suite être réactivé dans la masse cellulaire interne (à l'origine de tous les tissus de l'individu), puis une inactivation aléatoire de l'un des deux chromosomes X se produit (Allegrucci *et al.*, 2005). Cette réactivation consiste en la perte d'association du Xp avec l'ARN *Xist*, et des marques épigénétiques caractéristiques de l'état inactif. Cette dynamique de l'inactivation du chromosome X au cours de l'embryogenèse souligne la plasticité des marques épigénétiques et démontre aussi la capacité remarquable de reprogrammation de la masse cellulaire interne du blastocyste. Une fois l'inactivation aléatoire établie l'état inactif est stable et hérité de façon clonale.

La méthylation de la région 5' du gène *Xist* aurait également un rôle dans le maintien du chromosome X actif. En effet, elle réprimerait la transcription de l'ARN *Xist* sur ce chromosome. Une expression de cet ARN a en effet été observée dans les souris mâles *Dnmt1*^{-/-}, conduisant à une baisse partielle de l'expression de deux gènes liés à l'X testés (Csankovszki *et al.*, 2001). Néanmoins l'inactivation de *Dnmt3a* et *b* n'affecte pas cette expression (Sado *et al.*, 2004), suggérant une certaine spécificité.

La forte méthylation de l'ADN est l'une des caractéristiques du chromosome X inactif. Un grand nombre d'îlots de CpG, comme pour l'empreinte parentale, est fortement méthylé (Miller and Willard, 1998), et l'administration de substances induisant une déméthylation, comme la 5-aza-2'-désoxycytidine (5azaCdR), peut partiellement réactiver *in vitro* le chromosome X inactif (Csankovszki *et al.*, 2001). Par ailleurs, l'inactivation conditionnelle de *Dnmt1* dans des fibroblastes murins conduit à une déméthylation puis à une élévation du taux d'expression biallélique de gènes présents sur les chromosomes X (Csankovszki *et al.*, 2001). Il en est de même chez les patients atteints du syndrome d'ICF, déficients en DNMT3B (Hansen *et al.*, 2000). Tout ceci suggère un rôle au moins partiel de la méthylation du chromosome X dans le maintien d'un état inactif.

4.2.3- LA METHYLATION DE L'ADN, UN ACTEUR CLE DE LA DIFFERENCIATION CELLULAIRE

La différenciation cellulaire est le résultat d'un équilibre extinction/activation de groupes de gènes. Cet équilibre est régulé non seulement par des facteurs de transcription qui se lient à l'ADN en fonction des besoins cellulaires, mais aussi par l'information épigénétique qui incluent principalement des modifications de la méthylation de l'ADN.

Les profils de méthylation de l'ADN des différents types cellulaires retrouvés au sein de divers organes d'un organisme sont mosaïques (Gama-Sosa *et al.*, 1983). Toutefois, la comparaison de ces profils observés dans un organe spécifique chez différents individus présentent un haut degré de concordance inter-individuelle (Kochanek *et al.*, 1990). Ces données suggèrent donc que le mosaïsme type cellulaire- ou tissus-spécifique n'est pas juste la conséquence d'erreurs de méthylation apparues au cours du développement, mais serait plutôt le résultat d'événements précis et ordonnés de déméthylation/méthylation survenus durant ce processus (Monk, 1995).

L'importance de la méthylation de l'ADN dans la différenciation cellulaire a largement été démontrée par de nombreuses études, essentiellement effectuées *in vitro*, utilisant l'agent déméthylant, la 5azaCdR. L'une de ces expériences clés montre que sous l'effet d'un tel traitement des cellules embryonnaires fibroblastiques murines se transforment avec une haute efficacité en myoblastes, adipocytes et chondrocytes (Jones and Taylor, 1980). Des changements de profils de méthylation peuvent ainsi transformer une cellule d'un type cellulaire à un autre. Par ailleurs, des expériences *in vivo* viennent renforcer le rôle central de la méthylation de l'ADN dans le processus de différenciation. En effet, l'invalidation des gènes *Dnmt1* ou *Dnmt3a* et *b* dans les cellules ES murines montrent que ces cellules se divisent normalement mais sont incapables de se différencier (Jackson *et al.*, 2004). De nombreux gènes impliqués dans la différenciation cellulaire apparaissent donc être régulés par la méthylation de l'ADN. Par exemple, lors de la différenciation des précurseurs neuronaux en neurones ou astrocytes, il a été montré que la séquence régulatrice activatrice (séquence « enhancer ») STAT3 du promoteur du gène *GFAP* (astrocyte-specific marker, Glial Fibrillary Acidic Protein) se déméthyle spécifiquement lors de l'astrogénèse. Ceci favorise la fixation du facteur de transcription STAT3 sur sa séquence cible et induit l'expression du gène *GFAP*. En revanche, la séquence *STAT3* n'est pas déméthylée dans les neurones. Ces données suggèrent que la déméthylation ou à l'inverse le maintien de la méthylation de ce site

participe à l'orientation des précurseurs neuronaux dans une voie de différenciation spécifique (Shimozaki *et al.*, 2005).

Ces données de plus en plus nombreuses suggèrent donc que les profils de méthylation d'une cellule différenciée ne sont pas établis de manière aléatoire, mais bien définis, et corrélient avec la mise en place de profils d'expression génique spécifiques caractéristiques de l'état différencié.

Les profils de méthylation propres à chaque tissu sont, comme nous venons de le voir, acquis durant la différenciation cellulaire. Une fois ces profils spécifiques et caractéristiques de l'état différencié établis, il est peu probable qu'une cellule passe d'un état de différenciation à un autre, même si son environnement cellulaire change (Kato and Gurdon, 1993). En définitive, bien que toutes les cellules de l'organisme partagent le même génome (à l'exception des lymphocytes B), chaque type cellulaire possède sa propre signature épigénétique. Ces marques épigénétiques sont transmises des cellules mères aux cellules filles lors des divisions cellulaires en absence de signaux d'initiation ou de variations génétiques. C'est ce qu'on appelle communément la « mémoire épigénétique » des cellules (Bird, 2002). Cette transmission est cruciale pour le maintien de l'état de différenciation d'une cellule.

Ce rôle peut être illustré par des expériences de transplantations nucléaires, lors desquelles le noyau d'une cellule différenciée est transplanté dans un ovocyte ou dans un œuf énucléé. Ainsi, il a été montré que le génome du noyau transplanté est capable de « se reprogrammer », en d'autre terme de se dédifférencier en un état totipotent et d'induire le développement de tout un organisme (Gurdon and Byrne, 2003). Ce mécanisme implique l'effacement du profil épigénétique spécifique associé à la reprogrammation du profil d'expression génique. Ces modifications radicales permettent de restaurer la totipotence du noyau de la cellule différenciée donneuse (Ng and Gurdon, 2005b). Toutefois, seulement 1-2% des transplantations nucléaires mènent au développement d'un organisme en entier, suggérant que l'efficacité d'une reprogrammation complète est faible (Yang *et al.*, 2007). De plus, plusieurs embryons clonés présentent des expressions géniques aberrantes. Par exemple, certains gènes embryonnaires tels que *Oct4* n'arrivent pas à être ré-exprimer dans ces embryons (Boiani *et al.*, 2002; Bortvin *et al.*, 2003; Yang *et al.*, 2007) et des problèmes de profils d'expression des gènes soumis à l'empreinte parentale sont présents (Yang *et al.*, 2007). Par ailleurs, des études antérieures utilisant des transplantations nucléaires dans des embryons de *Xenopus* ont montré une persistance de l'expression de certains gènes spécifiques du donneur dans différents types cellulaires (Ng and Gurdon, 2005a), même après plus de 24 divisions cellulaires (Ng and Gurdon, 2008). De plus, certains de ces embryons présentent des profils épigénétiques anormaux, les profils étant très semblables à ceux des génomes donneurs (Dean *et al.*, 2001; Santos

et al., 2002). Toutes ces données suggèrent que la transmission épigénétique de l'état cellulaire différenciée est très stable et difficile à effacer même après un transfert nucléaire.

En définitive, ces données soulignent l'importance de la méthylation de l'ADN et donc de la régulation épigénétique pour déterminer et fixer les destinées cellulaires durant le développement (Wolffe and Matzke, 1999). Il est alors facile d'admettre que d'importantes perturbations des profils de méthylation sont impliquées dans de nombreuses pathologies humaines. Le cancer est l'une de ces maladies montrant d'importants remaniements des profils de méthylation et d'expression génique, assimilables à une dédifférenciation. Nous reviendrons sur ce sujet dans le troisième chapitre de cette introduction.

4.3- FONCTION ESSENTIELLE DE LA METHYLATION DE L'ADN DANS LA DEFENSE ET L'INTEGRITE STRUCTURALE DU GENOME

La plupart des études dans le domaine de la méthylation de l'ADN se focalisent sur les régions riches en CpG, les îlots de CpG. Toutefois, la majorité des dinucléotides CpG est dispersée dans les régions dites « pauvres en CpG » (par opposition aux séquences à îlot de CpG). De plus, comme il l'a été décrit dans le paragraphe 2.2 de ce chapitre, ces CpG dispersés sont méthylés dans une cellule saine de mammifère. Au vu du rôle de la méthylation de l'ADN dans la répression transcriptionnelle, il est donc important de s'intéresser à la localisation de ces CpG dispersés.

Les éléments parasites de l'ADN et les rétrotransposons, comme les rétrovirus endogènes et les éléments répétés L1 et ALU, constituent quarante pour cent du génome des mammifères. L'analyse précise de la répartition des dinucléotides CpG dans le génome a donc montré que la plupart de ces dinucléotides se situent au sein de ces séquences ((Yoder *et al.*, 1997; Colot and Rossignol, 1999). Ces séquences sont majoritairement inactivées par la méthylation de leur contenu en CpG (Yoder *et al.*, 1997). Ce phénomène limite ainsi l'expression de ces éléments mobiles transposables et empêche leur propagation au sein du génome (Yoder *et al.*, 1997). Il a, donc, été proposé que la méthylation puisse jouer un rôle dans la défense et le maintien de l'intégrité du génome. En effet, les éléments parasites de l'ADN menacent potentiellement l'intégrité structurale du génome car ils peuvent être à l'origine de recombinaisons entre séquences répétées non-alléliques, conduisant à des réarrangements chromosomiques ou des translocations (Montagna 1999, kazazian, 1998). De plus, l'expression des gènes codant les rétrotransposons, telle que la

transcriptase inverse, entraîne leur mobilité et une cascade d'événements nuisibles aboutissant à des mutations et une grande instabilité génomique (Yoder *et al.*, 1997).

Plusieurs études ont apporté des preuves, bien qu'indirectes, en faveur d'un rôle de la méthylation de l'ADN dans la défense du génome. En effet, l'inactivation homozygote du gène *Dnmt1* dans les cellules ES murines, entraînent une diminution de 70% du niveau global de méthylation mais une augmentation de 10 fois du taux de mutations impliquant des réarrangements géniques (Chen, 1998). De plus, ces cellules *Dnmt1* nullizygotés montrent une élévation drastique (de 50 à 100 fois) de l'expression des éléments transposables endogènes IAP. Il a été suggéré que cette augmentation massive de la transcription des IAP pouvait être à l'origine de l'augmentation de l'instabilité génomique observée dans ces cellules (Walsh, 1998). En outre, des hybrides obtenus entre deux espèces de kangourou montrent une hypométhylation globale du génome et une élévation massive du nombre de séquences virales intégrées (Waugh o'niell, 1988). Bien que le mécanisme expliquant l'hypométhylation du génome hybride reste inconnu, ces données suggèrent que la méthylation participe à l'inhibition de la diffusion des éléments parasites de l'ADN dans le génome.

Une autre cible de la méthylation est l'ADN répété. Il a été suggéré que cette méthylation spécifique permette de stabiliser les génomes des organismes qui contiennent une grande quantité d'ADN répété en réduisant la fréquence de recombinaison homologue entre ces séquences (Colot *et al.*, 1999). De telles recombinaisons peuvent apparaître dans la population humaine et entraîner des conséquences délétères (Puget, 1997, Rouyet, 1987, Small, 1997). Une preuve directe que la méthylation supprime la recombinaison homologue provient des travaux effectués sur le champignon *Ascobolus immersus*. Dans cet organisme il a été montré que la méthylation d'un « point chaud » de recombinaison méiotique connu réduit de plus de cent fois la fréquence de crossing-over dans cette région (Maloisel, 1998). De plus, dans les cellules de mammifères, la recombinaison site-spécifique des immunoglobulines (recombinaison VDJ) est réduite de plus de 100 fois quand le substrat de recombinaison est méthylé (Hsieh, 1992). D'autres preuves dans les cellules de mammifères, plus indirectes, incluent diverses observations : les régions soumises à l'empreinte parentale montrent des différences significatives de la fréquence de recombinaison entre les méioses mâle et femelle (Paldi, 1995) ; les personnes atteintes du syndrome ICF (mutées pour le gène *DNMT3B*) et les cellules en culture traitées avec un agent d'inhibition de la méthylation, la 5azaCdR, montrent une augmentation du nombre de translocations chromosomiques (Miniou, 1994 ; Ji, 1997). Le mécanisme par lequel la méthylation de l'ADN inhibe la recombinaison homologue n'est toujours pas élucidé. Cependant, de potentiels mécanismes ont été

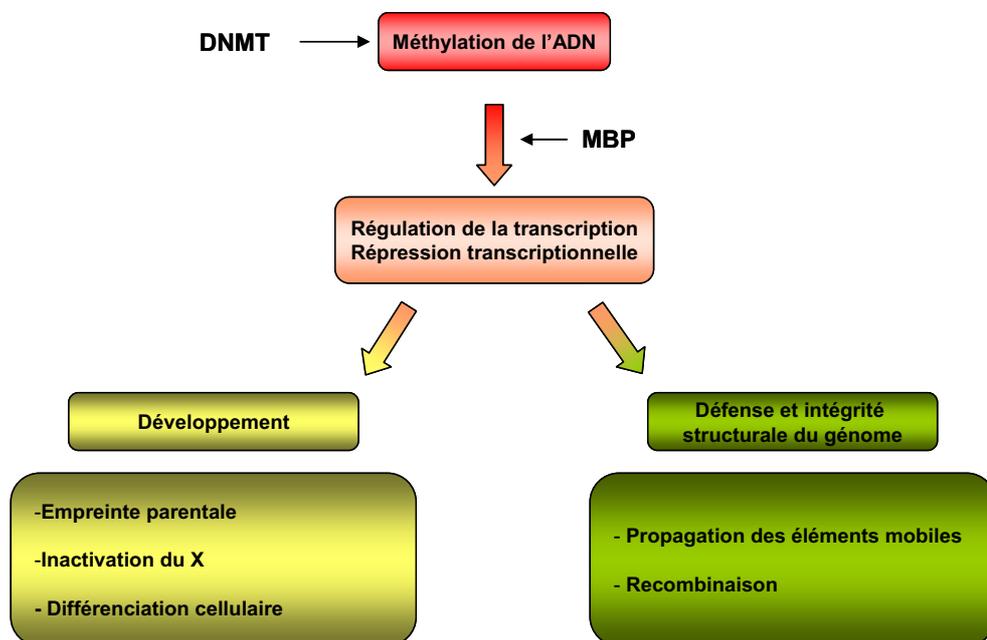


Figure 16. Bilan des fonctions associées à la méthylation de l'ADN.

envisagés tels qu'un mécanisme de masquage du site d'initiation de la recombinaison, un mécanisme de déstabilisation des intermédiaires de la recombinaison ou un mécanisme d'interférence avec l'assemblage de la machinerie de recombinaison.

5- CONCLUSION

La méthylation de l'ADN est un phénomène universel mettant en jeu diverses DNMT. Chez les mammifères, les profils de méthylation de l'ADN sont établis de façon précise durant le développement et sont fidèlement maintenus et transmis au cours des divisions cellulaires. Toutefois, la réversibilité des modifications de méthylation des CpG de l'ADN, met en évidence la plasticité de cette information épigénétique, à l'inverse du code génétique stable en dehors des événements de mutagenèse. La méthylation de l'ADN est impliquée dans de nombreuses fonctions biologiques liées notamment au développement, comme l'empreinte parentale, l'inactivation du chromosome X chez les mammifères femelles, ou l'expression de gènes tissus-spécifiques ; mais elle participe également à la défense et à l'intégrité structurale du génome (**Figure 16**). L'altération des profils de méthylation de l'ADN mène ainsi à diverses pathologies humaines telles qu'aux syndromes ICF, Prader-Willi, Angelman, ou Beckwith-Wiedemann mais aussi à des pathologies cancéreuses. Toutes les fonctions associées à la méthylation de l'ADN dépendent de son rôle majeur dans la répression transcriptionnelle (**Figure 16**). En effet, la méthylation de l'ADN intervient dans un vaste processus de répression de la transcription affectant soit un gène spécifique, soit une région précise du génome. Cette répression transcriptionnelle fait principalement appel à des interactions complexes entre la méthylation, la structure chromatinienne et les facteurs régulateurs. Il apparaît donc crucial de comprendre comment la méthylation est lue par les protéines qui reconnaissent le signal de méthylation de l'ADN et agit sur la transcription génique.

Nous allons à présent nous focaliser sur les protéines MBP possédant la capacité de reconnaître et de lier les CpG méthylés, ces « lecteurs » et « traducteurs » du signal de méthylation de l'ADN.

CHAPITRE 2

LES PROTEINES A MBD,

LES PRINCIPAUX INTERPRETES DE LA METHYLATION DE L'ADN

1- DIFFERENTES FAMILLES DE PROTEINES POSSEDANT UNE AFFINITE POUR LA METHYLATION DE L'ADN EXISTENT

A ce jour, une famille principale de protéines MBP est connue chez les vertébrés : la famille des protéines à domaine liant les CpG méthylés ou protéines à MBD (Methyl-CpG-Binding Domain). Toutefois, plus récemment deux autres familles ont été caractérisées : la famille des protéines apparentées à Kaiso ; et la famille des protéines à domaine SRA, plus largement décrite chez les plantes.

1.1- LES PROTEINES A MBD, L'OBJET DE TOUTES LES ATTENTIONS

Les premières protéines possédant une forte affinité pour l'ADN méthylé ont été découvertes par accident par l'équipe du Dr Adrian Bird (Meehan *et al.*, 1989; Lewis *et al.*, 1992). Ironiquement, cette équipe essayait d'identifier des facteurs pouvant lier l'ADN non-méthylé et protéger les îlots de CpG de la méthylation. Au lieu de cela, un complexe et un facteur protéiques capables de lier spécifiquement l'ADN méthylé, respectivement nommés MeCP1 et MeCP2 pour « Methyl-CpG-Binding Protein 1 et 2 », ont été détectés (Meehan *et al.*, 1989; Lewis *et al.*, 1992). MeCP2 fut par la suite purifiée et son domaine minimal de liaison à l'ADN méthylé identifié par l'analyse de mutants de délétion (Nan *et al.*, 1993). Ce domaine de 85 acides aminés fut appelé « Methyl-CpG-Binding Domain » (MBD). Grâce à la recherche par homologie de séquences de domaines semblables au domaine MBD de MeCP2 dans des bases de données EST humaines, quatre autres protéines à MBD ont par la suite été mises en évidence : MBD2 et MBD3 qui constituent le complexe MeCP1, MBD1 et MBD4 (Cross *et al.*, 1997; Hendrich and Bird, 1998).

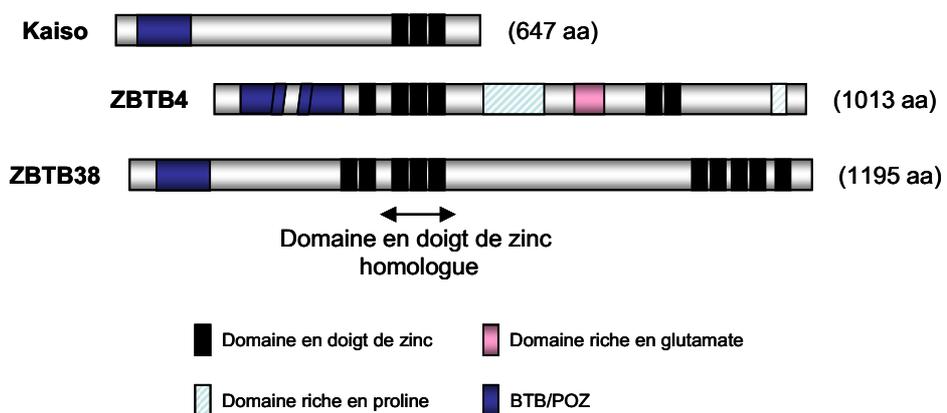


Figure 17. Organisation des protéines apparentées à Kaiso : Kaiso, ZBTB4 et ZBTB38 (adaptée de Filion *et al.*, 2006 (Filion *et al.*, 2006)).

Ces trois protéines contiennent trois domaines en doigts de zinc conservés. Le domaine BTB/POZ de ZBTB4 contient une insertion (domaine coupé).

Ces protéines à MBD, à l'exception de MBD3, sont toutes capables de reconnaître et de lier l'ADN méthylé *in vitro* comme *in vivo* (Hendrich *et al.*, 1998). Elles forment une famille de protéines génétiquement et structurellement très conservées entre les diverses espèces de vertébrés, attestant de leur importance fonctionnelle (Hendrich *et al.*, 1999a; Hendrich and Tweedie, 2003; Hung and Shen, 2003). Toutefois, ces cinq protéines diffèrent globalement entre elles au sein d'un même organisme (Hendrich *et al.*, 1998). La similarité entre ces protéines se limite au domaine peptidique MBD. Ces protéines forment donc davantage une famille fonctionnelle que structurale. Seules, MBD2 et MBD3 s'avèrent similaires en présentant 71,1% d'identité (Hendrich *et al.*, 1998; Hendrich *et al.*, 1999a). De plus, leur homologue chez les invertébrés est une même et unique protéine MBD2/3, qui est également présente chez *D. melanogaster* dont le génome est presque dépourvu de méthylation (Lyko *et al.*, 2000; Marhold *et al.*, 2004). Ces données suggèrent que ces deux protéines pourraient être les ancêtres de cette famille de protéines (Hendrich *et al.*, 2003).

L'identification de cette famille de protéines a permis d'établir un lien direct entre méthylation de l'ADN et répression transcriptionnelle. Depuis, ces protéines à MBD interprètes du signal répresseur lié à la méthylation de l'ADN ont fait et font toujours l'objet de nombreuses études. Elles sont aujourd'hui les protéines possédant une affinité pour l'ADN méthylé les mieux caractérisées. Ces protéines à MBD feront donc l'objet d'une analyse approfondie dans ce chapitre. Toutefois, d'autres protéines à forte affinité pour l'ADN méthylé, mais ne possédant pas de domaine MBD, sont connues.

1.2- D'AUTRES INTERPRETES DU SIGNAL METHYLATION ONT ETE CARACTERISES

1.2.1- LA FAMILLE DES PROTEINES APPARENTEES A KAISO

En dehors de la famille des protéines à MBD, un autre groupe de protéines possédant la propriété de se lier à l'ADN méthylé a été découvert chez les vertébrés. Cette seconde famille est composée de trois membres : Kaiso, le fondateur ; et les deux protéines humaines apparentées, ZBTB4 et ZBTB38 (**Figure 17**).

Ces trois protéines sont structurellement très différentes des protéines à MBD. Leur architecture est semblable à celle des facteurs de transcription BTB/POZ à doigt de zinc, qui sont impliqués dans de nombreux processus biologiques et développementaux (Daniel *et al.*, 2002; Filion *et al.*, 2006) (**Figure 17**). Toutefois, leur domaine en doigts de zinc C2H2 permet aux protéines

apparentées à Kaiso de reconnaître les CpG méthylés du génome (Daniel and Reynolds, 1999;Filion *et al.*, 2006).

La liaison de la protéine Kaiso à l'ADN méthylé nécessite la présence d'au moins deux CpG symétriquement méthylés consécutifs (CGCG) (Prokhortchouk *et al.*, 2001). Les protéines ZBTB4 et ZBTB38 peuvent, elles, interagir avec des séquences contenant un seul CpG méthylé (Filion *et al.*, 2006). De façon inattendue, les motifs en doigt de zinc de ces trois protéines présentent une dualité fonctionnelle. En effet, *in vitro*, ces motifs sont aussi capables de lier des séquences consensus non-méthylées. Ainsi, les protéines Kaiso et ZBTB4 reconnaissent les sites KBS (Kaiso Binding Site, TCCTGCNA) généralement localisés au niveau des promoteurs des gènes cibles de Wnt (Daniel *et al.*, 2002;Park *et al.*, 2005;Filion *et al.*, 2006;Daniel, 2007). Et, l'homologue de la protéine ZBTB38 chez le rat, Zenon, fixe les séquences cis-régulatrices E-box (CACCTG) (Kiefer *et al.*, 2005). Ces trois protéines en ciblant l'ADN méthylé et des séquences consensus non-méthylées apparaissent donc être des régulateurs transcriptionnels complexes (Prokhortchouk *et al.*, 2001;Daniel *et al.*, 2002;Kiefer *et al.*, 2005;Filion *et al.*, 2006).

Les protéines Kaiso, ZBTB4 et ZBTB38 ont toutes les trois été également impliquées dans la répression transcriptionnelle méthylation-dépendante (Prokhortchouk *et al.*, 2001;Yoon *et al.*, 2003;Filion *et al.*, 2006;Lopes *et al.*, 2008). En outre, Kaiso a été identifiée comme partenaire de la caténine p120, qui intervient dans les jonctions cellulaires (Daniel *et al.*, 1999). Cette donnée pourrait suggérer un rôle de Kaiso dans la régulation de l'expression génique en réponse à la signalisation de surface cellulaire.

1.2.2- LES PROTEINES A DOMAINE SRA

De récentes études ont suggéré qu'un autre domaine protéique, le domaine SRA (Set- and Ring finger-Associated, aussi appelé YNG), pouvait également interpréter le signal de méthylation de l'ADN (Unoki *et al.*, 2004;Woo *et al.*, 2007;Johnson *et al.*, 2007) (**Figure 18**). La fonction de ce domaine est mal connue. Toutefois, il permet l'association des protéines à la chromatine mais aucune homologie et signature de séquence ne permettent d'en appréhender le mécanisme. De façon intéressante, le domaine SRA semble plus versatile que le domaine MBD dans sa reconnaissance à l'ADN méthylé. En effet, *in vitro*, le domaine SRA lie les cytosines méthylées présentes au niveau de sites CpG, CpNpG et de sites non-symétriques CpNpN, avec une préférence pour les séquences CpNpG (Woo *et al.*, 2007;Johnson *et al.*, 2007).

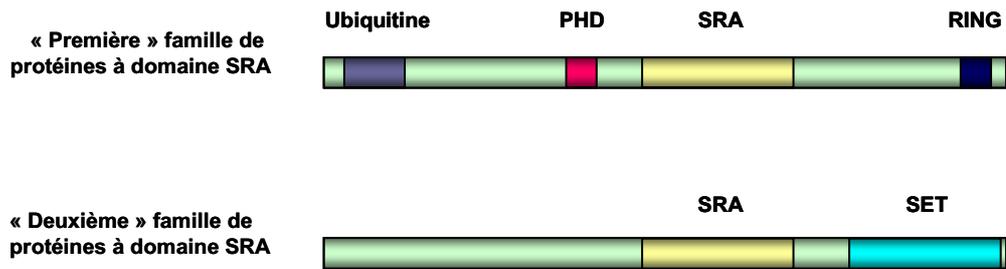


Figure 18. Organisation des protéines SRA.

La « première » famille de protéines à domaine SRA présente trois autres domaines protéiques : un domaine ubiquitine et un domaine RING, domaines dirigeant la dégradation des protéines cibles par le protéasome; et un domaine PHD (Plant Homo-Domain), domaine de reconnaissance des histones méthylés sur leur lysine 4. La « seconde » famille de protéines à domaine SRA, spécifique des plantes, présente le domaine SRA associé aux domaines Pre-SET et SET, impliqués dans la méthylation des histones.

Les protéines possédant un domaine SRA se subdivisent en deux familles distinctes.

La première famille de protéines présente le domaine SRA associé à deux autres domaines protéiques : le domaine PHD (Plant Homo-Domain), domaine de reconnaissance des histones méthylés sur leur lysine 4 et le domaine RING, domaine dirigeant la dégradation des protéines cibles par le protéasome (**Figure 18**). Au minimum cinq membres de cette famille existent chez *Arabidopsis thaliana*. Parmi, ces protéines, Vim1 a été récemment décrite comme nécessaire à la condensation des centromères (Woo *et al.*, 2007). A ce jour, chez les mammifères quatre principaux homologues portant le domaine SRA ont été décrits : la protéine humaine ICBP90 (UHRF1), son paralogue NIRF (UHRF2), et leurs orthologues respectifs chez la souris, Np95 et Np97 (Unoki *et al.*, 2004;Woo *et al.*, 2007;Johnson *et al.*, 2007). Ces protéines sont des protéines nucléaires impliquées dans la prolifération cellulaire (Fujimori *et al.*, 1998;Mori *et al.*, 2002). Dans les cellules tumorales, le taux d'expression de ces protéines est élevé et constant au cours du cycle cellulaire, alors que dans les cellules saines leur expression est dépendante du cycle cellulaire. Ces protéines sont essentielles pour la transition G1/S et sont impliquées dans la formation de l'hétérochromatine (Papait *et al.*, 2007), suggérant leur rôle fonctionnel dans le remodelage de la chromatine. Récemment, des travaux ont par ailleurs suggérés que la protéine Np95 joue un rôle clé dans l'héritabilité de la méthylation de l'ADN en recrutant Dnmt1 au niveau de la fourche de réplication et de l'ADN hémi-méthylé (Bostick *et al.*, 2007;Sharif *et al.*, 2007).

La seconde famille de protéines contenant un domaine SRA est spécifique des plantes. Aucun homologue chez les mammifères n'existe. Cette famille inclut essentiellement les histones méthyltransférases SUVH d'*A. thaliana* (Johnson *et al.*, 2007). Dans ces protéines, le domaine SRA est associé aux domaines Pre-SET et SET, impliqués dans la méthylation des histones (**Figure 18**).

2- CARACTERISTIQUES STRUCTURALES ET BIOCHIMIQUES DES PROTEINES A MBD

La famille des protéines à MBD est donc composée de cinq membres : MeCP2, MBD1, MBD2, MBD3 et MBD4. Ces cinq membres possèdent un domaine commun très conservé, le domaine de liaison à l'ADN méthylé, le domaine MBD. Ces protéines sont des facteurs épigénétiques essentiels dans la mesure où ils possèdent la capacité d'interpréter la méthylation de l'ADN. Nous allons donc nous intéresser ici à leurs caractéristiques structurales et biochimiques.

Tableau 3. Localisation chromosomique et structure des gènes humains codant les protéines à MBD (Hendrich *et al.*, 1999a;Kriaucionis and Bird, 2004).

Gènes	<i>MeCP2</i>	<i>MBD1</i>	<i>MBD2</i>	<i>MBD3</i>	<i>MBD4</i>
Localisations chromosomiques	Xq28	18q21	18q21	19p13	3q21-22
Longueur (kb)	60	14	50	7	11
Nombres d'exons	4	16	7	7	7

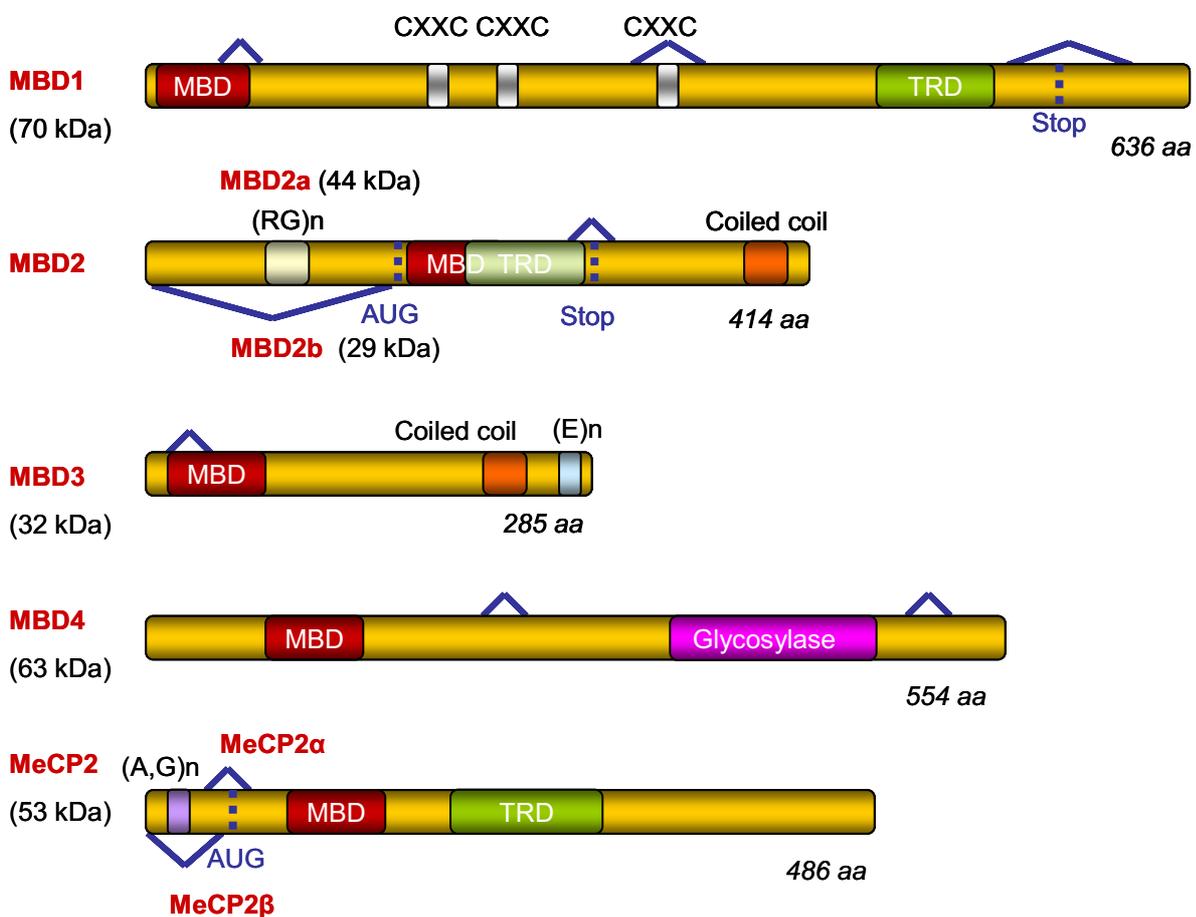


Figure 19. Les différentes isoformes des protéines à MBD de mammifères.

Les traits bleus représentent les variants d'épissages. Le domaine liant les CpG méthylés (MBD) est représenté en rouge, le domaine de répression transcriptionnelle (TRD) est représenté en vert et le domaine de réparation (glycosylase) est représenté en rose. CXXC représente des domaines riches en cystéines ; (E)_n, des motifs poly-glutamates ; (RG)_n, des motifs riches en arginine et glycine ; (A,G)_n, des régions riches en poly-alanine et poly-glycine.

Les cinq protéines à MBD sont des répresseurs transcriptionnels méthylation-dépendant. MBD3 possède un domaine MBD non fonctionnel, donc ne possède pas la propriété de lier l'ADN méthylé. Toutefois, il est un composant du complexe co-répresseur Mi2/NuRD. MBD4 est quand à elle principalement impliquée dans la réparation des mésappariement G/T *via* son activité glycosylase.

2.1- IDENTIFICATION ET DESCRIPTIF DES GENES CODANT LES PROTEINES A MBD ET DES DIFFERENTS ISOFORMES ET VARIANTS TRANSCRITS ET TRADUITS

MeCP2 a initialement été identifiée, purifiée et séquencée par l'équipe du Dr A. Bird sur la base de sa capacité de liaison à des dinucléotides CpG méthylés (Meehan *et al.*, 1989; Lewis *et al.*, 1992). Analysée comme une protéine monomérique de 84KDa chez le rat et de 80 KDa chez la souris, sa dégradation selon la méthode d'Edman a permis de générer des sondes utilisées pour identifier la séquence complète de son ADN complémentaire. Son gène a ensuite pu être localisé sur le locus Xq28 (Quaderi *et al.*, 1994; D'Esposito *et al.*, 1996) et est reconnu comme soumis au mécanisme d'inactivation du chromosome X. Des mutations dominantes dans ce gène sont par ailleurs responsables (dans 80% des cas) du syndrome de Rett (Amir *et al.*, 1999). Ce syndrome est une pathologie neuro-développementale progressive conduisant à un poly-handicap lourd associé à des retards mentaux sévères (Hagberg *et al.*, 1983). Il affecte une naissance de fille sur 10 000 à 15 000 et constitue ainsi la première cause génétique à l'origine de retards mentaux chez les femmes (Percy, 2002).

Les gènes des quatre autres protéines à MBD, sont localisés sur les chromosomes 18q21 pour MBD1 et MBD2, 19p13 pour MBD3 et 3q21-22 pour MBD4 (Hendrich *et al.*, 1999a).

La structure des cinq gènes codant les protéines à MBD est présentée dans le tableau 3 (**Tableau 3**). Il est toutefois à noter qu'à leur extrémité 5', ces cinq gènes possèdent tous un îlot de CpG, suggérant que leur régulation pourrait être soumise à un mécanisme méthylation-dépendant.

Les gènes des protéines à MBD codent différents isoformes et variants, qui résultent d'épissages ou de sites de polyadénylation alternatifs (**Figure 19**). Ainsi, le transcrit *MBD2* est soumis à un épissage spécifique du tissu testiculaire, conduisant à une forme plus courte de la protéine MBD2 dans sa partie carboxy-terminale. Le transcrit *Mbd1* peut également subir un épissage de sa région 5', qui code un troisième motif protéique CXXC (Hendrich *et al.*, 1998; Jorgensen *et al.*, 2004). Quant au transcrit *MeCP2*, il possède un signal de polyadénylation alternatif qui conduit à la transcription d'une longue région 3' UTR de 8,5 kb très conservée (Coy *et al.*, 1999; Reichwald *et al.*, 2000), qui semble impliquée dans le contrôle de la stabilité de ce transcrit (Samaco *et al.*, 2004). Cette forme longue du transcrit *MeCP2* serait la principale forme à l'origine de l'expression de la protéine MeCP2 dans le cerveau murin en développement, suggérant une spécificité tissulaire de cet épissage alternatif (Pelka *et al.*, 2005). Des variants d'origine traductionnelle sont également observés chez les protéines à MBD, du fait de l'existence de codons AUG ou stop alternatifs. Ainsi, une isoforme de MeCP2 a été découverte chez l'Homme et la souris par analyse des bases de

données d'EST (Kriaucionis and Bird, 2004). Cette nouvelle forme de 498 acides aminés, nommée MeCP2 alpha, est traduite dès le premier exon du gène MeCP2, quand la première forme caractérisée, MeCP2 bêta, de 486 acides aminés, n'était pas traduite qu'à partir d'un AUG présent dans le second exon. La traduction de l'isoforme alpha nécessite cependant l'épissage antérieur de l'exon 2, qui supprime donc ce second codon d'initiation traductionnelle. Les isoformes MBD2a, de 43 kDa, et MBD2b, 29 kDa, résultent également de la présence d'un codon d'initiation traductionnelle alternatif.

2.2- EXPRESSION TISSULAIRE DES DIFFERENTES PROTEINES A MBD

Les protéines à MBD ont la particularité d'être très peu, ou pas, exprimées dans les cellules souches embryonnaires (ES), hormis MBD3 (Hendrich *et al.*, 1998). Des études réalisées à partir d'embryons murins préimplantatoires montrent également une expression précoce de la protéine Mbd3. Mbd2 et Mbd4 sont toutefois détectées à des stades préimplantatoires (blastula), quand MeCP2 ne s'exprimerait qu'après l'implantation de l'embryon (Kantor *et al.*, 2003; Huntriss *et al.*, 2004). Une expression notable de toutes les protéines à MBD est détectée dans les ovogonies et ovocytes immatures ; elle disparaît cependant lors de leur maturation (Huntriss *et al.*, 2004).

Les protéines à MBD sont en revanche exprimées dans tous les types cellulaires somatiques et peuvent donc être considérées comme des protéines ubiquitaires (Hendrich *et al.*, 1998). Toutefois le niveau d'expression de ces protéines varie fortement dans les différents tissus.

MeCP2 est très fortement exprimée dans le cerveau chez l'Homme, la souris et le rat. Elle l'est plus faiblement dans les reins, et encore moins dans la rate, puis le foie puis enfin les testicules (Meehan *et al.*, 1992). Le niveau d'expression de la forme MeCP2 α , prédominante (Kriaucionis *et al.*, 2004; Mnatzakanian *et al.*, 2004), est particulièrement élevé dans le cerveau, le thymus et les poumons de souris (Dragich *et al.*, 2007). Dans le cerveau, MeCP2 est plus fortement exprimée dans le cervelet, le bulbe olfactif et le cortex préfrontal que dans le striatum, le septum et l'hippocampe (Cassel *et al.*, 2004; Rusconi *et al.*, 2008). L'analyse de la distribution de ce facteur dans le cerveau de souris (Shahbazian *et al.*, 2002a), de rat (Cassel *et al.*, 2004), de macaque (Akbarian *et al.*, 2001) et de l'homme (Shahbazian *et al.*, 2002b; Balmer *et al.*, 2003) indique que l'expression MeCP2, faible au cours du développement embryonnaire, augmente après la naissance pour atteindre un plateau maintenu tout au long de la vie. MeCP2 n'est exprimée quasiment que dans les neurones en cours de maturation ou post-mitotiques. Il est également à noter que MeCP2 est plus faiblement exprimée dans les cellules en culture telles les cellules HeLa (Ng *et al.*, 1999).

Plus généralement, on peut dire que cette protéine s'exprime plus fortement dans les cellules différenciées, qui se divisent peu, que dans les cellules se divisant activement.

MBD1 et MBD3 présentent un patron d'expression similaire à celui de MeCP2, avec une forte expression dans le cerveau chez la souris (Hendrich *et al.*, 1998). Cependant, au contraire de MeCP2, MBD1 est fortement concentrée dans les cellules en culture (Ng *et al.*, 2000) et MBD3 serait davantage spécifique des stades de développement précoce, prénatal, du système nerveux (Jung *et al.*, 2003).

A l'opposé, MBD2 serait plus faiblement exprimée dans le cerveau que dans les reins et les poumons (Hendrich *et al.*, 1998).

L'expression du gène *MBD4* n'est pas retrouvée par northern blot exceptée à un très faible niveau dans les cellules ES, mais celle-ci est détectable dans tous les tissus par RT-PCR (Hendrich *et al.*, 1998).

2.3- PROPRIETES DE LIAISON A L'ADN DES PROTEINES A MBD

2.3.1- LIAISON A L'ADN METHYLE VIA LE DOMAINE MBD

2.3.1.1- CO-LOCALISATION NUCLEAIRE DES PROTEINES A MBD AVEC LES 5-METHYLCYTOSINES

Les protéines à MBD sont des protéines exclusivement nucléaires (Hendrich *et al.*, 1998; Fujita *et al.*, 1999). Plus précisément, elles se superposent aux zones méthylées de l'ADN à l'exception de MBD3 qui ne présente pas d'affinité pour l'ADN méthylé. MeCP2, MBD1, MBD2 et MBD4 sont ainsi retrouvées au niveau des foyers d'hétérochromatine des régions péri-centromériques, contenant 40% des doublets CpG méthylés, mais aussi au niveau de régions moins riches en 5-méthylcytosines telles l'euchromatine et les séquences microsatellites dispersées (Nan *et al.*, 1996; Hendrich *et al.*, 1998). La localisation spécifique de MeCP2, MBD2 et MBD4 n'est plus détectée dans des cellules ayant moins de 5% du taux de méthylation normal (Nan *et al.*, 1996; Hendrich *et al.*, 1998).

La co-localisation spécifique des protéines à MBD avec les 5-méthylcytosines s'explique par la spécificité de ces protéines à reconnaître et à lier les dinucléotides CpG méthylés grâce à un domaine très conservé : le « Methyl-CpG-Binding Domain » (MBD). Bien qu'aucune séquence cible consensus n'ait pu être déterminée, des différences d'affinité pour l'ADN méthylé entre ces différentes protéines sont observées.

2.3.1.2- PROPRIETES DE LIAISON A L'ADN DU DOMAINE MBD

Le domaine MBD de MeCP2 est un domaine de 85 acides aminés nécessaire et suffisant pour permettre sa liaison à l'ADN méthylé *in vitro* et la reconnaissance d'une seule paire de dinucléotides CpG symétriquement méthylés sur les deux brins de l'hélice ADN (Nan *et al.*, 1993). MeCP2 est ainsi capable de reconnaître l'ADN méthylé nu comme assemblé en nucléosome (Nan *et al.*, 1997; Chandler *et al.*, 1999). L'interaction du domaine MBD de MeCP2 à l'ADN nucléosomique est par ailleurs renforcé par son domaine carboxy-terminal (Chandler *et al.*, 1999). De plus, la présence d'une séquence riche en A/T à proximité des dinucléotides CpG méthylés (à une distance de 3 à 8 bases) augmenterait l'affinité de MeCP2 pour ses cibles (Klose *et al.*, 2005). MeCP2 présente également une faible affinité pour l'ADN hémi-méthylé (Kimura and Shiota, 2003) et une faible affinité aspécifique pour l'ADN non-méthylé (Meehan *et al.*, 1992).

Tout comme MeCP2, les protéines MBD1, MBD2 et MBD4 se lient *via* leur domaine MBD, *in vitro* comme *in vivo*, à des séquences d'ADN symétriquement méthylées (Hendrich *et al.*, 1998; Ng *et al.*, 2000). La présence d'un seul site CpG méthylé suffit aussi à ces protéines pour se fixer. MBD1 et MBD2 semblent également impliquées dans la liaison à l'ADN hémi-méthylé (Ng *et al.*, 2000; Tatematsu *et al.*, 2000). En outre, MBD4 se fixerait préférentiellement aux sites hémi-méthylés tels ceux engendrés par des mésappariements 5mCpG/GpT (Hendrich *et al.*, 1999b). MBD4 est en effet principalement une ADN glycosylase impliquée dans la réparation de ces mésappariements. Cette fonction de MBD4 sera abordée dans le paragraphe 4.3.1.

En revanche, chez les mammifères, MBD3, contrairement à son homologue chez le xénope, possède un domaine non-fonctionnel (Hendrich *et al.*, 1998; Wade *et al.*, 1999).

2.3.1.3- STRUCTURE PROTEIQUE DU DOMAINE MBD

Par comparaison de séquences des domaines MBD des cinq protéines de la famille d'une part et par des expériences de mutagenèse dirigée d'autre part, neuf acides aminés très conservés et essentiels à l'interaction entre le domaine MBD et l'ADN méthylé ont été identifiés : Val20, Arg22, Arg/Lys30, Asp32, Tyr34, Arg44, Lys46, Ser45 et Lys65 (Hendrich *et al.*, 1998; Ohki *et al.*, 1999; Wakefield *et al.*, 1999; Ohki *et al.*, 2001) (**Figure 20A**). Chez les mammifères, la protéine MBD3 présente deux substitutions pour deux de ces neuf acides aminés importants : Arg/Lys30 en

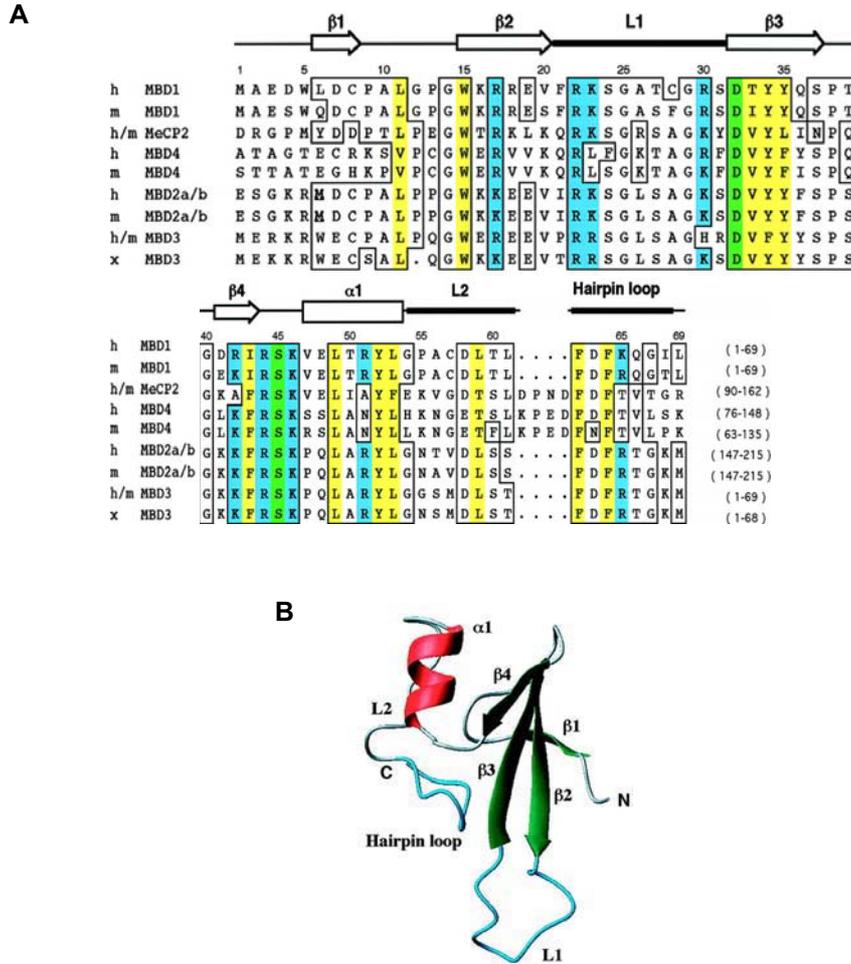


Figure 20. Le domaine de fixation à l'ADN méthylé (MBD).

(A) Alignement des séquences peptidiques et motifs secondaires des domaines MBD des cinq protéines à MBD, MBD1, MeCP2, MBD4, MBD2 et MBD3 de quelques vertébrés (h : Homme, m : souris, x : xénope). Les résidus conservés sont encadrés et les résidus importants colorés : les résidus basiques en bleus, les hydrophobes en jaunes et les résidus acides et polaires en verts. (B) Structure tri-dimensionnelle du MBD de mMBD1, établie par spectroscopie RMN 2D. α : hélice α , β : feuillet β , L: boucle, N : extrémité amino-terminale, C : extrémité carboxy-terminale.

His30 et Tyr34 en Phe34 (**Figure 20A**). Ces substitutions, n'étant pas observées chez son homologue xénope, seraient ainsi responsables de l'incapacité de MBD3 à lier l'ADN méthylé.

L'alignement des séquences peptidiques des domaines MBD a aussi révélé la présence de deux sous-classes de domaine MBD : les domaines MBD de MBD4 et de MeCP2 semblent très proches et ceux de MBD1, MBD2 et MBD3 forment une deuxième sous-classe (Hendrich *et al.*, 1999a) (**Figure 20A**).

Les structures tridimensionnelles des domaines MBD des protéines humaines MeCP2 et MBD1 ont été étudiées par « Résonance Magnétique Nucléaire » (RMN). Ces analyses ont révélé une structure similaire dite en sandwich α/β constituée d'un feuillet β antiparallèle à quatre brins (A, B, C et D) sur la face N-terminale et d'une hélice- α suivie d'un coude en épingle à cheveux sur la face C-terminale (**Figure 20B**). Ensemble, la boucle flexible entre brins B et C, et les faces exposées des brins B, C et D constituent la surface de liaison à l'ADN méthylé (Ohki *et al.*, 1999; Wakefield *et al.*, 1999; Ohki *et al.*, 2001).

Une fois le domaine MBD « classique » décrit, six autres protéines contenant un domaine semblable ont été identifiées par alignement de séquences dans différentes espèces (Roloff *et al.*, 2003). Parmi eux, sont retrouvées des protéines impliquées dans les modifications post-traductionnelles des histones : telles les histones acétyltransférases BAZ2A/TIP5 et BAZ2B, et les histones méthyltransférases, CLLD6 et SETDB1/ESET (Roloff *et al.*, 2003). Toutefois, si ces nouveaux membres semblent tracer un lien séduisant entre méthylation de l'ADN et structure chromatinienne, l'analyse des séquences de leur domaine MBD suggère une incapacité à fixer l'ADN méthylé. La recherche d'une telle capacité chez SETDB1 s'est par ailleurs montrée infructueuse (Ichimura *et al.*, 2005). Ces protéines ne feront donc pas l'objet de notre attention dans cette introduction.

2.3.2- LIAISON DE LA PROTEINE MBD1 A L'ADN NON-METHYLE VIA SES DOMAINES CXXC

Dans les cellules présentant un faible taux de méthylation, la localisation spécifique de MBD1 n'est pas altérée (Hendrich *et al.*, 1998). De plus, dans les cellules ES invalidées pour les *DNMT* ou les cellules COS7 traitées à la 5-aza-2'-désoxycytidine, la protéine MBD1-GFP de fusion reste partiellement fixée aux séquences microsatellites (Fujita *et al.*, 1999; Ng *et al.*, 2000). Toutes ces données suggéraient donc que MBD1 a la capacité de lier l'ADN non-méthylé.

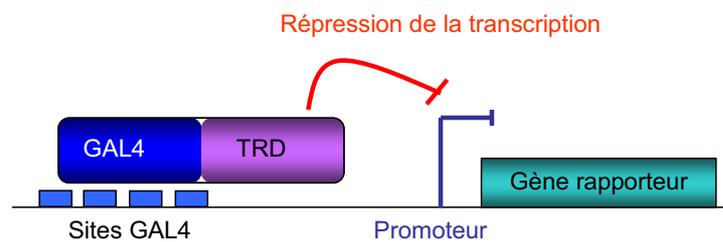


Figure 21. Principe du système de transcription GAL4.

Réalisation dans des cellules en culture des co-transfections de vecteurs codant le domaine de répression transcriptionnelle potentiel, TRD, fusionné au domaine de liaison de l'ADN GAL4 ; et de vecteurs codant un gène rapporteur (ex. Luciférase) placé sous le contrôle d'un promoteur (ex. β -actine, *HSV-tk*, *SV40*) et contenant en amont des sites de liaison GAL4.

En plus d'un domaine MBD, des domaines particuliers riches en cystéine et zinc, les domaines CXXC, ont été isolés au sein de la protéine MBD1 (Ng *et al.*, 2000). Le transcrit *MBD1* étant soumis à différents épissages alternatifs, deux à trois domaines CXXC peuvent être présents dans la protéine MBD1 (**Figure 19**). Différents auteurs ont pu montrer que la protéine Mbd1 murine était capable de lier l'ADN non-méthylé grâce à son troisième domaine CXXC. L'affinité de MBD1 pour l'ADN méthylé semble néanmoins bien supérieure en gel retard (Fujita *et al.*, 1999;Ng *et al.*, 2000;Jorgensen *et al.*, 2004)

2.4- LE DOMAINE FONCTIONNEL DE REPRESSION TRANSCRIPTIONNELLE TRD

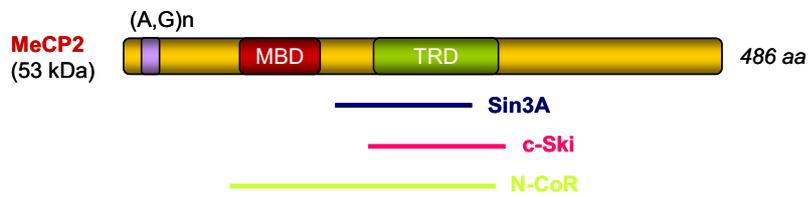
Les cinq protéines à MBD possèdent donc en commun un domaine de liaison à l'ADN méthylé. Ces protéines ont par ailleurs fourni le premier lien entre la méthylation de l'ADN et la répression transcriptionnelle. En effet, ces protéines ont la particularité d'être impliquées dans des mécanismes de répression transcriptionnelle. Les activités répressives de MeCP2, MBD1 et MBD2 s'exercent principalement par l'intermédiaire de leurs domaines de répression transcriptionnelle, appelés TRD (Transcriptional Repression Domain) (**Figure 19**). Ces domaines ont été identifiés par des expériences de délétions et des systèmes de co-transfection GAL4 (Nan *et al.*, 1997;Fujita *et al.*, 1999;Ng *et al.*, 2000;Boeke *et al.*, 2000) (**Figure 21**). Bien que les domaines TRD diffèrent totalement par leur séquence peptidique, ils remplissent des fonctions équivalentes.

3- ACTIVITE REPRESSIVE DES PROTEINES A MBD

3.1- MECP2, LE PREMIER REPRESSEUR METHYLATION-DEPENDANT CARACTERISE

La protéine MeCP2 est la première des protéines à MBD à avoir été étudiée pour son caractère de répresseur transcriptionnel. Lors des expériences pionnières de transcription *in vitro* et *in vivo*, il a été montré que cette protéine présente une forte activité répressive spécifiquement sur les promoteurs méthylés *via* son domaine TRD (Nan *et al.*, 1997). De plus, les premières études portant sur la distribution chromosomique de MeCP2 chez la souris ont montré que cette protéine co-localise avec les CpG méthylés. Plus particulièrement, elle se trouve concentrée dans les régions compactées et transcriptionnellement inactives d'hétérochromatine péricentromérique (Lewis *et al.*, 1992;Nan *et al.*, 1996). Ces données laissent donc supposer l'implication de MeCP2 dans la répression transcriptionnelle *via* l'établissement d'une chromatine compactée.

A



B

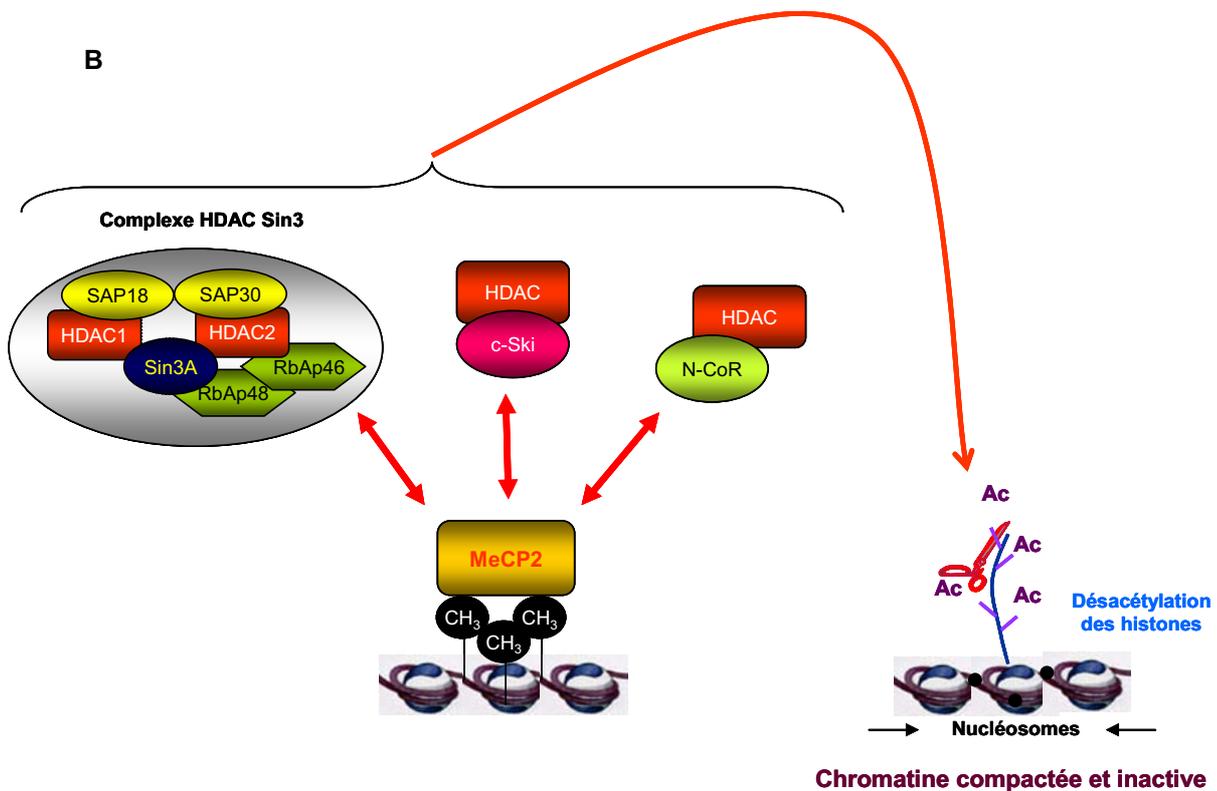


Figure 22. Activité répressive HDAC-dépendante de MeCP2.

(A) Domaines d'interactions entre MeCP2 et les co-répresseurs Sin3A, c-Ski et N-CoR. (B) MeCP2 reconnaît et lie les CpG méthylés de l'ADN. Elle serait alors capable de recruter trois complexes HDAC via ses interactions avec les co-répresseurs Sin3A, c-Ski et N-CoR, entraînant ainsi la désacétylation des histones au niveau des régions méthylées du génome. La désacétylation des histones menant à la compaction de la chromatine, MeCP2 conduirait par ce mécanisme à la répression transcriptionnelle dite HDAC-dépendante des régions méthylées du génome. Le recrutement par MeCP2 des trois complexes HDAC, Sin3, c-Ski/HDAC et N-CoR/HDAC pourrait soit entrer en compétition, soit interagir.

3.1.1- MeCP2 RECRUTE DES COMPLEXES CAPABLES DE MODIFIER POST-TRADUCTIONNELLEMENT LES HISTONES ET DE COMPACTER LA CHROMATINE

3.1.1.1- REPRESSION HDAC-DEPENDANTE

Le premier mécanisme mettant en évidence le rôle de MeCP2 dans la répression transcriptionnelle impliquait le recrutement par cette protéine de complexes co-répresseurs contenant des histones désacétylases (HDAC). En effet, en 1998, l'équipe du Dr Bird et celle du Dr Wolffe ont démontré *in vitro*, grâce à des systèmes GAL4, qu'un traitement à la trichostatine A (TSA), agent inhibiteur des complexes HDAC, lève en partie l'inhibition de l'expression de gènes rapporteurs initiée par MeCP2 (Nan *et al.*, 1998; Jones *et al.*, 1998). Ces deux mêmes équipes ont par la suite mis en évidence une interaction entre MeCP2, le co-répresseur Sin3A et une activité HDAC chez la souris et le xénope (Nan *et al.*, 1998; Jones *et al.*, 1998). Dans les 2 cas, l'interaction entre MeCP2 et Sin3A a été aussi bien démontré *in vitro* par des expériences de chromatographie et de co-sédimentation (GST pull-down), qu'*in vivo* par co-immunoprécipitation (Nan *et al.*, 1998; Jones *et al.*, 1998). Cette interaction est directe et est dépendante du domaine TRD et de la région située entre celui-ci et le domaine MBD de la protéine MeCP2 (**Figure 22A**). L'association de MeCP2 à Sin3A permettrait alors le recrutement du complexe HDAC Sin3, qui contient 6 co-répresseurs : les histones désacétylases de classe I, HDAC1 et HDAC2, et les sous-unités RbAp46, RbAp48, SAP18 et SAP30, qui interagissent avec les histones (**Figure 22B**) (Zhang *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 1999).

Ces données furent les premières mises en évidence du recrutement d'un complexe HDAC par une protéine à MBD et cette découverte permit d'établir un lien concret entre méthylation et désacétylation des histones.

Néanmoins, une étude plus récente a montré, à partir d'extraits tissulaires de rat, de cellules en culture et d'ovocytes de xénope laevis, qu'une fraction minoritaire de MeCP2 interagit avec Sin3a et que cette interaction n'est pas stable (Klose and Bird, 2004). MeCP2 existe principalement sous forme libre, monomérique. Ces données suggèrent que MeCP2 n'est pas obligatoirement un membre du complexe répresseur Sin3 et pourrait alors s'engager dans d'autres interactions pour établir la répression transcriptionnelle.

D'autres co-répresseurs, connus comme étant associés à des HDAC, ont aussi été identifiés comme capables d'interagir avec MeCP2. C'est le cas de l'oncogène c-Ski et de la protéine N-CoR (Kokura *et al.*, 2001). L'interaction de ces 2 co-facteurs avec MeCP2 a été démontrée par des

techniques de co-sédimentation et d'immunoprécipitation. Comme observées pour l'interaction MeCP2/Sin3A, les 2 interactions MeCP2/c-Ski et MeCP2/N-CoR sont directes et dépendantes d'une région contenant le domaine TRD de MeCP2 (**Figure 22 A**). De plus, c-Ski co-localise avec MeCP2 au niveau de régions d'hétérochromatine. L'implication de l'oncogène c-Ski dans la répression transcriptionnelle induite par MeCP2 a été démontrée par un système GAL4. En effet, le degré de répression transcriptionnelle induit par une protéine de fusion Gal4-MeCP2 est abrogé par la surexpression d'une forme dominante négative c-Ski ou d'anticorps anti-c-Ski bloquants. Il semble peu probable que dans la répression transcriptionnelle MeCP2 dépendante, les trois co-répresseurs Sin3A, c-Ski et N-CoR interviennent au sein d'un même complexe. En effet, des études biochimiques ont montré que le complexe Sin3 purifié ne contient ni N-CoR/SMRT, ni c-Ski/Sno comme composants (Zhang *et al.*, 1997; Laherty *et al.*, 1998). Par ailleurs, Sin3 et c-Ski/Sno ne sont pas détectés au sein du complexe N-CoR/SMRT (Huang *et al.*, 2000; Kao *et al.*, 2000; Guenther *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2000). Dès lors, il existerait trois complexes différents : MeCP2/Sin3A/HDAC, MeCP2/c-Ski/HDAC et MeCP2/N-CoR/HDAC, qui pourrait soit entrer en compétition, soit interagir (**Figure 22B**).

Les analyses de la structure chromatinienne associée à la protéine MeCP2 confirment également la participation des complexes HDAC dans le blocage de l'activité transcriptionnelle conduite par cette protéine. En effet, plusieurs expériences d'immunoprécipitation de chromatine (ChIP) ont montré que les promoteurs liés par MeCP2 sont appauvris en histones acétylées (Ballestar *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2003). De plus, *in vivo*, MeCP2 co-localise avec des histones hypoacétylées sur les chromosomes murins (Hendrich *et al.*, 1998). Enfin, dans des lignées cellulaires n'exprimant pas MeCP2, tant humaine, issues de patients porteurs de mutations *MeCP2* et atteints d'un syndrome de Rett, que murines, obtenues par invalidation génique, un enrichissement en histones acétylées est au contraire observé au niveau de gènes cibles de MeCP2 (Martinowich *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2003; Horike, 2005a) ou à l'échelle globale du génome (Shahbazian *et al.*, 2002b).

La répression transcriptionnelle initiée par MeCP2 fait donc appel à une activité HDAC. Toutefois, dans certains cas elle n'est pas ou que partiellement levée par un traitement à la TSA. En effet, Nan *et al.* ont observé lors de leurs études que la répression transcriptionnelle du promoteur de la β -actine humaine par MeCP2 n'est levée qu'à 50% par la TSA (Nan *et al.*, 1997). Ultérieurement, Yu *et al.* ont montré par un système GAL4 classique que MeCP2 *via* son domaine TRD était capable d'inhiber la transcription d'un gène rapporteur sous la dépendance du promoteur *SV40*, mais qu'un traitement à la TSA n'avait aucun impact sur cette répression (Yu *et al.*, 2000).

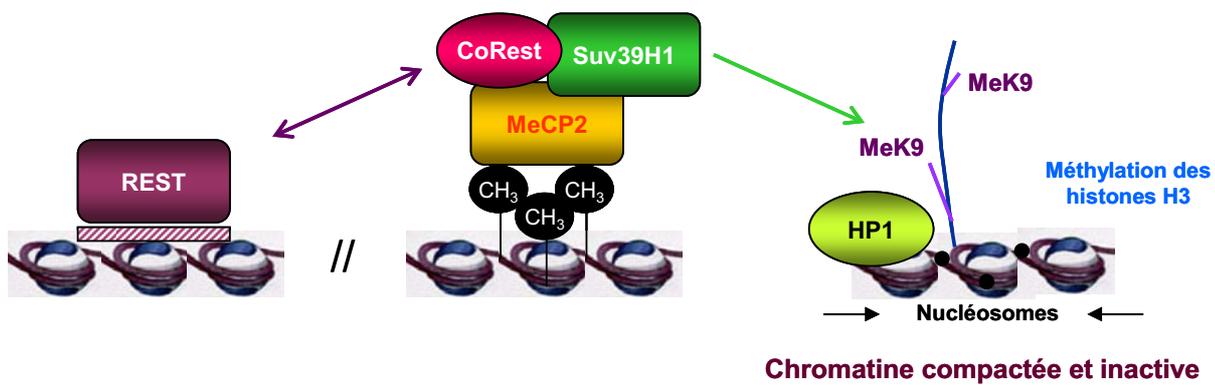


Figure 23. Activité répressive HMT-dépendante de MeCP2.

L'interaction de MeCP2 avec Suv39H1 au niveau de régions méthylées favorise la méthylation des lysines 9 (MeK9) d'histones H3. Cette association implique aussi le facteur CoRest, partenaire du facteur séquence-spécifique REST.

Ces données suggèrent donc que d'autres voies, HDAC-indépendante, sont utilisées et que la séquence du promoteur utilisée lors des expériences pourrait être à l'origine du choix de la voie de répression.

3.1.1.2- REPRESSION HMT-DEPENDANTE

La méthylation des lysines 9 et 27 des histones H3 et des lysines 20 des histones H4 participe également à la répression transcriptionnelle de nombreux gènes ayant leurs séquences activatrices méthylées. Des associations entre MeCP2 et des histones méthyltransférases (HMT) ont pu être mises en évidence. Ainsi le recrutement d'HMT par MeCP2 sur l'ADN méthylé entraîne la méthylation des lysines des histones, qui conduit à la compaction de la chromatine puis à la répression transcriptionnelle.

L'association entre la protéine MeCP2 et l'activité HMT fut tout d'abord établie dans des lysats cellulaires Rat-1 (Lunyak *et al.*, 2002). Cette observation fut par la suite confirmée par d'autres auteurs *in vitro* puis *in vivo* : un système d'induction de l'expression de MeCP2 par la tétracycline (« Tet-Off ») conduit à la fixation de MeCP2 et à l'apparition d'histone H3 méthylées sur la lysine 9 au niveau de la région DMR du gène *H19* dans des cellules n'exprimant pas MeCP2 endogène ; au contraire, en absence d'induction de MeCP2, la présence d'histones H3 méthylées est fortement réduite dans cette région (Fuks *et al.*, 2003). L'activité HMT, notamment impliquée dans la répression transcriptionnelle *via* MeCP2 du gène spécifique de neurone *NaChII*, fut par la suite caractérisée par ChIP (Lunyak *et al.*, 2002). Ainsi, la présence de MeCP2, mais aussi du co-répresseur CoRest, d'histones H3 méthylées sur la lysine 9 et du facteur d'hétérochromatine HP1 ont été détectés sur les régions méthylées du gène *NachII*. Des expériences de co-immunoprécipitation ont par la suite montré que MeCP2 interagit avec CoRest mais aussi avec l'HMT Suv39H1 (**Figure 23**). La réalisation de « ChIP-reCHIP », c'est-à-dire de deux immunoprécipitations de chromatine successives à l'aide de deux anticorps distincts, a révélé une co-localisation de MeCP2 avec CoRest ou Suv39H1 sur la région méthylée *NaChII*.

Dès lors, la répression induite par MeCP2 peut non seulement s'effectuer par une voie HDAC-dépendante mais aussi par une voie HMT-dépendante. L'analyse de la chromatine inactive montre qu'elle porte conjointement des marques de désacétylation et de méthylation des histones. Toutefois, à l'heure actuelle, aucune étude ne s'est intéressée à déterminer si le recrutement d'HDAC ou d'HMT par MeCP2 était simultané, exclusif ou successif.

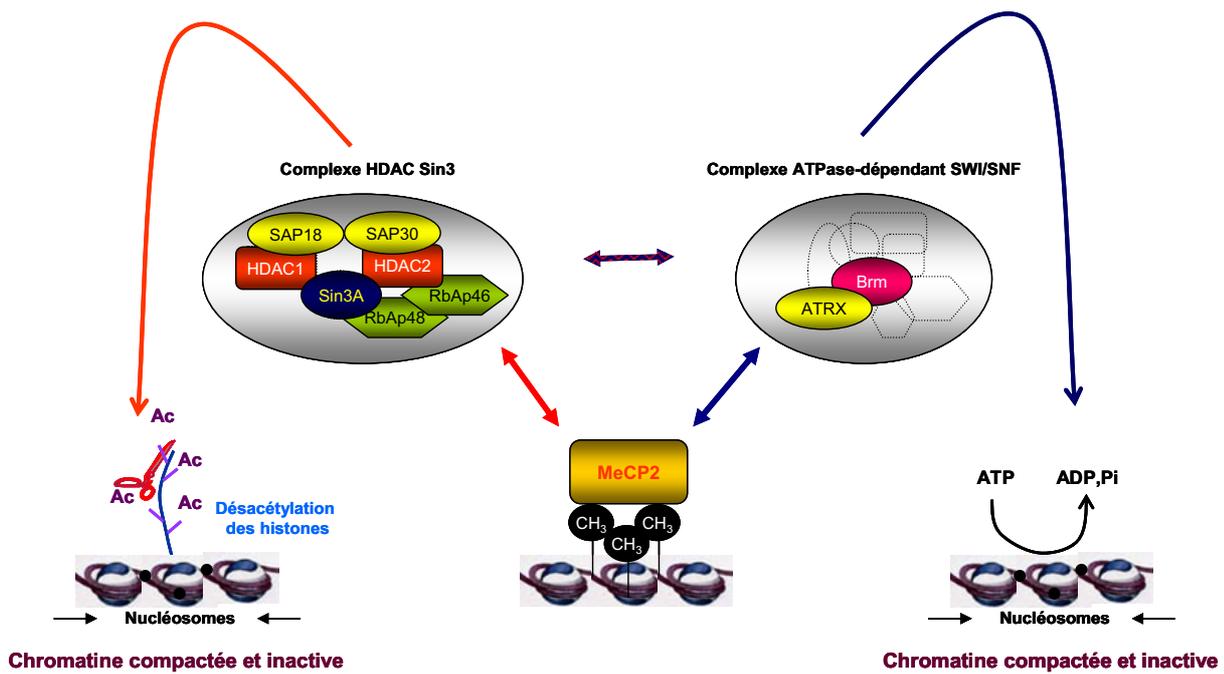


Figure 24. Activité répressive ATPase-dépendante de MeCP2.

L'interaction de MeCP2 avec Brahma et Sin3 au niveau de régions méthylées conduit à la désacétylation des histones ainsi qu'au remodelage ATP-dépendant de la chromatine.

3.1.2- MeCP2 REPRIME LA TRANSCRIPTION EN MODIFIANT L'ARCHITECTURE CHROMATINIENNE

3.1.2.1- MeCP2 « DEPLACE » LES NUCLEOSOMES

MeCP2 participe donc à la répression transcriptionnelle de séquences méthylées *via* l'établissement d'une structure chromatinienne inactive. Comme nous venons de le voir, ce mécanisme est rendu possible par le recrutement d'HDAC et d'HMT qui initie des modifications post-traductionnelles de la queue des histones. Toutefois, le remodelage de la chromatine peut non seulement s'effectuer par des modifications post traductionnelles des histones mais aussi par la « translocation » de nucléosomes en entier.

Une voie de répression transcriptionnelle MeCP2-dépendante impliquant le complexe de remodelage chromatinien ATPase-dépendant, SWI/SNF, a été démontrée (Harikrishnan *et al.*, 2005). En effet, plusieurs approches moléculaires ont permis de mettre en évidence une interaction entre MeCP2 et certains membres du complexe SWI/SNF, dont Brahma (Brm) (**Figure 24**). Dans la lignée cellulaire NIH3T3, MeCP2 co-sédimente, co-immunoprécipite et co-localise avec Brm. De plus, la réalisation de CHIP a par la suite montré la présence de Brm sur les promoteurs méthylés et réprimés par MeCP2, tels que celui des gènes *MDR1* et *THBS1* dans les cellules cancéreuses et celui du gène *FMR1* dans des cellules de patients atteints du syndrome de l'X fragile. La co-existence de ce facteur avec MeCP2 sur ces différents promoteurs méthylés a été vérifiée par CHIP reCHIP. Par ailleurs, l'implication de Brm dans la répression transcriptionnelle initiée par MeCP2 a été prouvée grâce à des expériences d'inactivation par interférence à l'ARN. Ainsi, l'utilisation de siRNA (small interfering RNA ou petit ARN interférents) dirigés contre les transcrits *Brm* ou *MeCP2* a montré une activation de l'expression des gènes étudiés. La co-transfection des ces 2 siRNA a un effet synergique. De plus, l'absence de Brm ou de MeCP2 entraîne respectivement la dissociation de MeCP2 ou de Brm des promoteurs méthylés. L'ensemble de ces données suggère que ces deux facteurs interagissent pour l'établissement de la répression transcriptionnelle. Le complexe SWI/SNF permet grâce à son activité ATPase de faire « glisser » les nucléosomes le long de la molécule de l'ADN, favorisant dans ce cas la compaction de la chromatine. Des données suggèrent que cette activité peut être associée à la modification post-traductionnelle des histones. En effet, certains membres du complexes HDAC Sin3 et du complexe SWI/SNF interagissent (Tong *et al.*, 1998; Sif *et al.*, 2001; Martens and Winston, 2002). Dans l'étude menée par l'équipe du

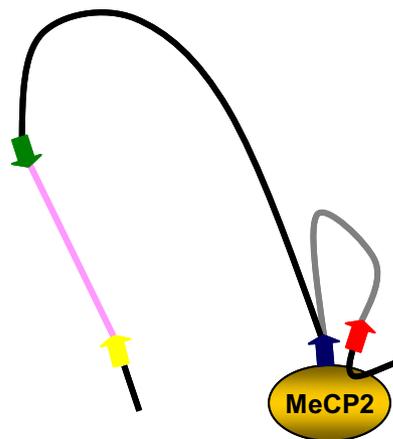


Figure 25. MeCP2 forme des boucles répressives (adaptée de Horike *et al.*, 2005 (Horike *et al.*, 2005)).

Mécanisme alternatif par lequel la protéine MeCP2 pourrait exercer son action de répression transcriptionnelle. La protéine serait susceptible de reconnaître certains éléments dans l'ADN et de former des boucles d'ADN inactif entre ces éléments. Les gènes contenus dans la boucle ne sont plus exprimés.

Dr El-Osta, Sin3A et HDAC1 ont aussi été impliqués dans la répression transcriptionnelle initiée par MeCP2 et Brm (Harikrishnan *et al.*, 2005) (**Figure 24**).

Néanmoins, l'implication de Brm et du complexe SWI/SNF dans la répression transcriptionnelle initiée par MeCP2 a été remise en cause un an plus tard. L'équipe du Dr Wang s'est retrouvée dans l'incapacité de reproduire les données publiées précédemment. De plus, cette équipe met en avant l'argument que les souris invalidées pour *Brm* sont viables et ne développent aucun désordre neurologique sévère similaire aux souris *MeCP2* nulles (Reyes *et al.*, 1997; Guy *et al.*, 2001).

Cependant, récemment, il a été montré que MeCP2 interagit avec un autre membre de la famille SWI/SNF, une ADN hélicase/ATPase SWI2/SNF2 nommée ATRX (Alpha Thalassemia/mental Retardation, X linked) (Nan *et al.*, 2007) (**Figure 24**). Cette interaction a été démontrée *in vitro* par des expériences de double hybride chez la levure mais aussi par co-sédimentation et *in vivo* par co-immunoprécipitation. De plus, ces deux protéines co-localisent au niveau des foyers d'hétérochromatine. Il a été suggéré que MeCP2 et la méthylation de l'ADN ciblent *in vivo* le domaine C-terminal d'ATRX au niveau de ces foyers. En effet, dans le noyau d'une cellule neuronale *Mecp2*^{-/-}, ATRX est délocalisée. Par ailleurs, certaines mutations dans le gène *MeCP2* inhibent *in vitro* l'interaction entre MeCP2 et ATRX. En revanche, lors de cette étude rien n'a été démontré quant au rôle de l'interaction MeCP2-ATRX dans la répression transcriptionnelle.

3.1.2.2- IMPLICATION DE MECP2 DANS L'ETABLISSEMENT DE STRUCTURES SECONDAIRES DE LA CHROMATINE

La protéine MeCP2 pourrait également être impliquée dans la répression transcriptionnelle de certains gènes non pas directement comme il l'a été vu ci-dessus mais plutôt en les plaçant dans une « boucle » d'ADN inactive. En effet, MeCP2 pourrait ne pas avoir uniquement le rôle simple qu'on lui attribuait initialement, c'est à dire se fixer sur les séquences régulatrices méthylées des gènes et réprimer leur expression. Elle semble également être capable de reconnaître certaines régions d'ADN spécifiques et contribuer à faire des boucles entre elles (**Figure 25**). La conséquence de cet isolement dans des boucles serait l'absence d'expression des gènes qui s'y trouvent.

Ainsi, Horike *et al.* ont proposé dans une étude publiée en 2005, que MeCP2 serait impliquée dans la formation de boucle chromatinienne au niveau des gènes *Dlx5* et *Dlx6*, entraînant leur inactivation transcriptionnelle (Horike *et al.*, 2005b). Lors de ce travail, des sites de liaison MeCP2

à proximité des gènes *Dlx5* et *Dlx6* ont été identifiés. De plus, une augmentation de 2 fois du niveau de transcrits de chacun de ces gènes a été observée dans le cortex frontal des souris invalidées pour *Mecp2* par rapport à celui observé dans des souris sauvages. Par ailleurs, la réalisation d'expériences de capture de conformation chromatinienne (3C) a montré que l'inactivation de l'expression de ces 2 gènes est induite par la formation d'une boucle chromatinienne qui n'est pas détectée chez les souris *Mecp2* nulles, suggérant que la formation de cette boucle dépend de MeCP2. Cette boucle répressive de 11Kb, reliant l'intron de *Dlx6* à la zone promotrice *Dlx5* est associée à la désacétylation et à la méthylation de la lysine 9 des histones H3. Toutefois, l'implication de MeCP2 dans la répression transcriptionnelle de ces gènes a été remise en question par *Schule et al.* En effet, ces auteurs ont été dans l'incapacité de détecter une augmentation significative et reproductible de l'expression de *Dlx5* et *Dlx6* dans le cortex frontal des souris *Mecp2*^{-/-} (*Schule et al.*, 2007). Néanmoins, la liaison de MeCP2 au locus *Dlx5/Dlx6* fut indépendamment confirmée par ChIP (*Yasui et al.*, 2007). Par ailleurs, plusieurs études *in vitro*, utilisant différentes techniques : gel retard, ultracentrifugation analytique et électrophorèse sur gel d'agarose ; couplées à des observations sous microscope électronique sont venues parallèlement ou par la suite renforcer l'implication de MeCP2 dans la formation de boucle chromatinienne (*Georgel et al.*, 2003; *Nikitina et al.*, 2007a; *Nikitina et al.*, 2007b). Cette capacité s'exerce sur de l'ADN nu, préférentiellement méthylé, ainsi qu'au sein de complexes nucléosomiques assemblées *in vitro*. Des structures secondaires en formes ellipsoïdes sont ainsi observables. La superstructure de la chromatine est généralement établie par les histones associées à l'ADN internucléosomal, telles que les histones H1. Il a été démontré *in vitro* comme *in vivo*, que MeCP2, tout comme l'histone H1, est capable de se lier à l'ADN internucléosomal (*Chandler et al.*, 1999; *Ishibashi et al.*, 2008). Toutefois, cette liaison s'effectue préférentiellement avec l'ADN internucléosomal méthylé. L'interaction de MeCP2 à l'ADN internucléosomal méthylé serait ainsi à l'origine de la compaction de la chromatine en induisant des interactions nucléosomes/nucléosomes (*Chandler et al.*, 1999; *Georgel et al.*, 2003; *Nikitina et al.*, 2007a; *Nikitina et al.*, 2007b; *Ishibashi et al.*, 2008).

La capacité de MeCP2 à former de telles boucles n'est pas totalement surprenante, dans la mesure où l'homologue aviaire de MeCP2 n'est autre que la protéine ARBP (*Weitzel et al.*, 1997). Cette protéine se lie aux courtes séquences MAR (Matrix/Scaffold Attachment Regions), régulièrement réparties dans le génome, qui partagent la chromatine en domaines fonctionnels en formant des boucles et permettent son ancrage à la matrice nucléaire (*von Kries et al.*, 1991). De plus, le domaine de liaison aux séquences *MAR* de la protéine aviaire ARBP est très homologue au domaine MBD de la protéine MeCP2 de mammifères (*Heitmann et al.*, 2003). Contre toutes

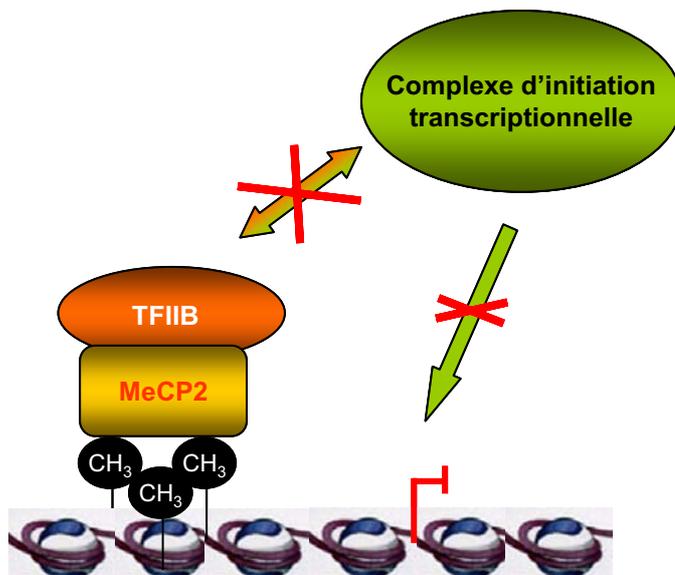


Figure 26. Séquestration de TFIIB par MeCP2.

L'association de MeCP2 avec le facteur transcriptionnel TFIIB bloquerait le recrutement du complexe de préinitiation de la transcription par ce facteur.

attentes, c'est le domaine TRD de MeCP2 murine qui a été montré comme impliqué dans la formation de macrostructures de chromatine (Georgel *et al.*, 2003). En revanche, comme nous l'avons vu dans le paragraphe précédent une interaction entre MeCP2 et ATRX a été récemment décrite (Nan *et al.*, 2007). ATRX est classée parmi les « protéines associées à la matrice » (Berube *et al.*, 2000), suggérant que son interaction avec MeCP2 pourrait avoir un rôle dans l'ancrage des boucles d'ADN à la matrice nucléaire. Lors de cette étude, il a été montré par des expériences de co-sédimentation que l'interaction entre ces deux protéines s'effectue *via* le domaine MBD de MeCP2.

L'implication de MeCP2 dans la formation de boucle chromatinienne et donc de son effet sur l'organisation de la chromatine à grande échelle reste à éclaircir. Toutefois, ce rôle semble bien exister car une recherche dans les cellules MCF7, des cibles de MeCP2, au moyen de CHIP suivies d'une hybridation sur puces à ADN (CHIP-on-chip), a montré que des séquences *MAR* sont identifiées (Koch and Stratling, 2004).

3.1.3- MECP2 PEUT INTERFERER DIRECTEMENT AVEC LA MACHINERIE TRANSCRIPTIONNELLE EN SEQUESTANT TFIIB

Dans le but d'identifier les partenaires potentiels de MeCP2 dans la répression transcriptionnelle indépendante de tous remodelages chromatinien, l'équipe du Dr Wolffe a utilisé un système de transcription *in vitro* dépourvu de composants chromatinien (Kaludov and Wolffe, 2000). Cette étude mettant en présence des plasmides d'ADN nu, MeCP2 et les composants de la machinerie de transcription purifiés a montré que MeCP2, se lie et inhibe spécifiquement la transcription des vecteurs méthylés. Par ailleurs, des expériences de co-sédimentation ont montré que MeCP2 interagit *via* son domaine TRD au facteur de transcription TFIIB (Transcriptional Factor II B). MeCP2 est ainsi capable d'interférer *in vitro* avec la formation, ou le bon fonctionnement, du complexe de pré-initiation de la transcription au niveau d'ADN méthylé (**Figure 26**). L'addition exogène de TFIIB ne permet pas de lever la répression transcriptionnelle initiée par MeCP2. Par ailleurs, en présence d'extrait nucléaire de cellules HeLa, pouvant contenir des enzymes de remodelage de la chromatine, un traitement à la TSA n'induit pas la réexpression des vecteurs méthylés éteints par MeCP2.

Dès lors, MeCP2, par l'intermédiaire de son domaine TRD, est capable de séquestrer le facteur TFIIB, compromettant ainsi la formation du complexe de pré-initiation de la transcription (Kaludov

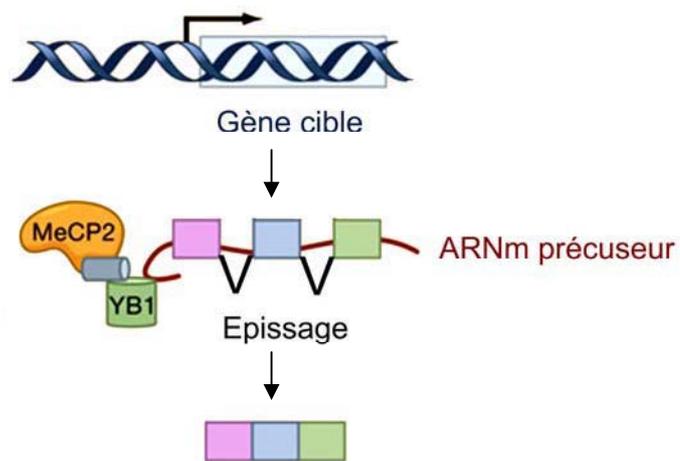


Figure 27. MeCP2 interagit avec YB-1 et régule l'épissage alternatif des transcrits cibles (adaptée de Chahrour et Zoghbi, 2007 (Chahrour and Zoghbi, 2007)).

et al., 2000). En outre, ces observations suggèrent l'existence d'une voie de répression MeCP2 dépendante sans modification de la chromatine ou du moins sans modification de l'état d'acétylation des histones. Cette répression ne passerait pas par une voie HDAC-indépendante. Néanmoins, la confirmation de l'existence d'un tel mécanisme *in vivo* n'est pas encore établie.

3.1.4- INTERVENTION DE MECP2 DANS L'ÉPISSAGE ALTERNATIF

Des expériences de co-immunoprécipitation ont pu mettre à jour l'interaction de MeCP2 avec Y-box-binding protein 1 (YB-1), interaction nécessitant la présence d'ARN. YB-1, qui appartient à la famille multifonctionnelle des protéines de liaison aux ADN/ARN, prend part à la régulation de l'épissage alternatif des ARN messagers. Il agit aussi comme facteur de transcription en se liant aux boîtes Y des promoteurs de gènes cibles et participe à la réparation et à la réplication de l'ADN. La signification fonctionnelle de cette association a été testée dans un modèle de mini gènes rapporteurs, cibles de YB-1, possédant plusieurs sites d'épissage. Le complexe MeCP2/YB-1 est capable de prendre en charge l'ARN précurseur transcrit du gène rapporteur et d'en orienter l'épissage alternatif *in vitro* mais également *in vivo* (**Figure 27**). La description de profils d'épissage alternatif aberrants dans le cortex cérébral de souris *Mecp2308/y*, notamment pour *Dlx5* ou pour la sous-unité 1 du récepteur au NMDA (NR1), semble valider la relevance *in vivo* d'une telle interaction (Young *et al.*, 2005).

La régulation par MeCP2 des mécanismes de transcription et d'épissage pourrait être coordonnée pour assurer à la fois le contrôle quantitatif et qualitatif de l'expression des gènes cibles. Ainsi, la réactivation d'un promoteur cible libérerait MeCP2 et la rendrait disponible pour le contrôle de l'épissage du transcrit néosynthétisé.

3.1.5- CONCLUSION : MECP2 UN REPRESSEUR TRANSCRIPTIONNEL MAIS AUSSI UNE PROTEINE NUCLEAIRE ARCHITECTURALE

MeCP2 fut la première protéine à MBD caractérisée pour son rôle dans la répression transcriptionnelle. Elle est aussi celle dont les mécanismes de répression sont les plus étudiés et donc les plus connus. Elle interviendrait aussi bien dans la répression transcriptionnelle à petite échelle, de gènes spécifiques, que dans une répression transcriptionnelle à large échelle *via* la mise en place de compartimentation du génome (**Figure 28**). MeCP2 peut donc être vu non seulement comme un répresseur transcriptionnel mais aussi comme une protéine nucléaire architecturale.

Répresseur méthylation-dépendant « type »

Rôles émergents de MeCP2

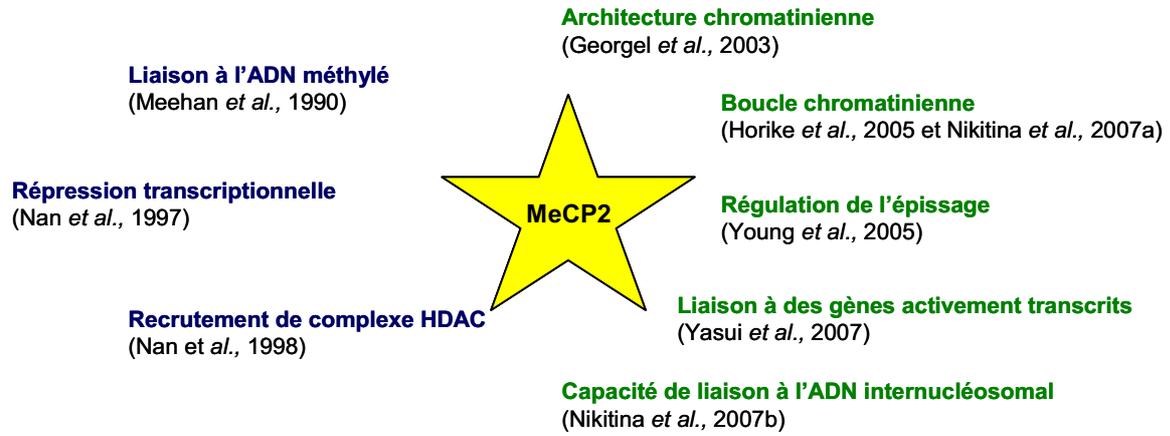


Figure 28. Représentation chronologique des fonctions connues de MeCP2 (adaptée de Hite *et al.*, 2009 (Hite *et al.*, 2009)).

Toutefois, un nombre limité de gènes régulés par MeCP2 a été à ce jour identifié. De plus, l'analyse des changements d'expression entre un tissu murin de cerveau normal et un tissu murin de cerveau *Mecp2^{-/-}* ne montre pas de changement massif d'expression génique (Tudor *et al.*, 2002). En outre, la carte de liaison de MeCP2 dans des neurones a montré que 63% des sites MeCP2 sont des promoteurs de gènes actifs (Yasui *et al.*, 2007) (**Figure 28**). MeCP2 fut donc initialement décrite comme un répresseur transcriptionnel mais certaines données récentes la décrivent plutôt comme un activateur. MeCP2 aurait-elle donc ces deux activités antagonistes ?

3.2- MBD2 INITIE UNE REPRESSION TRANSCRIPTIONNELLE MAJORITAIREMENT HDAC-DEPENDANTE

L'implication potentielle de MBD2 dans la répression transcriptionnelle des gènes méthylés a été étudiée dès son identification (Ng *et al.*, 1999). A ce jour, plusieurs études, dont trois de notre équipe, ont démontré l'association de MBD2 à de nombreux promoteurs méthylés et son implication directe dans leur répression transcriptionnelle (Bakker *et al.*, 2002; Lin and Nelson, 2003; Auriol *et al.*, 2005; Lopez-Serra *et al.*, 2008). De plus, une approche globale réalisée par l'équipe du Dr Esteller en collaboration avec notre équipe, a montré que MBD2 serait de loin le répresseur méthylation-dépendant réprimant le plus grand nombre de gènes (~ 900 gènes sur 967) dans les cancers (Lopez-Serra *et al.*, 2008).

Les mécanismes par lesquels MBD2 est capable de réprimer la transcription semblent principalement dépendants des voies HDAC. En effet, seules des interactions entre MBD2 et des complexes HDAC ou des co-répresseurs membres de ces complexes ont été rapportés.

3.2.1- MBD2 ET MBD3 COOPERE AU SEIN DU COMPLEXE MECP1

L'activité répressive de MBD2 a été démontrée *in vitro* par des systèmes GAL4 similaires à ceux utilisés lors de la caractérisation du rôle de MeCP2 (Ng *et al.*, 1999). Par ailleurs, la neutralisation des capacités répressives de MBD2 par la TSA, agent inhibiteur des HDAC, a permis de suggérer un rôle important de la désacétylation des histones dans la répression transcriptionnelle engendrée par cette protéine (Ng *et al.*, 1999).

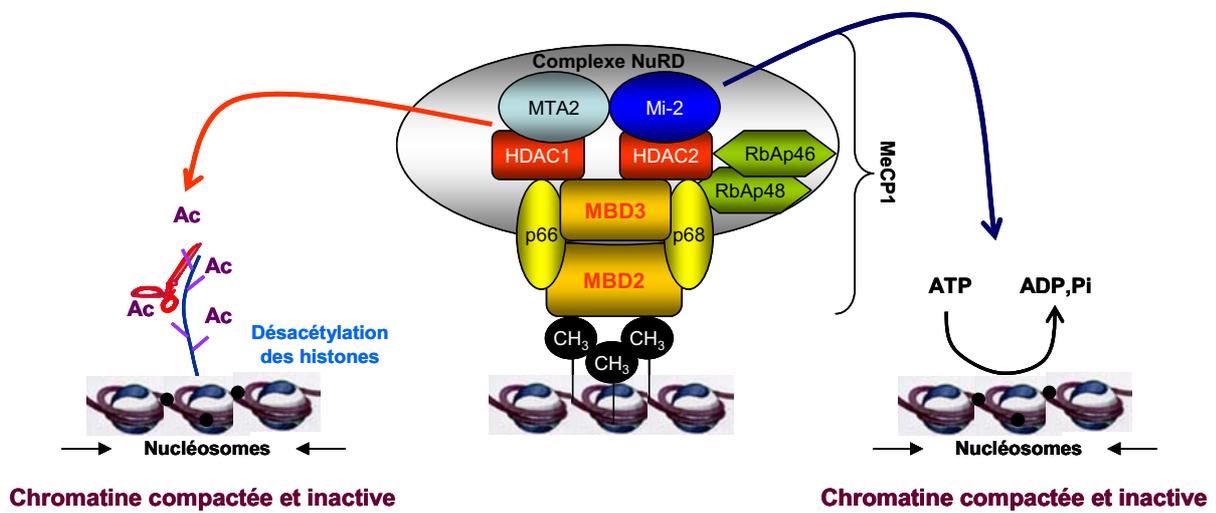


Figure 29. Recrutement du complexe MeCP1 par MBD2 au niveau de portions d'ADN.

La formation du complexe MeCP1 au niveau de régions méthylées conduit à la désacétylation des histones, grâce aux HDAC du complexe NuRD, ainsi qu'au remodelage ATP-dépendant de la chromatine, grâce à Mi2.

MBD2 a tout d'abord été identifiée comme appartenant au complexe nommé MeCP1 (Ng *et al.*, 1999) (**Figure 29**). Ce complexe, découvert 10 ans plus tôt, a été le premier complexe caractérisé pour ses propriétés de fixation à l'ADN méthylé et d'induction de la répression transcriptionnelle (Meehan *et al.*, 1989;Antequera *et al.*, 1990;Boyes and Bird, 1991;Boyes and Bird, 1992). L'utilisation d'anticorps anti-MBD2 très spécifiques lors d'expériences d'immunoprécipitation sur des extraits nucléaires de cellules HeLa a permis d'identifier les membres associés à MBD2 au sein du complexe MeCP1. Parmi les constituants ont été retrouvées non seulement des protéines affines pour les histones, RbAp46 et RbAp48 mais aussi les histones désacétylases, HDAC1 et HDAC2 (Ng *et al.*, 1999).

Parallèlement, il a été mis en évidence que MBD2 est capable de s'associer au complexe de désacétylation des histones NuRD (Zhang *et al.*, 1999;Wade *et al.*, 1999) et de le recruter au niveau d'ADN méthylé (Zhang *et al.*, 1999;Wade *et al.*, 1999) (**Figure 29**). Le complexe HDAC NuRD, caractérisé chez le xénope et dans les cellules HeLa, est composé de sept membres : les histones désacétylases HDAC1 et HDAC2 ; les protéines RbAp46 et RbAp48 affines pour les histones ; l'ATPase Mi-2 impliquée dans le remodelage de la chromatine ; MTA2 (Metastasis associated 1 family, member 2), qui permet la formation du complexe enzymatiquement actif ; et la protéine à MBD, MBD3 (Zhang *et al.*, 1999;Wade *et al.*, 1999). Cette dernière a la capacité de s'associer aussi bien à MBD2a qu'à MBD2b comme l'ont montré des expériences de double hybride chez la levure. Cette interaction implique le domaine MBD et le domaine d'interactions protéiques carboxy-terminaux « coiled-coil » des deux protéines (Tatematsu *et al.*, 2000). Ainsi, l'interaction de MBD2 au complexe NuRD est permise *via* la protéine MBD3.

Finalement, des analyses par western blot et gel retard d'extraits de cellules HeLa, ont révélé que le complexe MeCP1 n'est autre que le complexe NuRD associé à la protéine MBD2 ainsi qu'à deux autres protéines p66 et p68 (Feng et Zhang, 2001) (**Figure 29**). Les deux protéines p66 et p68 sont deux isoformes d'une protéine en doigt de zinc qui favoriseraient l'interaction de MBD2 avec le complexe NuRD (Feng and Zhang, 2001;Brackertz *et al.*, 2002).

En définitive, la protéine MBD2, possédant un domaine MBD fonctionnel et la capacité de se lier à MBD3, permettrait le recrutement du complexe HDAC NuRD au niveau de régions méthylées. La formation du complexe MeCP1 conduirait alors à la désacétylation des histones *via* HDAC1 et HDAC2 et au remodelage ATP-dépendant de la chromatine *via* Mi-2, induisant ainsi l'inactivation transcriptionnelle des gènes ciblés.

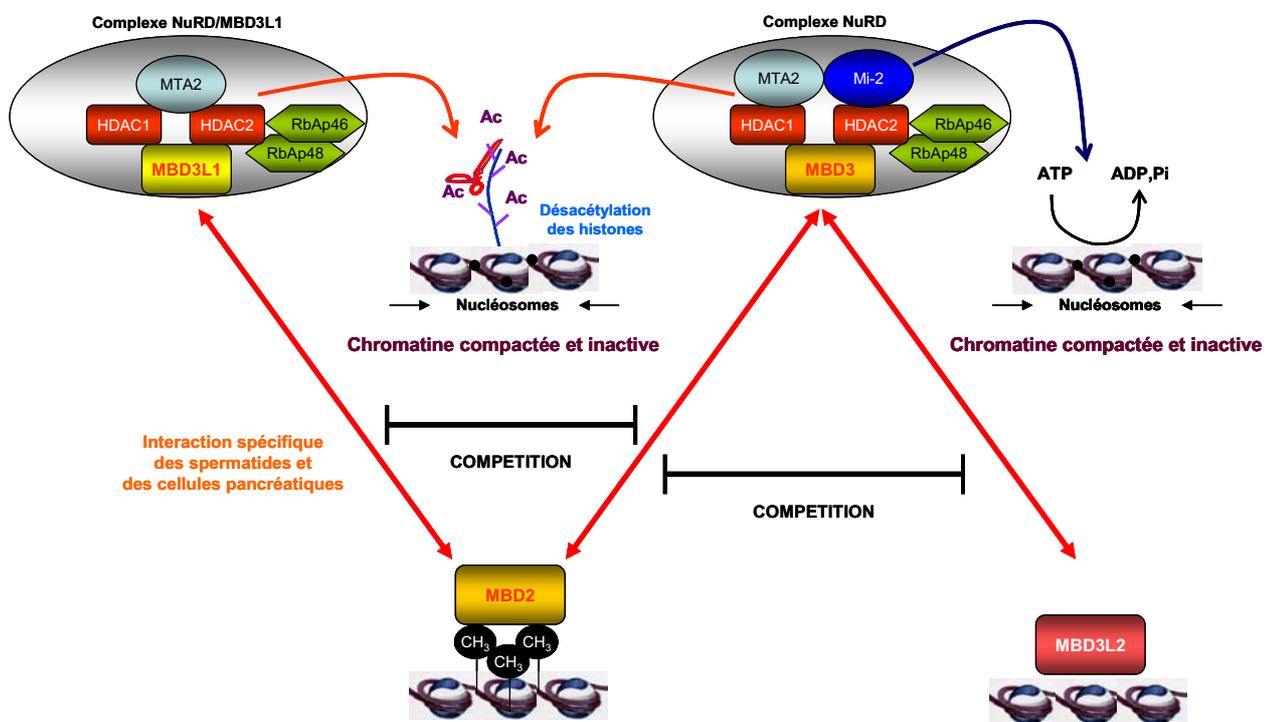


Figure 30. Compétition entre MBD3L1 et MBD3 pour l'association à MBD2 et compétition entre MBD2 et MBD3L2 pour le recrutement du complexe NuRD.

Dans les spermatides et les cellules pancréatiques, MBD2 peut alternativement interagir avec MBD3L1 au sein d'un complexe HDAC distinct du complexe NuRD, pour désacétyler les histones présentes sur les régions méthylées du génome. De plus, MBD3 au sein du complexe NuRD semble à la fois capable d'interagir avec MBD2, spécifique des séquences méthylées, ainsi qu'avec MBD3L2, qui se fixe à l'ADN non méthylé.

L'interaction entre MBD2 et le complexe NuRD semble fortement conservée. En effet, les protéines homologues dMBD2/3 et dNuRD identifiées chez *Drosophila melanogaster* sont également capables de s'associer *in vivo* (Roder, 2000). De plus, cette interaction aurait une fonction répressive.

Des variants des complexes NuRD et MeCP1 existent. En effet, deux protéines partiellement analogues à MBD2 et MBD3, MBD3L1 et MBD3L2 (MBD3 Like) ont été identifiées et caractérisées par l'équipe du Dr Pfeifer (Jiang *et al.*, 2002). Ces deux protéines ne possèdent pas de domaine MBD, mais ont un domaine « coiled-coil » similaire à MBD3 et MBD2. Ce domaine permettant à ces deux dernières d'interagir, une association entre les protéines MBD3L et MBD3 ou MBD2 a été recherchée ainsi que leur potentielle appartenance au complexe NuRD. Ainsi, il a été démontré que MBD3L1 fait partie d'un complexe NuRD ne contenant pas MBD3 et est capable de s'associer à MBD2 pour initier la répression transcriptionnelle (Jiang *et al.*, 2004) (**Figure 30**). Toutefois, il apparaît que la formation d'un tel complexe represseur MBD2/NuRD/MBD3L1 se limiterait aux spermatides et aux cellules pancréatiques car MBD3L1 est seulement exprimée dans ces deux types cellules (Jiang, 2004). Au contraire de MBD3L1, l'expression de la protéine MBD3L2 est plus ubiquitaire et cette protéine n'interagit pas avec MBD2 mais s'associe à MBD3 au sein d'un complexe du complexe NuRD. MBD3 et MBD3L2 co-localisent dans le noyau mais cette localisation est distincte de celle de MBD2 et des régions d'ADN denses en CpG méthylés. MBD3L2 n'a d'ailleurs pas d'affinité pour l'ADN méthylé *in vitro*. MBD3L2 présente également des fonctions répressives dans un système de transcription GAL4, mais atténue les capacités de répression HDAC-dépendantes de MBD2 (Jin *et al.*, 2005). Par ailleurs, l'ajout de protéines MBD3L2 entraîne une séparation du complexe MeCP1 des sondes d'ADN méthylées lors d'expériences de gel retard (Jin *et al.*, 2005). Dès lors, MBD3L2 serait un modulateur de l'activité de MBD2, entrant en compétition avec cette protéine à MBD pour dissocier le complexe MeCP1 et recruter le complexe NuRD au niveau de sites non-méthylés du génome (**Figure 30**).

3.2.2- MBD2, TOUT COMME MECP2, EST CAPABLE DE S'ASSOCIER A SIN3A

La protéine MBD2b est également capable de s'associer au répresser transcriptionnel Sin3A (**Figure 31**). Cette interaction, mise en évidence par des expériences de double hybride et de co-sédimentation, est directe et fait intervenir le domaine TRD de MBD2 (Boeke *et al.*, 2000).

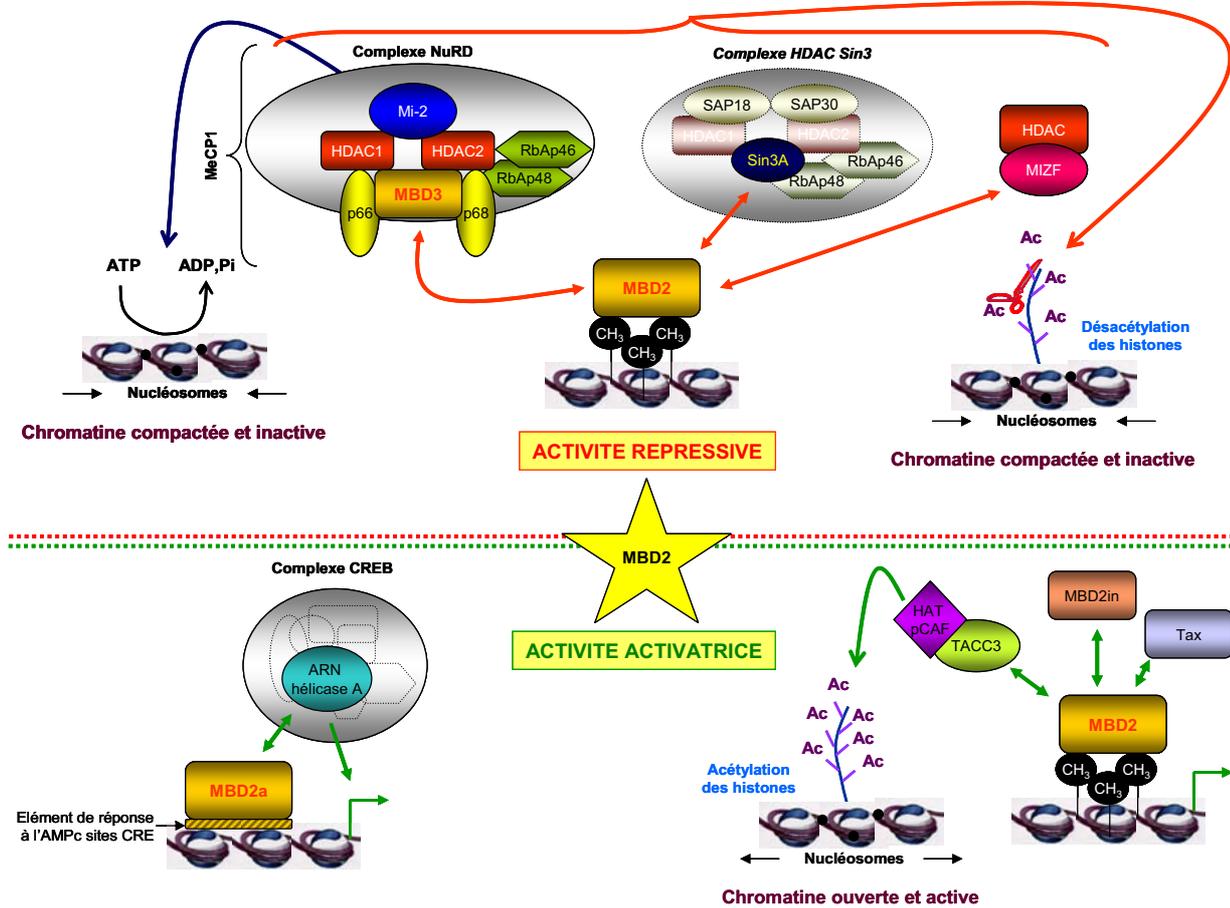


Figure 31. MBD2 régulateur de l'expression génique.

MBD2 serait aussi bien impliquée dans la répression que dans l'activation transcriptionnelle. Une fois fixée à l'ADN méthylé, MBD2, en recrutant le complexe NuRD et les co-répresseurs Sin3A et MIZF, engendre une compaction de la chromatine par désacétylation des histones et/ou par rapprochement ATPase-dépendant des nucléosomes, menant ainsi à la répression transcriptionnelle. En revanche, dans certaines situations, MBD2 en se fixant soit à l'ADN non méthylé, soit à l'ADN méthylé, pourrait également recruter des co-activateurs tels MBD2in, Tax, l'ARN hélicase A du complexe CREB ou TACC3, conduisant ainsi à l'activation transcriptionnelle (flèche verte). L'activation transcriptionnelle induit par MBD2 et TACC3 ferait intervenir une histone acétyltransférase, pCAF, et donc la décompaction de la chromatine. Les deux activités antithétiques de MBD2 semblent entrer en compétition, suggérant qu'elles doivent dépendre du contexte génomique et de la balance entre les concentrations intracellulaires relatives de ses co-activateurs et co-répresseurs.

Sin 3A étant un co-répresseur du complexe de désacétylation des histones Sin3, ces résultats suggèrent que, MBD2, tout comme MeCP2, pourrait conduire à la répression transcriptionnelle des séquences méthylées en s'associant à ce complexe HDAC (**Figure 31**).

3.2.3- INTERACTION ENTRE MBD2B ET MIZF

Un troisième partenaire co-répresseur de MBD2 a été identifié par Sekimata *et al.* en 2001: la protéine MIZF (MBD2 Interaction Zing Finger) (Sekimata *et al.*, 2001) (**Figure 31**). L'interaction entre MBD2b et MIZF a été tout d'abord caractérisée par double hybride, puis confirmée par co-sédimentation et immunoprécipitation dans des cellules rénales embryonnaires humaines. Les domaines en doigts de zinc de la protéine MIZF et une région à cheval sur le domaine TRD de MBD2b sont responsables de cette interaction. L'implication de MIZF dans la répression transcriptionnelle induite par MBD2 a été mise en évidence par des expériences de gènes rapporteurs (**Figure 31**). Les résultats montrent que la co-expression de MBD2 et MIZF augmente significativement le recrutement et l'activité HDAC. Toutefois, les mécanismes par lesquels MIZF stimule la répression transcriptionnelle HDAC-dépendante initiée par MBD2 restent à définir. En effet, il a été montré que MIZF ne possède pas de domaine prédictif de liaison aux complexes HDAC. De plus, HDAC1 n'est pas immunoprécipitée par double hybride MIZF. La protéine MIZF semble donc incapable de lier les complexes HDAC directement.

La répression transcriptionnelle engendrée par MBD2 semble donc majoritairement impliquées la désacétylation des histones. *In vivo*, le rôle de MBD2 dans le recrutement de complexe HDAC est également suggéré par la réalisation de ChIP de séquences cibles du répresseur, qui apparaissent appauvries en histones H3 et H4 acétylées (Magdinier and Wolffe, 2001; Ballestar *et al.*, 2003; Lin *et al.*, 2003).

3.2.4- FONCTIONS ANTITHETIQUES DE MBD2 DANS LA REGULATION TRANSCRIPTIONNELLE

Paradoxalement, MBD2 serait également un activateur transcriptionnel (**Figure 31**). Ce rôle a été tout d'abord expliqué par la fonction, largement contredite, de déméthylase de MBD2 (Detich *et al.*, 2002). Toutefois, l'hypothèse avancée à ce jour est que MBD2 serait capable d'activer

l'expression de gènes en recrutant des facteurs transcriptionnels différents de ceux impliqués dans ses fonctions répressives.

Ainsi l'équipe du Dr Chiariotti a montré par des systèmes de gènes rapporteurs que MBD2 a la capacité d'inhiber sa propre répression en recrutant, au niveau de séquences méthylées, la protéine GTPase MBD2in (MBD2 interacting protein) et/ou le facteur TACC3 (Transforming Acid Coiled Coil) (Lembo *et al.*, 2003;Angrisano *et al.*, 2006) (**Figure 31**). L'activation transcriptionnelle induite par les hétérodimères MBD2/MBD2in et MBD2/TACC3 s'effectue par ailleurs sans modification du profil de méthylation des promoteurs. Des expériences de co-immunoprécipitation ont toutefois montré que MBD2/TACC3 forme un complexe *in vivo* avec l'histone acétyltransférase (HAT) pCAF, suggérant que la réactivation transcriptionnelle est rendue possible par l'ouverture de la chromatine (Angrisano *et al.*, 2006). Lors de ces expériences, il a également été observé que l'association de MBD2 au complexe « activateur » d'acétylation des histones, TACC3/pCAF, et l'association de MBD2 à l'histone désacétylase « inhibitrice », HDAC2, sont mutuellement exclusives. En d'autres termes, ces résultats suggèrent que les complexes de répression et les complexes d'activation recrutés par MBD2 sont des complexes distincts.

En outre, une interaction entre le trans-activateur viral Tax et MBD2 a été rapportée (**Figure 31**). L'association de ces deux protéines au niveau de la séquence LTR (Long Terminal Repeat) méthylée du gène *HTLV-1* (Human T Leukaemia Virus Type 1) stimule l'activation transcriptionnelle initiée par Tax (Ego *et al.*, 2005).

Par ailleurs, l'isoforme longue de MBD2, MBD2a, serait également capable de lier des séquences promotrices ou cis-activatrices non-méthylées et d'activer par ce biais la transcription des gènes associés (**Figure 31**). En effet, *in vitro* la fixation de MBD2a à des éléments de réponse à l'AMPc (sites CRE) non-méthylés active la transcription des gènes associés (Fujita *et al.*, 2003a). MBD2a interagirait pour se faire avec l'ARN hélicase A du complexe CREB et non avec HDAC1.

Récemment, une étude, qui s'est intéressée à l'implication des protéines à MBD dans la régulation de l'expression des oncogènes *MAGE-A*, a aussi observé pour quatre de ces gènes le rôle activateur de MBD2a envers des promoteurs non-méthylés (Wischnewski *et al.*, 2007).

En définitive, alternativement à ses fonctions répressives, MBD2 pourrait s'associer à des facteurs transcriptionnels pour activer l'expression de gènes méthylés ou non (**Figure 31**).

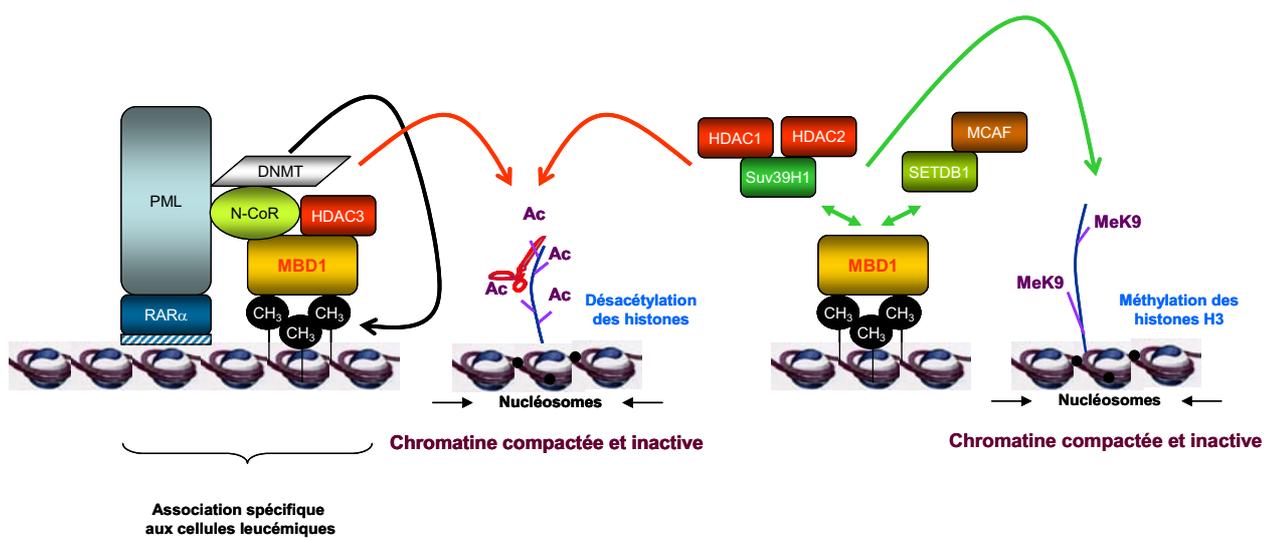


Figure 32. Répression transcriptionnelle initiée par MBD1.

L'activité de MBD2 semble alors dépendre du contexte génomique et de la balance entre les concentrations intracellulaires relatives de ses co-activateurs et co-répresseurs. MBD2 jouerait ainsi un rôle central dans la régulation génique en instaurant un équilibre dynamique entre activation et répression. Toutefois, le rôle activateur de MBD2 n'a pas été démontré *in vivo* sur des gènes endogènes. L'ensemble de ces résultats nécessite donc d'être plus amplement confirmés. De plus, les mécanismes restent à définir.

3.3- MBD1, UN REPRESSEUR TRANSCRIPTIONNEL MAJORITAIREMENT HMT-DEPENDANT

3.3.1- HDAC3, L'UNIQUE LIEN DIRECT ENTRE MBD1 ET LA REPRESSION TRANSCRIPTIONNELLE HDAC-DEPENDANTE

MBD1, initialement nommé PCM1 pour « Protein Containing MBD » 1, fut initialement décrit comme un membre du complexe répresseur MeCP1 (Cross *et al.*, 1997). Toutefois, une étude fonctionnelle plus approfondie de MBD1, utilisant des anticorps anti-MBD1 plus spécifiques, a par la suite réfuté cette donnée. En effet, au sein d'extraits nucléaires de cellules HeLa, comme il l'a été montré par chromatographie sur gel filtration, les masses moléculaires apparentes des complexes de répression associés à MBD1 et MBD2, membre du complexe MeCP1, diffèrent (Ng *et al.*, 2000). Par ailleurs, MBD1 n'a pu être directement immunoprécipitée par des sérums spécifiques de MTA2, HDAC1 et SAP30, suggérant que cette protéine n'appartient ni au complexe HDAC Mi-2/NuRD, ni au complexe Sin 3, tous deux précédemment définis (Ng *et al.*, 2000). Néanmoins, bien que l'identité du ou des complexes HDAC associés à MBD1 reste encore inconnue, la répression transcriptionnelle initiée par MBD1 fait tout de même intervenir, au moins pour certains gènes, une activité de désacétylation des histones. En effet, en système GAL4, la répression induite par MBD1 est abaissée jusqu'à 75% lors du traitement des cellules à la TSA (Ng *et al.*, 2000). De plus, la localisation nucléaire de MBD1 dans les zones hypoacétylées des chromosomes ainsi que des analyses par ChIP confirment ceci (Ng *et al.*, 2000; Ballestar *et al.*, 2003). Toutefois, à ce jour, le seul lien direct entre MBD1 et HDAC a été démontré lors d'une étude s'intéressant aux mécanismes de répression transcriptionnelle induits par la protéine de fusion PML-RAR α dans les leucémies promyélocyaires aiguës. Cette étude montre que MBD1 est bien un répresseur HDAC-dépendant et ce *via* son interaction avec HDAC3 (Villa *et al.*, 2006) (**Figure 32**). Dans ce complexe de répression le co-répresseur N-CoR et DNMT1 sont également retrouvés.

3.3.2- MBD1 ET LES HISTONES METHYLTRANSFERASES

3.3.2.1- MBD1 ET Suv39H1

La répression transcriptionnelle initiée par MBD1 opère également *via* le recrutement d'histone méthyltransférases. Cette répression HMT-dépendante est d'ailleurs à ce jour mieux connue.

Une interaction entre MBD1 et l'histone méthyltransférase, Suv39h1, a tout d'abord été rapportée (Fujita *et al.*, 2003c) (**Figure 32**). Dans cette étude, des expériences d'immunofluorescence mettent en évidence la co-localisation nucléaire entre MBD1 ; Suv39h1 ; HP1 α (Hétérochromatin Protein 1), une protéine de l'hétérochromatine se liant aux histones H3 triméthylées sur les lysines 9 (trimethylH3K9 ; les histones H3 triméthylées sur les lysines 9 ; et la méthylation de l'ADN. L'interaction directe entre MBD1 et Suv39h1 a ensuite été démontrée *in vitro* par co-sédimentation et immunoprécipitation de lysats cellulaires. Par ces expériences, les auteurs ont aussi montré que cette association s'effectue *via* le domaine MBD de MBD1. Enfin, des ChIP réalisées avec des anticorps anti-MBD1, anti-Suv39h1, anti-HP1 α et anti-ARN polymérase II confirment *in vivo* la co-localisation spécifique de MBD1, Suv39h1 et HP1 α au niveau d'une région hyperméthylée, le promoteur *p16*. Cette co-localisation excluant l'ARN polymérase II, ces données confirment l'implication de MBD1, Suv39h1 et HP1 α dans la répression de l'expression génique déjà observée lors d'expériences utilisant un système de transcription GAL4. Enfin, les résultats obtenus par co-sédimentation, immunoprécipitation et les systèmes de transcription GAL4 démontrent une amplification du pouvoir répresseur de MBD1 par Suv39h1 et une coopération entre MBD1, HMT et HDAC. En effet, l'HMT Suv39h1 permet le recrutement secondaire des enzymes HDAC1 et HDAC2 au sein d'un complexe multiprotéique incluant MBD1 (**Figure 32**).

3.3.2.2- MBD1 ET SETDB1

Une interaction entre MBD1 et une autre H3K9 méthylase, SETDB1, a par la suite été décrite (Sarraf and Stancheva, 2004; Ichimura *et al.*, 2005) (**Figure 32**). Comme le démontrent les analyses par double-hybride et co-sédimentation, cette interaction fait ici intervenir le second domaine CXXC ainsi qu'une région carboxy-terminale proche du TRD de MBD1 (Sarraf *et al.*, 2004). SETDB1 semble, par ailleurs, être le principal co-répresseur impliqué dans la répression transcriptionnelle HMT-dépendante initiée par MBD1. En effet, les complexes MBD1, immunoprécipités à partir de cellules HeLa n'exprimant plus SETDB1, ne sont plus capables de méthyler *in vitro* les histones H3 (Sarraf *et al.*, 2004).

La participation du complexe MBD1/SETDB1 dans la répression transcriptionnelle fut prouvée par des expériences GAL4 (Ichimura *et al.*, 2005), mais aussi lors de l'étude de l'inhibition transcriptionnelle du gène endogène *p53BP2* hyperméthylé et cible de MBD1 dans les cellules HeLa (Sarraf *et al.*, 2004). Cette dernière étude montre, en outre, qu'un traitement à la TSA ne permet pas de lever les capacités répressives de MBD1/SETDB1 vis-à-vis du promoteur *p53BP2* (Sarraf *et al.*, 2004). Ce résultat suggère que, contrairement aux voies d'inactivation mettant en jeu MBD1/Suv39h1, les complexes potentiellement recrutés par MBD1/SETDB1 ne sont pas associés à des histones désacétylases.

L'équipe de Dr Nakao, qui a mis en évidence l'interaction entre MBD1 et Suv39h1, a décrit la même année une coopération entre MBD1 et son cofacteur chromatinien, MCAF (« MBD1-Containing Chromatin Associated Factor) lors de la répression transcriptionnelle et la formation de l'hétérochromatine (Fujita *et al.*, 2003b). Chez l'Homme, MCAF est connu pour faciliter la conversion des diméthylH3K9 en triméthylH3K9 par l'HMT SETDB1, aussi bien *in vitro* qu'*in vivo* (Wang *et al.*, 2003). Ainsi, par ce biais, MCAF stimulerait la triméthylation des histones H3 initiée par SETDB1 et la subséquente répression transcriptionnelle MBD1/SETDB1-dépendante (Ichimura *et al.*, 2005) (**Figure 32**).

L'interaction entre MBD1 et SETDB1 a par ailleurs un rôle crucial au cours de la phase de réplication de l'ADN. En effet, il a été montré que la migration de la fourche de réplication déstabilise l'interaction de MBD1 à l'ADN méthylé pour induire l'assemblage d'un complexe transitoire spécifique de la phase S entre MBD1/SETDB1 et la principale sous-unité p150 du complexe d'assemblage de la chromatine CAF-1 (Reese *et al.*, 2003; Sarraf *et al.*, 2004). Le recrutement de SETDB1 dépendant de MBD1 au niveau de la machinerie d'assemblage de la chromatine post-réplivative permettrait ainsi le maintien de la méthylation H3K9 en phase avec la méthylation de l'ADN lors de la réplication (Sarraf et Stancheva, 2004). Le rôle de MBD1 dans l'héritabilité des modifications épigénétiques dans les cellules somatiques sera discuté par la suite.

En définitive, MBD1 agit comme répresseur transcriptionnel *via* la coopération des domaines MBD, cystéines riches CXXC et de son domaine C-terminal TRD avec différents HMT, HDAC et facteurs chromatinien.

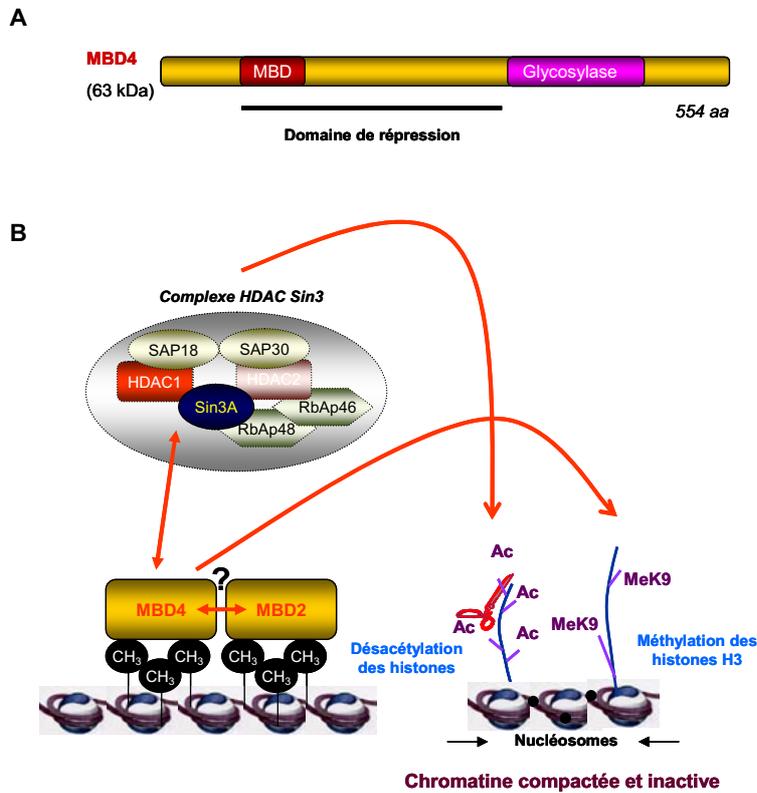


Figure 33. Répression transcriptionnelle initiée par MBD4.

(A) Identification du domaine de répression transcriptionnelle de MBD4 du résidu 76 au résidu 454. Ce domaine inclus le domaine MBD mais exclut le domaine glycosylase. (B) Mécanismes de répression transcriptionnelle initiée par MBD4. Ces derniers sont très peu connus. Toutefois, il semblerait que MBD4 coopère avec MBD2 pour initier la répression. Une interaction entre MBD4, Sin3 et HDAC1 a été mise en évidence. De plus, MBD4 co-localise avec des marques de chromatine inactive, telle, la désacétylation des histones H3 et H4 et la méthylation des histones H3.

3.4- QUELQUES DONNEES SUR MBD4

Très peu de données existent à ce jour sur l'implication de la protéine MBD4 dans la répression transcriptionnelle. En effet, MBD4 est essentiellement connue et considérée comme une thymidine ADN glycosylase impliquée dans la réparation de l'ADN (cette fonction de MBD4 sera abordée dans le paragraphe 4.3.1). Toutefois, en 2005, Kondo *et al.* ont démontré, pour la première fois, la capacité de MBD4 à réprimer spécifiquement la transcription de gènes méthylés (Kondo *et al.*, 2005). Aucun domaine TRD n'a été cependant mis en évidence au sein de la protéine MBD4. Néanmoins, des expériences de délétions couplées à un système de transcription LexA, dont le principe est identique au système GAL4 précédemment évoqué, ont permis de démontrer que l'activité répressive de MBD4 s'exerce par l'intermédiaire de son domaine central (du résidu 76 au résidu 454) (**Figure 33A**). Ce domaine inclut le domaine MBD mais exclut le domaine catalytique glycosylase C-terminal. La fonction de MBD4 en tant que répresseur transcriptionnel semble être HDAC-dépendante. En effet, le traitement par la TSA des cellules transfectées par le système LexA lève la répression transcriptionnelle initiée par MBD4. De plus, des expériences de co-immunoprécipitation, de co-localisation et de co-sédimentation ont montré que MBD4 est capable de former un complexe avec Sin3A et HDAC1 *via* sa région centrale (**Figure 33B**). Enfin, des expériences *in vivo* de CHIP ont mis en évidence une fixation de MBD4 aux promoteurs *p16^{INK4a}* et *hMLH1*. Cette liaison est uniquement et spécifiquement observée dans des lignées cellulaires humaines où les promoteurs de ces gènes sont hyperméthylés et associés à des histones H3 et H4 désacétylées et des histones H3 diméthylées sur leur lysine 9. Cependant, l'utilisation d'ARN interférents dirigés contre l'ARNm *MBD4* permet de diminuer de façon significative l'expression de MBD4 dans différentes lignées cellulaires mais n'induit pas la réactivation des gènes *p16^{INK4a}* et *hMLH1* éteints. L'inhibition seule de MBD4 n'est donc pas suffisante à la réexpression de ces gènes. Ces données peuvent s'expliquer par le fait qu'il a été aussi démontré dans cette étude, ainsi que par d'autres auteurs, que MBD2 est également liée aux promoteurs *p16^{INK4a}* et *hMLH1* méthylés (Magdinier *et al.*, 2001; Majumder *et al.*, 2006). Il y aurait donc peut être une certaine redondance entre ces deux protéines, ou comme l'a suggéré Bachman *et al.*, les modifications des histones à elles seules seraient capables de maintenir la répression transcriptionnelle (Bachman *et al.*, 2003).

Une publication plus récente a également démontré l'association de MBD4 à un promoteur méthylé, celui du gène codant la métallothionéine-1 (MT-1) et son implication dans l'inactivation de l'expression de ce gène (Majumder *et al.*, 2006). La répression transcriptionnelle de gène *MT-1*

semble également être HDAC-dépendante puisqu'un traitement à la TSA permet sa réaction. Par ailleurs, le promoteur *MT-1* méthylé est aussi associé à des histones H3 méthylées sur leur lysine 9 et à MBD2.

En définitive, ces deux études démontrent que MBD4 joue non seulement un rôle dans la réparation de l'ADN mais également dans la répression transcriptionnelle méthylation-dépendante de certains gènes. L'intervention de MBD4 dans la répression transcriptionnelle ne semble pas totalement surprenante si l'on considère (i) son appartenance à la famille des protéines à MBD, qui possèdent toutes une activité répressive ; (ii) que plusieurs ADN glycosylases : TDG (Um *et al.*, 1998; Missero *et al.*, 2001), méthylpurine ADN glycosylase (Watanabe *et al.*, 2003; Likhite *et al.*, 2004) et DEMETER ADN glycosylase chez *Arabidopsis thaliana* (Choi *et al.*, 2002), ont également été impliquées dans la régulation transcriptionnelle *via* leur interactions physiques avec des facteurs de transcription qui modulent l'expression génique. Par ailleurs, il est intéressant de noter que les promoteurs, *p16^{INK4a}*, *hMLH1* et *MT-1*, spécifiquement associés à MBD4 sont aussi fixés par MBD2. Dans les cellules murines, MBD4 et MBD2 co-localisent au niveau de l'ADN satellites hautement méthylés (Hendrich *et al.*, 1998; Bachman *et al.*, 2003). L'ensemble de ces résultats suggère que MBD4 et MBD2 pourraient coopérer pour réprimer l'expression génique (**Figure 33B**). Une étude viendrait, par ailleurs, appuyer cette hypothèse. En effet, un criblage double hybride chez la levure a montré que MBD4 interagit avec la protéine RFP (Rett Finger Protein) (Fukushige *et al.*, 2006). Cette protéine est connue pour son implication dans la répression transcriptionnelle *via* son interaction avec ECP1 (Enhancer of Polycomb 1) (Shimono *et al.*, 2000) et CDH4 (Shimono *et al.*, 2003). CDH4 est un membre du complexe Mi2/NurD, qui contient également MBD3 et qui est connu comme pouvant être recruté par MBD2. Un réseau entre les différents répresseurs à MBD pourrait ainsi être envisagé. FRP est également capable de s'associer à MBD2 (Fukushige *et al.*, 2006). L'interaction de RFP à MBD4 et MBD2 permettrait l'augmentation de leur activité répressive mais ne serait pas indispensable à l'établissement de la répression initiée par ces deux protéines (Fukushige *et al.*, 2006).

3.5- REGULATION DE L'INHIBITION TRANSCRIPTIONNELLE MBD-DEPENDANTE PAR DES MODIFICATIONS POST-TRADUCTIONNELLES DES MBD

Très peu d'études se sont penchées à ce jour sur les mécanismes permettant la régulation de la répression transcriptionnelle initiée par les protéines à MBD. De telles régulations apparaissent

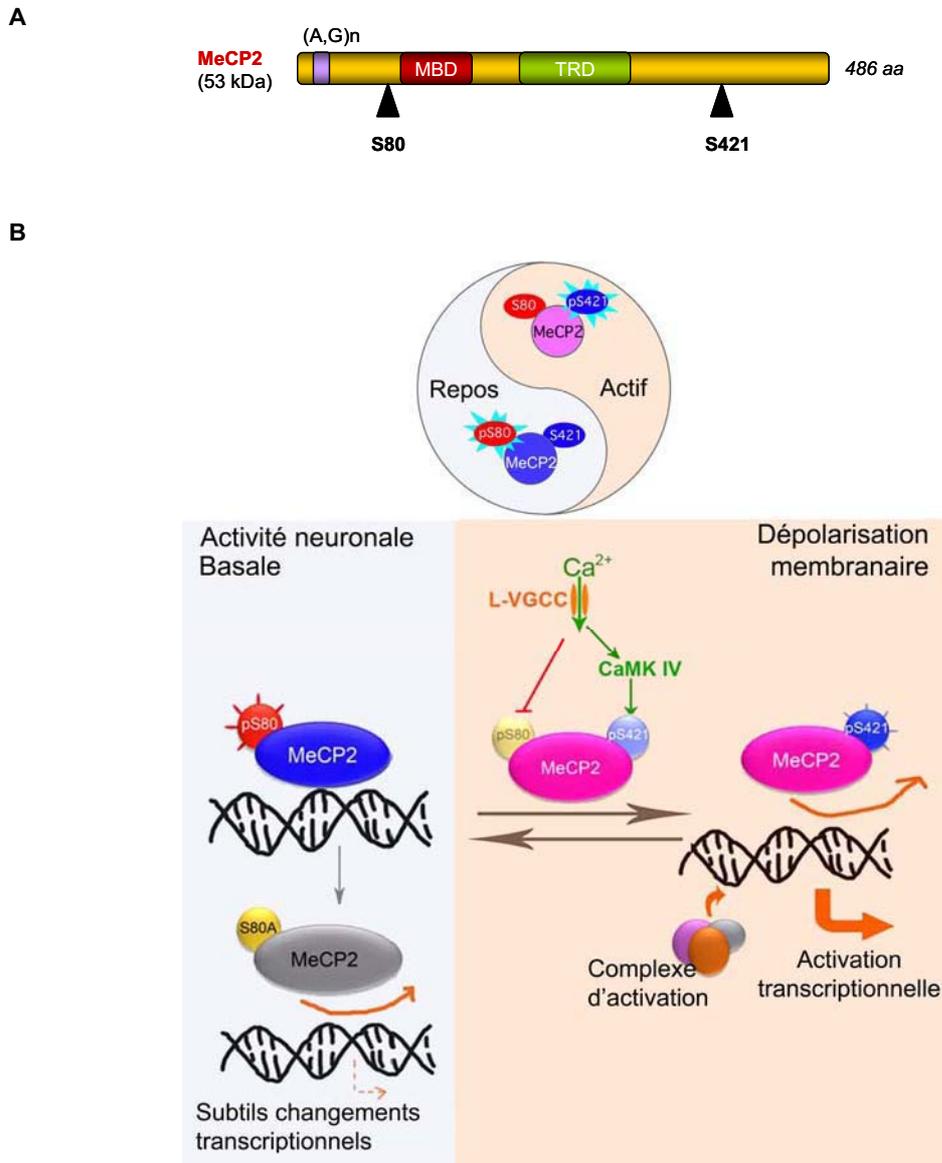


Figure 34. Modèle de régulation de l'activité de MeCP2 par phosphorylation/déphosphorylation dans les neurones (adaptée de Tao *et al.*, 2009 et Chao et Zoghbi, 2009 (Tao *et al.*, 2009;Chao and Zoghbi, 2009)).

(A) Localisation des deux sites de phosphorylation les mieux caractérisés, sérine 80 (S80) et sérine 421 (S421). (B) Schéma représentant les événements de phosphorylation/déphosphorylation de MeCP2 spécifiques au cerveau. Lorsque les neurones sont au repos, MeCP2 est principalement phosphorylée sur sa sérine 80. Cette phosphorylation de MeCP2, lui permet de se fixer et de réprimer ses gènes cibles dont *Rad3*, *Vamp3*, *Igsf4b* et *BDNF*. Lors de la dépolarisation membranaire, le niveau de phosphorylation de S80 diminue fortement alors que celui de S421 augmente. La déphosphorylation de S80 associée à la phosphorylation de la S421 conduit au détachement de MeCP2 de la chromatine permettant l'activation transcriptionnelle des gènes cibles de MeCP2.

portant être importantes en particuliers au cours du développement et de la différenciation cellulaire quand les profils de méthylation de l'ADN et d'expression génique subissent de gros changements.

Potentiellement, les modifications post-traductionnelles des protéines à MBD pourraient modifier l'affinité du domaine MBD à l'ADN méthylé et/ou affecter l'assemblage des protéines à MBD à leurs complexes de répression. C'est ce que quelques études ont récemment décrit.

3.5.1- REGULATION DE L'ACTIVITE DE MeCP2 PAR PHOSPHORYLATION

Plusieurs travaux conduits entre 2003 et 2009 ont montré qu'en réponse à l'activité neuronale, MeCP2 subit des modifications post-traductionnelles de phosphorylation/déphosphorylation à différents sites (Martinowich *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2003; Zhou *et al.*, 2006; Tao *et al.*, 2009). Deux sites de phosphorylation sont particulièrement bien caractérisés : la sérine 80 (S80) du domaine MBD et la sérine 421 (S421) de la région C-terminale (Zhou *et al.*, 2006; Tao *et al.*, 2009) (**Figure 34A**). Par ces événements de phosphorylation/déphosphorylation spécifiques au cerveau, l'activité neuronale régulerait de façon dynamique la liaison de MeCP2 à l'ADN et ainsi son implication et dans la régulation transcriptionnelle de gènes cibles.

Lorsque les neurones sont au repos, MeCP2 est principalement phosphorylée au niveau de S80 (**Figure 34B**). La phosphorylation de la S80 favorise la liaison de MeCP2 au niveau de certains promoteurs (*Rad3d*, *Vamp3* et *Igsf4b*) (Tao *et al.*, 2009). La mutation ponctuelle de ce site *in vivo* diminue cette association sans pour autant affecter la localisation hétérochromatinienne de MeCP2. De subtils changements transcriptionnels d'un nombre limité de gènes sont donc uniquement observés. Ces données suggèrent que l'état de phosphorylation de ce site régule l'association de MeCP2 à la région 5' de certains gènes cibles et donc leur expression (Tao *et al.*, 2009). De plus, les souris mutées au niveau de cette S80 ont un déficit locomoteur suggérant que les gènes cibles régulés par cette phosphorylation jouent un rôle dans ce phénotype comportemental.

Dans le cerveau de modèles de souris épileptiques ou dans les neurones en culture soumis à une dépolarisation membranaire, le niveau de phosphorylation de S80 diminue fortement alors que celui de S421 augmente (Tao *et al.*, 2009) (**Figure 34B**). La phosphorylation de la S421 suite à l'activation neuronale conduit, quant à elle, au détachement de MeCP2 de la chromatine permettant l'activation transcriptionnelle (Zhou *et al.*, 2006). Cette phosphorylation est assurée par l'activation de la kinase dépendant du complexe CaMKIV (Calcium/Calmodulin-dépendant kinase IV) suite à l'influx calcique. Une mutation de ce site bloque la capacité de MeCP2 à contrôler la croissance

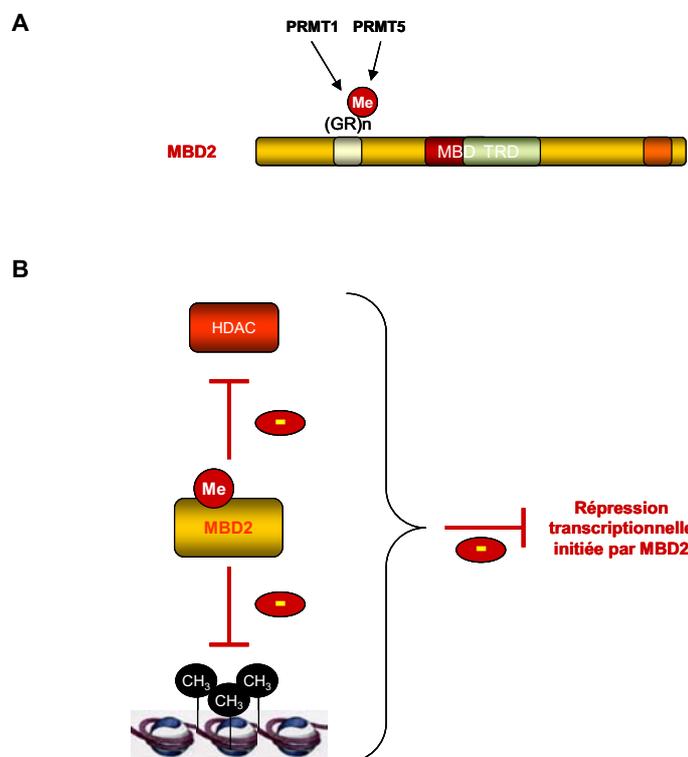


Figure 35. Régulation de l'activité répressive de MBD2 par la méthylation de ses arginines.

(A) Schéma montrant la méthylation des arginines (R) de MBD2 par les arginines méthyltransférases PRMT1 et PRMT5. (B) La méthylation des résidus arginines de MBD2 par PRMT1 et PRMT5 inhibe l'interaction de MBD2 avec le HDAC et l'ADN méthylé et dès lors sa fonction répression.

dendritique, la maturation des épines dendritiques et la transcription du gène « *Brain Derived Neurotrophic Factor* » (*Bdnf*) (Zhou *et al.*, 2006). Le gène *BDNF* code une protéine essentielle à la survie et à la croissance de certains types de neurones (Martinowich *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2003). Considérant le rôle de BDNF, la régulation de son expression par MeCP2 a fait l'objet de nombreuses études. Des expériences de ChIP ont montré que lorsque les neurones sont au repos, MeCP2, en complexe avec ses partenaires Sin3A et HDAC1, se fixe spécifiquement au promoteur III méthylé de ce gène et bloque ainsi son expression. Une dépolarisation membranaire, responsable de l'activation de CaMKII et de la subséquente phosphorylation de MeCP2 sur la S421, entraîne le détachement de MeCP2, HDAC1 et Sin3A au promoteur *BDNF*, favorisant la re-acétylation de H3 et *in fine* la transcription du gène *Bdnf* (Martinowich *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2003).

3.5.2- MBD2 ET LA METHYLATION DE SES ARGININES

L'activité répressive de MBD2 semble également être régulée par la modification post-traductionnelle de cette protéine. En effet, MBD2 présente en son domaine N-terminal des motifs RG répétés. Les résidus arginines de tels motifs sont fréquemment les cibles d'une méthylation post-traductionnelle. Tan et Nakielny ont ainsi démontré que MBD2 pouvait être post-traductionnellement méthylée *in vitro* comme *in vivo* par les arginine méthyltransférases, PRMT1 et PRMT5 (Protein Arginine (R) MethylTransferases) (Tan and Nakielny, 2006) (**Figure 35A**). Les conséquences de la méthylation de MBD2 sur ses propriétés moléculaires et fonctionnelles ont également été analysées lors de cette étude par différentes expériences : co-immunoprécipitation ; test *in vitro* de l'activité HDAC à partir de cellules humaines 293T sauvages et invalidées pour PRMT1 ou PRMT5 par interférence à l'ARN ; test *in vitro* de fixation à l'ADN méthylé ; et système de transcription GAL4 avec différents mutants de MBD2 plus ou moins délétés sur diverses régions contenant les motifs répétés RG. L'ensemble des résultats a révélé que la méthylation des résidus arginines de MBD2 inhibe son interaction avec les HDAC et l'ADN méthylé et dès lors sa fonction répressive (Tan *et al.*, 2006) (**Figure 35B**).

3.5.3- SUMOYLATION DE MBD1

La SUMOylation est une modification post-traductionnelle qui semble réguler les propriétés biochimiques des protéines cibles (trafic intracellulaire, interaction protéique, interaction ADN-protéine, activité transcriptionnelle...) *via* la liaison covalente d'une ou plusieurs protéines SUMO (Small Ubiquitin-related Modifier) aux lysines accepteuses. Par ailleurs, des preuves irréfutables

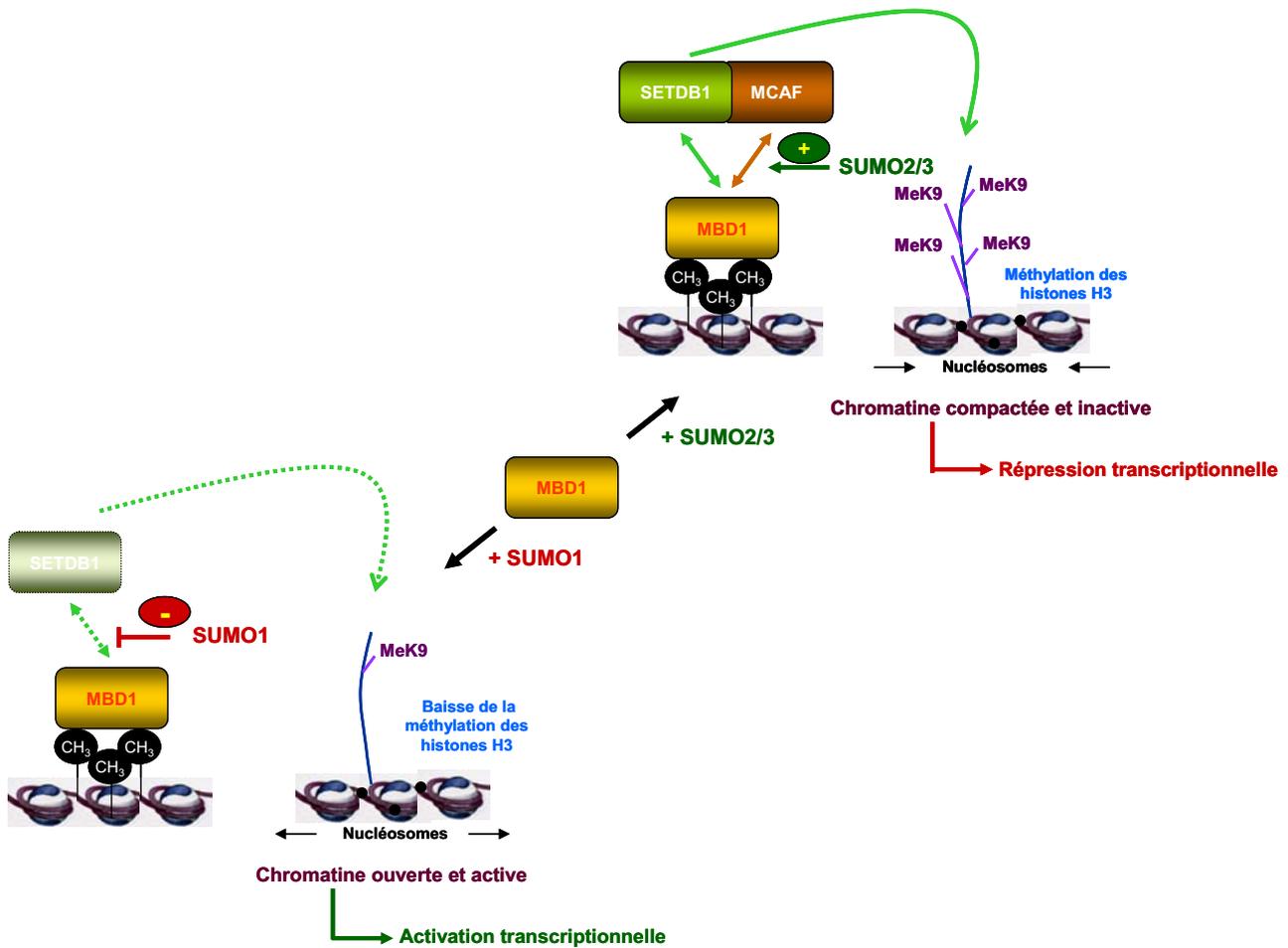


Figure 36. Effets opposés des conjugaisons de SUMO1 et SUMO2/3 à MBD1 sur son activité répressive.

SUMO1 inhibe l'activité répressive de MBD1 en inhibant sa liaison à SETDB1. Tandis que SUMO2/3 augmente l'activité répressive de MBD1 en facilitant son interaction à MCAF.

existent à ce jour sur l'implication de la SUMOylation dans la régulation de l'expression génique (Verger *et al.*, 2003; Gill, 2005).

En 2006, deux équipes indépendantes ont montré qu'une fraction non-négligeable de MBD1 est post-traductionnellement modifiée par SUMOylation dans différentes lignées cellulaires humaines (Lyst *et al.*, 2006; Uchimura *et al.*, 2006).

Dans leur étude, Uchimura *et al.* ont trouvé que la modification de MBD1 par SUMO2/3 stimule, *in vitro*, son interaction avec le co-répresseur MCAF (Uchimura *et al.*, 2006) (**Figure 36**). Ils démontrent par ailleurs que la déplétion en SUMO2/3 par interférence à l'ARN induit la délocalisation de MCAF ainsi qu'une baisse de la triméthylation H3K9 au niveau des foci d'hétérochromatine contenant MBD1. Ces résultats suggèrent alors un rôle positif de la SUMOylation dans la répression transcriptionnelle initiée par MBD1.

A l'opposé, Lyst *et al.* ont observé que la conjugaison de SUMO1 à MBD1 inhibe l'association de MBD1 à la méthyltransférase H3K9, SETDB1 (Lyst *et al.*, 2006) (**Figure 36**). La SUMOylation de MBD1 mène ainsi à la perte des marques répressives de triméthylation H3K9 au niveau du promoteur *p53BP2* cible de MBD1 et à la levée de la répression transcriptionnelle du gène associé. Il apparaît alors dans cette étude que la SUMOylation inhibe la répression transcriptionnelle MBD1-dépendante. Il est toutefois à noter que la SUMOylation de MBD1 n'empêche ni sa localisation au niveau de l'hétérochromatine, ni sa fixation au promoteur méthylé *p53BP2*, indiquant que la SUMOylation interfère avec les interactions protéiques de MBD1 et non sur son interaction à l'ADN méthylé.

L'ensemble de ces données suggère que les conjugaisons de SUMO1 et SUMO2/3 ont des effets opposés sur l'activité répressive de MBD1 et doivent servir à recruter différents partenaires protéiques. La SUMOylation apparaît ainsi être un modulateur de la répression transcriptionnelle initiée par les protéines à MBD1.

3.6- CONCLUSION : LES PROTEINES A MBD, LES CHAINONS ENTRE METHYLATION DE L'ADN, COMPACTION CHROMATINIENNE ET REPRESSION TRANSCRIPTIONNELLE

En définitive, les protéines à MBD sont impliquées dans un vaste processus de répression transcriptionnelle méthylation-dépendante mettant majoritairement en jeu de la modification la

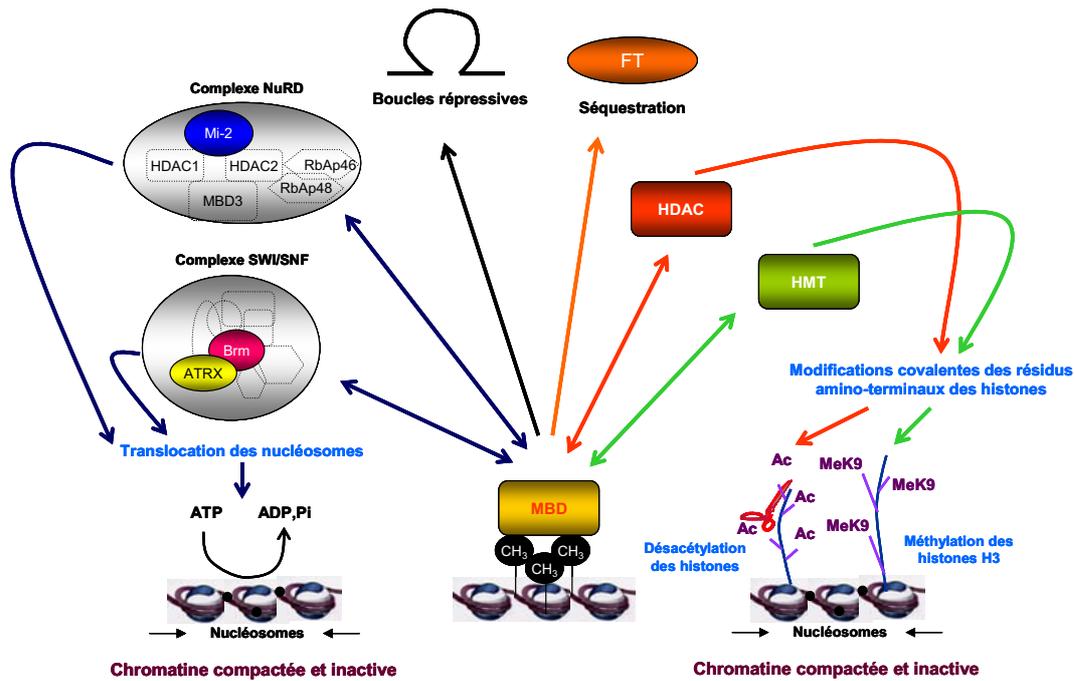


Figure 37. Bilan des mécanismes répressionnels impliquant les protéines à MBD.

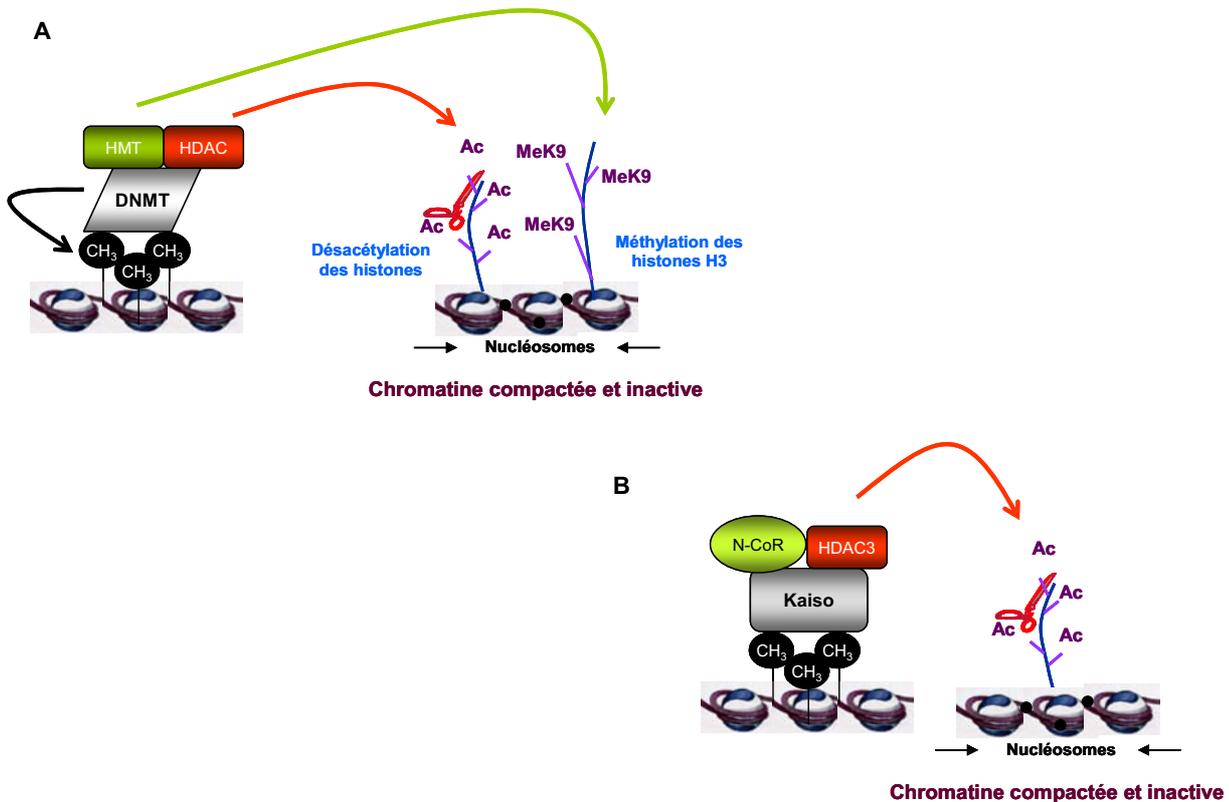


Figure 38. Répression méthylation-dépendante indépendante des protéines à MBD.

(A) En plus de leur activité ADN méthyltransférase, les enzymes DNMT sont liées aux activités HDAC et HMT. Ainsi une répression transcriptionnelle est instaurée, couplée ou non à l'ajout de groupement méthyle à l'ADN. (B) Kaiso peut se lier à l'ADN méthylé et recruter les co-répresseurs N-CoR et HDAC3 pour initier la répression transcriptionnelle.

structure chromatinienne (**Figure 37**). Par ailleurs, les modifications post-traductionnelles de ces protéines telles que la phosphorylation, la méthylation ou la SUMOylation pourraient contribuer à la régulation de leur fonction répressive, en affectant leur localisation nucléaire et/ou en activant ou inhibant la formation de complexes spécifiques.

Bien que l'implication des protéines à MBD dans la répression transcriptionnelle méthylation-dépendante semble être très importante, d'autres facteurs, également capables de reconnaître et de lier l'ADN méthylé, interviennent dans ce processus. En effet, les DNMT peuvent également réprimer la transcription d'une manière dépendante ou indépendante de leur activité ADN méthyltransférase. Des interactions entre DNMT1, DNMT3A et HDAC ou HMT (Suv39H1) ont été décrites (Robertson *et al.*, 2000a;Fuks *et al.*, 2001;Fuks *et al.*, 2003) (**Figure 38A**). Les DNMT peuvent également intervenir dans la répression dépendante des protéines à MBD, comme il l'a été décrit pour la répression induite par la protéine de fusion PML-RAR α dans les leucémies promyélocyaires aiguës faisant intervenir MBD1/N-CoR/HDAC3 et DNMT1 (Villa *et al.*, 2006). En outre, les protéines apparentées à Kaiso, comme nous l'avons vu dans le paragraphe 1.2 de ce chapitre, ont également été impliquées dans la répression transcriptionnelle méthylation-dépendante. Kaiso, tout comme MBD1, interagit avec le co-répresseur N-CoR et HDAC3 (Yoon *et al.*, 2003) (**Figure 38B**).

4- LES AUTRES FONCTIONS DES PROTEINES A MBD

4.1- LES PROTEINES A MBD ET HERITABILITE DES MODIFICATIONS EPIGENETIQUES DES CELLULES SOMATIQUES

4.1.1- INTERACTIONS SPECIFIQUES DE LA PHASE DE REPLICATION DE L'ADN ENTRE LES PROTEINES A MBD ET L'ADN METHYLTRANSFERASE DNMT1

L'hétérodimère MBD2/MBD3 et la protéine MeCP2 ont la propriété particulière de fixer l'ADN hémi-méthylé *in vitro* comme *in vivo* (Tatematsu *et al.*, 2000;Kimura *et al.*, 2003). De plus, des expériences de co-immunoprécipitation à partir de cellules humaines 293T ont montré que MBD2/MBD3 et MeCP2 forment un complexe avec l'ADN méthyltransférase DNMT1.

L'ADN hémi-méthylé étant majoritairement présent aux foyers de réplication de l'ADN, avant la méthylation du brin néosynthétisé par une DNMT, ces observations semblaient suggérer un rôle de ces protéines à MBD dans le maintien de la méthylation du génome au cours des divisions cellulaires.

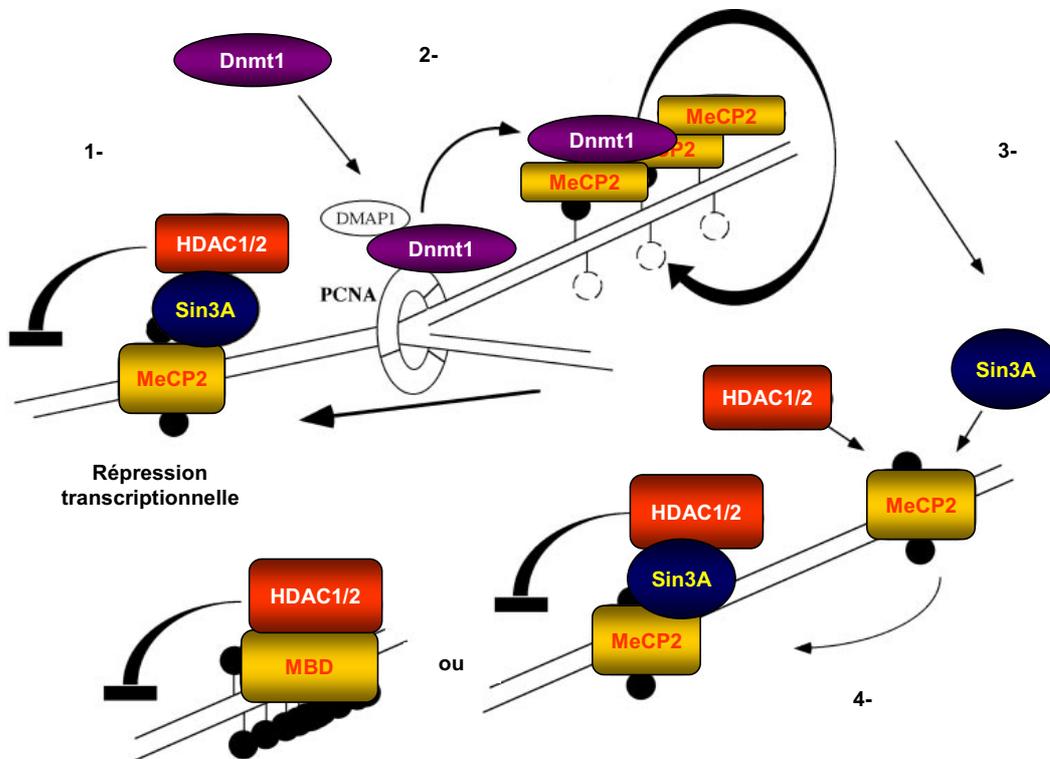


Figure 39. Représentation schématique d'un mécanisme moléculaire d'héritabilité *via* MeCP2 des modifications épigénétiques au cours de la division cellulaire de cellules somatiques (adaptée de Kimura *et al.*, 2003 (Kimura and Shiota, 2003)).

1- MeCP2/Sin3A/HDAC1/2, liés à l'ADN double brin méthylé, répriment l'expression de gènes *via* l'établissement d'un environnement chromatinien condensé. 2- Au cours de la réplication, le complexe MeCP2/Sin3A/HDAC1/2 se dissocie. MeCP2 interagit alors avec DNMT1 et l'ADN hémi-méthylé au moment de la néo-synthèse du nouveau brin d'ADN. Le complexe MeCP2-DNMT1 méthyle alors le nouveau brin d'ADN néo-synthétisé. 3- MeCP2 se retrouve ainsi lié à de l'ADN double-brin méthylé. 4- Elle se dissocie alors de DNMT1 et recrute de nouveau ces co-répresseurs Sin3A/HDAC1/2 pour rétablir l'environnement chromatinien et la répression transcriptionnelle. La méthylation de l'ADN, l'environnement chromatinien condensé et la répression transcriptionnelle peuvent ainsi être maintenus au cours des divisions cellulaires des cellules somatiques.

Pendant la phase de réplication de l'ADN (phase S), MBD2/MBD3 co-localise avec DNMT1 au niveau des fourches de réplication (Tatematsu *et al.*, 2000). Ainsi, l'hétérodimère reconnaît l'ADN hémi-méthylé au niveau des fourches de réplication et recruterait aussi bien l'enzyme DNMT1 que des complexes HDAC pour maintenir la méthylation de l'ADN et la chromatine inactive.

Des résultats plus approfondis ont été obtenus pour MeCP2 (Kimura *et al.*, 2003). Le complexe MeCP2, immunoprécipité, présente une activité ADN méthyltransférase mais ne contient pas l'histone désacétylase, HDAC1, quand il est lié à l'ADN hémi-méthylé. L'interaction directe entre MeCP2 et DNMT1 prévient l'association d'HDAC avec l'un ou l'autre de ses partenaires, leur activité de méthyltransférase s'effectue donc indépendamment d'un remodelage des histones par les désacétylases. Une interaction dynamique entre MeCP2, DNMT1 et HDACs au cours de la réplication cellulaire pourrait expliquer les mécanismes moléculaires à l'origine du maintien des profils de méthylation de l'ADN et de la répression transcriptionnelle des gènes ainsi méthylés (**Figure 39**). Dès lors, les auteurs ont suggéré que lors de la phase S, le complexe répresseur MeCP2/HDAC est désassemblé et les protéines sont libérées dans le noyau. DNMT1 est ensuite recrutée au niveau des fourches de réplication par PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen), un co-facteur de la réplication de l'ADN. MeCP2 se réassocie à l'ADN hémi-méthylé, nouvellement synthétisé et DNMT1 se détache de PCNA pour interagir avec MeCP2. DNMT1 transfère alors un groupement méthyle sur les dinucléotides CpG non-méthylés. MeCP2 se retrouve ainsi liée à une séquence symétriquement méthylée. DNMT1 est libérée et MeCP2 recrute des complexes HDAC. Ainsi, le profil de méthylation et la répression génique sont maintenus au cours de la réplication de l'ADN.

Par ailleurs, d'autres études montrent que Mecp2 et Mbd1 co-localisent avec Dnmt3a aux foyers d'hétérochromatine en phase S dans les cellules murines NIH3T3 (Bachman *et al.*, 2001).

4.1.2- COMPLEXE SPECIFIQUES DE LA PHASE S : CAF-1/MBD1/SETDB1

Comme nous l'avons vu précédemment, MBD1 et l'HMT SETDB1 forment un complexe stable au niveau de l'ADN méthylé *in vivo* (Sarraf *et al.*, 2004). Lors de la réplication, MBD1 recrute SETDB1 au niveau de la sous unité p150 du facteur d'assemblage de la chromatine, CAF-1, pour former un complexe spécifique de la phase S : CAF-1/MBD1/SETDB1. Des expériences de co-immunoprécipitation supplémentaires ont montré que ce complexe s'associe avec PCNA. Le

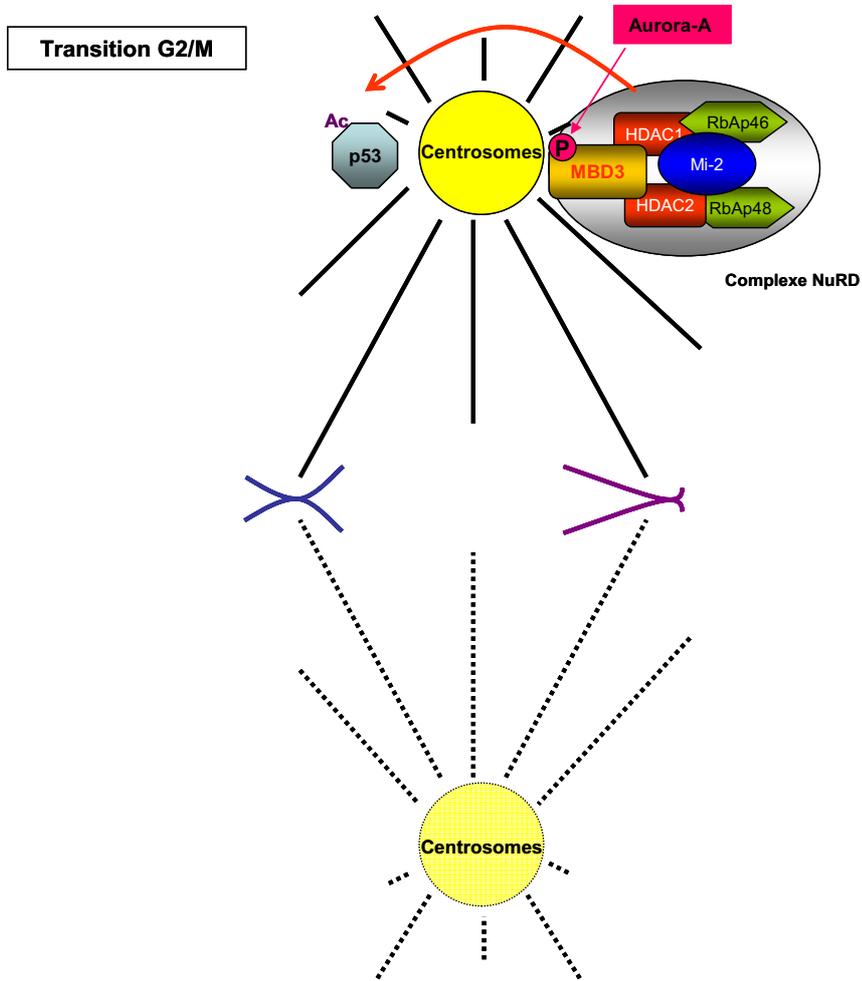


Figure 40. Rôle de MBD3 dans la transition G2/M.

A la transition G2/M, MBD3 serait phosphorylée par Aurora-A. MBD3 phosphorylée, au sein du complexe NuRD, irait se localiser au niveau des centrosomes et pourrait alors acétyler p53 augmentant ainsi sa liaison à l'ADN.

complexe CAF1/MBD1/SETDB1 facilite la méthylation des H3K9 couplée à l'assemblage de la chromatine durant la réplication. Ainsi, la structure chromatinienne est transmise lors de la réplication de l'ADN.

En définitive, les protéines à MBD joueraient un rôle dans le maintien du profil de la méthylation de l'ADN et de l'intégrité de la structure chromatinienne condensée conduisant au maintien de la répression transcriptionnelle pendant la réplication de l'ADN.

4.2- RÔLE DE MBD3 DANS LA REGULATION DE LA PROGRESSION DU CYCLE CELLULAIRE

L'état d'acétylation des histones, ainsi que les activités relatives des HAT et HDAC, varient au cours du cycle cellulaire (Weiss *et al.*, 1996; Lusser *et al.*, 1997). Ces changements observés semblent être régulés au cours du cycle cellulaire et apparaissent par ailleurs être impliqués dans le contrôle de la progression du cycle. En effet, ils seraient à l'origine d'une part de la régulation de l'expression des gènes requis pour la progression du cycle cellulaire et d'autre part des modifications de la structure et de la fonction des chromosomes et de leurs composants fonctionnels tels que les kinétochores. Dans ce cadre, plusieurs équipes ont recherché le potentiel rôle du complexe HDAC NuRD et de MBD3 au cours du cycle cellulaire.

La caractérisation biochimique et cytologique de MBD3 a montré que cette protéine est *in vivo* phosphorylée et localisée au niveau des centrosomes en fin de phase G₂ et début de phase M (Sakai *et al.*, 2002) (**Figure 40**). La sérine/thréonine kinase, Aurora-A serait responsable de cette phosphorylation (Sakai *et al.*, 2002) (**Figure 40**). En effet, cette kinase est (i) active spécifiquement en à la phase G₂/M, (ii) capable de phosphoryler *in vitro* MBD3, (iii) se trouve être associée à MBD3 *in vivo*, et (iv) co-localise avec MBD3 et HDAC1 au niveau des centrosomes en début de phase M. Ces observations indiquent que MBD3 au sein du complexe NuRD est régulée biochimiquement par sa phosphorylation au cours du cycle cellulaire. La forme phosphorylée de MBD3 étant spécifiquement observée lors de la phase G₂/M et localisée au niveau des centrosomes, ces résultats suggèrent un rôle de MBD3 et du complexe NuRD dans le point de surveillance de la transition G₂/M (**Figure 40**). Ce contrôle permet le passage en phase M en l'absence de dommage de l'ADN ou d'anomalie de la structure chromosomique. Des protéines autres que les histones peuvent être la cible des HDAC. D'une façon intéressante, le facteur p53, « contrôleur » du cycle

cellulaire, est l'une de ses cibles et se localise également au niveau des centrosomes en phase M (Luo *et al.*, 2000; Morris *et al.*, 2000) (**Figure 40**).

Tout récemment, une équipe a montré que, dans différentes lignées cellulaires cancéreuses humaines, l'inactivation de MBD3 par ARN interférant induit un arrêt des cellules en phase G₂/M et conduit à un défaut de mitose entraînant la mort cellulaire (Noh *et al.*, 2009). Ces résultats confirment ainsi l'implication de MBD3 dans la régulation de la progression du cycle cellulaire. Par ailleurs, les auteurs ont mis en évidence l'association de ces effets à la modulation transcriptionnelle de gènes régulateurs du cycle cellulaire, dont *Cycline B1*, *Plk1*, *Survivine* et *p21^{WAF1/Cip1}*. Des analyses de CHIP ont ensuite démontré le rôle direct de MBD3 dans la répression transcriptionnelle de ces gènes. Il est, en outre, à noter que les effets observés après inactivation de MBD3 sont semblables à ceux observés après un traitement des cellules à la TSA, un inhibiteur des HDACs.

L'ensemble de ces résultats démontre donc le rôle de MBD3, *via* son appartenance au complexe HDAC NuRD, dans la progression du cycle cellulaire et plus précisément lors de la transition G₂/M.

4.3- MBD4, MBD1 ET MAINTIEN DE L'INTEGRITE DU GENOME

4.3.1- MBD4, UNE ADN GLYCOSYLASE

4.3.1.1- MBD4 MINIMISE L'HYPERMUTABILITE DES DINUCLEOTIDES CPG METHYLES

La protéine MBD4 fut tout d'abord caractérisée comme une protéine à MBD (Hendrich *et al.*, 1998). Cependant, par des expériences de double hybride chez la levure, MBD4 fut identifiée d'une part, comme l'homologue humain de MutH, endonucléase de *E. coli* et d'autre part, comme interagissant avec la protéine humaine de réparation des mésappariements, MLH1 (Bellacosa *et al.*, 1999). MBD4 a alors été appelée MED1 (Methyl-CpG-binding Endonuclease 1). Il a été déterminé ultérieurement que MBD4 possède une activité ADN glycosylase (voir chapitre 1, paragraphe 3.4.2) et non pas une activité endonucléase comme initialement décrit (Hendrich *et al.*, 1999b; Petronzelli *et al.*, 2000).

La protéine MBD4 se lie préférentiellement aux mésappariements 5mCpG-TpG, produits primaires de la désamination des 5-méthylcytosines (Hendrich *et al.*, 1998). Ainsi, il a été proposé que MBD4 minimise les mutations au niveau des 5-méthylcytosines (Hendrich *et al.*, 1999b)

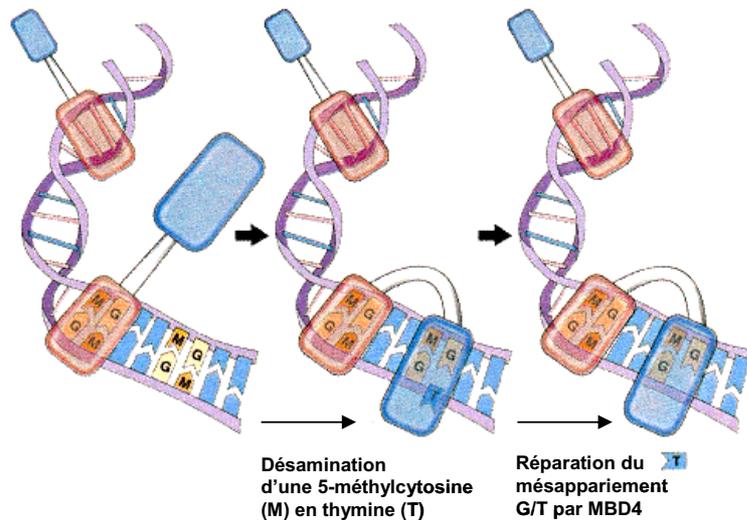


Figure 41. Modélisation du rôle de MBD4 dans la surveillance et la réparation des sites CpG méthylés (adaptée de Bellacosa, 2001 (Bellacosa, 2001)).

MBD4 « sonde » les sites CpG méthylés du génome avec son domaine MBD (en rouge). La désamination des 5-méthylcytosines (M) en thymine (T), au niveau des sites CpG, génère des mésappariements G/T qui sont alors détectés et réparés par le domaine catalytique ADN glycosylase de MBD4 (bleu). L'activité thymine glycosylase du domaine catalytique de MBD4 catalyse l'excision de la thymine. Une défaillance de l'activité glycosylase de MBD4 entraîne une transition CpG:TpA après une étape de réplication de l'ADN.

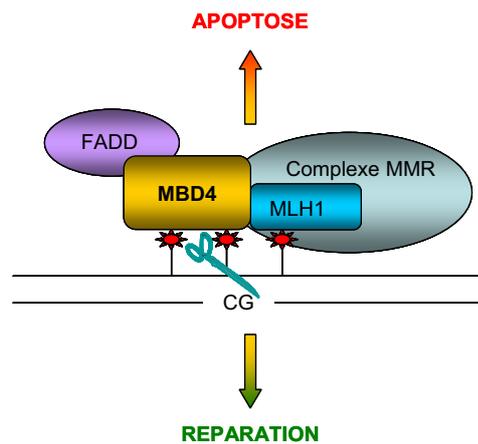


Figure 42. MBD4 et la réponse apoptotique aux dommages à l'ADN.

MBD4 répare les mésappariements 5mCpG-TpG. De trop importants dommages à l'ADN (représenté par des ronds rouges étoilés) pourraient amener MBD4 à s'associer avec MLH1, du complexe MMR, et avec le facteur pro-apoptotique FADD, pour induire une entrée en apoptose.

(**Figure 41**). Chez l'Homme, le taux de mutations des 5-méthylcytosines est de 10 à 50 fois plus élevé que pour les autres bases. Une défaillance de l'activité glycosylase de MBD4 entraînerait donc des transitions mutationnelles 5mCpG:TpA après une étape de réplication de l'ADN. Ce rôle dans la réparation des mésappariements a été confirmé *in vivo* chez la souris. L'inactivation homozygote de *Mbd4* est viable, suggérant une importante redondance fonctionnelle avec la thymine-glycosylase TDG, mais conduit à une élévation de trois fois du taux de transitions des cytosines (C) en thymines (T) dans un transgène riche en CpG (Millar *et al.*, 2002; Wong *et al.*, 2002).

Par ailleurs, *in vitro* MBD4 est capable d'exciser l'analogue de l'uracile le 5-fluorouracile (5-FU) dans le contexte de mésappariements G-5-FU. Cette observation suggère que MBD4 peut être impliquée dans la résistance au traitement au 5-FU, principal agent utilisé pour le traitement du cancer du côlon (Petronzelli *et al.*, 2000). MBD4 possède également une faible activité glycosylase pour exciser les 3,N⁴-éthénocytosines (Petronzelli *et al.*, 2000), des adduits exocycliques formés par la réaction entre les métabolites de chlorure de vinyl et les cytosines de l'ADN.

Ces observations suggèrent qu'il existe un lien entre MBD4 et le système de réparation des mésappariements (MMR) et que MBD4 serait aussi impliquée dans la réponse cellulaire à des agressions environnementales.

4.3.1.2- MBD4 EST IMPLIQUEE DANS LA REPONSE APOPTOTIQUE AUX DOMMAGES A L'ADN

Le système MMR remplit la fonction importante de détecter les dommages de l'ADN et de prendre la décision de les réparer ou d'induire l'apoptose si la cellule n'est pas capable d'effectuer efficacement les réparations des dommages subis par son ADN (**Figure 42**). Le niveau protéique de plusieurs protéines du système MMR est diminué dans les fibroblastes embryonnaires de souris invalidées pour *Mbd4*. Ceci pourrait expliquer, le défaut de réponse apoptotique que présentent ces mêmes cellules face à des agents causant des dommages à l'ADN tels que le 5-fluorouracil, le temozolamide, l'irradiation γ et la cisplatine (Cortellino *et al.*, 2003; Sansom *et al.*, 2003). Ces observations suggèrent que l'interaction entre MBD4 et le système MMR doit être important pour la mise en place de voie de signalisation de réponse aux dommages à l'ADN (Parsons, 2003; Cortellino *et al.*, 2003; Sansom *et al.*, 2003; Sansom *et al.*, 2004) (**Figure 42**).

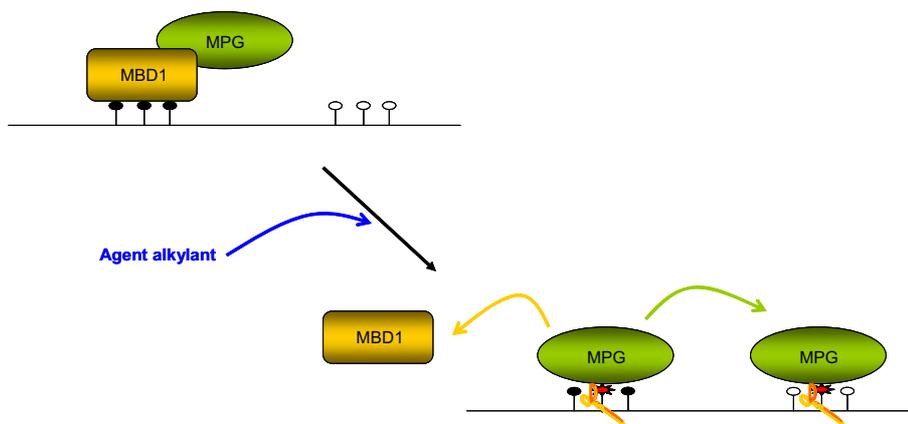


Figure 43. La protéine MBD1, réservoir de MPG et capteur de l'alkylation des bases de l'ADN.

En absence de dommage à l'ADN, MBD1 séquestrerait l'ADN glycosylase méthylpurine dans les régions méthylées. Lorsque des dommages à l'ADN dus à l'alkylation surviennent, MBD1 se dissocierait de l'ADN et de la MPG, permettant sa répartition à l'échelle de tout le génome pour réparer les anomalies.

Les souris invalidées pour le gène *MLH1* présentent les mêmes caractéristiques que les souris *Mbd4*^{-/-} (Meyers *et al.*, 2001). Par ailleurs, un croisement entre ces deux lignées n'amplifie pas le phénotype observé (Sansom *et al.*, 2003). Ces résultats suggèrent donc que ces deux protéines interviennent dans une même voie pro-apoptotique lors de dommages irréversibles de l'ADN et que la réponse apoptotique MMR-dépendante doit être initiée par MBD4 (**Figure 42**).

L'association entre MBD4 et le système MMR ne serait pas la seule voie par laquelle MBD4 modulerait la réponse apoptotique. En effet, Screaton *et al.* ont également montré une interaction fonctionnelle entre MBD4 et le facteur de mort FADD (Screaton *et al.*, 2003) (**Figure 42**). La réponse apoptotique au ligand Fas est par ailleurs très faible dans les souris *Mbd4*^{-/-}, suggérant une implication globale de MBD4 dans les mécanismes apoptotiques (Screaton *et al.*, 2003).

4.3.2- MBD1, REPARATION ET STABILITE GENOMIQUE

Parmi la famille des protéines glycosylases, l'ADN glycosylase méthylpurine (MPG) catalyse l'excision de nombreuses bases modifiées. Une équipe japonaise a mis en évidence une interaction *in vitro* comme *in vivo* entre MPG et MBD1. Par des expériences de CHIP, Watanabe *et al.* (Watanabe *et al.*, 2003) ont montré que le complexe MBD1/MPG interagit avec des séquences promotrices méthylées dans des cellules saines (**Figure 43**). Le traitement de ces cellules avec un agent alkylant, le méthylméthanesulfonate (MMS), induit la modification de bases et la dissociation de MBD1 dont l'affinité pour l'ADN est alors atténuée (expériences de retard sur gel). Ainsi, MPG est localisée aussi bien au niveau de l'ADN méthylé que de l'ADN non méthylé (**Figure 43**). Après achèvement de la réparation, le complexe MBD1/MPG se reforme au niveau des promoteurs méthylés. MBD1 ne participerait donc pas directement à la réparation de l'ADN. Toutefois, l'inactivation de MBD1 par ARNi augmente significativement la sensibilité des cellules au MMS (Watanabe *et al.*, 2003). MBD1 fonctionnerait donc comme un réservoir pour MPG et, en se détachant de l'ADN méthylé lorsque les bases sont endommagées, déclencherait l'action glycosylase de MPG.

En outre, les souris nulles *Mbd1* ne présentent aucun problème de développement et sont viables. Cependant dans une étude sur le système nerveux central, une forte instabilité génomique a été observée (Zhao *et al.*, 2003). Les causes de cette instabilité restent inconnues. Toutefois, elles pourraient être liées soit à un système de réparation nécessitant MBD1 défectueux, soit à une dérégulation de rétrovirus endogènes IAP (Intracisternal A particle). En effet, l'inactivation de

Mbd1, tout comme l'inactivation de *Dnmt1*, entraîne l'activation de l'expression des rétroéléments IAP qui, dans les cellules sauvages, sont méthylés et réprimés. Une augmentation de deux fois de l'expression des IAP est également observée dans les cellules cancéreuses porteuses d'aberrations chromosomiques. Par ailleurs, le profil global de méthylation de l'ADN n'est pas altéré dans les cellules *MBD1*^{-/-}. Ces résultats suggèrent donc que seule l'inactivation de *MBD1* est requise pour la réactivation de ces gènes.

En définitive, MBD1 est impliquée dans des processus de réparation de l'ADN et dans la répression transcriptionnelle des gènes méthylés tels que les rétroéléments. Si l'une des deux ou les deux fonctions de MBD1 sont altérées, l'intégrité génomique n'est plus maintenue.

5- CONCLUSION

Les protéines apparaissent donc être des protéines multifonctionnelles qui *via* leur interaction avec l'ADN méthylé et de multiples facteurs interviennent dans différents processus : répression transcriptionnelle, réparation de l'ADN, réponse apoptotique aux dommages à l'ADN, régulation du cycle cellulaire. De plus, leur rôle principal d'interprète du signal de méthylation se trouve être renforcé par leur intervention dans l'héritabilité des modifications épigénétiques dans les cellules somatiques.

En définitive, les protéines à MBD sont impliquées dans de nombreux processus physiologiques et au même titre que la méthylation de l'ADN, des altérations de celles-ci mènent à des pathologies humaines comme l'illustre l'implication des mutations de MeCP2 dans le syndrome de Rett. Mais, ces protéines à MBD participent également au processus de cancérogenèse.

CHAPITRE 3

IMPLICATION DE LA METHYLATION DE L'ADN ET DES PROTEINES A MBD

DANS LA CANCEROGENESE

1- LE CANCER, UNE MALADIE EPIGENETIQUE

1.1- GENERALITES SUR LE CANCER

Le cancer est un problème de santé publique majeur. En 2004, plus d'un dixième des décès à travers le monde étaient dus à cette maladie (données de l'OMS). « Cancer » est un terme général qui ne s'applique pas à une seule et unique maladie mais regroupe un ensemble de maladies extrêmement variées. Environ 200 types de tumeurs, pouvant affecter tous les tissus du corps, existent. De plus, pour un cancer particulier une variété impressionnante de causes et de pathologies existe. Toutefois, les connaissances acquises ces dernières années dans le domaine de l'oncologie indiquent que les différents types de cancers résultent tous d'un déséquilibre entre division cellulaire (mitose), différenciation cellulaire et mort cellulaire programmée (apoptose). L'altération de cet équilibre est liée en majeure partie à la dérégulation de l'expression de deux classes de gènes : les oncogènes et les gènes suppresseurs de tumeur. Les oncogènes codent pour des protéines ayant une fonction déterminante dans les mécanismes contrôlant la mitose et la différenciation cellulaire. Ce sont des régulateurs positifs de la prolifération cellulaire. Leurs activités sont essentielles au cours du développement et lors des processus normaux de régénération tissulaire, mais ils ne sont que peu ou pas actifs dans les cellules différenciées. Dès lors, l'activation ectopique et non contrôlée de ces oncogènes entraîne les cellules vers une tendance forte à proliférer et, donc, à former des tumeurs. D'autre part, les gènes suppresseurs de tumeurs sont des gènes, qui codent à l'état normal pour des protéines qui régulent négativement le cycle cellulaire. Ils inhibent les progressions anormales du cycle cellulaire. L'extinction de tels gènes constitue donc un mécanisme inducteur du cancer. Ainsi, l'activation constitutive des oncogènes, associée à l'inactivation des gènes suppresseurs de tumeurs, permet aux cellules de proliférer sans limite.

Les cellules cancéreuses prolifèrent pour former une masse appelée tumeur. Deux types de tumeurs existent : (i) les tumeurs dites bénignes qui typiquement ont une prolifération limitée et

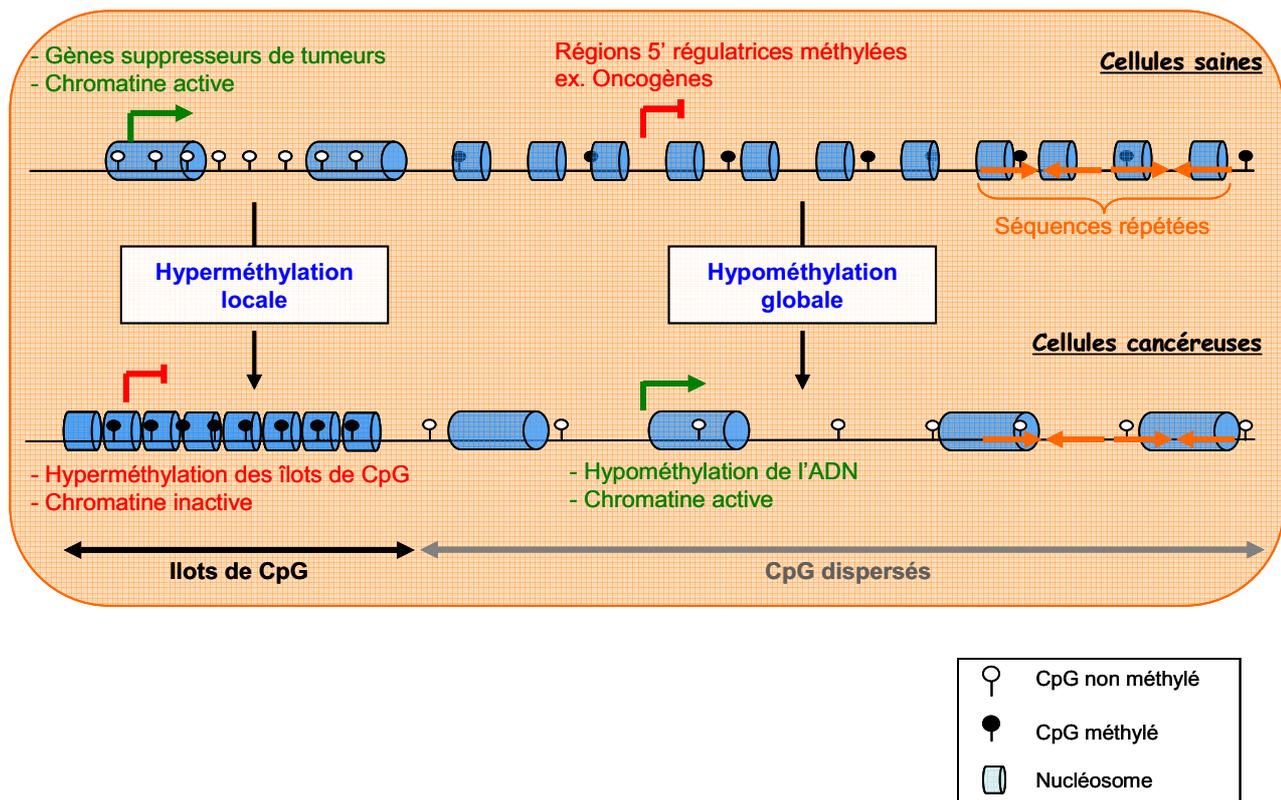


Figure 44. L'altération des profils de méthylation de l'ADN perturbe les patrons d'expression génique dans les cancers.

Dans une cellule saine, le génome est globalement méthylé, à l'exception de la plupart des îlots de CpG, situés dans les régions régulatrices de 60% de gènes, favorisant leur expression (flèche verte). Dans les cellules cancéreuses, le phénomène s'inverse avec une hyperméthylation régionale des îlots de CpG, qui aboutit à l'inhibition transcriptionnelle (flèche rouge) en outre des gènes régulateurs de la croissance cellulaire, tels que les gènes suppresseur de tumeurs, et une hypométhylation globale des autres séquences génomiques, telles que les rétroéléments et les oncogènes, alors surexprimés (flèche verte).

restent très localisées et (ii) les tumeurs dites malignes qui au contraire vont proliférer rapidement et ont la capacité d'essaimer dans d'autres organes, formant ce qu'on appelle des métastases. Tandis que la tumeur en elle-même peut être dangereuse et endommager les tissus sains environnants, l'aspect le plus dangereux du cancer est quand les cellules de la tumeur se dissocient de la masse tumorale primitive et migrent vers d'autres organes pour former des métastases. L'apparition de métastases nécessite l'activation d'autres gènes qui permettent aux cellules tumorales de dégrader les matrices extracellulaires, de perdre leur cohésion intercellulaire, de devenir mobiles et d'échapper au système immunitaire. La dissémination métastatique est un événement clé dans l'histoire de la maladie cancéreuse, parce qu'elle transforme une maladie locorégionale curable par un traitement local en une maladie généralisée plus difficile à traiter et dont le traitement est systémique.

En définitive, une reprogrammation profonde des profils d'expression génique est à l'initiation et au développement cancéreux. Les modifications de l'expression de ces gènes peuvent être expliquées par l'altération génétique des séquences intrinsèques de l'ADN, telles que les mutations, les amplifications ou les pertes de matériels chromosomiques, et les translocations récurrentes. Toutefois, si les causes génétiques ont longtemps occupé le devant de la scène, il est maintenant clairement établi que de nombreuses voies moléculaires impliquées dans l'immortalisation cellulaire et la transformation maligne sont affectées par des modifications épigénétiques.

1.2- ALTERATION DES PROFILS DE METHYLATION DE L'ADN DANS LES CANCERS

Les cellules cancéreuses sont « marquées » par diverses dérégulations épigénétiques. Des altérations relatives à la méthylation de l'ADN seraient ainsi impliquées dans plus de 65% des cancers (Ehrlich, 2002; Das and Singal, 2004). Dans le génome de mammifère, on observe une absence de méthylation des îlots de CpG et une méthylation plus générale des autres dinucléotides CpG répartis dans le génome. Lors de la transformation maligne, cet équilibre est altéré et des modifications des profils de méthylation se produisent. Une hypométhylation globale du génome s'opère, associée à une hyperméthylation locale de certaines séquences à îlots de CpG (**Figure 44**). L'ensemble de ces altérations favorise l'instabilité génomique, l'expression ectopique de certains gènes (oncogènes, rétrotransposons et gènes soumis à l'empreinte) ou au contraire réprime l'expression d'autres gènes (gènes suppresseurs de tumeurs, gènes de la réparation de l'ADN et gènes impliqués dans les processus métastatiques), apportant un avantage sélectif aux cellules cancéreuses.

1.2.1- HYPOMETHYLATION GLOBALE DU GENOME

Les nombreux travaux sur l'hyperméthylation de certains gènes suppresseurs de tumeurs ont longtemps évincé le premier lien établi entre la méthylation de l'ADN et le cancer. En effet, dès 1983, il avait été démontré que le génome des cellules cancéreuses est globalement moins méthylé que celui des tissus sains correspondants (Gama-Sosa *et al.*, 1983;Feinberg and Vogelstein, 1983a). Cette hypométhylation globale a été observée dans différents types de néoplasies humaines ou animales, indiquant que cette différence est spécifique du phénomène cancérogène et non du tissu. L'hypométhylation globale se caractérise par une baisse de 20 à 60% de la teneur en 5-méthylcytosines. Bien que les mécanismes responsables de cette hypométhylation ne soient pas clairement définis, les conséquences fonctionnelles sont multiples.

Dans les cellules tumorales, la perte de la méthylation génomique est majoritairement observée au niveau des éléments transposables (LINE-1 (Dante *et al.*, 1992;Chalitchagorn *et al.*, 2004) et Alu (Weisenberger *et al.*, 2005)) et des séquences répétées pericentromériques satellites hautement méthylés dans les cellules normales (Ehrlich, 2002). Ces séquences représentant environ 45% du génome humain, leur hypométhylation semble donc être représentative de l'hypométhylation globale retrouvée dans les cancers (Yoder *et al.*, 1997).

Comme décrit avant, une des fonctions de la méthylation de l'ADN est la suppression de la transcription et de l'expansion des transposons (Yoder *et al.*, 1997). La fonction d'un gène pourrait être alors altérée non seulement par l'insertion directe d'un nouvel élément transposable dans un exon codant, mais aussi dans un intron et provoquer sa transcription, ou par la génération d'un transcrit anti-sens si l'élément est intégré dans une orientation anti-sens (Robertson and Wolffe, 2000b).

La méthylation de l'ADN peut également agir en stabilisant le génome, en inhibant la recombinaison homologue entre les séquences répétées (Colot and Rossignol, 1999). Plusieurs études ont maintenant clairement démontré que les éléments répétitifs sont hypométhylés dans les tumeurs et que le degré d'hypométhylation est corrélé avec l'instabilité du génome et la progression de la maladie (Narayan *et al.*, 1998;Qu *et al.*, 1999). L'hypométhylation des différentes séquences satellites a été fréquemment observée (40-90%) dans plusieurs types de tumeurs (Narayan *et al.*, 1998;Wong *et al.*, 2001;Ehrlich *et al.*, 2003). Dans les tumeurs ovariennes, l'hypométhylation de l'ADN satellite est corrélée à la progression tumorale, et elle peut être considérée comme un possible marqueur de mauvais pronostic (Qu *et al.*, 1999;Widschwendter *et al.*, 2004).

La perte de la méthylation des éléments répétitifs peut avoir lieu tôt au cours de la progression tumorale et peut prédisposer la cellule aux réarrangements du génome *via* la recombinaison mitotique. La recombinaison pourrait, à son tour, soit inactiver les gènes critiques dans la régulation de la croissance soit, *via* le gain et/ou la perte d'un bras d'un chromosome, induire l'expression inappropriée d'un gène suppresseur de tumeur ou d'un oncogène.

En définitive, la diminution de méthyl-CpG au niveau des régions non régulatrices et d'éléments structuraux comme l'ADN centromérique augmente l'instabilité chromosomique, favorisant les réarrangements et facilite le développement tumoral (Dante *et al.*, 1992; Qu *et al.*, 1999; Eden *et al.*, 2003; Chalitchagorn *et al.*, 2004). Cette hypothèse est soutenue par l'augmentation des aberrations chromosomiques associées au développement précoce de tumeurs chez les souris invalidées pour l'expression de *Dnmt1* (Gaudet *et al.*, 2003) et le lien établi entre l'hypométhylation et l'instabilité génomique dans les cancers du sein (Tsuda *et al.*, 2002) ou de la prostate (Schulz *et al.*, 2002).

L'hypométhylation peut aussi, dans les cancers, avoir lieu dans une région promotrice d'un gène spécifique, par exemple un proto-oncogène, entraînant la surexpression et résultant dans une augmentation de la prolifération cellulaire. L'oncogène *Ras* fut le premier gène identifié comme étant hypométhylé dans les tissus cancéreux (Feinberg *et al.*, 1983a; Feinberg *et al.*, 1983b). Dans différentes tumeurs, des mutations activatrices de ce gène avaient été répertoriées. Toutefois, ces mutations ne pouvaient expliquer à elles seules l'augmentation de l'activité de ce gène dans les différentes tumeurs. Ces études ont été suivies par la mise en évidence de la perte de méthylation de plusieurs autres oncogènes, tels que *c-myc* (Cheah *et al.*, 1984), *MAGE* (De Smet *et al.*, 1996), *HOX11* (Watt *et al.*, 2000) et *uPA* (Guo *et al.*, 2002), un gène impliqué dans le développement des métastases.

L'hypométhylation semble, donc, être corrélée à la progression vers le cancer et offre des mécanismes potentiels pour expliquer la cancérogenèse (Dunn, 2003).

1.2.2- HYPERMETHYLATION REGIONALE AU NIVEAU DES ILOTS DE CpG

Dans les cancers, l'hyperméthylation *de novo* des îlots de CpG est l'altération épigénétique la plus souvent décrite. Elle est retrouvée dans presque tous les types de néoplasies et est associée à l'inhibition de la transcription de gènes suppresseurs de tumeurs conférant ainsi un avantage aux cellules tumorales (Jones and Baylin, 2002; Paz *et al.*, 2003). Dans chaque type de cancer, les gènes

Tableau 4. Liste des gènes suppresseurs de tumeurs les plus souvent inactivés par l'hyperméthylation des CpG situés dans leur région promotrice lors de la tumorigenèse, ainsi que les principaux types de cancers associés à ces inactivations (Mulero-Navarro and Esteller, 2008).

Cette liste n'est pas exhaustive.

Rôles biologiques	Gènes inactivés par hyperméthylation	Principaux types de cancers associés
Cycle Cellulaire	<i>Rb</i> <i>p16^{INK4A}</i> <i>CDKN2B / p15^{INK4B}</i> <i>p14^{ARF}</i> <i>P53</i>	Rétinoblastome, cancer du poumon, gliome, cancer du côlon Leucémie, lymphome, cancers de la peau et du poumon Leucémie, Lymphome Cancer gastrique Cancers poumon, de la prostate, du sein et de l'ovaire
Réparation de l'ADN	<i>BRCA1</i> <i>O6-MGMT</i> <i>MLH1</i> <i>MSH2</i> <i>GSTP1</i> <i>WRN</i>	Cancers de l'ovaire et du sein Gliomes, cancers colorectaux, cancers du poumon non à petites cellules, lymphomes et cancers du cou et de la tête Cancers gastrique, du côlon, du sein et de l'ovaire Cancers rénal, du côlon et de l'endomètre Cancers colorectaux et du sein Multiples
Apoptose	<i>Caspase 8</i> <i>DAPK</i> <i>DR4</i> <i>XAF1</i> <i>RASSF1A</i> <i>TSM1</i>	Médulloblastome, cancers du poumon et du foie Lymphome, gliome, cancers gastrique et col de l'utérus Mélanome Cancer rénal, mélanome Cancers rénal, du poumon et du sein, mélanome, gliome Cancer du sein
Adhésion cellulaire, angiogénèse	<i>E-cadhérine (CDH1)</i> <i>H-cadhérine (CDH13)</i> <i>APC</i> <i>FAT</i> <i>TIMP- 3</i> <i>MMPs</i> <i>TIMP-2</i>	Cancers gastrique, de la thyroïde et du sein Multiples Multiples Multiples Médulloblastome et cancer du foie Cancer du col de l'utérus Cancer du col de l'utérus
Réponse aux facteurs de croissance et aux hormones	<i>PTEN</i> <i>ER</i> <i>PR</i> <i>AR</i> <i>RARβ2</i> <i>IGFBP1</i> <i>IGFBP3</i> <i>SOSC1</i> <i>SHP-1</i>	Glioblastome, cancers gastrique, du sein et de la thyroïde Cancer du sein et de la prostate Cancer de l'endomètre Cancer de la prostate Leucémie promyelocytaire aiguë, cancers du col de l'utérus, de la prostate et du sein Cancer rénal Cancer rénal Myélome Lymphome

Rb: retinoblastoma; *CDK*: cyclin dependant Kinase; *RASSF1A*: ras effector homologue; *BRCA1*: breact cancer 1; *O6-MGMT*: O6-methyl guanine DNA methyl transferase; *MLH1*: human mutant L homologue; *GSTP1*: glutathione-S-transferase P1; *DAPK*: death associated protein kinase; *DR4*: Apo2/TRAIL receptor; *TIMP*: tissue inhibitor of metalloproteinase; *MMPs*: metalloproteinase protein; *PTEN*: phosphatse and tensin homologue; *PI3-K*: phosphotidylinositol; *ER*: estrogen receptor; *PR*: progesterone receptor; *AR*: androgen receptor; *RAR β 2*: retinoid acid receptor β 2; *IGFBP*: insulin-like growth factor binding protein; *SOSC 1*: Suppressor of cytokine signaling.

hyperméthylés appartiennent à des voies différentes et peuvent être des marqueurs de détection très sensibles dans pratiquement tous les types de tumeurs (Costello *et al.*, 2000; Esteller *et al.*, 2001).

Une des premières descriptions associe l'hyperméthylation du gène *Rb* avec des cas familiaux de rétinoblastome unilatéral (Greger *et al.*, 1989). Puis il a été montré que quand un allèle de *p16^{ink4a}* est muté et l'autre méthylé, il y a perte de fonction de ce gène intervenant dans le cycle cellulaire (Herman *et al.*, 1995). Depuis il a été accepté que l'inactivation des gènes suppresseurs de tumeurs par hyperméthylation puisse être un mécanisme fréquent dans les cancers humains où elle peut agir comme un événement primaire d'inactivation contribuant directement à la tumorigénèse.

L'importance de l'hyperméthylation des îlots de CpG dans les cancers peut être évaluée en considérant la fréquence de cet événement et la nature des gènes impliqués. Environ 50% des gènes suppresseurs de tumeurs, mutés dans les cancers familiaux, sont hyperméthylés dans les cancers sporadiques. Un nombre grandissant de gènes « associés à la cancérogénèse » a été observé comme étant porteur d'une méthylation dense dans leur région promotrice à îlot de CpG normalement non méthylée (**Tableau 4**). D'une manière générale, les gènes participant aux différentes étapes du développement tumoral en favorisant la prolifération cellulaire (gènes *Rb*, *p16^{ink4a}*, *p15^{nk4b}*, *RASSF1A*, *LKB1*, *p73*, *hTERT*...), l'instabilité chromosomique (gènes *MGMT*, *BRCA1*, *MLH1*), la résistance aux drogues (gènes *MDR1*, *MGMT*, *GSTP1*), l'invasion tumorale (gènes de la *cadhérine E*, *VHL*, *TIMP-3*...) ou la différenciation (gènes *MyoD*, *récepteurs aux oestrogènes*...) sont hyperméthylés et réprimés dans les cancers avec une spécificité pour certains types de tumeurs (Robertson, 2005).

Dans les tumeurs avec une progression tumorale bien définie, tel que le cancer du côlon, l'hyperméthylation est détectable dès les lésions précoces. Ces données indiquent que la méthylation *de novo* aberrante des îlots de CpG n'est pas un événement tardif qui survient à la suite d'altérations génétiques et suggèrent qu'elle contribue directement à la transformation (Chan *et al.*, 2002). Ainsi, l'hyperméthylation des îlots de CpG pourrait représenter un bon marqueur potentiel pour la détection de cancer précoce (Laird, 2003). De plus, ce phénomène semble actif dans les cellules puisque l'on trouve de plus en plus de gènes hyperméthylés dans les différents changements cellulaires menant au cancer (Tsuda *et al.*, 2002; Nephew and Huang, 2003; Weisenberger *et al.*, 2005; Tryndyak *et al.*, 2006a).

1.2.3- HYPERMETHYLATION ET MUTATIONS DE L'ADN

En marge de l'inactivation génique par hyperméthylation des promoteurs de certains gènes, se trouvent des phénomènes mutationnels intrinsèquement liés à la présence de groupements méthyles sur l'ADN. En effet, les 5-méthylcytosines peuvent générer des mutations par : (i) désamination spontanée, engendrant une transition dans le code génétique de cytosine vers thymine ; (ii) adsorption accrue des rayons UV ; (iii) liaison accrue des carcinogènes (Pfeifer, 2006).

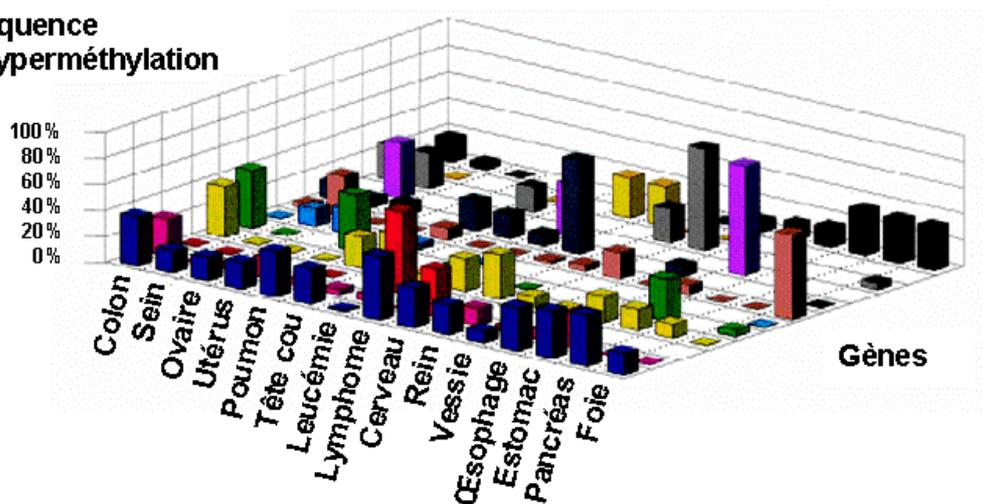
1.2.4- PERTE DE L'EMPREINTE PARENTALE

Les altérations épigénétiques touchent également les gènes soumis à l'empreinte. Ces gènes, dont l'expression est normalement monoallélique d'origine parentale, jouent un rôle important dans la prolifération et la croissance cellulaire. Dès lors, la « perte de l'empreinte » (LOI, Loss Of Imprinting), associée à une expression biallélique ou à une extinction totale de l'expression, a été impliquée dans plusieurs cancers. L'exemple le mieux connu est celui du gène *IGF2*, dont l'expression devient biallélique et augmentée dans les tumeurs du côlon, du foie, du poumon, de l'ovaire ainsi que dans les tumeurs de Wilms (Moulton *et al.*, 1994;Cui, 2007). Le gène *IGF2* est normalement exprimé à partir de l'allèle paternel et code un facteur de croissance autocrine qui possède un rôle mitogénique et anti-apoptotique. La perte de l'empreinte au niveau du gène *IGF2* induit ainsi la prolifération cellulaire (Kaneda *et al.*, 2007).

1.2.5- CONCLUSION : HYPOMETHYLATION GLOBALE *VERSUS* HYPERMETHYLATION LOCALE, LE PARADOXE DE LA METHYLATION DANS LES CELLULES CANCEREUSES

En définitive, les altérations des profils de méthylation de l'ADN apparaissent être des événements fréquents et précoces dans les cancers. De plus, comme le démontre les études comparatives effectuées dans des lignées cancéreuses à différents stades, les aberrations de la méthylation de l'ADN semblent augmenter au cours du processus tumoral et être associées à une augmentation de la malignité, de l'envahissement tumoral et du nombre de métastases (Narayan *et al.*, 1998;Qu *et al.*, 1999;Tsuda *et al.*, 2002;Nephew *et al.*, 2003;Widschwendter *et al.*, 2004;Weisenberger *et al.*, 2005;Tryndyak *et al.*, 2006a). Toutefois, la nature des séquences affectées ainsi que l'absence d'associations entre ces deux aberrations, sont fortement en faveur d'un rôle indépendant de l'hypométhylation et l'hyperméthylation dans l'initiation et la progression tumorale (Ehrlich *et al.*, 2003).

Fréquence d'hyperméthylation



Gène	Fonction	Type de cancers	Conséquence
p16 ^{INK4A}	Inhibiteur des cdk	Multiple cancers	Inhibition du contrôle du cycle cellulaire
p14 ^{ARF}	Inhibiteur de MDM2	Colon, estomac	Dégradation de p53
p15 ^{INK4A}	Inhibiteur des cdk	Leucémie	Inhibition du contrôle du cycle cellulaire
MGMT	Réparation des O6-alkyl-guanine de l'ADN	Multiple cancer	Mutations, sensibilité aux agents chimiques
hMLH1	Réparation des mésappariements de l'ADN	Colon, estomac, utérus	Mutations
BRCA1	Réparation de l'ADN, transcription	Sein, ovaire	Cassures double-brin ?
GSTP1	Transfert du glutathion	Sein, rein, foi	Accumulation d'adduits ?
DAPK	Pro-Apoptotique	Lymphome	Résistance à l'apoptose
CDH1	E-cadhérine, adhésion cellulaire	Sein, leucémie, oesophage	Invasion tissulaire
TIMP-3	Inhibiteur de la métalloprotéinase 3	Rein	Invasion tissulaire
p73	Homologue de p53	Leucémie, lymphome	Inconnu
APC	Inhibiteur de la β -caténine	Colon, estomac, pancréas, foi	Activation de la voie β -caténine

Figure 45. Fréquence d'hyperméthylation des îlots de CpG de certains gènes dans plusieurs types de cancer (adaptée de Esteller *et al.*, 2001 (Esteller *et al.*, 2001)).

1.3- MISE EN PLACE DE CES ALTERATIONS

Les altérations des profils de méthylation de l'ADN ont longtemps été associées à la surexpression anormale des DNMT dans différents types de cancers et tumeurs (el-Deiry *et al.*, 1991; Kanai *et al.*, 2001; Ehrlich *et al.*, 2006). Toutefois, aucune corrélation claire et nette entre le niveau d'expression des DNMT et le degré de tumorigénicité n'a encore pu être établie (Eads *et al.*, 1999). De plus, la co-existence d'une hypométhylation globale et d'une hyperméthylation spécifique de gènes dans les cellules cancéreuses suggère que ces profils aberrants de méthylation de l'ADN sont la conséquence de mécanismes complexes faisant intervenir de multiples facteurs. Des études récentes ont montré que l'hyperméthylation de certains îlots de CpG pouvait être due au recrutement d'ADN méthyltransférases par des facteurs de transcription au niveau de leurs gènes cibles. Ainsi le facteur de transcription oncogénique PML-RAR α , généré par la translocation chromosomique du gène *PML* (ProMyelocytic Leukemia) au niveau du locus du récepteur à l'acide rétinoïde α (RAR α), recrute les ADN méthyltransférases, DNMT1 et DNMT3A, au niveau des promoteurs de ces gènes cibles de RAR α , induisant ainsi leur répression transcriptionnelle *via* la méthylation (Di Croce *et al.*, 2002). Un tel mécanisme de ciblage de méthylation *de novo* a également été observé avec l'histone méthyltransférase EZH2 (Enhancer of Zeste Homologue 2) (Vire *et al.*, 2006; Schlesinger *et al.*, 2007). Toutefois, l'hyperméthylation des gènes cibles de EZH2 due au recrutement de DNMT *via* ce facteur n'est pas à l'origine de tous les événements de méthylation aberrante dans tous les types de cancers (Schlesinger *et al.*, 2007).

1.4- « METHYLOTYPE » OU PROFIL DE METHYLATION DE L'ADN : MARQUEUR DIAGNOSTIQUE ET/OU PRONOSTIQUE

Le « méthyloptype » ou profil de méthylation de l'ADN est une proposition actuelle d'une signature épigénétique d'une tumeur donnée (**Figure 45**) (Esteller *et al.*, 2001). Il peut s'agir aussi bien d'un gène qui est hyperméthylé spécifiquement dans un type de tumeur ou d'un groupe de gènes dont l'association des différentes hyperméthylations caractérise la tumeur. Un très bon exemple est celui des tumeurs de la prostate où un seul marqueur, *GSTP1*, est informatif dans 80-90% des cas (Lee *et al.*, 1994). Toutefois, à ce jour, il n'a pu être que très rarement mis en évidence que la méthylation d'un seul gène puisse être utilisée comme marqueur d'une tumeur. De plus, l'association de plusieurs gènes pourrait permettre d'obtenir une sensibilité proche de 100%.

Tableau 5. Applications cliniques des marqueurs épigénétiques (adaptée de Mulero-Navarro et Esteller, 2008 (Mulero-Navarro et al., 2008)).

Gènes hyperméthylés	Potentielle utilité en clinique			
	Facteur de risque/ Détection/ Diagnostique/ Classification	Pronostic de l'évolution tumorale	Facteur prédictif de réponses aux traitements	Facteur prédictif de rechute
<i>p16^{INK4a}</i>	- Facteur de risque de développement de cancers du colon et de l'endomètre, - Détection des cellules néoplasiques du foie et du poumon	- Facteur de progression tumorale des cancers du plancher oral		
<i>p14^{ARF}</i>	- Détection des cancers du cerveau	- Facteur de progression tumorale des cancers du plancher oral		
<i>O6-MGMT</i>	- Facteur de risque de développement de cancers colorectaux, - Détection du cancer du poumon		- Facteur prédictif de réponses aux traitements des gliomes	
<i>APC</i>	- Détection des cancers colorectaux et du sein			
<i>BRCA1</i>			- Facteur prédictif de réponses aux traitements dans les cancers du sein et de l'ovaire	
<i>MLH1</i>	- Facteur de risque de développement de cancers gastrique, du colon et de l'endomètre		- Facteur prédictif de réponses aux traitements	
<i>SFRP1</i>		- Facteur de mauvais pronostic dans le cancer du sein		
<i>DAPK</i>				- Facteur prédictif de rechute dans le cancer de la vessie
<i>CDH1, CDH13, THBS-1, FAT tumor suppressor cadherin</i>		- Facteurs de mauvais pronostic		
<i>GSTP1</i>	- Détection des cancers de la prostate		- Facteur prédictif de réponses aux traitements	
<i>ER, AR, PR</i>				- Facteur prédictif de réponses aux traitements

Les études actuelles recherchent une association entre l'hyperméthylation des îlots de CpG des gènes suppresseurs de tumeurs et l'évolution tumorale dans l'idée de prévoir l'évolution et la réponse au traitement (**Tableau 5**). L'hyperméthylation des îlots de CpG pourrait être ainsi utilisée comme un outil en clinique pour détecter et caractériser les cellules cancéreuses dans tous types de liquides biologiques, petits prélèvements comme les biopsies ou dans l'ADN circulant des patients (Esteller *et al.*, 1999; Esteller, 2002; Laird, 2003). Les données les plus abouties concernent les glioblastomes de haut grade et le traitement par un agent alkylant pénétrant la barrière hématoencéphalique, le témozolide. Dans un essai randomisé par l'Organisation Européenne pour la Recherche et le Traitement du Cancer (EORTC) et l'Institut National du Cancer du Canada (NCIC), il a été montré qu'une chimiothérapie par témozolide associée à une radiothérapie concomitante entraîne une réduction du risque de décès de 37% (Stupp *et al.*, 2005). Des recherches biologiques associées ont permis de démontrer que le gain de l'adjonction d'une chimiothérapie alkylante se limite principalement aux patients dont l'expression du gène de réparation *MGMT* est inhibée par hyperméthylation (Esteller *et al.*, 2000; Hegi *et al.*, 2005). Le statut de méthylation de *MGMT* est donc un facteur prédictif du bénéfice du traitement par le témozolide.

Les « méthyloypes » présentent ainsi un intérêt en tant que facteurs diagnostique et pronostique. Cependant, ils restent à être clairement établis car beaucoup de variations sont encore décrites pour les profils de méthylation d'un même type histologique. Deux problèmes semblent être impliqués : d'une part, le panel des gènes étudiés dans un type de tumeur n'est pas encore bien défini ; et d'autre part, diverses méthodes avec des sensibilités et des spécificités différentes sont utilisées pour ne pas évaluer forcément la même région d'un gène, pouvant ainsi donner des résultats hétérogènes.

1.5- MUTATIONS EPIGENETIQUES *VERSUS* MUTATIONS GENETIQUES : PRONOSTIC ET ESPOIRS THERAPEUTIQUES

Les mutations génétiques tout comme les mutations épigénétiques, entraînent des modifications profondes des profils d'expression génique et conduisent à phénotype similaire permettant le développement et la croissance des cellules cancéreuses. Ces deux mécanismes peuvent par ailleurs intervenir seuls ou simultanément. Toutefois des questions importantes se posent : Est-ce que la différence entre ces deux mécanismes d'inactivation ou d'activation génique mène à une différence de croissance tumorale ? Et, est-ce que le pronostic des patients diffère si les gènes clés sont mutés ou « épimutés » ? A travers les années, les scientifiques ont été capables de corrélérer les données sur

Tableau 6. Agents de déméthylation de l'ADN (adaptée de Mulero-Navarro et Esteller, 2008 (Mulero-Navarro et al., 2008)).

Agents de déméthylation de l'ADN	Type	Phase d'étude
5-Azacytidine (azacytidine, Vidaza)	Analogue nucléosidique	Approuvé par la FDA (Cancers hématologiques)
5-Aza-24-deoxycytidine (decitabine, Dacogen)	Analogue nucléosidique	Approuvé par la FDA (Cancers hématologiques)
5,6-Dihydro-5-azacytidine (DHAC)	Analogue nucléosidique	Phase I/II pour les cancers ovariens et lymphomes
Zébularine	Analogue nucléosidique	Préclinique
5-Fluoro-2'-deoxycytidine (FdCyd)	Analogue nucléosidique	Phase I/II
Arabinosyl-5-azacytidine (fazarabine)	Analogue nucléosidique	Phase I/II
Hydralazine (apresoline)	Analogue non-nucléosidique	Phase I pour cancer du col de l'utérus
Procaine (procainamide, novocaïne)	Analogue non-nucléosidique	Préclinique
Epigallocatechin-3-gallate (EGCG)	Analogue non-nucléosidique	Préclinique
Psammaplin A	Analogue non-nucléosidique	Préclinique
MG98 (DNMT1 antisense)	Analogue non-nucléosidique	Phase II pour les tumeurs métastatiques solides
RNAi (DNMT)	Analogue non-nucléosidique	Préclinique
EGX30P (oligonucléotide)	Analogue non-nucléosidique	Préclinique
RG108	Analogue non-nucléosidique	Préclinique

FDA: Food and Drug Administration

les maladies cancéreuses avec les études de certains gènes candidats très fortement étudiés pour leurs mutations géniques et épigénétiques. Une étude récente a ainsi montré que des patients porteurs d'une méthylation aberrante au niveau du promoteur *BRCA1* présentent un pronostic plus mauvais que ceux porteurs de mutations dans ce gène (Chiang *et al.*, 2006). Un mauvais pronostic est également diagnostiqué pour les patients atteints de leucémie lymphoblastique aiguë (LLA) hyperméthylés au niveau du promoteur du gène *p15* (Chim and Kwong, 2006). De plus, les méthylations aberrantes du promoteur du gène *IL12-Rbeta2* ou du promoteur *RRAD* sont des prédictifs d'un mauvais pronostic pour les patients atteints d'un cancer du poumon (Suzuki *et al.*, 2007a; Suzuki *et al.*, 2007b). En définitive, les mutations épigénétiques semblent être plus dangereuses et de moins bons pronostics que les mutations génétiques dans le cancer. Toutefois contrairement aux mutations génétiques irréversibles, les altérations épigénétiques sont potentiellement réversibles, débouchant sur une opportunité pour des interventions thérapeutiques du cancer.

1.6- THERAPIES EPIGENETIQUES ANTI-CANCEREUSES VISANT LA METHYLATION DE L'ADN

Les stratégies thérapeutiques anti-cancéreuses visent actuellement à corriger les erreurs épigénétiques et plus particulièrement les conséquences de l'hyperméthylation. La répression transcriptionnelle des gènes suppresseurs de tumeurs due à cette aberrante méthylation peut être levée à plusieurs niveaux : par l'inhibition de la méthylation de l'ADN d'une part et par l'inhibition des HDAC d'autre part, puisque les changements au niveau de la méthylation de l'ADN sont accompagnés de changements au niveau de la structure chromatinienne. Ainsi des inhibiteurs de DNMT et des HDAC présentant des propriétés anti-cancéreuses et pouvant être utilisés seuls ou en combinaison ont été développés et sont en cours d'évaluation dans des protocoles cliniques (Issa, 2007; Pan *et al.*, 2007). Les inhibiteurs des DNMT présentent par ailleurs un développement clinique plus avancé que les inhibiteurs des HDAC (**Tableau 6**).

Les inhibiteurs de DNMT peuvent être classés en deux groupes : les inhibiteurs nucléosidiques et les inhibiteurs non-nucléosidiques (Lyko and Brown, 2005).

Les inhibiteurs nucléosidiques fonctionnent comme des analogues de nucléosides et peuvent donc s'insérer dans l'ADN en lieu et place de la cytosine mais ne peuvent pas être méthylés. Toute méthylation de l'ADN sera donc ainsi inhibée après division de la cellule (Jones *et al.*, 1983; Worm

and Guldberg, 2002). Ce premier groupe comporte des molécules comme la 5-azacytidine (5-aza-CR ; Vidaza), la 5-aza-2'-déoxycytidine (5-aza-CdR ou décitabine ; Dacogen) et la zébularine.

Les inhibiteurs non-nucléosidiques agissent quant à eux en inhibant les DNMT. L'EGCG (EpiGalloylCatechin-3-O-Gallate), qui n'est autre que le principal composant polyphénol du thé vert, et le RG108 bloquent le site actif de l'enzyme, tandis que la procaine se fixe sur les régions CpG de l'ADN empêchant ainsi la liaison des DNMT à l'ADN.

Toutefois, bien que de nombreux composants soient testés, ceux disponibles dans les traitements sont encore très limités. A ce jour, seules la 5-aza-CdR et la décitabine sont utilisées pour le traitement des tumeurs hématopoïétiques et plus particulièrement les syndromes myélodysplasiques avec 70% de réponses et 35% de rémissions complètes (Oki and Issa, 2007). Pour les tumeurs solides, les premiers essais ont été décevants ; toutefois, de nouvelles approches sont en cours, en employant des doses plus faibles et en combinant un inhibiteur des DNMT à un inhibiteur des HDAC (Mack, 2006).

En dépit de l'avenir très prometteur que présentent ces nouvelles approches thérapeutiques, de nombreux problèmes restent encore à résoudre. En effet, ces inhibiteurs de la méthylation globale montrent une certaine toxicité. Une approche alternative consiste à diminuer spécifiquement le taux de DNMT1 *via* l'utilisation d'oligonucléotides anti-sens (Winqvist *et al.*, 2006). Ces produits sont testés en phase clinique 2 et ne provoqueraient pas de déméthylation globale de l'ADN.

2- IMPLICATION DES PROTEINES A MBD DANS LA CANCEROGENESE

Au vu du rôle clé des protéines à MBD en tant qu'interprètes du signal de méthylation de l'ADN, l'implication de ces protéines dans la cancérogenèse a été suggérée.

2.1- DEREGULATION DE L'EXPRESSION DES PROTEINES A MBD DANS LES CANCERS

En association avec les changements aberrants des profils de méthylation de l'ADN et d'expression génique, des variations relativement importantes du niveau d'expression des protéines à MBD dans les cellules cancéreuses ont été rapportées.

En effet, dans les cancers du sein, les expressions des gènes *MeCP2* et *MBD2* semblent fréquemment altérées (Billard *et al.*, 2002; Muller *et al.*, 2003; Tryndyak *et al.*, 2006b). Le taux de transcrits *MBD2* est significativement augmenté dans les biopsies de tumeurs bénignes. De plus, le niveau d'expression de ce gène semble être corrélé à la taille des tumeurs mammaires malignes, suggérant un rôle de *MBD2* dans la prolifération pathologique de la glande mammaire (Billard *et al.*, 2002). Une dérégulation de l'expression de *MeCP2* semble également fréquente dans les carcinomes mammaires (Billard *et al.*, 2002). Sa surexpression dans les tissus néoplasiques apparaît être associée à la présence des récepteurs aux œstrogènes (Muller *et al.*, 2003). En outre, l'expression des gènes *MBD2* et *MeCP2* est inhibée par un traitement des cellules cancéreuses mammaires MCF7 à l'œstradiol, suggérant un contrôle hormono-dépendant de ces répresseurs (Muller *et al.*, 2003; Vendrell *et al.*, 2005).

Des dérégulations de l'expression (sur- ou sous- expression) des gènes *MBD2* et *MeCP2* ont également été décrites dans plusieurs autres types de cancer tels les cancers colorectaux et gastriques (Kanai *et al.*, 1999; Oue *et al.*, 2001; Fang *et al.*, 2004), les cancers hépatiques (Saito *et al.*, 2001), les cancers du poumon (Muller-Tidow *et al.*, 2001; Sato *et al.*, 2002) et les leucémies lymphoïdes chroniques (Kn *et al.*, 2004). Dans les cellules B de leucémie lymphoïde chronique, le niveau d'expression de *MeCP2* et de *MBD2* est par ailleurs corrélé au niveau d'histones méthyltransférases (Kn *et al.*, 2004), suggérant une dérégulation de l'ensemble de la machinerie épigénétique.

MBD1 serait fortement exprimée dans les tumeurs bénignes et les stades précoces de tumeur de la prostate, puis diminuerait dans les stades plus avancés (Patra *et al.*, 2003).

Un nombre important d'études a donc mis en évidence des dérégulations de l'expression des protéines à MBD dans divers cancers, suggérant ainsi leurs potentielles importances et implications au cours de la tumorigenèse. Les variations d'expression de ces répresseurs transcriptionnels pourraient alors engendrer des régulations aberrantes de certains gènes cibles dans des cellules cancéreuses. Dès lors, la relative dérégulation de l'expression des répresseurs à MBD dans les cancers pourrait se superposer à la désorganisation des profils de méthylation pour accélérer le processus tumoral.

Tableau 7. Fixation des protéines à MBD sur les promoteurs à îlot de CpG hyperméthylés des gènes suppresseurs de tumeurs dans les cancers (adaptée de Lopez-Serra et Esteller, 2008 (Lopez-Serra et al., 2008)).

Protéines à MBD	Gènes cibles
MeCP2	<i>RASSF1A, RARβ2, GSTP1, MGMT, CDH1, CDH13, LTBP3, PARVG, COL11A2</i>
MBD1	<i>GSTP1, SOCS-1, COL11A2, PTPRN, FGF19, RARβ2, CDH1</i>
MBD2	<i>MGMT, p16^{INK4A}, p14^{ARF}, LTBP3, PTPRN, ER1, TIMP3, CDH1, GSTP1, PRLR, PTPN4, BRCA1</i>
MBD3	<i>p21, CHFR, PTPN4</i>
MBD4	<i>p16^{INK4A}, MHL1</i>

2.2- LES GENES A ILOTS DE CPG HYPERMETHYLES REPRIMES PAR LES PROTEINES A MBD DANS LES CANCERS

Les deux principales caractéristiques des protéines à MBD, à savoir leur ciblage spécifique aux sites méthylés et leur propriété de répresseur transcriptionnel, en ont faits des facteurs inactivateurs potentiels et privilégiés des gènes hyperméthylés dans les cellules cancéreuses.

2.2.1- ASSOCIATION DES PROTEINES A MBD AUX ILOTS DE CPG HYPERMETHYLES : DEMONSTRATION D'UNE CERTAINE SPECIFICITE DE CIBLE ET SPECIFICITE CELLULAIRE

Depuis quelques années, plusieurs études ont montré des interactions entre protéines à MBD et îlots de CpG hyperméthylés de gènes associés à la cancérogenèse. La première mise en évidence de la présence de protéines à MBD sur un promoteur hyperméthylé d'un gène dans le cancer a été établie en 2001, quand les Dr Magdinier et Wolffe (Magdinier and Wolffe, 2001) ont identifié la fixation de la protéine MBD2 au promoteur hyperméthylé du gène *p16^{INK4A}* dans des cellules du cancer du colon. Depuis de nombreuses études gènes candidats mais aussi d'approches globales se sont attachées à cartographier les sites de liaison des protéines à MBD sur les promoteurs hyperméthylés dans les cellules cancéreuses (**Tableau 7**) (Nguyen *et al.*, 2001; Bakker *et al.*, 2002; Koizume *et al.*, 2002; Ballestar *et al.*, 2003; Lin and Nelson, 2003; Kondo *et al.*, 2005; Auriol *et al.*, 2005; Lopez-Serra *et al.*, 2006). Pour se faire les techniques d'immunoprécipitation de chromatine (ChIP) et de ChIP-on-chip, soit d'hybridation de l'ADN immunoprécipité par ChIP sur des puces à ADN génomique, ont principalement été utilisées.

Lors d'une analyse des profils de liaison des principaux répresseurs à MBD (MeCP2, MBD2, MBD1 et MBD3) à 22 gènes dans 10 lignées cellulaires cancéreuses humaines différentes, l'équipe du Dr M. Esteller a montré que les protéines à MBD sont spécifiquement associées aux promoteurs à îlot de CpG hyperméthylés et que 89% de ces promoteurs sont fixés par une ou plusieurs protéine(s) à MBD (Lopez-Serra *et al.*, 2006). L'association des protéines à MBD aux promoteurs hyperméthylés apparaît donc être systématique, ce qui confirme la nécessaire intervention de ces interprètes dans le processus répressif associé à la méthylation. Les 11% des promoteurs à îlot de CpG hyperméthylés restants sont sûrement la cible d'autres répresseurs interprètes du signal de méthylation de l'ADN, telles MBD4 ou les protéines de la famille Kaiso.

De plus, plusieurs travaux sur la distribution des protéines à MBD sur divers gènes dans différentes lignées cancéreuses humaines tendent à montrer que les profils d'occupation des protéines à MBD sont promoteurs spécifiques (Ballestar *et al.*, 2003; Lopez-Serra *et al.*, 2006). Ainsi le promoteur *GSTP1* semblent être des cibles spécifiques de MBD2 et celui de *CDH13* une cible spécifique de MeCP2 (Bakker *et al.*, 2002; Ballestar *et al.*, 2003; Lin *et al.*, 2003; Stirzaker *et al.*, 2004; Lopez-Serra *et al.*, 2006). Il existerait donc des spécificités de cibles des protéines à MBD vis-à-vis de certains promoteurs hyperméthylés, quand d'autres séquences semblent attirer de façon aspécifique tous les répresseurs.

En outre, l'ensemble de ces données a démontré que les promoteurs hyperméthylés sont préférentiellement fixés par une seule et unique protéine à MBD plutôt que par plusieurs (Ballestar *et al.*, 2003; Auriol *et al.*, 2005; Lopez-Serra *et al.*, 2006), renforçant ainsi l'hypothèse de l'existence d'une spécificité de cible des protéines à MBD au moins pour certains loci.

Par ailleurs, chaque type cellulaire tendrait à « utiliser » une protéine en particulier indépendamment des concentrations intracellulaires de chaque protéine à MBD. En d'autres termes, la cellule n'« utiliserait » pas préférentiellement la protéine à MBD la plus exprimée (Ballestar *et al.*, 2003; Lopez-Serra *et al.*, 2006).

2.2.2- INACTIVATION DES GENES HYPERMETHYLES PAR LES PROTEINES A MBD

L'implication directe de la fixation des protéines à MBD sur les promoteurs hyperméthylés dans la répression transcriptionnelle des gènes associés n'a été mise en évidence que par la suite. Lors de ces études, des expériences d'ARN interférence (*RNA Interference* ou RNAi) anti-protéine à MBD ont montré une réexpression du gène cible, prouvant ainsi l'implication directe de la protéine à MBD dans la répression transcriptionnelle du gène. Ainsi, par exemple, une relation de cause à effet entre fixation de la protéine MBD2 sur les promoteurs à îlots de CpG hyperméthylés *GSTP1* et *NBR2* et leur inactivation transcriptionnelle dans les cancers a été établie (Bakker *et al.*, 2002; Lin *et al.*, 2003; Auriol *et al.*, 2005). Les conséquences fonctionnelles de l'inactivation ciblée d'une ou de plusieurs protéines à MBD sur le profil d'expression génique global ont également été évaluées dans des cellules HeLa (Lopez-Serra *et al.*, 2008). Des analyses du statut de méthylation de l'ADN et d'immunoprécipitation de chromatine associée aux différentes protéines à MBD ont été réalisées en parallèle de l'analyse sur puce d'expression (*microarrays*) des différents transcriptomes des cellules HeLa n'exprimant plus spécifiquement une ou plusieurs MBD. Les résultats obtenus ont

montré que les fortes réductions en concentration intracellulaire en protéines à MBD conduisent à la réactivation de gènes réprimés par hyperméthylation de leur promoteur (Lopez-Serra *et al.*, 2008). Cette réactivation génique est associée à la perte de fixation des protéines à MBD aux îlots de CpG hyperméthylés et non pas au changement de profil de méthylation de ces régions. Il est par ailleurs intéressant de souligner que l'inactivation des trois principaux répresseurs à MBD (MeCP2, MBD2 et MBD3) n'induit pas un changement massif du profil d'expression génique. En effet, seulement 15 % (967 sur 6386) des gènes sont stimulés suite à cette triple inactivation. De plus, il apparaît que MBD2 est le répresseur méthylation-dépendant réprimant le plus grand nombre de gènes (~ 900 gènes sur 967) (Lopez-Serra *et al.*, 2008).

Ces études démontrent donc les capacités répressives des protéines à MBD sur des promoteurs hyperméthylés dans des lignées tumorales. En définitive, l'hyperméthylation des îlots de CpG suivie de la fixation des protéines à MBD prend une part importante dans l'inactivation génique observée au cours de la cancérogenèse.

2.3- POSSIBLE IMPLICATIONS DES PROTEINES A MBD DANS L'ETABLISSEMENT DES PROFILS ABERRANTS DE METHYLATION DANS LES CELLULES CANCEREUSES

Comme nous l'avons vu précédemment, les mécanismes précis entraînant les changements d'état de méthylation des cellules cancéreuses sont encore mal connus. Des dérégulations de l'activité et de l'expression des DNMTs ont été observées dans certains processus de cancérogenèse, suggérant un rôle de ces enzymes (el-Deiry *et al.*, 1991; Kanai *et al.*, 2001; Ehrlich *et al.*, 2006). Par ailleurs, plusieurs études ont décrit une altération de l'expression des gènes codant les protéines à MBD dans certaines cellules cancéreuses (Kanai *et al.*, 1999; Muller-Tidow *et al.*, 2001; Oue *et al.*, 2001; Sato *et al.*, 2002; Billard *et al.*, 2002; Muller *et al.*, 2003; Patra *et al.*, 2003; Kn *et al.*, 2004; Fang *et al.*, 2004; Tryndyak *et al.*, 2006b). Les protéines à MBD, qui ont des niveaux d'expression variables dans les cancers, pourraient engendrer un recrutement aberrant de DNMTs aux fourches de réplication et ainsi altérer les profils de méthylation.

Par ailleurs, pour élucider les mécanismes responsables de l'initiation de l'hyperméthylation dans les cellules cancéreuses, Strizaker *et al.* (Strizaker *et al.*, 2004) ont étudié les relations temporelles entre la méthylation de l'ADN et les différentes modifications des histones en introduisant par transfections transitoires des vecteurs porteurs de la région promotrice à îlot de CpG du gène *GSTP1* méthylé ou non et/ou transcriptionnellement actif ou inactif (en délétant les

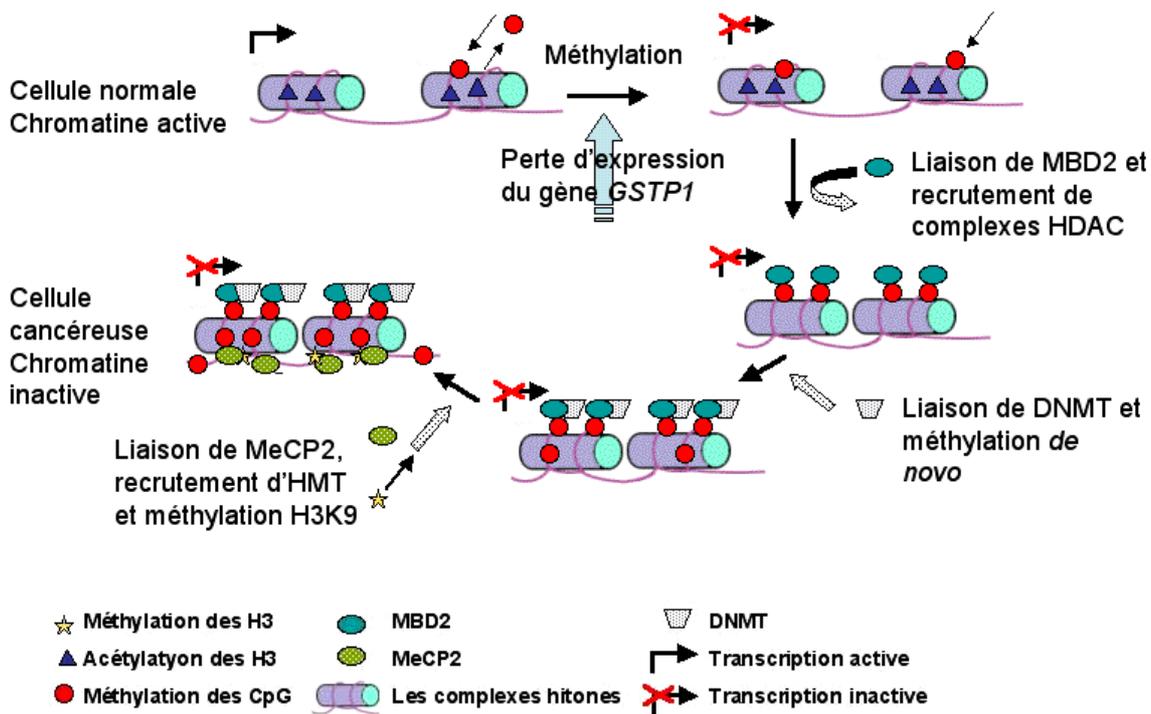


Figure 46. Modèle des processus séquentiels menant à l'hyperméthylation de l'îlot de CpG du gène *GSTP1* (adaptée de Stirzaker *et al.*, 2004 (Stirzaker *et al.*, 2004)).

Dans une cellule saine, les îlots de CpG ne seraient pas méthylés et quand les gènes associés sont activement transcrits, l'absence de méthylation serait alors maintenue par un équilibre de faible méthylation *de novo* et de déméthylation. Cependant, si le gène *GSTP1* dans les cellules de la prostate est inactivé, soit par un manque de facteurs de transcription, soit de façon transitoire, l'équilibre est rompu et le faible niveau de méthylation *de novo* n'est plus contrebalancé par la déméthylation. Cet événement conduit à l'accumulation de la méthylation qui va s'étendre tout le long de l'îlot de CpG à partir des quelques dinucléotides CpG méthylés préexistants. Dès lors, MBD2 fixe l'ADN faiblement méthylé et recrute des complexes HDAC et DNMT. Ce recrutement entraîne la désacétylation des histones et la méthylation *de novo* de l'ADN. MeCP2 peut alors se fixer à l'îlot de CpG hautement méthylé et recruter des HMT. Les HMT méthylent les H3-K9 et consolident la structure chromatinienne inactive.

sites Sp1) dans des cellules cancéreuses de la prostate. La combinaison des résultats obtenus dans cette étude a permis de proposer un modèle expliquant les processus séquentiels menant à l'hyperméthylation des îlots de CpG du promoteur *GSTP1* (**Figure 46**) (Stirzaker *et al.*, 2004).

Dans ce modèle, l'inactivation génique du gène *GSTP1* s'effectue avant le remodelage de la chromatine. Les gènes seraient inactivés aléatoirement et leur inactivation maintenue grâce aux protéines à MBD par la combinaison de l'hyperméthylation de l'ADN et du remodelage de la chromatine. MBD2 se fixe aux dinucléotides CpG méthylés répartis le long du promoteur *GSTP1* et catalyse l'hyperméthylation et le remodelage de la chromatine. MeCP2 interagit alors avec l'ADN hautement méthylé pour renforcer la structure chromatinienne inactive.

Pour conclure, l'ensemble de ces données met en évidence le rôle central de MBD2 dans la mise en place de l'hyperméthylation de l'îlot de CpG *GSTP1* porté par un vecteur. Il serait intéressant de savoir si MBD2 a la même capacité de propagation de la méthylation sur un gène endogène et si d'autres protéines à MBD ont cette propriété.

Cette étude souligne aussi que l'altération de l'expression du gène *MBD2* dans les cellules cancéreuses, outre l'inactivation génique, pourrait conduire à une hyperméthylation.

2.4- LA GENETIQUE, POLYMORPHISMES ET MUTATIONS, DES GENES CODANT LES PROTEINES A MBD DANS LES CANCERS

2.4.1- POLYMORPHISMES DES GENES CODANT LES PROTEINES A MBD, DES PREDISPOSITIONS AU CANCER ?

Des polymorphismes ont été observés au sein des séquences génomiques codant les protéines à MBD. Certains de ces polymorphismes semblent être associés au risque de développer des cancers. Par exemple, dans la population coréenne et chinoise, cinq polymorphismes dont trois : -634G>A, -501delT, et Pro(401)Ala, décrits dans la région promotrice du gène *MBD1* et deux dans la région codante : rs125555 et rs140689, semblent prédisposés génétiquement au cancer du poumon et plus particulièrement aux adénocarcinomes (Jang *et al.*, 2005;Liu *et al.*, 2008). A l'opposé, deux variations génétiques rares d'une seule paire de base (*Single Nucleotide Polymorphisms* ou SNPs) : rs1259938 et rs609791, génotypées dans le gène *MBD2* seraient associées à un faible risque de développer un cancer du sein chez les femmes pré-ménopausées caucasiennes (Zhu *et al.*, 2005).

Toutefois, très peu de mutations des gènes codant les répresseurs à MBD ont été observées dans les cancers (Bader *et al.*, 2003;Zhu *et al.*, 2004), à l'exception de *MBD4*.

2.4.2- ANALYSES DES MUTATIONS *MBD4* DANS LES CANCERS : *MBD4*, UN GENE SUPPRESSEUR DE TUMEUR ?

Des mutations inactivatrices de *MBD4* ont été observées dans 20 % à 43 % des cancers humains colorectaux, gastriques, pancréatiques et de l'endomètre présentant une instabilité des séquences microsatellites (MSI) (Bader *et al.*, 1999;Riccio *et al.*, 1999;Menoyo *et al.*, 2001;Yamada *et al.*, 2002;Evertson *et al.*, 2003). Ces mutations touchent les séquences microsatellites poly-adénines (A₁₀) présentes dans la région codante du gène *MBD4* et provoquent par l'addition ou la délétion d'adénines un décalage du cadre de lecture au sein de la séquence codante. Une protéine tronquée de son domaine glycosylase carboxy-terminal, jouant un rôle dominant négatif, est ainsi synthétisée (Bader *et al.*, 2007). Un nombre important de ces cancers est corrélé à un système MMR (MisMatch Repair, système de réparation des mésappariements) défectif. Toutefois, des analyses complémentaires suggèrent que les mutations de *MBD4* sont davantage la conséquence plutôt que la cause d'une déficience du système MMR (Bader *et al.*, 1999;Pinto *et al.*, 2008). *MBD4* n'aurait donc pas un rôle primaire dans la tumorigenèse.

Néanmoins, des études chez la souris ont apporté des éléments en faveur d'une implication des mutations de *Mbd4* dans le processus de tumorigenèse. Bien que les souris nulles *Mbd4* soient viables, une augmentation des transitions 5mCpG : TpA des sites 5mCpG a été observée (Wong *et al.*, 2002). Malgré cette augmentation de mutabilité, ces souris ne développent pas plus de cancers que les souris sauvages. L'absence de *Mbd4* seule n'entraîne donc pas de cancers à MSI dans le génome murin. En revanche, chez les souris *Apc*^{Min/+} (Min), qui ont une prédisposition au développement de cancers colorectaux, l'absence de *Mbd4* accroît le nombre de tumeurs et active la progression tumorale du tractus gastro-intestinal. Ce phénotype est associé à une augmentation des transitions mutationnelles 5mCpG : TpA des sites 5mCpG de la séquence codante de l'allèle sauvage *Apc*, entraînant son inactivation (Wong *et al.*, 2002). De plus dans des cellules humaines du cancer du colon, l'expression de la protéine *MBD4* tronquée semble augmenter le spectre mutationnel et prédisposer les cellules à des translocations réciproques chromosomiques (Bader *et al.*, 2007;Abdel-Rahman *et al.*, 2008).

L'inactivation de *MBD4* pourrait donc moduler le spectre mutationnel durant la tumorigenèse et influencer la progression tumorale (Wong *et al.*, 2002;Bader *et al.*, 2007;Abdel-Rahman *et al.*, 2008). Dès lors, il a été proposé que *MBD4* soit un gène suppresseur de tumeur (Clarke and

Sansom, 2003). Le fait d'observer un défaut d'arrêt du cycle cellulaire dans les cellules MEF dérivées de souris *Mbd4*^{-/-} va dans le sens d'une telle fonction (Cortellino *et al.*, 2003).

3- MBD2 ET TUMORIGENESE

D'après toutes ces données, MBD2 semble être la protéine à MBD majoritairement impliquée dans la tumorigenèse. En effet, des dérégulations de son expression ont été observées dans différents cancers (Kanai *et al.*, 1999;Muller-Tidow *et al.*, 2001;Oue *et al.*, 2001;Sato *et al.*, 2002;Billard *et al.*, 2002;Muller *et al.*, 2003;Kn *et al.*, 2004;Fang *et al.*, 2004;Tryndyak *et al.*, 2006b). De plus, cette protéine semble être liée à de très nombreux gènes suppresseurs de tumeurs et apparaît être le répresseur méthylation-dépendant réprimant le plus grand nombre de gènes dans les cancers (Ballestar *et al.*, 2003;Lopez-Serra *et al.*, 2006;Lopez-Serra *et al.*, 2008). En outre, cette protéine serait impliquée dans la mise en place des profils aberrants de méthylation dans les cellules cancéreuses (Stirzaker *et al.*, 2004). Par ailleurs, le rôle de MBD2 dans la stimulation de la prolifération des cellules cancéreuses a été mis en évidence par plusieurs études, démontrant l'implication de MBD2 dans de la tumorigénicité (Slack *et al.*, 2002;Sansom *et al.*, 2003;Campbell *et al.*, 2004).

L'inactivation de l'expression de *MBD2* par ARN anti-sens inhibe la formation de colonies dans un milieu semi-solide, une caractéristique des cellules transformées. Ces données furent les premières à mettre en évidence un rôle de MBD2 dès les premiers stades de la tumorigenèse dans la perte de la dépendance à l'ancrage de la prolifération cellulaire (Slack *et al.*, 2002).

Cette observation a été confirmée par une étude *in vivo*, lors de laquelle des souris prédisposées à développer des néoplasies intestinales fatales (souris *Apc*^{Min/+}) ont été croisées avec des souris invalidées pour le gène *Mbd2* (Sansom *et al.*, 2003). Les souris *Apc*^{Min/+} aussi dénommées souris Min sont hétérozygotes pour le gène suppresseur de tumeur *Apc* (*adenomatous polyposis coli*). La perte d'expression de *Mbd2* chez ces souris a un rôle protecteur contre le risque de développer des cancers intestinaux (Sansom *et al.*, 2003). Les souris Min *Mbd2*^{-/-} ou Min *Mbd2*^{+/-} développent peu d'adénomes et de cancers intestinaux par rapport aux souris Min. Elles voient ainsi leur durée de vie s'allonger. Cet effet est, de plus, proportionnel au nombre de copies du gène *Mdb2* invalidées. En outre, la taille des tumeurs de ces souris est diminuée par rapport à celle observée dans les souris Min. L'ensemble des ces données suggèrent donc une implication de *Mbd2* dans la prolifération des

cellules tumorales. Par ailleurs, ces souris présentent une augmentation de la méthylation des îlots de CpG. Néanmoins, l'hyperméthylation de l'îlot de CpG de l'allèle *Apc*, qui est observée dans les cancers du colon humains, n'est pas observé chez ces souris. Des résultats très controversés proposaient que MBD2 possédait une activité déméthylase (Bhattacharya *et al.*, 1999). Cependant, il semble que l'augmentation de la méthylation soit davantage due à un phénomène de compensation de l'absence de MBD2. Une étude précédente a montré que la tumorigenèse chez les souris Min est également dépendante de Dnmt1 (Laird *et al.*, 1995; Eads *et al.*, 2002). La double dépendance à Mbd2 et Dnmt1 démontre que le phénotype observé chez les souris Min en absence de MBD2 est méthylation-dépendant.

L'équipe du Dr Clarke a poussé ces recherches plus loin et a apporté une explication mécanistique au contrôle épigénétique de la formation de néoplasies intestinales chez les souris Min (Pheesse *et al.*, 2008). L'analyse du transcriptome par microarray du tissu intestinal (petit intestin) de souris invalidées conditionnellement pour le gène *Apc* a montré une suppression partielle de la voie Wnt lorsque ces dernières étaient croisées à des souris *Mbd2*^{-/-}. Dans un contexte *Apc* nul, la déficience en Mbd2 participe à la stimulation de l'expression de gènes cibles de Wnt dont *Lect2*. Ce dernier gène est méthylé et fixé par Mbd2 dans le tissu intestinal de souris. De plus, il apparaît être un répresseur de la voie de signalisation Wnt. La voie de signalisation Wnt joue un rôle clé dans le développement et l'organisation normale de l'intestin. En amont de la voie de signalisation Wnt se trouve le gène *APC*. L'invalidation de ce gène entraîne la dérégulation de la voie Wnt qui conduit à une prolifération anormale des cellules du tissu intestinal. Dans ce contexte, l'inactivation de MBD2 permettrait de lever la répression transcriptionnelle de certains répresseurs de la voie Wnt, tel que *Lect2*, de rétablir la signalisation cellulaire Wnt dépendante et de stopper la prolifération anormale des cellules intestinales (Pheesse *et al.*, 2008).

Une étude plus récente a également montré que l'inactivation de MBD2 par ARN anti-sens inhibe la croissance *in vitro* de lignées cellulaires humaines de cancer du poumon ou de cancer colorectal. Cette inactivation spécifique inhibe également la croissance tumorale *in vivo* des ces cellules cancéreuses humaines greffées à des souris « nude » (Campbell *et al.*, 2004). Lorsque les cellules cancéreuses humaines, prétraitées aux anti-sens MBD2, ont été implantées aux souris, une inhibition de l'implantation tumorale a été observée. Dans le cas où les cellules ont été implantées aux souris, puis ces souris traitées par injection d'anti-sens MBD2, une régression tumorale a été observée. De plus, un traitement couplé avec un anti-mitotique, la bléomycine, montre un effet additif sur la régression tumorale (Ivanov *et al.*, 2003). En parallèle, la toxicité d'un tel traitement a été testée. Les oligonucléotides anti-sens MBD2 n'affectent ni la croissance des cellules saines ou

des cellules non transformées, ni les paramètres du cycle cellulaire *in vitro*. Ils ne présentent pas non plus d'effets toxiques *in vivo*. Ces expériences mettent donc en évidence le rôle de MBD2 dans la tumorigenèse des cancers humains, ainsi que son importance en thérapie comme agent anti-tumoral.

En outre, des tests *in vitro* de migration et d'invasion en chambres de Boyden, réalisés avec des cellules cancéreuses invasives de cancer de la prostate, PC-3, ont montré que la déplétion en MBD2 par ARN anti-sens, réduit la capacité invasive et migratoire de ces cellules (Shukeir *et al.*, 2006). L'analyse de l'expression de certains gènes connus pour leur implication dans la progression tumorale des cellules PC-3, a révélé une inhibition de la transcription des gènes *VEGF* (*Vascular Endothelial Growth Factor*) et *MMP-2* (*Matrix MetalloProteinase-2*) impliqués dans la néoangiogenèse et d'un marqueur métastatique uPA (*Urokinase-type plasminogen activator*) dans les cellules traitées par ARN anti-sens *MBD2*. Une diminution du niveau de molécules appartenant aux voies de signalisation de l'angiogenèse (CD31) et de survie cellulaire (pAkt) a également été observée lors de l'étude immunohistochimique de tumeurs issues de xéno greffes de cellules PC-3, traitées aux anti-sens *MBD2*, dans des souris BALB/c nu/nu. Le répresseur *MBD2* interviendrait donc également dans le potentiel invasif et métastatique des cellules malignes.

En définitive, la protéine *MBD2* posséderait un rôle central et important au cours de la tumorigenèse. L'ensemble de ces données montre en effet, son intervention dès les premiers stades de la tumorigenèse dans la perte de la dépendance à l'ancrage de la prolifération cellulaire, puis dans la croissance et l'implantation tumorale et enfin dans le pouvoir métastatique et invasif des tumeurs.

Cette propension à lier et à réprimer des gènes suppresseurs de tumeurs, combinée à la possible dérégulation de l'expression des répresseurs à *MBD* dans les cancers, fait de ces protéines et plus particulièrement de *MBD2* de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles en cancérologie.

4- LES PROTEINES A MBD, DIAGNOSTIC ET THERAPIE

4.1- LES PROTEINES A MBD, UN OUTIL POUR IDENTIFIER DE NOUVEAUX GENES HYPERMETHYLES DANS LES CELLULES CANCEREUSES

La propriété des protéines à MBD à s'associer aux séquences méthylées et à les réprimer transcriptionnellement a été utilisée pour identifier des nouvelles cibles de l'inactivation épigénétique (nouveaux gènes à îlot de CpG hyperméthylés) dans les cancers humains. Une banque à ADN fut constituée à partir de CHIP réalisées sur des lignées cellulaires cancéreuses mammaires avec des anticorps dirigés contre les protéines à MBD. Par le criblage sur puce à ADN de cette banque, des gènes tels que *PAX6*, un gène à homéoboite, le gène codant le récepteur de la prolactine, et le gène codant la dipeptidylpeptidase IV ont été révélés comme des gènes candidats à îlots de CpG hyperméthylés dans le cancer du sein humain (Ballestar *et al.*, 2003).

Ainsi, comme il l'a été mentionné dans le paragraphe 1.4, une meilleure connaissance du profil de méthylation des patients permettrait un diagnostic rapide et facile du type de tumeur. Par exemple, les tumeurs ayant un répresseur métastatique réprimé tels que l'*E-cadhérine* ou *DAPK* auront un caractère plus invasif.

4.2- LES PROTEINES A MBD, DES CIBLES PROMETTEUSES POUR DES THERAPIES ANTI-CANCEREUSES

Au vue de leur implication dans la cancérogenèse, les protéines à MBD, de la même manière que la méthylation de l'ADN en elle même, pourraient être des cibles pour des traitements anticancéreux.

4.2.1- POURQUOI CIBLER SPECIFIQUEMENT MBD2 ? LEÇONS TIREES DES SOURIS INVALIDEES POUR LES GENES CODANT LES PROTEINES A MBD

La génération de souris nullizigotes *Mecp2*, *Mbd1*, *Mbd2*, *Mbd3*, ou *Mbd4* a montré que chacune de ces protéines possèdent une fonction spécifique qui ne peut pas être compensée par d'autres protéines (Hendrich *et al.*, 2001; Guy *et al.*, 2001; Wong *et al.*, 2002; Zhao *et al.*, 2003). Ces résultats suggèrent donc qu'une inactivation ciblée est envisageable. Toutefois, seule l'inactivation de *MBD2* a été à ce jour considérée. En effet, en dehors de son rôle central dans la tumorigenèse par rapport aux autres protéines à MBD, l'inactivation spécifique de *MBD2* semble être l'inactivation

conduisant à la plus faible incidence phénotypique. L'invalidation de *MeCP2* entraîne peu de variations d'expression génique (Tudor *et al.*, 2002; Matarazzo and Ronnett, 2004). Toutefois, la perte fonctionnelle de cette protéine conduit à des désordres neuro-fonctionnels lourds chez la souris, assimilés au syndrome de Rett chez l'Homme (Amir *et al.*, 1999; Guy *et al.*, 2001). MBD1 posséderait également un rôle dans la régulation du développement cérébral. Chez la souris, l'invalidation de *Mbd1* nous suggère son rôle dans la neurogénèse hippocampique adulte, une fonction nécessaire aux mécanismes de mémorisation (Zhao *et al.*, 2003). De plus, l'analyse du transcriptome de cellules souches neuronales adultes murines *Mbd1*^{-/-} montre une sur-expression des rétrovirus endogènes IAP qui pourrait en partie expliquer l'aneuploïdie élevée de ces cellules (Zhao *et al.*, 2003). MBD3 est un membre du complexe HDAC Mi-2/NurD intervenant non seulement dans la répression transcriptionnelle méthylation-dépendante mais également dans le processus de répression transcriptionnelle général. Son invalidation aurait donc un impact majeur sur l'expression génique et semble inenvisageable. L'invalidation de *Mbd3* chez la souris est ainsi létale avant l'étape de neurulation chez la souris (Hendrich *et al.*, 2001). Enfin, l'invalidation de MBD4 augmente le spectre mutationnel (voir paragraphe 2.4.4 ci-dessus) (Wong *et al.*, 2002; Bader *et al.*, 2007; Abdel-Rahman *et al.*, 2008). Au vu de toutes ces données apportées par les souris invalidées pour les gènes codant les protéines MeCP2, MBD1, MBD3 et MBD4, l'inactivation ciblée de chacune de ces protéines ne semble pas possible pour des traitements anti-cancéreux. Les effets secondaires seraient sans doute trop sévères. L'invalidation du gène *Mbd2*, en revanche, est viable chez la souris et conduit à peu d'anomalies chez l'adulte (Hendrich *et al.*, 2001; Hutchins *et al.*, 2002). Seule une anomalie du comportement maternel et une expression ectopique du gène codant l'interleukine 4 dans les lymphocytes T CD4⁺ (T helper), corrélée à un défaut de différenciation de ces cellules, ont été observées. Toutefois ces phénotypes restent beaucoup moins sévères que ceux observés lors de l'invalidation des autres protéines à MBD. En outre, cette invalidation a la caractéristique avantageuse de présenter un rôle protecteur contre le risque de développer des cancers intestinaux chez les souris *ApC*^{Min/+} (Sansom *et al.*, 2003). De plus, l'équipe de M. Szif, qui a développé une stratégie thérapeutique à l'aide d'ARN anti-sens dirigés contre les transcrits *Mbd2*, a montré que des injections de ces ARN chez la souris nude ont un fort effet anti-tumoral sur des tumeurs intestinales et pulmonaires greffées et n'ont révélé aucune toxicité vis-à-vis des cellules non tumorales murines (Campbell *et al.*, 2004).

4.2.2- AVANTAGES DE L'INVALIDATION SPECIFIQUE DE MBD2 PAR RAPPORT AUX TRAITEMENTS HYPOMETHYLANTS

L'absence de Dnmt1 entraîne une létalité embryonnaire chez les souris alors que les souris *Mbd2* nulles sont viables et fertiles. Par ailleurs, il a été montré que l'invalidation de *Mbd2* n'accélère pas le développement des lymphomes des souris *p53*^{-/-} ou *p53*^{-/+} contrairement à ce qui est observé lors d'une baisse du taux de méthylation de l'ADN (Sansom *et al.*, 2005).

En outre, les invalidations de *MBD2*, chez la souris ou transitoire dans des cellules cancéreuses, ont montré que l'absence de cette protéine ne conduit pas à une modification générale de la transcription contrairement à ce qui est observé lors de l'utilisation des inhibiteurs de la méthylation à spectre large comme la 5-aza-CdR (Berger *et al.*, 2007; Lopez-Serra *et al.*, 2008). Son inhibition apparaît alors avoir une conséquence spécifique et non globale sur l'expression génique, relativement restreinte sur l'organisme et une faible toxicité. L'inhibition ciblée de la protéine MBD2 pourrait ainsi être une alternative aux thérapies déméthylantes pour le traitement des cancers, dans la mesure où il existerait chez ce facteur une certaine spécificité de cibles.

Ainsi, l'inactivation ciblée des protéines à MBD, et plus spécifiquement de MBD2, par une technique d'interférence à l'ARN ou d'ARN anti-sens spécifique, permettrait donc un traitement ciblé conduisant à la réactivation de certains gènes réprimés, à l'inhibition de la croissance tumorale, mais également à la prévention de la mise en place de l'hyperméthylation des îlots de CpG.

Pour le développement d'une telle stratégie thérapeutique, moins lourde et alternative aux traitements impliquant des agents déméthylants généraux, l'inhibition des interprètes de la méthylation, et plus spécifiquement de MBD2, pourrait être envisagée, dans la mesure où une spécificité de séquences cibles existerait chez ces facteurs. Aussi, dans la perspective du développement d'un tel outil thérapeutique, la recherche d'une spécificité des répresseurs à MBD, l'analyse, le cas échéant, des mécanismes de cette spécificité, ainsi que la recherche de tous leurs gènes semblent nécessaires.

5- BILAN DE SPECIFICITE DES PROTEINES A MBD

5.1- SPECIFICITE DE SEQUENCES

La liaison des protéines à MBD, *via* leur domaine MBD, s'effectue sur les dinucléotides CpG méthylés de façon séquence-indépendante (Hendrich and Bird, 1998; Fraga *et al.*, 2003). Toutefois, cette observation a été nuancée par deux études (Fraga *et al.*, 2003; Klose *et al.*, 2005). En effet, la liaison de MeCP2 semble être favorisée par la présence de séquence A/T adjacentes aux CpG méthylés (Klose and Bird, 2004). De plus, une technique d'électromobilité sur capillaires permettant de mesurer l'affinité des protéines à MBD pour différentes séquences a montré que la densité et le nombre de CpG méthylés sont des paramètres importants alors que le contexte de séquence aurait un effet tout relatif (Fraga *et al.*, 2003). La même constatation a été faite par Stirzaker *et al.* (Stirzaker *et al.*, 2004), avec des transgènes *GSTP1* différenciellement méthylés. Seule MBD2 est présente sur des transgènes faiblement méthylés, quand MeCP2 vient à son tour s'y fixer lorsque ceux-ci sont fortement méthylés.

En définitive, aucune spécificité de séquences proprement dite n'a été à ce jour identifiée pour les protéines MBD à l'exception de MeCP2. Cependant, les études globales de la distribution des protéines à MBD, menées dans des cellules cancéreuses, montrent que près de 50% des sites méthylés analysés ne sont occupés que par une seule et unique protéine à MBD (Ballestar *et al.*, 2003; Lopez-Serra *et al.*, 2006).

5.2- SPECIFICITES DE CIBLES

5.2.1- PLUSIEURS PROTEINES SUR UN MEME LOCUS : REDONDANCE POUR UNE INACTIVATION TRANSCRIPTIONNELLE TOTALE ?

Les profils de localisation nucléaire des protéines à MBD sont semblables, montrant une fixation majoritaire dans les foyers d'hétérochromatine (Hendrich *et al.*, 1998; Fujita *et al.*, 1999). L'analyse par CHIP de la répartition de ces protéines sur les séquences satellites *Sat2* et *NBL2* montre d'ailleurs la présence des quatre principaux répresseurs MBD1, MBD2, MBD3 et MeCP2 sur ces régions riches en CpG méthylés (Ballestar *et al.*, 2003). Il semble en être de même pour les portions régulatrices fortement méthylées des gènes soumis à l'empreinte ou de certains gènes impliqués dans la cancérogenèse (Lopez-Serra *et al.*, 2006). Matarazzo *et al.* montrent également par CHIP suivis d'autres CHIP (CHIP reCHIP) que les protéines MeCP2, MBD2 et MBD3 peuvent fixer simultanément le promoteur du gène à copie unique *SYBL1*. La protéine Kaiso ainsi qu'un

complexe polycombe PRC2 impliqué dans la répression transcriptionnelle semblent également pouvoir occuper le promoteur de ce gène. Ainsi, il semble que deux mécanismes soient mis en place afin de garantir le verrouillage de cette cible, soit par une redondance des protéines à MBD soit par l'action d'autres protéines de liaison à l'ADN ou complexe.

Toutes ces données suggèrent l'importance de la méthylation et de la subséquente inactivation de certaines cibles. Une certaine redondance entre ces différents répresseurs semble alors nécessaire pour assurer et maintenir une inactivation totale de ces séquences.

Par ailleurs, les études d'inactivation de gènes codant les protéines à MBD menées chez la souris montrent que leur déficience, à l'exception de *Mbd3*, ne provoque pas de létalité embryonnaire (Hendrich *et al.*, 2001; Guy *et al.*, 2001; Wong *et al.*, 2002; Zhao *et al.*, 2003), suggérant une compensation ou redondance fonctionnelle entre les membres de la famille. De plus, les analyses des transcriptomes de certains tissus de souris *Mecp2*^{-/-}, *Mbd2*^{-/-} et *Mbd1*^{-/-}, ne montrent aucun changement significatif de l'expression génique globale par rapport aux transcriptomes des souris témoins (Tudor *et al.*, 2002; Zhao *et al.*, 2003; Matarazzo *et al.*, 2004; Berger *et al.*, 2007). Seuls quelques gènes sont dérégulés. Ceci reste donc en faveur d'une redondance entre ces protéines à MBD. Toutefois, une certaine spécificité pour quelques gènes est à noter.

En outre, les souris hétérozygotes et nullizygotés pour les protéines à MBD ont révélé des différences phénotypiques comme nous l'avons vu dans le paragraphe 4.2.1. De plus, différents doubles mutants ont été créés. Seul le double mutant *Mbd2*^{-/-} *Mbd3*^{-/-} présente un phénotype aggravé par rapport aux simples mutants, du à la participation des protéines *Mbd2* et *Mbd3* à des fonctions cellulaires communes (Hendrich *et al.*, 2001). Les doubles invalidations *Mecp2* et *Mbd2* ne donnent aucune aggravation des phénotypes, laissant supposer que ces protéines ne partagent pas les mêmes fonctions (Guy *et al.*, 2001; Martin, I *et al.*, 2009).

Ainsi, il semble que les protéines à MBD possèdent des spécificités tissulaires et fonctionnelles même si certains phénomènes de redondance ne peuvent être exclus. Dans ce cadre, il doit exister un ensemble de cibles aspécifiques où plusieurs protéines peuvent être retrouvées et de cibles spécifiques d'une protéine à MBD.

5.2.2- UNE SEULE ET UNIQUE PROTEINE A MBD POUR UN LOCUS SPECIFIQUE

Des approches gènes candidats mais aussi des approches globales démontrent une régulation spécifique de certaines cibles par une protéine à MBD particulière (Bakker *et al.*, 2002; Auriol *et al.*, 2005; Lopez-Serra *et al.*, 2006).

Bakker *et al.* démontrent par ChIP que, dans les cancers hépato-cellulaires humains, le promoteur de *GSTP1* est hyperméthylé et que seule la protéine MBD2 vient se fixer sur ce promoteur afin d'initier la répression de ce gène (Bakker *et al.*, 2002). De même d'autres gènes suppresseurs de tumeurs voient leurs promoteurs hyperméthylés occupés par une unique protéine à MBD. De nombreux exemples sont donnés par l'étude de Lopez-Serra *et al.* (Lopez-Serra *et al.*, 2006). Parmi ceux-ci, MBD1 se fixe spécifiquement sur le promoteur de *p16* dans les cellules H1299 et le promoteur de *RASSF1A* dans les cellules MCF7.

De plus, MBD2 lie le promoteur *BRCA1-NBR2* et en absence de cette protéine aucune autre protéine à MBD ne vient la remplacer sur ce site (Auriol *et al.*, 2005).

En définitive, la liaison d'une seule protéine à MBD sur un locus révèle qu'il existe des spécificités de cibles pour ces protéines répressives. Ne possédant aucune spécificité de séquence apparente (du moins connue à ce jour), deux hypothèses ont été émises pour expliquer ce phénomène, en particulier les concentrations relatives des protéines à MBD et l'existence de facteurs de ciblage.

5.3- COMMENT EXPLIQUER LES SPECIFICITES DE CIBLES ?

5.3.1- EFFETS DE CONCENTRATION

Il a été suggéré que les quantités intracellulaires des protéines à MBD étaient inférieures au nombre de CpG méthylés (Bird and Wolffe, 1999). Les concentrations relatives de ces protéines pourraient donc être un facteur important pour leur fixation à certaines séquences. Toutes les protéines à MBD sont ubiquitaires dans les cellules somatiques avec cependant une différence de distribution selon les tissus et les observations réalisées dans les souris invalidées pour les protéines à MBD pourraient être en faveur d'une telle théorie. En effet, MeCP2 est le répresseur le plus abondant dans le système nerveux central et son invalidation conduit à un phénotype sévère, qui

semble strictement lié à la fonction nerveuse (Meehan *et al.*, 1992;Ng *et al.*, 1999;Guy *et al.*, 2001;Chen *et al.*, 2001).

Toutefois, les effets de concentrations ne suffisent pas à expliquer toutes les spécificités de cibles. Comme il l'a été dit précédemment, les cellules cancéreuses tendraient à utiliser une protéine à MBD particulière mais indépendamment des concentrations intracellulaires de chacune (Ballestar *et al.*, 2003;Lopez-Serra *et al.*, 2006). De plus, une étude réalisée par notre équipe a montré que dans des cellules HeLa déficientes en MBD2, la protéine MeCP2 ne se fixe pas au promoteur *BRCA1-NBR2* cible du répresseur MBD2 (Auriol *et al.*, 2005). Dès lors, l'abondance relative des protéines à MBD ne peuvent expliquer à elle seule la fixation exclusive d'une protéine à MBD à un gène spécifique. Ce fut la première démonstration de l'existence d'une réelle spécificité d'une protéine à MBD pour une région génomique, allant dans le sens de la théorie « un gène - une protéine à MBD ». Néanmoins, il est à noter qu'une surexpression exogène de Mecp2, à des concentrations non physiologiques, dans les ces cellules HeLa n'exprimant plus MBD2, entraîne (force) sa liaison à la région *BRCA1-NBR2* (Auriol *et al.*, 2005). Ainsi, l'environnement dans lequel se trouvent les protéines à MBD peut influencer leur fixation. Des facteurs nucléaires pourraient ainsi diriger les protéines à MBD sur des cibles spécifiques.

5.3.2- FACTEURS DE CIBLAGE

Plusieurs études montrent que les protéines à MBD peuvent interagir avec des co-répresseurs spécifiques de séquences. Ces partenaires pourraient donc « guider » les protéines à MBD sur certaines cibles.

Ainsi, par double hybride et co-immunoprécipitation, la protéine MiZF a été identifiée comme partenaire de MBD2 (Sekimata *et al.*, 2001). L'association de la protéine MBD2 à ce facteur augmenterait ses capacités répressives HDAC-dépendantes dans un système GAL-4. Par ailleurs, une co-localisation partielle des deux protéines est observée dans des cellules COS7 (Sekimata *et al.*, 2001). MiZF reconnaît, *via* ses motifs en doigt de zinc, une séquence consensus CGGAC notamment présente dans le promoteur du gène du rétinoblastome (Rb). Par cette liaison spécifique MiZF réprime l'expression du gène *Rb* (Sekimata and Homma, 2004). Néanmoins, la possible implication du répresseur MBD2 dans ce processus de répression ainsi que le recrutement de ce dernier par MiZF à proximité de ces séquences consensus reste à vérifier.

De même, des facteurs de transcription possédant des sites de liaison spécifiques peuvent s'associer aux protéines à MBD. Ainsi, la protéine GATA-1 peut se fixer spécifiquement sur le locus *GATA-2* et pourrait participer au recrutement du complexe MeCP1. Des expériences de spectrométrie de masse et d'immunoprécipitation ont montré une association entre ce facteur de transcription et ce complexe HDAC contenant MBD2. De plus, des expériences de ChIP ont confirmés *in vivo*, dans des cellules MEL, leur co-localisation sur le promoteur *GATA-2* (Rodriguez *et al.*, 2005). De la même façon, une association entre le facteur de transcription PU.1, MeCP2 et le complexe mSin3A-HDAC sur le gène de la β -globine a été démontré par Suzuki *et al.* (Suzuki *et al.*, 2003).

Enfin, les siRNA, qui s'hybrident avec leurs cibles complémentaires semblent aussi être des partenaires des protéines à MBD. En effet, les protéines MBD2 et MeCP2 présentent une région riche en arginines et glycines donc sont susceptibles d'interagir avec l'ARN. Après incubation d'ARN messager avec les protéines à MBD purifiées, Jeffery *et al.* (Jeffery and Nakielny, 2004) montrent qu'un complexe protéine-ARN ou -ribo-nucléo protéiques (RNP) s'est formé. De même, les protéines à MBD sont capables de former un complexe RNP avec les siRNA.

Ainsi, les associations des protéines à MBD à des co-facteurs, facteurs de transcription et siRNA de ciblage pourraient être à l'origine de leur ciblage et participeraient à leur spécificité de cibles. En revanche, l'implication de ces interactions dans un tel ciblage reste à vérifier.

5.4- BILAN DE SPECIFICITE

Il semble qu'une collaboration existe entre les répresseurs à MBD pour une régulation globale de la transcription, sans doute majoritairement au niveau des foyers d'hétérochromatine constitutive, avec lesquels ils co-localisent pour abaisser l'expression basale de rétroéléments et compacter la chromatine. Mais ceci n'exclut pas une régulation spécifique de certains gènes de l'euchromatine, propre à chaque protéine à MBD, à l'image de chaque facteur de transcription. Le recrutement de ces protéines sur leurs séquences cibles serait alors du à la combinaison complexe de spécificité de séquences, d'effets de concentration intracellulaire d'une protéine à MBD par rapport à une autre et d'intervention de facteurs nucléaires. De plus, la redondance des protéines à MBD ou leurs spécificités semblent dépendantes du tissu et du gène considérés.

6- CONCLUSION

L'implication des protéines à MBD - MeCP2, MBD1, MBD2, MBD3 et MBD4 - dans l'établissement et le maintien de la répression transcriptionnelle des séquences méthylées, dans la conservation du profil de méthylation de l'ADN, ou dans l'intégrité du génome, a permis de déterminer un lien entre ces protéines et la cancérogenèse.

Le rôle de ces protéines dans la répression transcriptionnelle est aujourd'hui clairement établi. Ces protéines ont la capacité de réguler l'expression des gènes principalement *via* le recrutement sur les séquences méthylées de complexes affectant la structure chromatinienne. Dans les cellules tumorales, les protéines à MBD sont retrouvées sur les îlots de CpG hyperméthylés. Elles participent ainsi à la répression transcriptionnelle de gènes suppresseurs de tumeurs, de gènes impliqués dans la réparation de l'ADN et de gènes impliqués dans les processus métastatiques.

L'implication des protéines à MBD dans le maintien des profils de méthylation et de répression a également été déterminée par des associations entre les protéines à MBD et DNMT1 ou HMT au niveau des fourches de réplication pendant la phase S. En conséquence, les altérations de l'expression des gènes codant les protéines à MBD décrites dans plusieurs cancers pourraient alors engendrer des modifications des profils de méthylation telle l'hyperméthylation dans les cellules cancéreuses.

L'inactivation ou l'altération de l'expression des gènes codant les protéines MBD1 et MBD4 impliquées dans la réparation de l'ADN est une cause d'hypermutabilité qui influence la progression tumorale. Cette inactivation ou altération pour MBD1 est aussi responsable de la levée de la répression de certains gènes. Ainsi l'expression ectopique d'oncogènes ou de rétroéléments entraîne des processus de cancérogenèse et une instabilité génomique.

Ces protéines ont donc des fonctions régulatrices majeures, qui altérées, auraient un rôle dans la cancérogenèse.

A l'heure actuelle, les données disponibles pour comprendre le lien entre les cinq protéines à MBD et la cancérogenèse ont ouvert de nouveaux horizons thérapeutiques.

De nombreuses études ont mis en évidence le rôle central de MBD2 dans la cancérogenèse. En effet, elle serait impliquée dans la répression transcriptionnelle de nombreux gènes à îlot de CpG hyperméthylés dans les cancers, dans l'établissement de l'hyperméthylation des cellules cancéreuses, et dans la progression tumorale.

Des expériences d'ARN interférence anti-*MBD2* ont montré la réactivation de gènes suppresseurs de tumeur à îlots de CpG hyperméthylés dans des lignées cellulaires cancéreuses. De plus, une régression tumorale a été observée par l'inactivation de MBD2 par ARN anti-sens *in vitro* comme *in vivo*.

Ces résultats suggèrent donc qu'il serait possible, dans certains cas, de réduire ou bloquer la prolifération tumorale par l'inhibition de MBD2. Il serait donc important de préciser les mécanismes en jeu dans ces modèles.



OBJECTIFS DE TRAVAIL

OBJECTIFS DE TRAVAIL

Les connaissances acquises ces dernières années dans le domaine de l'oncologie indiquent que les différents types de **cancers** résultent d'un **déséquilibre entre division cellulaire** (mitose), **différenciation cellulaire et mort cellulaire programmée** (apoptose). L'altération de cet équilibre est **liée en partie à l'inactivation par hyperméthylation de nombreux gènes suppresseurs de tumeurs**, montrant ainsi le rôle prépondérant joué par les modifications épigénétiques. De plus, la possibilité de réactivation de ces gènes, dans les cellules en culture, par une inhibition de la méthylation, laisse supposer que l'on pourrait agir sur les cancers par ce processus (Issa *et al.*, 1997).

De nombreux essais thérapeutiques sont actuellement en cours pour évaluer les possibilités de traitements *via* des agents hypométhylants comme la 5-aza-2'-desoxycytidine (décitabine). Toutefois l'inhibition globale et non ciblée de la méthylation par ces drogues serait un facteur d'instabilité chromosomique (Gaudet *et al.*, 2003). Alternativement, **l'inactivation ciblée des répresseurs à domaine liant les CpG méthylés** pourrait conduire à une **levée plus sélective de la répression** (Auriol *et al.*, 2005; Lopez-Serra *et al.*, 2008). En effet, à l'intérieur de cette famille de protéines, trois d'entre elles, MeCP2, MBD1 et MBD2, sont directement responsables de la répression transcriptionnelle méthylation-dépendante et il apparaît, qu'au moins pour certains loci, que l'hypothèse un gène - une protéine à MBD soit vérifiée (Auriol *et al.*, 2005; Lopez-Serra *et al.*, 2006). Par ailleurs, il a été montré que l'inactivation de *Mbd2*, chez la souris, conduit à un ralentissement du développement tumoral (Sansom *et al.*, 2003; Campbell *et al.*, 2004) et n'accélère pas le développement des lymphomes des souris *p53^{-/-}* ou *p53^{-/+}* contrairement à ce qui est observé lors d'une baisse du taux de méthylation de l'ADN (Sansom *et al.*, 2005).

Afin d'évaluer si chaque protéine à MBD présente un **profil de liaison spécifique** et si cette propriété peut être exploitée dans le cadre de traitements anti-cancéreux, j'ai centré mon étude sur deux axes :

- d'une part, **analyser et définir les patrons de fixation** de ces répresseurs sur les gènes impliqués dans les cancers,
- d'autre part, **étudier leur capacité à contrôler l'expression génique.**

Ainsi, l'objectif de ma thèse a été d'identifier et de caractériser les répresseurs méthylation-dépendants spécifiques de gènes éteints dans les cancers. Pour cela, nous avons réalisé une approche gène candidat et une approche globale permettant d'analyser sur puces promoteurs 25,500 gènes, en utilisant les cellules humaines HeLa dérivées de carcinome utérin, comme modèle initial.



RÉSULTATS

ARTICLE 1

Specific association between the methyl-CpG-binding domain protein 2 and the hypermethylated region of the human telomerase reverse transcriptase promoter in cancer cells.

Chatagnon A, Bougel S, Perriaud L, Lachuer J, Benhattar J, Dante R.

Carcinogenesis. 2009 Jan;30 (1):28-34.

ARTICLE 1

MBD2 SE FIXE ET REPRIME DIRECTEMENT ET SPECIFIQUEMENT LE GENE *hTERT* HYPERMETHYLE DANS LES CELLULES CANCEREUSES

Afin d'étudier la spécificité des protéines à MBD pour des gènes cibles, nous nous sommes intéressés à l'étude d'un locus partiellement méthylé : celui du gène codant la sous-unité catalytique de l'holoenzyme télomérase humaine (*hTERT*).

Cette étude a été effectuée dans le cadre d'une collaboration avec l'équipe du Dr Jean Benhattar de l'Institut Universitaire de Pathologie de Lausanne en Suisse.

1- INTRODUCTION

Le gène *hTERT* possède un rôle physiologique important au cours de la cancérogenèse. En effet, ce gène code pour la sous-unité catalytique de l'holoenzyme télomérase humaine, enzyme impliquée dans le maintien de la taille des télomères. Dans la plupart des cellules somatiques, le raccourcissement des télomères est un événement clé de la sénescence répllicative. La réexpression de *hTERT*, observée dans 85% des cellules cancéreuses (Kim *et al.*, 1994), entraîne les cellules vers la prolifération continue encore appelée immortalité répllicative. **L'étude des mécanismes de régulation de l'expression du gène *hTERT* s'inscrit donc dans la compréhension des mécanismes de l'immortalisation cellulaire.**

Plusieurs activateurs et répresseurs de ce gène ont été identifiés, et l'hyperméthylation de son îlot de CpG dans les cancers laisse supposer une régulation méthylation-dépendante de son expression (Guilleret and Benhattar, 2004). Dans les cellules cancéreuses télomérase-positives, l'hyperméthylation de l'îlot de CpG du gène *hTERT* joue un rôle complexe mais essentiel dans la régulation de l'expression de ce gène. En effet, paradoxalement l'hyperméthylation de cet îlot de CpG est nécessaire pour l'expression du gène *hTERT*. Cette méthylation empêche la fixation de facteurs de répression, tel que CTCF (Renaud *et al.*, 2007). Toutefois elle doit être partielle au

niveau d'une région (de -165 à -80 pb à partir du site d'initiation de la transcription) comprise dans le promoteur minimal pour permettre une expression basale du gène *hTERT* (Guilleret and Benhattar, 2004; Zinn *et al.*, 2007; Renaud *et al.*, 2007). **Pour approfondir nos connaissances sur les mécanismes épigénétiques qui contrôlent l'expression du gène *hTERT* dans les cellules cancéreuses, nous avons recherché l'implication potentielle des protéines à MBD dans ce processus.**

2- RESULTATS

Dans les cellules humaines HeLa, issues d'un cancer du col de l'utérus, des expériences d'immunoprécipitation de chromatine (ChIP) ont montré une fixation exclusive de la protéine MBD2 au promoteur hyperméthylé du gène *hTERT*. Par ailleurs, l'absence en protéine MBD2, induite par l'expression constitutive d'un transgène codant pour des ARN interférents ciblant l'ARNm *MBD2* (siRNA *MBD2*), n'est pas compensée par la fixation d'autres répresseurs à MBD, MBD1 et MeCP2, sur la zone promotrice hyperméthylée *hTERT*. Ces données montrent donc que **la fixation exclusive de la protéine MBD2 au promoteur hyperméthylé du gène *hTERT* est le reflet d'une réelle spécificité de ce répresseur pour cette région.** De plus, les résultats obtenus par ChIP-on-chip indiquent que la fixation de la protéine MBD2 n'est pas seulement restreinte à la région promotrice hyperméthylée mais recouvre les 2,6 Kb de l'îlot de CpG du gène *hTERT*.

En outre, dans les cellules HeLa, une forte diminution en protéine MBD2 (~90%), induite par interférence à l'ARN transitoire ou constitutive, conduit à une élévation significative, d'un facteur 2 en moyenne, du taux de transcrits *hTERT*. De plus, dans ces cellules HeLa n'exprimant plus la protéine MBD2, l'expression transitoire d'ADNc *Mbd2* résistant aux siRNA *MBD2* entraîne une baisse statistiquement significative du taux de transcrits *hTERT*, ramenant ce taux à celui observé dans les cellules HeLa. Ces résultats indiquent donc que **la protéine MBD2 réprime directement et spécifiquement le gène *hTERT*.**

La stimulation transcriptionnelle du gène *hTERT* après traitement aux siRNA *MBD2* a également été observée dans d'autres lignées cellulaires dérivées de carcinome mammaire (MCF7), hépatique (HepG2) et de neuroblastomes (LAN-1). Toutefois, la diminution significative en protéine MBD2 n'a aucun effet sur l'expression du gène *hTERT* dans des lignées cellulaires où l'îlot de CpG *hTERT* est non-méthylé. **La répression transcriptionnelle du gène *hTERT* initiée**

par la protéine MBD2 apparaît donc être dépendante du statut de méthylation de l'îlot de CpG mais indépendante du type cellulaire.

Ainsi, la protéine MBD2 semble être un répresseur spécifique du gène *hTERT* dans les cellules cancéreuses *hTERT*-méthylées télomérase-positives.

3- CONCLUSION

Lors de cette étude, nous avons donc pu **identifier un nouveau régulateur négatif de la transcription du gène *hTERT*** : le répresseur méthylation-dépendant MBD2. La protéine MBD2 se fixe et réprime directement et spécifiquement le gène *hTERT* hyperméthylé dans les cellules cancéreuses télomérase-positives.

Il est toutefois à noter que **dans ce contexte la protéine MBD2 semble plus être un facteur limitant qu'un répresseur transcriptionnel strict**. En effet, le répresseur MBD2 permettrait, en se liant aux séquences hyperméthylées entourant la région promotrice non-méthylée, de limiter le niveau d'expression du gène *hTERT*.

Ce travail a par conséquent apporté des éléments de réponse concernant les mécanismes épigénétiques qui contrôlent l'expression du gène *hTERT* dans les cellules cancéreuses. Ces éléments sont importants lorsque l'on sait que l'expression du gène *hTERT* est un pré-requis pour l'immortalisation cellulaire.

Specific association between the methyl-CpG-binding domain protein 2 and the hypermethylated region of the human telomerase reverse transcriptase promoter in cancer cells

Amandine Chatagnon^{1,†}, Stéphanie Bougel^{2,†}, Laury Perriaud¹, Joël Lachuer³, Jean Benhattar² and Robert Dante^{1,*}

¹INSERM U590, Lyon F-69008, France, ²Institut de Pathologie, Centre Hospitalier Universitaire Vaudois and University of Lausanne, Lausanne CH-1011, Switzerland and ³ProfileXpert/Neurobiotec Service, INSERM U842, Bron F-69676, France

*To whom correspondence should be addressed. INSERM U590, Oncogénèse et Progression Tumorale, Centre Léon Bérard, 28 rue Laënnec, 69373 Lyon Cedex 08, France. Tel: +33 4 78 78 59 22; Fax: +33 4 78 78 27 20; Email: dante@univ-lyon1.fr

Human telomerase reverse transcriptase (*hTERT*) is expressed in most cancer cells. Paradoxically, its promoter is embedded in a hypermethylated CpG island. A short region escapes to this alteration, allowing a basal level of transcription. However, the methylation of adjacent regions may play a role in the maintenance of low *hTERT* expression. It is now well established that methyl-CpG binding domain proteins mediate the transcriptional silencing of hypermethylated genes. The potential involvement of these proteins in the control of *hTERT* expression was firstly investigated in HeLa cells. Chromatin immunoprecipitation assays showed that only methyl-CpG-binding domain protein 2 (MBD2) associated the hypermethylated *hTERT* promoter. In MBD2 knock-down HeLa cells, constitutively depleted in MBD2, neither methyl CpG binding protein 2 (MeCP2) nor MBD1 acted as substitutes for MBD2. MBD2 depletion by transient or constitutive RNA interference led to an upregulation of *hTERT* transcription that can be downregulated by expressing mouse Mbd2 protein. Our results indicate that MBD2 is specifically and directly involved in the transcriptional repression of *hTERT* in HeLa cells. This specific transcriptional repression was also observed in breast, liver and neuroblastoma cancer cell lines. Thus, MBD2 seems to be a general repressor of *hTERT* in *hTERT*-methylated telomerase-positive cells.

Introduction

An increasing body of evidences indicate that the alterations of DNA methylation patterns are a characteristic of cancer cells (1). Generally, global reduction of DNA methylation level is associated with localized hypermethylation (1). Specifically, an aberrant hypermethylation of CpG islands at the 5' end of tumor suppressor genes, leading to transcriptional repression, has been described both in cancer cell lines and tumor tissues (2,3).

In human epithelial and fibroblast cells, telomere shortening is a key event in replicative senescence. In >85% of cancer cells, telomere length is maintained through telomerase holoenzyme activity (4,5). Although germ cells and stem cells also exhibit high telomerase activity (4), in normal somatic cells, the catalytic subunit of the telomerase [*human telomerase reverse transcriptase (hTERT)*] is silenced, leading to a limited life span (6). The regulation of *hTERT* transcription has been extensively investigated and several inductors and repressors have been identified, including c-Myc, Sp1, hALP, Hif-1, Mbi-1, USF1/2, estrogen response element, p53, Mad1, myeloid-

Abbreviations: ChIP, chromatin immunoprecipitation; *hTERT*, human telomerase reverse transcriptase; KD, knockdown; MBD, methyl-CpG-binding domain; mRNA, messenger RNA; nt, nucleotide; PCR, polymerase chain reaction; RT, reverse transcription.

[†]These authors contributed equally to this work.

specific zinc finger protein 2, transforming growth factor- β , Wilms' Tumor 1 and CTCF (7–9). In addition, the *hTERT* promoter region is embedded in a large CpG island spanning nucleotides (nt) –1100 to +1500 from the transcription start site, suggesting that transcription of the gene might be regulated by DNA methylation.

The first studies examining the methylation status of the *hTERT* CpG island had led to a paradox. In normal somatic cells, this CpG island was found unmethylated while the gene was transcriptionally silent. However, in most of cancer cells, this region was aberrantly methylated, whereas telomerase activities and *hTERT* messenger RNAs (mRNAs) were unambiguously detected (10–13). This paradox was recently solved. *hTERT* methylation prevents the binding of negatively acting transcription factors such as CTCF inhibitor (9), and a partial hypomethylation of the *hTERT* promoter region can result in some level of transcriptional activity (14). In several cancer cell lines and tumor tissues, careful analysis of *hTERT* methylation patterns has shown that a short region of the CpG island (positions nt –165 to nt –80) is unmethylated or slightly methylated despite highly methylated border regions (14). This unmethylated region is located in the *hTERT* core promoter (positions nt –279 to nt +5) (15), and chromatin immunoprecipitation (ChIP) assays have shown that active chromatin marks are associated with this unmethylated region (16). Moreover, studies using plasmid expression vectors and patch methylation techniques indicate that the *hTERT* core promoter does not show any activity when all CpG sites are methylated (17). In contrast, the selective demethylation of a small region upstream the transcription start site significantly activates the *hTERT* promoter in a reporter plasmid. Nevertheless, the activity of the promoter under these conditions is significantly lower than when using the unmethylated core promoter. In this condition, *hTERT* does not provide a real exception to the general model of gene silencing by promoter methylation and the hypermethylation around the unmethylated region seems to play a major role in the reduction of *hTERT* transcriptional activity. Indeed, in telomerase-positive cancer cells, only 0.2–6 mRNA molecules per cell can be detected (18,19), suggesting that the transcriptional activity of the *hTERT* promoter is limited by cellular factors since high transcription rates are induced when the unmethylated promoter is used in plasmid expression vectors (14).

Transcriptional repression mediated by CpG methylation often involves methyl-CpG-binding domain (MBD) proteins. The five MBD proteins identified to date, methyl CpG binding protein 2 (MeCP2), MBD1, MBD2, MBD3 and MBD4, share a highly conserved MBD. With the exception of MBD4, which is primarily a thymine glycosylase involved in DNA repair (20), all MBD proteins are involved in the transcriptional repression mediated by DNA methylation. It has now been well established that MeCP2, MBD1 and MBD2 bind to methylated DNA and recruit different histone deacetylase complexes and histone methyl transferases, belonging to the chromatin remodeling complexes that control chromatin compaction and induce gene silencing (21–23). MBD3 lacks a functional MBD but is an integral subunit of histone deacetylase complex the Mi2–NuRD complex that is recruited through MBD2 (24,25).

These data have prompted us to investigate whether MBD proteins are involved in the repression of *hTERT* expression when hypermethylated in telomerase-positive cells.

Materials and methods

Cell culture

Five human tumor cell lines, HeLa (cervical adenocarcinoma), MCF7 (breast adenocarcinoma), HepG2 (hepatocellular carcinoma), LAN-1 (neuroblastoma) and NCCIT (teratocarcinoma) and a normal human embryonic lung fibroblast

cell line, MRC5, were used in this study. Cells were obtained from the American Type Culture Collection (Rockville, MD), except for LAN-1, and grown in the medium recommended at 37°C in a humidified 5% CO₂ atmosphere.

ChIP assays

ChIP was done as described previously (26). Cross-linked chromatin was immunoprecipitated using 15 µl of two different polyclonal anti-MBD2 antibodies (kindly provided by Dr P.Wade and Dr E.Ballestar) or 20 µl of polyclonal anti-MeCP2 (Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY), anti-MBD1 (Abcam, Paris, France) antibodies or anti-mouse IgG (Dakocytomation, Trappes, France).

Purified DNAs obtained from the input, unbound and bound fractions were quantified by densitometry using the VersaFluor™ Fluorometer (Bio-rad, Ivry, France) and RiboGreen reagent (Molecular Probes, Interchim, Montluçon, France).

Polymerase chain reaction (PCR) analysis was then performed to assess the binding of MBD proteins to the *hTERT* core promoter. An equal quantity (0.4 ng) of each DNA fraction was amplified by dose-dependent PCR (supplementary Figure S1 is available at *Carcinogenesis* Online) using HotStar Taq polymerase Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France), 5% of dimethyl sulfoxide and 0.5 µM of primers spanning a region from nt -296 to nt -84 of *hTERT* (*hTERT* ChIP, see supplementary Table S1 available at *Carcinogenesis* Online). The thermal cycler program was 37 cycles of 94°C for 30 s, 65°C for 60 s and 72°C for 90 s. PCR products were analyzed on a 2% agarose gel containing 1 µg/ml ethidium bromide and were quantified by densitometry using a Fluor's fluorimeter and Quantity One software (Bio-rad).

ChIP-on-chip

For ChIP-on-chip analysis, the specific protein-DNA complexes were obtained from independent immunoprecipitations using two different polyclonal anti-MBD2 antibodies (kindly provided by Dr P.Wade and Dr E.Ballestar). The ChIP DNAs from the input and bound fractions were amplified, labeled and hybridized on microarrays by ProfileXpert service according to Affymetrix™ protocols. Briefly, the ChIP DNA was amplified by ligation-mediated PCR. To test for enrichment of MBD2-bound sites, PCR amplification of *NBR2* (26) and *pS2* promoters was performed on each ChIP samples before and after amplification. The amplified DNAs were then labeled using the GeneChip® WT Double-Stranded DNA Terminal Labelling Kit and hybridized to the human tiling arrays (Human Promoter 1.0R Arrays), which were then washed and scanned. Raw data from the scans were analyzed using Affymetrix® Tiling Analysis Software and the results were viewed in Affymetrix' Integrated Genome Browser Software.

DNA methylation analysis

Bisulfite sequencing used to determine the CpG methylation pattern of *hTERT* promoter and proximal exonic region was performed as described previously (12,14). Briefly, bisulfite-modified genomic DNA was amplified by two primer sets [P1, positions nt -442 to nt -219 (12) and P2, positions nt -206 to nt +108 (14)] to analyze a region from nt -442 to nt +108 from the transcription start site of *hTERT*. PCR amplifications were accomplished using the master mix (Promega, Madison, WI), with the following conditions: 40 cycles of 94°C for 30 s, 54°C (P1) or 57°C (P2) for 45 s and 72°C for 50 s. DNA methylation status was then established by a direct sequencing of PCR products or by a sequencing of cloned PCR products. For the last procedure, PCR products were cloned into the pGEM-T vector using the pGEM-T vector system II (Promega). After transformation of JM109 *Escherichia coli* competent cells (Promega), plasmid DNA was extracted from clones with the QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen). Each clone was sequenced with the M13 forward primer (5'-GTAAACGACGGCCAG-3'), using a Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit and an ABI Prism 3100 sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA).

Transient transfection

siRNA duplexes for *MBD2* (sense: 5'-GGAGGAAGUGUACCGAAAATT-3' and antisense: 5'-UUUUCGGAUCACUCCUCCTT-3'; Eurogentec, Seraing, Belgium); non-specific small interfering RNA (siRNA) control (Eurogentec); pRev-Mbd2 (kindly provided by Dr A.Bird) (26) and pGL3 basic (Promega) were transfected in cell lines using lipofectamine 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA) according to the manufacturer's recommendations. Briefly, cells were seeded at 2×10^5 cells per well in six-well plates and grown to 50–60% confluence on the day of transfection. All transfections were done in Opti-MEM medium (Invitrogen) with 625 nM of *MBD2* siRNA or 1 µg of *Mbd2* expression plasmid. Lipofectamine 2000 complexes were incubated for 4–5 h. The medium was then removed and replaced with fresh medium. Cells were grown and harvested at various time after the transfection.

RNA extraction and reverse transcription-PCR analysis

Total RNA was extracted from cells using the RNeasy Mini Kit (Qiagen). After extraction, the integrity of total RNA was examined on a 1.2% agarose gel

containing 1 µg/ml ethidium bromide and quantified by densitometry using a Fluor's fluorimeter and Quantity One software (Bio-rad) by comparison with serial dilutions of a standard RNA (Roche Molecular Biochemicals, Maylan, France).

MBD2 mRNA was quantified by competitive quantitative reverse transcription (RT)-PCR as described previously (27). *hTERT* mRNA levels were monitored by relative RT-PCR using One Step RT-PCR kit (Qiagen) and 0.1 µg of total RNA. Cycling parameters were 50°C for 30 min followed by 95°C for 15 min and then 32 cycles of 94°C for 30 s, 55°C for 60 s and 72°C for 90 s. *hTERT* transcripts were co-amplified with *PBGD* transcripts used as internal controls (for primers *hTERT* RT-PCR and *PBGD* RT-PCR, see supplementary Table S1 available at *Carcinogenesis* Online). PCR products were analyzed on a 2% agarose gel containing 1 µg/ml ethidium bromide and quantified by densitometry. The ratio between *hTERT* and *PBGD* signals was determined. To quantify more precisely *hTERT* mRNA, real-time RT-PCR was also carried out on a Rotorgene 6000 cyclor (Corbett Research, Sydney, Australia) using *C. therm.* Polymerase One-Step RT-PCR System (Roche Molecular Biochemicals, Maylan, France). Each reaction mixture included 50 ng of template RNA, 250 nM of FAM-labeled probe (see supplementary Table S1 available at *Carcinogenesis* Online) and 500 nM of primers specific for *hTERT* (*hTERT* RT-PCR Q, see supplementary Table S1 available at *Carcinogenesis* Online). Cycling parameters were 60°C for 30 min followed by 95°C for 5 min and then 45 cycles at 95°C for 15 s and 60°C for 60 s. β -Actin mRNA levels were used to normalize *hTERT* expression. The relative level of each mRNA was calculated on the basis of two standard curves using the relative quantification method.

Results

hTERT hypermethylated CpG island is selectively associated with *MBD2* in HeLa cells

To explore the potential involvement of MBD proteins in *hTERT* regulation, we have chosen cervical cancer cell line HeLa, as a first model. In these telomerase-positive tumor cells, as was shown in our earlier studies, the *hTERT* core promoter is also regionally hypermethylated (17) and might be a target of MBD proteins.

To address this issue, ChIP assays were performed using antibodies directed against MeCP2, MBD1 and MBD2. As a control, the fractions immunoprecipitated with a non-MBD protein-specific antibody (anti-mouse IgG) were also analyzed. The relative amounts of *hTERT* core promoter were determined by a dose-dependent PCR assay (supplementary Figure S1 available at *Carcinogenesis* Online) using a constant amount of DNA from each fractionation process: input, unbound and bound fractions. Representative data from at least three independent experiments are shown in Figure 1A. A strong enrichment in *hTERT* promoter was observed in the fraction immunoprecipitated by anti-MBD2 antibodies when compared with input or non-retained fractions (Figure 1A 'input', 'unbound' and 'IgG'). Since dose-dependent PCR assays were performed with a constant amount of DNA, these data strongly suggest that MBD2 is associated with the methylated region of the *hTERT* promoter. In contrast, analysis of the fractions immunoprecipitated by anti-MeCP2 or anti-MBD1 antibodies showed that these fractions were depleted in *hTERT* DNA (Figure 1A), indicating that these two proteins are not bound to *hTERT* promoter in HeLa cells. Furthermore, the depletion in *hTERT* DNA observed in the fractions bound by anti-MeCP2 and anti-MBD1 antibodies suggests that these two proteins are probably linked to other chromatin domains in HeLa cells.

Taken together, these data strongly suggest that the methylated regions adjacent to the unmethylated region of the *hTERT* core promoter are selectively associated with MBD2.

Recently, we have developed high-throughput analyses of MBD2-binding pattern using a ChIP-on-chip approach (A. Chatagnon, L. Perriaud, J. Lachuer and R. Dante, in preparation). DNAs obtained from the chromatin immunoprecipitated by anti-MBD2 antibodies were hybridized to Affymetrix Human Promoter 1.0R Array. On this chip, 25 500 human promoter regions tiled at 35 bp resolution are representing. Each promoter region covers ~7.5 kb upstream through 2.45 kb downstream of 5' transcription start site and for 1300 cancer-associated genes, additional 2.45 kb are also represented. Data obtained from two independent experiments performed with two different anti-MBD2 antibodies indicated that MBD2 not only bound the

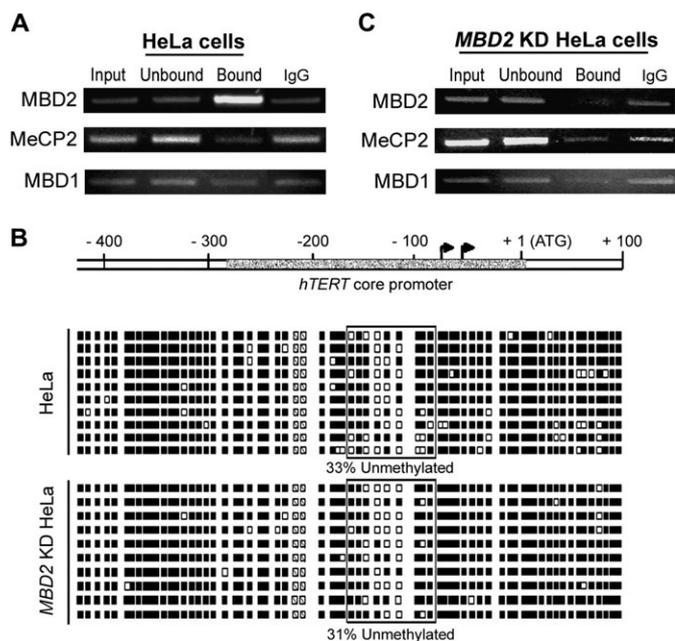


Fig. 1. MBD2 specifically binds the hypermethylated region of the *hTERT* promoter in HeLa cells. (A) ChIP analysis of MBD proteins binding to the hypermethylated region of the *hTERT* promoter (positions nt -296 to nt -84 from the ATG translational start site) in HeLa cells. Cross-linked chromatin was immunoprecipitated using anti-MeCP2, anti-MBD1 and anti-MBD2 antibodies or anti-mouse IgG. The relative amounts of *hTERT* core promoter were determined by a dose-dependent PCR assay using a constant amount of DNA from each step of the fractionation process: input, unbound and bound fractions. The intensities of the bands corresponding to representative PCR products amplified from the input, unbound and bound fractions are shown. (B) Genomic bisulfite sequencing profiles of *hTERT* promoter and proximal exonic region in wild-type HeLa and *MBD2* KD HeLa cells. A 550 bp region (positions nt -442 to nt $+108$) of the *hTERT* CpG island is presented on a schematic map. White dotted box, core promoter; black arrows, transcription start sites. Bisulfite-sequencing status of *hTERT* promoter and proximal exonic region is shown (number of analyzed clones for each cell line, $n = 10$). Each line represents a single-DNA template molecule. Filled and open squares, respectively, represent methylated and unmethylated CpGs. Sequencing was performed from two different regions that do not overlap (see Materials and Methods), leading to unanalyzed CpGs, barred squares. The slightly methylated region (positions nt -165 to nt -80) is framed. (C) MeCP2 and MBD1 do not compensate for MBD2 depletion at the *hTERT* promoter in *MBD2* KD HeLa cells. Representative examples of ChIP assays performed in *MBD2* KD HeLa cells are presented.

hypermethylated region of the *hTERT* core promoter but also covered all the hypermethylated *hTERT* CpG island (Figure 2A). As a control, results obtained for a previously identified MBD2-free hypermethylated promoter (28), *PARVG*, are also shown on Figure 2B. As expected, no MBD2-positive signal was observed along this hypermethylated promoter (Figure 2B).

The hypermethylated hTERT promoter remains free of MBD proteins in MBD2-depleted cells

In HeLa cells, among the MBD transcripts, *MBD2* mRNAs are the most abundant (27), suggesting that the selective binding of MBD2 to *hTERT* promoter might be due to its prominent expression. Thus, we investigated *hTERT* promoter occupancy in a HeLa clone cell line [*MBD2* knockdown (KD) HeLa cells] constitutively depleted in *MBD2* by a transgene expressing a siRNA targeting the mRNA coding for this protein (26).

Quantitative competitive RT-PCR assays indicated that 89–96% *MBD2* mRNA depletion was obtained and maintained over many passages in *MBD2* KD HeLa cells. This low level of *MBD2* transcripts was correlated with a very low level of MBD2 protein, which was

almost undetectable in western blot experiments (26). In addition, neither the amounts of MeCP2 and MBD1 transcripts nor the amounts of the corresponding proteins were altered by *MBD2* depletion (data not shown).

As *MBD2* belongs to the DNA methylation machinery, a prolonged *MBD2* depletion might alter DNA methylation patterns. Therefore, the DNA methylation patterns of the *hTERT* promoter were determined in *MBD2* KD HeLa cells. DNA extracted from the cell lines was modified and amplified by PCR with primers specifically designed to amplify bisulfite-modified DNA sequence of the *hTERT* promoter and proximal exonic region. PCR fragments were cloned and sequenced. The analysis of 10 clones from wild-type HeLa cells and *MBD2* KD HeLa cells indicated that over the hypermethylated *hTERT* promoter and proximal exonic region, a small sequence (positions nt -165 to nt -80), corresponding to a part of the *hTERT* core promoter, was hypomethylated in the two cell lines analyzed (Figure 1B). Indeed, this region exhibit a low level of methylation ($\sim 30\%$) but no significant difference was observed between wild-type HeLa cells and HeLa cells depleted in *MBD2*. Thus, the methylation patterns of the *hTERT* promoter in *MBD2* KD HeLa cells were not altered by the absence of MBD2.

As expected, in HeLa cells depleted in *MBD2* proteins, ChIP assays indicated that MBD2 was no longer detected at the hypermethylated region of the *hTERT* core promoter (Figure 1C). Furthermore, this region seemed to remain free of MBD proteins since the immunoprecipitated fractions are depleted in the methylated *hTERT* promoter when anti-MeCP2 or anti-MBD1 antibodies were used in ChIP experiments (Figure 1C).

Thus, the hypermethylated region of the *hTERT* promoter is specifically targeted by MBD2 in HeLa cells and no redundancy between MBD2 and MeCP2 or MBD1 was observed at this hypermethylated region.

MBD2 depletion enhances hTERT gene transcription in HeLa cells

MBD2 is a member of the MBD protein family and their methylation-dependent repressive activities are now well established (29). Therefore, we investigated the potential involvement of MBD2 in the repression of the endogenous *hTERT* promoter in HeLa cells.

First, we determined the consequence of a transient *MBD2* depletion on the expression of *hTERT* in HeLa cells. At 24 h intervals after *MBD2*-specific siRNA transfection, RNA was extracted and the levels of *hTERT* and *MBD2* transcripts determined by RT-PCR assays were compared with their levels in HeLa cells transfected with a non-specific siRNA. Quantitative competitive RT-PCR assays (27) indicated that a reduction of $\sim 90\%$ in *MBD2* mRNA level was reached 24 h after transfection with *MBD2* siRNA and maintained >96 h after transfection (Figure 3A). Western blot analysis also showed a dramatic decrease in *MBD2* proteins in these cells (data not shown). In HeLa cells, 48 h after the *MBD2* siRNA transfection, an elevation of 1.2-fold of *hTERT* mRNA level was observed when compared with HeLa cells transfected with a non-specific siRNA. This stimulation increased to a maximum of 1.9 at 96 h after *MBD2* siRNA treatment. The expression level of *hTERT* was determined using relative RT-PCR (Figure 3A) and identical results were obtained with real-time RT-PCR for critical points (Figure 3B). It should be noted that neither the level of *MBD2* transcripts nor the level of *hTERT* transcripts were altered by non-specific siRNA transfection when compared with untreated wild-type HeLa cells (data not shown).

These data suggest that MBD2 actually represses *hTERT* expression in HeLa cells.

Stimulation of hTERT transcription in MBD2 KD HeLa cells is reversed by ectopic expression of Mbd2

The *MBD2* KD HeLa cell line offers the opportunity to investigate the functional control of the specific repression of *hTERT* by MBD2. In this cell line, *MBD2* expression can be rescued using pRev-Mbd2, a vector coding for a mouse *Mbd2* RNA containing five silent point mutations and, therefore, refractory to siRNA-mediated decay (26). We also observed a 2-fold stimulation of *hTERT* expression in the *MBD2* KD HeLa cells as compared with wild-type HeLa cells (Figure 4). In these

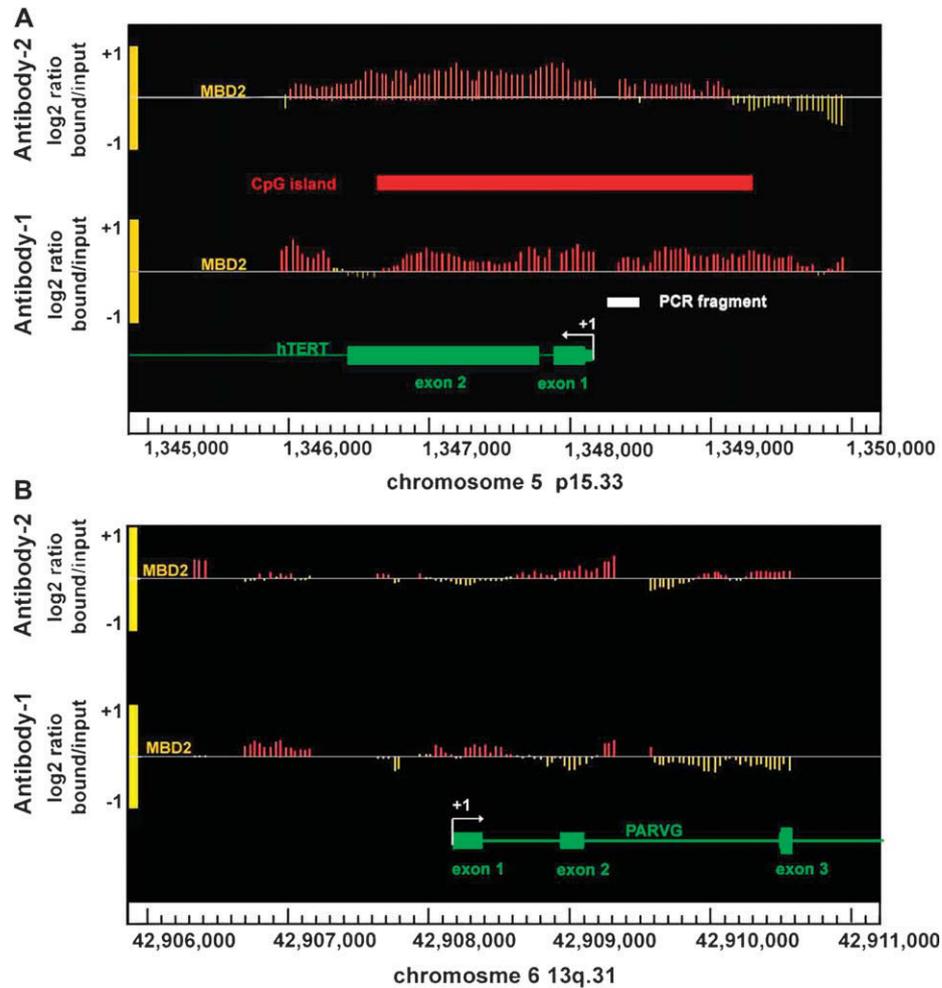


Fig. 2. ChIP-on-chip analysis of MBD2-binding sites on *hTERT* promoter. (A) Array peaks on *hTERT* promoter of MBD2 log₂ signal ratio (MBD2/input) values are shown below the Affymetrix' Integrated Genome Browser window. Gene is transcribed from right to left. *hTERT* CpG island is shown by a red box. DNA fragment analyzed by PCR following MBD2 ChIP is represented by a white box. (B) *PARVG* 5' end viewed as a MBD2-free control. Gene is transcribed from left to right.

cells, the ectopic expression of Mbd2 reduced *hTERT* transcription to a level similar to the level observed in wild-type HeLa cells (Figure 4), suggesting that MBD2 directly represses *hTERT* expression in HeLa cells. In wild-type HeLa cells, the abundance of MBD2 does not seem to be a limiting factor since the overexpression of MBD2 mediated by pRev-Mbd2 transfection did not modify *hTERT* expression level in cells containing normal amounts of MBD2 (Figure 4).

Our results demonstrate that MBD2 specifically binds to *hTERT* and represses its expression in HeLa cells.

MBD2 hTERT repression is specifically observed in hTERT-methylated telomerase-positive cancer cell lines and independent of the cellular types

Data obtained suggest that MBD2 might be a general repressor of *hTERT* transcription in *hTERT*-methylated telomerase-positive cells. In order to address this point, we tested whether the above-mentioned MBD2 KD-mediated *hTERT* stimulation in HeLa cells could be recapitulated in other *hTERT*-methylated cell lines. A functional study was undertaken in different cell lines exhibiting characteristic *hTERT* DNA methylation patterns: (i) MCF-7, LAN-1 and HepG2 cells, three telomerase-positive cancer cell lines showing an *hTERT* core promoter unmethylated or slightly methylated despite an hypermethylated CpG island (ii) NCCIT cells, an *hTERT*-unmethylated telomerase-positive teratocarcinoma cell line and (iii) MRC5 cells, an *hTERT*-unmethylated telomerase-negative normal embryonic cell

line. The *hTERT* core promoter methylation status of these cell lines and the corresponding transcript levels are shown in Figure 5. Control experiments indicated that these cell lines exhibited approximately the same level of MBD2 transcripts ($4.8 \pm 2.7 \times 10^6$ mRNA molecules per microgram of total RNA), with the exception of NCCIT (7×10^4 mRNA molecules per microgram of total RNA).

As observed in HeLa cells, a significant decrease of MBD2 transcripts (60–79%) was observed in the different cell lines 96 h after MBD2 siRNA transfection. Relative to the transfection with a non-specific siRNA, a ~2-fold increase in *hTERT* mRNA was observed in all *hTERT*-methylated cell lines, LAN-1, MCF7 and HepG2 cells. In contrast, MBD2 depletion did not affect *hTERT* expression in *hTERT*-unmethylated cell lines, NCCIT and MRC5 cells (Figure 6). Since MBD2 does not bind to unmethylated DNA (24,25), these data indicate that *hTERT* induction due to MBD2 depletion is not mediated by an indirect effect.

Taken together, the specific transcriptional repression of *hTERT* by MBD2 does not seem to be restricted to a particular cancer cell line since this effect was observed in cervix, breast, liver and neuroblastoma cancer cell lines. Thus, MBD2 seems to be a general repressor of *hTERT* in *hTERT*-methylated telomerase-positive cells.

Discussion

Most (~96%) of the CpG islands are unmethylated in normal cells (30), whereas hypermethylation of these sequences is a characteristic

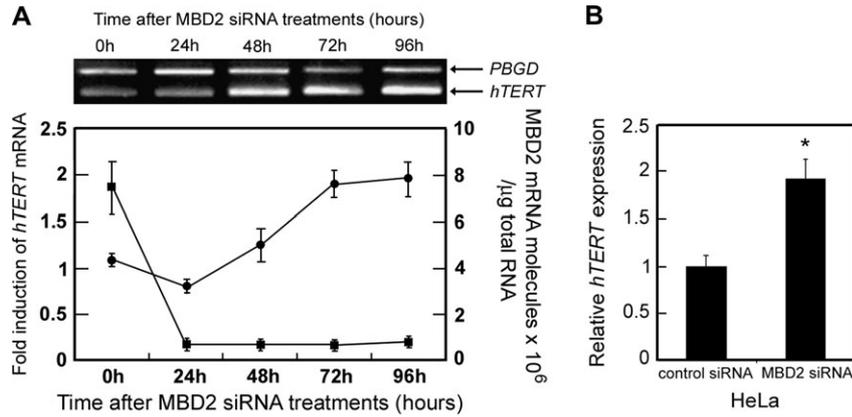


Fig. 3. Transient depletion of MBD2 proteins by MBD2-specific siRNA induces time-dependent stimulation of *hTERT* expression in HeLa cells. (A) HeLa cells were transiently transfected, with either MBD2 siRNA or a negative control scrambled siRNA. After 24, 48, 72 or 96 h following the transfection, RNA was extracted and the efficiency of the MBD2 siRNA treatment was determined by quantification of *MBD2* mRNA as described previously (27). *hTERT* mRNA levels were monitored by relative RT-PCR. The fold induction of *hTERT* expression was calculated from the ratio *hTERT* mRNA/*PBGD* mRNA in MBD2 siRNA-transfected cells versus scrambled siRNA-transfected cells. Mean values (\pm standard deviation) obtained from at least three independent transfection experiments are shown. Filled squares, *MBD2* mRNA level; filled circles, fold induction of *hTERT* mRNA. (B) Quantitative RT-PCR expression analysis of *hTERT* in HeLa cells 96 h after transfection with either a negative control siRNA or MBD2 siRNA. Real-time RT-PCR was done on cells lines and *hTERT* expression was normalized to β -actin. The relative level of each mRNA was calculated on the basis of the two standard curves using the relative quantification method. At least three independent determinations of fold differences were used to calculate the average fold difference values and associated standard deviation ($P = 0.0027$; *t*-test).

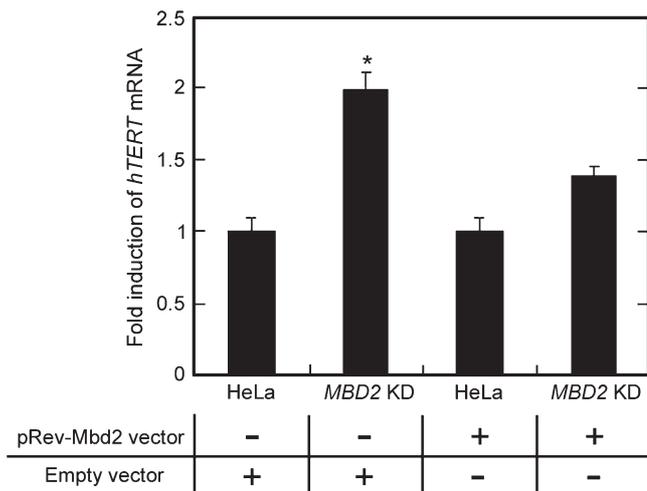


Fig. 4. Mbd2 expression rescues the reduction of *hTERT* transcript in MBD2 KD HeLa cells. The transcriptional expression of *hTERT* was analyzed by quantitative RT-PCR 48 h after lipofectamine transfection of HeLa and MBD2 KD HeLa cells using pRev-Mbd2, an Mbd2 vector expressing a transcript resistant to RNAi or an empty pGL3 basic vector. The relative *hTERT* mRNA in pRev-Mbd2-transfected cells or in pGL3-transfected cells or in KD HeLa cells was calculated using the same reference: the *hTERT* mRNA level in untransfected HeLa cells. Mean values obtained from at least three independent transfection experiments are shown ($P = 0.0035$, *t*-test).

of cancer cells (1). These aberrant DNA methylation patterns have been correlated with the transcriptional silencing of genes undergoing such alterations at their 5' end CpG islands. The *hTERT* gene has provided an interesting exception since a bimodal alteration of the DNA methylation status of its 5' end CpG island is associated with its expression in $\sim 85\%$ of cancer cells and tumors tissues (4,5). The large CpG island, 2.6 kb in length, lying from nt -1102 to nt +1519 from the *hTERT* transcription, is hypermethylated at the exception of a short region (positions nt -165 to nt -80) that is unmethylated or slightly methylated despite highly methylated border regions (16,17). This particular pattern of methylation seems crucial for establishing

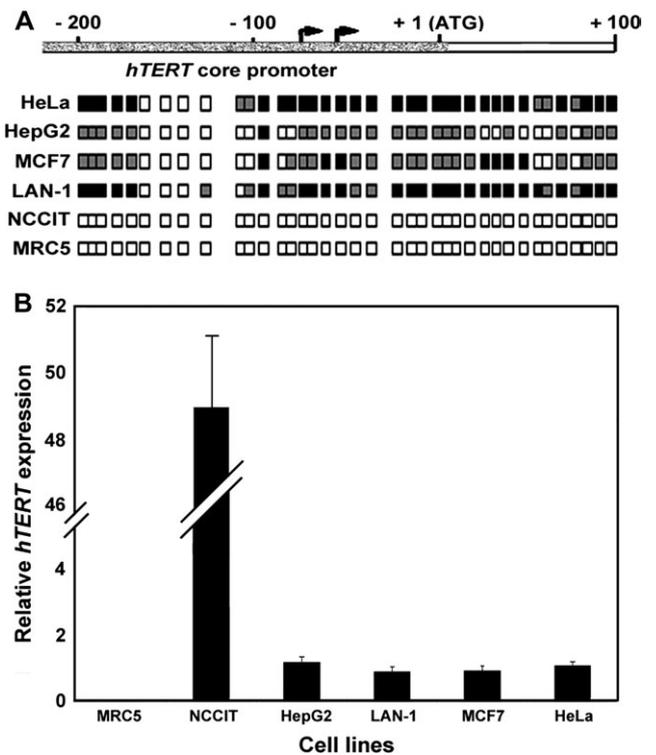
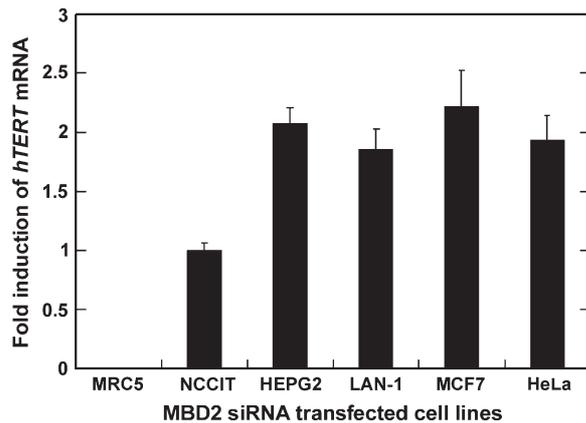


Fig. 5. DNA methylation patterns of *hTERT* and the corresponding transcript levels in different cell lines. (A) Bisulfite sequencing of five telomerase-positive cancer cell lines (HeLa, MCF7, HepG2, LAN-1 and NCCIT) and one normal telomerase-negative fibroblast cell line (MRC5). Bisulfite-treated DNA was PCR amplified using a primer set spanning the end of the promoter and the proximal exonic region of *hTERT*. PCR products were then directly sequenced. The analyzed 314 bp region (-206 to +108) is presented on a schematic map and results are shown for each cell lines. Filled and open squares, respectively, represent complete methylated and unmethylated CpG sites, whereas gray squares correspond to partial methylated CpG sites. (B) Quantitative expression of *hTERT* in MRC5, NCCIT, HepG2, LAN-1, MCF7 and HeLa cells. Real-time RT-PCR was done on cell lines, and β -actin was used as a reference.



Efficiency of MBD2 siRNA	91% ± 9%	63% ± 5%	63% ± 7%	73% ± 6%	72% ± 3%	87% ± 7%
--------------------------	----------	----------	----------	----------	----------	----------

Fig. 6. Depletion of MBD2 by siRNA results in transcriptional activation of *hTERT* in *hTERT*-methylated telomerase-positive cancer cell lines. Fold change of *hTERT* expression between MBD2-depleted cells (MBD2 siRNA-transfected cells) and control cells (scrambled siRNA-transfected cells). *hTERT* expression was monitored by quantitative RT-PCR 96 h after transfection. Mean values (\pm standard deviation) obtained from at least three independent transfection experiments are shown.

hTERT expression at a basal level. Indeed, hypermethylation of CpG islands seems to be a crucial event in carcinogenesis. Thus, the methylation-free region in *hTERT* promoter may result from antagonistic pressure between the mechanisms leading to aberrant methylation and the need to keep *hTERT* expressed for unlimited life span of cancer cells.

A body of evidence has been accumulated concerning association between hypermethylation of CpG islands, transcriptional silencing and MBD-proteins binding (21). ChIP experiments and ChIP-on-chip analysis indicate that MBD2 associated the hypermethylated CpG island of *hTERT*. In this context, MBD2 seems to be a limiting factor rather than a transcriptional silencer.

Recently, a large screening of tumor suppressor gene promoters in 10 cell lines showed that human cancer cell lines tend to use a particular MBD protein (31). Furthermore, in MRC5 cells, ChIP experiments have indicated that MeCP2 and MBD2 proteins have non-overlapping binding specificities *in vivo* (23). These data, as well as our data are in favor of the 'one gene-one MBD' hypothesis, at least for some genes. Indeed, MBD2 was specifically associated with the methylated region of the *hTERT* CpG island, whereas MeCP2 and MBD1 were not detected at this locus. Moreover, MBD2 depletion did not induce MeCP2 or MBD1 binding at this methylated area in HeLa cells. Thus, the specificity of MBD proteins does not seem to be driven by their relative concentrations in a cell line, as it was suggested in an other study (31): a strong expression of a particular MBD is not necessarily associated with its preferential use in promoters.

Several studies have shown that transcriptional activation could be realized upon depletion of MBD proteins by RNA interference (RNAi) (26,28). A large-scale microarray analysis indicated that 15% of 6386 genes analyzed exhibit an increased expression change between untreated and triple MBD-depleted cells (28). It should be noted that for single-MBD interference, MBD2 depletion was the protein most commonly involved in the observed release of gene silencing by far (28). These data suggest that MBD2 plays an important role in methylation-dependent gene silencing. MBD2 depletion mediated by RNAi stimulates *hTERT* expression, either in stable KD HeLa clones or in transiently transfected HeLa cells. A 2-fold stimulation of *hTERT* expression upon MBD2 depletion was observed, suggesting that MBD2 plays an important role in the regulation of this gene. Indeed, in human cell lines, fold changes induced by MBD2

depletion is also of the same range, 2-fold for NBR2 induced by MBD2 siRNA (26) and microarray analysis of MBD2-depleted cells exhibited a mean fold change of 7 (28). Furthermore, the fold change observed in Mbd2-deficient mouse cells is not very different from our own data. For example, it has been shown (32) that Mbd2^{-/-} fibroblasts had 3-fold higher levels of Xist than wild-type cells. Moreover, elevated *hTERT* transcription upon MBD2 depletion is not limited to cervix (HeLa cells) since this effect was observed in breast, liver and neuroblastoma cancer cell lines. MBD2 RNAi experiments in cell lines exhibiting unmethylated *hTERT* CpG island (MRC5 and NCCIT) did not affect *hTERT* transcription indicating that MBD2 specifically and directly represses *hTERT* expression in methylation-dependent manner. Collectively, these data strongly suggest that MBD2 is a general repressor of *hTERT* expression in cancer cells.

A considerable number of transcription factors have been proposed as negative regulators of *hTERT* transcription. Nevertheless, direct evidence indicating that *hTERT* gene transcription is downregulated remains to be firmly established. Thus, MBD2 may represent a new factor directly involved in the negative regulation of *hTERT* expression. In cancer cells, MBD2 seems to play a specific role since its binding to the hypermethylated part of the *hTERT* promoter establishes a direct link between a common DNA alteration of tumor cells, CpG hypermethylation and a reduced level of *hTERT* transcription. The binding of MBD2 represents an additional layer for the control of *hTERT* expression, thereby underlying the importance of *hTERT* regulation in immortalized and cancers cells.

Supplementary material

Supplementary Figure S1 and Table S1 can be found at <http://carcin.oxfordjournals.org/>

Funding

Ligue Nationale contre le Cancer (Comité du Rhône and Comité de la Loire); Institut National contre le Cancer (EpiPro, CircBio, 419807-37/NG-LC); Swiss National Science Foundation (3100A0-101732, 3100A0-113505).

Acknowledgements

Conflict of Interest Statement: None declared.

References

- Ehrlich, M. (2002) DNA methylation in cancer: too much, but also too little. *Oncogene*, **21**, 5400–5413.
- Esteller, M. (2007) Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps. *Nat. Rev. Genet.*, **8**, 286–298.
- Herman, J.G. *et al.* (2003) Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *N. Engl. J. Med.*, **349**, 2042–2054.
- Kim, N.W. *et al.* (1994) Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science*, **266**, 2011–2015.
- Stampfer, M.R. *et al.* (2003) Human epithelial cell immortalization as a step in carcinogenesis. *Cancer Lett.*, **194**, 199–208.
- Yasumoto, S. *et al.* (1996) Telomerase activity in normal human epithelial cells. *Oncogene*, **13**, 433–439.
- Goueli, B.S. *et al.* (2003) Regulation of telomerase reverse transcriptase gene activity by upstream stimulatory factor. *Oncogene*, **22**, 8042–8047.
- Poole, J.C. *et al.* (2001) Activity, function, and gene regulation of the catalytic subunit of telomerase (*hTERT*). *Gene*, **269**, 1–12.
- Renaud, S. *et al.* (2005) CTCF binds the proximal exonic region of *hTERT* and inhibits its transcription. *Nucleic Acids Res.*, **33**, 6850–6860.
- Dessain, S.K. *et al.* (2000) Methylation of the human telomerase gene CpG island. *Cancer Res.*, **60**, 537–541.
- Devereux, T.R. *et al.* (1999) DNA methylation analysis of the promoter region of the human telomerase reverse transcriptase (*hTERT*) gene. *Cancer Res.*, **59**, 6087–6090.
- Guilleret, I. *et al.* (2002) Hypermethylation of the human telomerase catalytic subunit (*hTERT*) gene correlates with telomerase activity. *Int. J. Cancer*, **101**, 335–341.

13. Nomoto, K. *et al.* (2002) Methylation status and expression of human telomerase reverse transcriptase mRNA in relation to hypermethylation of the p16 gene in colorectal cancers as analyzed by bisulfite PCR-SSCP. *Jpn. J. Clin. Oncol.*, **32**, 3–8.
14. Renaud, S. *et al.* (2007) Dual role of DNA methylation inside and outside of CTCF-binding regions in the transcriptional regulation of the telomerase hTERT gene. *Nucleic Acids Res.*, **35**, 1245–1256.
15. Horikawa, I. *et al.* (1999) Cloning and characterization of the promoter region of human telomerase reverse transcriptase gene. *Cancer Res.*, **59**, 826–830.
16. Zinn, R.L. *et al.* (2007) hTERT is expressed in cancer cell lines despite promoter DNA methylation by preservation of unmethylated DNA and active chromatin around the transcription start site. *Cancer Res.*, **67**, 194–201.
17. Guilleret, I. *et al.* (2004) Unusual distribution of DNA methylation within the hTERT CpG island in tissues and cell lines. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **325**, 1037–1043.
18. Yi, X. *et al.* (2001) Quantitation of telomerase components and hTERT mRNA splicing patterns in immortal human cells. *Nucleic Acids Res.*, **29**, 4818–4825.
19. Ducrest, A.L. *et al.* (2001) Regulation of human telomerase activity: repression by normal chromosome 3 abolishes nuclear telomerase reverse transcriptase transcripts but does not affect c-Myc activity. *Cancer Res.*, **61**, 7594–7602.
20. Hendrich, B. *et al.* (1999) The thymine glycosylase MBD4 can bind to the product of deamination at methylated CpG sites. *Nature*, **401**, 301–304.
21. Bird, A.P. *et al.* (1999) Methylation-induced repression—belts, braces, and chromatin. *Cell*, **99**, 451–454.
22. Fatemi, M. *et al.* (2006) MBD family proteins: reading the epigenetic code. *J. Cell Sci.*, **119**, 3033–3037.
23. Klose, R.J. *et al.* (2005) DNA binding selectivity of MeCP2 due to a requirement for A/T sequences adjacent to methyl-CpG. *Mol. Cell*, **19**, 667–678.
24. Ng, H.H. *et al.* (1999) MBD2 is a transcriptional repressor belonging to the MeCP1 histone deacetylase complex. *Nat. Genet.*, **23**, 58–61.
25. Wade, P.A. *et al.* (1999) Mi-2 complex couples DNA methylation to chromatin remodelling and histone deacetylation. *Nat. Genet.*, **23**, 62–66.
26. Auriol, E. *et al.* (2005) Specific binding of the methyl binding domain protein 2 at the BRCA1-NBR2 locus. *Nucleic Acids Res.*, **33**, 4243–4254.
27. Billard, L.M. *et al.* (2002) MeCP2 and MBD2 expression during normal and pathological growth of the human mammary gland. *Oncogene*, **21**, 2704–2712.
28. Lopez-Serra, L. *et al.* (2008) Unmasking of epigenetically silenced candidate tumor suppressor genes by removal of methyl-CpG-binding domain proteins. *Oncogene*, **27**, 3556–3566.
29. Klose, R.J. *et al.* (2006) Genomic DNA methylation: the mark and its mediators. *Trends Biochem. Sci.*, **31**, 89–97.
30. Weber, M. *et al.* (2007) Distribution, silencing potential and evolutionary impact of promoter DNA methylation in the human genome. *Nat. Genet.*, **39**, 457–466.
31. Lopez-Serra, L. *et al.* (2006) A profile of methyl-CpG binding domain protein occupancy of hypermethylated promoter CpG islands of tumor suppressor genes in human cancer. *Cancer Res.*, **66**, 8342–8346.
32. Barr, H. *et al.* (2007) Mbd2 contributes to DNA methylation-directed repression of the Xist gene. *Mol. Cell. Biol.*, **27**, 3750–3757.

Received August 20, 2008; revised October 3, 2008;
accepted October 11, 2008

ARTICLE 2

Cancer epigenetics: a role for the methyl-CpG-binding domain protein 2 in the modulation of the estrogen response of the *pS2/TFF1* gene.

Chatagnon A, Ballestar E, Esteller M, Dante R.

FASEB. En soumission.

ARTICLE 2

LA PROTEINE MBD2 MODULE SPECIFIQUEMENT LA REPONSE ŒSTROGENO-DEPENDANTE DU GENE *pS2/TFF1*

Dans le but de poursuivre notre étude sur la spécificité des protéines à MBD pour des gènes cibles, mais aussi dans le but d'approfondir nos connaissances sur les mécanismes de répression transcriptionnelle induits par les protéines à MBD, nous nous sommes également intéressés à la régulation de l'expression du gène *pS2/TFF1*.

1- INTRODUCTION

De même qu'hTERT, pS2 possède des rôles physiologiques importants au cours de la cancérogenèse. En effet, ce gène est un gène œstrogéno-régulé, dont la détection est un marqueur tumoral classique du contrôle par les œstrogènes de l'expression génique et de la prolifération cellulaire dans les cancers du sein notamment (Perry *et al.*, 2008; Amiry *et al.*, 2009). La fonction de la protéine pS2 reste encore mal connue. Cependant, elle aurait un rôle protecteur contre la mort par apoptose, l'augmentation de la mobilité cellulaire et la stimulation de l'angiogenèse (Perry *et al.*, 2008; Amiry *et al.*, 2009). Ce gène serait également un gène suppresseur de tumeur gastrique spécifique (Perry *et al.*, 2008; Amiry *et al.*, 2009).

Dans les cancers du sein, l'expression du gène *pS2* est un exemple caractéristique d'hypométhylation dans les cancers (Martin *et al.*, 1997; Dietrich *et al.*, 2009). Son expression est inversement corrélée à la méthylation de sa région 5' régulatrice pauvre en CpG (Martin *et al.*, 1997). Toutefois, dans quelques biopsies tumorales mammaires exprimant les récepteurs aux œstrogènes (dites RE-riches), l'expression du gène *pS2* est observée malgré la méthylation de sa région promotrice (Martin *et al.*, 1997). Ces observations nous ont alors amené à **étudier les mécanismes de régulation de l'expression du gène *pS2* initiés par la méthylation de sa région 5' et leur potentielle implication dans la réponse à une stimulation aux œstrogènes.**

Pour explorer les rôles relatifs de la méthylation de l'ADN et du trans-activateur naturel, le récepteur aux oestrogènes α (RE α), dans la régulation de l'expression du gène *pS2*, nous avons choisi d'utiliser trois lignées cellulaires possédant différents profils de méthylation de la région 5' régulatrice de ce gène : non-méthylée, pour les cellules MCF7 ; partiellement méthylée pour les cellules HeLa ; et totalement méthylée, pour les cellules MDA MB231. Ces trois profils de méthylation sont caractéristiques de ceux observés dans les biopsies de tumeurs mammaires (Martin *et al.*, 1997). Les cellules HeLa, contrairement aux cellules MCF7 et MDA MB231, ne sont pas des cellules cancéreuses mammaires. Cependant, elles ont été retenues pour notre étude car après un large crible des profils de méthylation de diverses cellules cancéreuses mammaires aucune ne présentait une méthylation partielle de la région 5' du gène *pS2*. En revanche, les cellules HeLa possèdent un profil de méthylation similaire à celui des biopsies mammaires partiellement méthylées, c'est-à-dire non-méthylé au niveau de la région 5' contenant l'élément de réponse aux oestrogènes (ERE) et méthylé au niveau de la région promotrice plus en aval contenant la « boîte TATA ».

2- RESULTATS

L'analyse des profils de méthylation de la région 5' régulatrice (-464 à +294 pb à partir du site d'initiation de la transcription) du gène *pS2* dans ces trois lignées cellulaires, associée à l'étude de l'expression transcriptionnelle de ce gène, a permis de **préciser la corrélation inverse entre l'expression du gène *pS2* et la densité de méthylation de son extrémité 5'**. Ces résultats suggèrent ainsi un impact des profils de méthylation autour du site d'initiation de la transcription sur l'activité du promoteur *pS2* dans ces cellules.

La recherche de fixations potentielles de protéines à MBD sur le promoteur *pS2* par ChIP a ensuite montré une association exclusive et spécifique de la protéine MBD2 aux promoteurs méthylés des cellules HeLa et MDA MB231. De plus, l'analyse hautement résolutive du profil de fixation de la protéine MBD2 par ChIP-on-chip a indiqué que MBD2 se lie spécifiquement à la région promotrice *pS2* méthylée et que cette fixation ne se propage pas à la région non-méthylée, contenant l'ERE, dans les cellules HeLa. Ces données ont donc démontré que **la fixation exclusive de la protéine MBD2 est parfaitement en phase avec les profils de méthylation de la région 5' régulatrice du gène *pS2***. De plus, cette liaison, observée dans deux lignées cellulaires différentes, semble être le reflet d'une **réelle spécificité de ce répresseur pour cette région méthylée**.

Afin de déterminer l'implication de la fixation de la protéine MBD2 dans la répression transcriptionnelle du gène *pS2*, nous avons utilisé une approche d'interférence à l'ARN spécifique des transcrits *MBD2* permettant l'invalidation transitoire de cette protéine. La forte diminution en protéine MBD2, ainsi induite, ne conduit pas à la ré-expression du gène *pS2* dans les cellules MDA MB231 où la région 5' du gène *pS2* est totalement méthylée. En revanche, dans les cellules HeLa, ces expériences entraînent à une élévation significative du taux de transcrits *pS2* (d'un facteur 3,5 en moyenne). De plus, dans ces mêmes cellules dépourvues de protéines MBD2, l'expression transitoire d'ADNc *Mbd2* résistant aux siRNA *MBD2* induit une baisse statistiquement significative du taux de transcrits *pS2*, ramenant ce taux à celui observé dans les cellules HeLa. Ces résultats mettent ainsi en évidence la **participation directe et spécifique de la protéine MBD2 dans la répression transcriptionnelle du gène *pS2* méthylé**. En outre, la diminution significative en protéine MBD2 n'a aucun effet sur l'expression du gène *pS2* dans la lignée cellulaire MCF7 où la région régulatrice 5' du gène est non-méthylée. Ces dernières données confirment donc que l'augmentation de l'expression du gène *pS2* induite par la dégradation des transcrits *MBD2* dans les cellules HeLa n'est pas due à un effet indirect.

L'influence de la méthylation de l'ADN et de la protéine MBD2 dans la réponse hormono-dépendante du gène *pS2* a ensuite été évaluée. Pour se faire, nous avons manipulé artificiellement le niveau protéique en RE α dans les cellules HeLa et MDA MB231 qui n'expriment pas de manière endogène cette protéine. Les expériences de CHIP réalisées à partir des cellules MCF7, HeLa, MDA MB231 et des cellules HeLa et MDA MB231 transfectées transitoirement avec un vecteur d'expression des RE α , HEG0, ont montré que les **RE α lient uniquement et spécifiquement l'ERE non méthylé indépendamment du statut de méthylation du promoteur**.

En outre, dans les cellules HeLa, l'expression transitoire des RE α stimule d'un facteur 4 en moyenne l'expression du gène *pS2*. Cette stimulation par les RE α est totalement reversée par un traitement au tamoxifène, un antagoniste des œstrogènes, démontrant ainsi l'œstrogène-dépendance de la trans-activation. Comme attendue, l'expression du gène *pS2* n'est pas induite par l'expression ectopique des RE α dans les cellules MDA MB231. En effet, les RE α sont incapables de lier l'ERE méthylé dans cette lignée cellulaire. Ces résultats suggèrent donc que **l'hypométhylation de l'ERE permet une réponse de l'expression du gène *pS2* à une stimulation aux œstrogènes**.

L'expression ectopique des RE α dans les cellules HeLa conduit à leur fixation sur l'ERE non-méthylée et à la subséquente activation de l'expression du gène *pS2* mais ceci sans modifier le statut de méthylation du promoteur. Nous avons donc voulu savoir si le répresseur MBD2 était toujours présent sur le promoteur *pS2* dans ces conditions. Des expériences de CHIP, réalisées dans cet objectif, ont montré que l'expression ectopique des RE α dans les cellules HeLa n'entraîne pas la dissociation de MBD2 au promoteur *pS2*. De plus, l'enrichissement en fragment « promoteur *pS2* » dans les fractions immunoprécipitées grâce à des anticorps anti-MBD2 à partir de chromatine issue de cellules HeLa n'est pas affecté par la présence des RE α . Ces résultats suggèrent donc la co-existence du trans-activateur RE α et du répresseur méthylation-dépendant MBD2 sur la région 5' régulatrice du gène *pS2*. Afin de répondre à cette question, des expériences d'immunoprécipitation de chromatine en série (CHIP reCHIP) ont été réalisées et ont vérifié cette hypothèse. L'ensemble de ces données a permis de mettre en évidence que les **RE α peuvent partiellement pallier l'effet inhibiteur de la protéine MBD2, lorsqu'ils lient l'ERE du gène *pS2*, sans affecter le statut de méthylation de son promoteur et l'association de MBD2 à cette région.**

Les effets opposés de MBD2 et des RE α sur l'expression du gène *pS2* suggèrent une action antagoniste de ces deux régulateurs transcriptionnels. Pour explorer cette possibilité les concentrations en protéines MBD2 et RE α ont été artificiellement manipulées. Dans les cellules HeLa, l'expression des RE α , concomitante à l'inhibition de la synthèse en protéines MBD2, entraîne une stimulation importante (d'un facteur 31 en moyenne) du niveau d'expression du gène *pS2*, ce dernier devenant similaire à celui observé dans les cellules MCF7, cellules RE-riches sur-exprimant sous effet d'œstradiol le gène *pS2* non méthylé. Les réponses de l'expression du gène *pS2* à l'activation par les RE α (d'un facteur 4 en moyenne) et à l'inhibition de MBD2 (d'un facteur 3,5 en moyenne) n'apparaissent donc pas être additives et suggèrent que l'activité de ce gène est le produit de ces deux régulateurs transcriptionnels. Il est toutefois à noter que dans les cellules MDA MB231, possédant une région 5' régulatrice *pS2* totalement méthylée, ni l'inactivation transitoire de MBD2, ni l'expression ectopique des RE α , ni la combinaison des deux, mènent à la ré-expression du gène *pS2*, suggérant que la méthylation totale de la région 5' régulatrice du gène *pS2* induit des changements chromatiniens importants qui préviennent de toute stimulation. Toutefois, dans les cellules possédant un profil de méthylation bimodale, telles les cellules HeLa, une stimulation synergique est observée. Ces données montrent donc que **la liaison de MBD2 à la région promotrice méthylée du gène *pS2* réduit mais n'abolit pas la réponse de l'expression du gène *pS2* aux RE α , suggérant que l'hypométhylation régionale de l'ERE, « prépare » la transcription de *pS2*.**

Les protéines MBD2 et RE α régulent la transcription génique *via* le recrutement de complexes enzymatiques catalysant des modifications post-traductionnelles des histones (Klose and Bird, 2006;Sahar and Sassone-Corsi, 2007). Ainsi, les RE α interagissent avec plusieurs co-activateurs possédant des activités histones acétyltransférases (CBP, p300, p/CAF et des membres de la famille p160) (Sahar and Sassone-Corsi, 2007) ou histones déméthylases (LSD1). A l'opposé, MBD2 recrute des co-répresseurs associés à des activités histones désacétylases (Mi2/NuRD) (Klose and Bird, 2006). L'acétylation et la méthylation des histones sont des marques chromatinienne qui ont fait l'objet de nombreuses études ces dernières années. Elles apparaissent respectivement être associées à des promoteurs actifs ou réprimés. Pour explorer de manière plus approfondie les mécanismes associés aux effets antagonistes de MBD2 et des RE α sur la transcription du gène *pS2*, nous avons regardé les marques chromatinienne du promoteur *pS2* dans les cellules HeLa par CHIP. La stimulation de l'expression du gène *pS2* par les RE α est ainsi associée à une augmentation de l'acétylation des histones H3 (d'un facteur 2, en moyenne) et à une diminution importante de la tri-méthylation des lysines 9 des histones H3 (d'un facteur 500 en moyenne) au niveau du promoteur *pS2*. En outre, la stimulation synergique du gène *pS2*, induite par la concomitante expression des RE α et inhibition de la synthèse en protéines MBD2, conduit à plus forte induction de l'acétylation des histones H3 (d'un facteur 28 en moyenne), tandis que le taux de tri-méthylation des lysines 9 des histones H3 reste faible. En définitif, **le répresseur méthylation-dépendant MBD2 et le trans-activateur RE α co-participent à la régulation de l'expression du gène *pS2* en induisant une balance entre les marques activatrices d'acétylation et les marques répressives de méthylation des histones H3.**

3- CONCLUSION

L'ensemble de ces données montre que la protéine **MBD2 module spécifiquement la réponse œstrogène-dépendante du gène *pS2*** quand elle est recrutée sur la région TATA-box méthylée et suggère que **le rôle des protéines à MBD ne se limite pas à des répresseurs stricts de l'expression génique**. La méthylation de l'ADN pourrait ainsi représenter un mécanisme additionnel pour la régulation génique.

Cancer Epigenetics: A role for Methyl-CpG-Binding Domain protein 2 in the modulation of the estrogen response of *pS2/TFF1* gene

Amandine Chatagnon^{*}, Esteban Ballestar[†], Manel Esteller[†], and Robert Dante^{*1}.

^{*} INSERM, U590, Lyon, F-69008, France;

[†] Cancer Epigenetics and Biology Programme (PEBC), Catalan Institute of Oncology (ICO-IDIBELL), Avda. Gran Via 199-203, 08907 L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain.

¹Correspondence: Dr Robert Dante

Running title: MBD2 modulates estrogen-dependent *pS2* expression

Key words: DNA hypomethylation - Cancer - Transcription - Transactivator - Methylation dependent repressor

ABSTRACT

In human Estrogen Receptor α (ER α)-positive breast cancers, 5' end dense methylation of the estrogen-regulated *pS2/TFF1* gene correlates with its transcriptional inhibition. However, in some ER α -rich biopsies, *pS2* expression is observed despite the methylation of its TATA-box region. Herein, we investigated the methylation-dependent mechanism of *pS2* regulation. We observed interplay between Methyl-CpG-Binding Domain protein 2 (MBD2) transcriptional repressor and ER α transactivator: (i) the *pS2* gene is poised for transcription upon demethylation limited to the enhancer region containing the estrogen responsive element (ERE); (ii) MBD2-binding sites overlapped with the methylation status of the *pS2* 5' end; (iii) MBD2 depletion elevated *pS2* expression and ectopic expression of ER α partially overcame the inhibitory effect of MBD2, when the ERE is unmethylated. Furthermore, serial chromatin immunoprecipitation assays indicated that MBD2 and ER α could simultaneously occupy the same *pS2* DNA molecule; (iv) concomitant ectopic ER α expression and MBD2 depletion resulted in synergistic transcriptional stimulation, while the *pS2* promoter remains methylated. Indeed, MBD2 and ER α drive opposite effects on *pS2* expression, which are associated with specific steady state levels of histone H3 acetylation and methylation marks. Thus, epigenetic silencing of *pS2* could be dependent on balance of the relative intracellular concentrations of ER α and MBD2.

INTRODUCTION

Global loss of DNA methylation and localized CpG island hypermethylation is a common characteristic of cancer cells (1-3), leading respectively to aberrant ectopic gene activation or inversely to gene silencing. The *pS2* gene (also called *TFF1*) has been identified by differential screening of a cDNA library from the human breast cancer cell line MCF7 (4). In this cell line, its transcription is directly controlled by estrogens (5) and an estrogen responsive element (ERE) has been identified at nt positions -405 to -393, from transcription start site (5). In breast tumors, expression of the *pS2* gene is correlated with the presence of estrogen receptors (ER), and it had been suggested that *pS2* expression increases cell proliferation and tumor cell survival (6, 7). Analysis of breast cancer biopsies or microdissected cells from formalin-fixed breast tissues has shown that *pS2* is hypomethylated in sub-classes of breast cancers (8, 9).

We have previously shown (8) that the hypomethylation of the CCGG site close to the *pS2* ERE correlates with its expression in human breast cancer biopsies. Southern blots performed with methylation sensitive enzymes and bisulphite sequencing have indicated that the breast tumors analyzed exhibited different DNA methylation patterns at the 5' end of *pS2* (8). Biopsies can display either methylated, unmethylated and partially methylated 5' end *pS2* sequences at CpGs analyzed (nt positions -84 to +16) (8). These observations prompted us to investigate the methylation-linked mechanisms of *pS2* gene repression and the potential involvement of DNA methylation in its response to estrogen stimulation.

In mammals, mechanisms implicated in the generation of a repressive state of chromatin associated with methylated DNA sequences have been investigated for over 20 years (10-13). Pioneering studies led to the discovery of the Methyl-CpG-binding domain (MBD) proteins family (14), which mediate DNA methylation-dependent gene silencing. The five *bona fide* MBD proteins, MeCP2, MBD1, MBD2, MBD3, and MBD4, share a canonical MBD. Biochemical and genetic analyses of these proteins have provided evidence of a direct link between DNA methylation and repressive chromatin architecture. MeCP2, MBD1 and MBD2 proteins bind to methylated DNA and recruit different histone deacetylase (HDAC)- and histone methyltransferase (HMT)-containing complexes that control chromatin compaction and gene silencing (15-17). Mammalian MBD3, which lacks a functional MBD, does not recognize methylated DNA but is part of the histone deacetylase and chromatin remodeling Mi2/NuRD complex (18-20). The last member of this protein family, MBD4, is a thymine glycosylase primarily involved in DNA repair (21).

The involvement of MBD proteins in gene imprinting (22), X inactivation (23), and transcriptional silencing of genes possessing hypermethylated CpG islands in cancer cells (2, 3) is now well documented. However, in contrast to the situation observed for DNMT-deficient mice, which either fail to develop or else die shortly after birth (24), the loss of MBD proteins, with the exception of MBD3, does not result in dramatic phenotypes (17), suggesting that MBD proteins deficiency causes subtle gene-expression changes.

Although the involvement of MBD proteins in gene silencing is well established, new facets regarding the links between DNA methylation, MBD proteins and gene transcription are emerging. For instance, it has been reported that DNA methylation in the body of genes can alter chromatin structure and reduce transcriptional elongation (25). In parallel with the above findings, we have shown that the association of MBD2 with a methylated CpG island located downstream of the promoter region reduces the transcription of *NBR2* gene (26).

The density of methylation seems to be an important parameter in the MBD proteins-dependent repression. Several years ago, using *in vitro* methylated plasmids, it had been shown that the density of methylated CpG and promoter strength modulate transcriptional repression mediated by MeCP1 complexes containing MBD2 (27). Furthermore, analysis of the transcriptional activity of patch-methylated plasmids microinjected into *Xenopus* oocytes has suggested a competition between transactivators and MBD proteins for the establishment of an open conformation (28). All together, these data suggest that transcriptional repression mediated by DNA methylation is a consequence of a cross-talk between methylated CpG density, MBD proteins and transactivators.

To further explore the relative roles of methylated CpG patterns and the competition between transactivators and MBD proteins to influence or modulate gene transcription, we here investigate the expression of the estrogen-regulated *pS2/TFF1* gene (29) in cell lines exhibiting different DNA methylation patterns at its 5' end, unmethylated, regionally methylated, and fully methylated. In these cell lines, it was possible to manipulate artificially the Estrogen Receptor- α (ER α), the natural transactivator of *pS2*, and MBD protein levels, and therefore, use them to determine the contribution of these proteins to *pS2* expression.

MATERIALS AND METHODS

Cell culture

MDA MB231, MCF7, and HeLa cells were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD). Cells were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) containing 1g/l glucose (Eagle, Sigma, L'isle d'Abeau, France) and supplemented with 10% of heat inactivated fetal bovine serum (Lonza, Vervier, Belgium) and grown at 37°C in a humidified 5% CO₂ atmosphere.

Due to the poor efficiency of repeated siRNA treatments associated with vector transfections in estradiol depleted medium by charcoal extraction, all the experiments were performed in standard DMEM medium supplemented with fetal bovine serum. To investigate the estrogen dependence of *pS2* expression, cells were exposed to estradiol or to 5 μM 4-hydroxytamoxifen (OHT).

Sodium bisulphite modification

Sodium bisulphite reactions were carried out as previously described (30). Two regions (nt positions -464 to +67, and nt positions +37 to +314 from the *pS2* transcription start site) within the *pS2* promoter gene were analyzed. PCR amplifications were accomplished in 100 μl using the HotStart *Taq* DNA polymerase Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) and 0.25 μM of the primers (**Supplementary Table S1**), after 15 min at 95°C for *Taq* polymerase activation and 35 cycles (30 s denaturation at 94°C, 1 min annealing at 52°C, and 1.5 min extension at 72°C). To determine accurately the proportion of methylated CpG, PCR products were cloned into a pGEM-T vector (Promega, Lyon, France) and 10 random clones from each sample were analyzed by automatic sequencing (Biofidal, Lyon, France).

Chromatin Immunoprecipitation (ChIP) assays

Nucleoprotein complexes were sonicated to reduce the length of DNA fragments to 300–600 bp, and ChIP assays were carried out as described previously (26). Fifteen μl of two different polyclonal anti-MBD2 antibodies (kindly provided by Dr. P. Wade and Dr. E. Ballestar) or 20 μl of polyclonal anti-MBD1 (Abcam, Cambridge, UK), anti-MeCP2 (Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY) antibodies, or 2.5 μg of polyclonal anti-ER α antibody (Santa Cruz Biotechnology, Inc, Santa Cruz, CA) or anti-mouse IgG (Dakocytomation, Trappes, France), were used for immunoprecipitation. DNA samples obtained from the input, unbound and bound fractions were quantified by densitometry using the VersaFluorTM Fluorometer (Biorad, Ivry, France) and RiboGreen reagent (Molecular Probes, Interchim, Montluçon, France). The amounts of DNA in IgG control fractions were at the limit of the fluorometric detection methods. Thus, PCR quantification of DNA fragments in IgG fractions was not accurate as in other fractions, since we have used very large parts of the "IgG fractions" when compared with the other fractions.

PCR assays were performed to assess the binding of the proteins to the *pS2* 5' flanking sequence. Two regions were analyzed: "*pS2* ERE fragment" (from nt positions -461 to -204 from the *pS2* transcription start site) and "*pS2* promoter fragment" (from nt positions -11 to +292). We amplified, by dose-dependent and quantitative PCR (Q-PCR), equal amounts of total DNA (0.5 ng) from the input, unbound and bound

fractions. HotStar *Taq* polymerase kit (Qiagen) and 0.4 μM of the primers (Supplementary Table S1) were used in classical PCR. After 15 min at 95°C for *Taq* polymerase activation and 37 cycles (30 s denaturation at 94°C, 1 min annealing at 53°C, and 1.5 min extension at 72°C) for the “*pS2* ERE fragment” or 36 cycles (30 s denaturation at 94°C, 1 min annealing at 58°C, and 1.5 min extension at 72°C) for the “*pS2* promoter fragment”, PCR products were analyzed on a 2% agarose gel containing 1 $\mu\text{g/ml}$ ethidium bromide and were quantified by densitometry. Real-time PCR was carried out using LightCycler® Fast Star DNA Master PLUS SYBR Green I System (Roche Molecular Biochemicals, Maylan, France) and 0.4 μM of the primers (Supplementary Table S1). Cycling parameters were 95°C for 10 min followed 45 cycles at 95°C for 10 s, 64°C for 5 s and 72°C for 10s.

ChIP-on-chip

For ChIP-on-Chip analysis, the specific protein-DNA complexes were obtained from independent immunoprecipitations using two different polyclonal anti-MBD2 antibodies (kindly provided by Dr. P. Wade and Dr. E. Ballestar). The ChIP DNAs from the input and bound fractions were amplified, labelled and hybridized on microarrays by ProfileXpert service according to Affymetrix™ protocols. Briefly, the ChIP DNA was amplified by random PCR. Enrichment of MBD2-bound sites during the amplification procedure was assayed, by PCR amplification of *NBR2* (26) and *pS2* promoters, on each ChIP samples before and after amplification. The amplified DNAs were then labelled using the GeneChip® WT Double - Stranded DNA Terminal Labelling Kit and hybridized to the human tiling arrays (Human Promoter 1.0R Arrays), which were then washed and scanned. Raw data from the scans were analyzed using Affymetrix® Tiling Analysis Software (TAS) and the results were viewed in Affymetrix' Integrated Genome Browser (IGB) Software.

Serial ChIP assays (ChIP re-ChIP)

The ERE and the TATA box regions of *pS2* are placed about 450 bp apart. In order to immunoprecipitate, from the same DNA fragments, the proteins bound to both regions, nucleoprotein complexes were sheared to reduce the length of DNA fragments to 500-1000 bp. In serial ChIP experiments, following primary immunoprecipitation, the cross-linked complexes were eluted from the immunoprecipitated fraction by incubation with elution buffer (1% SDS, 50 mM NaHCO_3) at room temperature for 30 min, and then diluted 1:10 in ChIP dilution buffer (0.01% SDS; 1.1% Triton X-100, 1.2 mM EDTA, 16.7 mM Tris-HCl, pH 8.0, 167 mM NaCl) followed by reimmunoprecipitation with a second set of antibodies.

Transient MBD2 siRNA knockdown and ER α vector transfections

siRNA duplexes for *MBD2* (sense: 5'-GGAGGAAGUGUACCGAAATT-3'; antisense: 5'-UUUUCGGAUCACUCCUCCTT-3') and non-specific siRNA control were obtained from Eurogentec (Eurogentec, Seraing, Belgium). HEG0, an expression vector coding for human ER α (31), and the empty vector pSG5, were provided by Prof. P. Chambon. MBD2 siRNA and ER α vector was transfected with Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA) according to the manufacturer's instructions. Briefly, cells were seeded at 2×10^5 cells per well in six-well plates, and grown to 50-60% confluence on the day of

transfection. All transfections were done in Opti-MEM medium (Invitrogen) with 625 nM of MBD2 siRNA and 1 µg of ER α expression plasmid. Lipofectamine 2000 complexes were incubated for 4-5 hours. The medium was then removed and replaced with fresh medium. Cells were grown and harvested at various times after the transfection.

Reverse-transcription-PCR analysis

Total RNA was extracted from the cell lines using the RNeasy Mini kit (Qiagen). After extraction, the integrity of total RNA was examined on a 1.2% agarose gel containing 1 µg/ml ethidium bromide and quantified by densitometry using a Fluor's fluorimeter and Quantity One software (Biorad, Ivry, France) by comparison with serial dilutions of a standard RNA (Roche, Molecular Biochemicals, Maylan, France).

pS2 mRNA was detected by relative RT-PCR using primers described in Supplementary Table S1. Briefly, 0.1 µg of total RNA were amplified simultaneously for *β -actin* and *pS2* using the One Step RT-PCR kit (Qiagen). After 30 min incubation at 50°C, RT was inactivated by heating at 95°C for 15 min. PCR amplification was then performed under the following conditions: 30 cycles, 30 s denaturation at 94°C, 1 min annealing at 55°C and 1.5 min extension at 72°C. PCR products were analyzed on a 2% agarose gel and quantified. The ratio between *pS2* and *β -actin* signals was then determined.

Real-time RT-PCR were also carried out to quantify *pS2* mRNA using LightCycler® RNA Master SYBR Green I One-Step RT-PCR mix on a LightCycler® 2.0 system according to the manufacturer's instructions (Roche). *β -actin* mRNA was used as a reference. The primers sequences used for reverse-transcription-PCR are available in Supplementary Table S1.

MBD2 mRNA was quantified by competitive quantitative RT-PCR as previously described (32).

RESULTS

Correlation between methylation patterns and *pS2* transcriptional repression

Expression of *pS2* is driven by a complex promoter containing a promoter/enhancer region responsive to estrogens, EGF, a phorbol ester tumor promoter, c-Ha-ras oncoprotein, and c-jun protein (33). Specifically, the 5' end of *pS2* possesses an estrogen-responsive element (ERE), conferring potential estrogen inducibility. In the ER α -rich MCF7 cell line, it has been shown (34) that proteins present on the *pS2* promoter in the absence of estradiol (E₂) include basal transcriptional factors, active polymerase II, certain HATs and HMTs. This basal transcriptional activity implies steroid-independent expression of *pS2*. Moreover, the 5' end of *pS2* (nt positions -464 to +314) is included in a CpG-poor region, G + C = 0.54 %, CpG observed / CpG expected = 0.35. A correlation between the methylation status of the *pS2* promoter region and its expression has been observed in human tissues and the breast cancer cells lines (8, 35). Experimental evidences are also in favour of a role of DNA methylation in the repression of *pS2* transcription. In the ER α -rich MCF7 cells, *pS2* is unmethylated and transcriptionally active while in the ER α -negative MDA MB231 cell line the 5' end of *pS2* (nt positions -665 to +17) is fully methylated and the *pS2* gene is silenced, (35). We have extended this analysis to the downstream region of *pS2* promoter, since it had been suggested that DNA methylation of the regions adjacent to a promoter region may affect transcription (26, 36, 37).

The methylation status of the 5' end of *pS2*, from nt positions -464 to +294, was investigated in MCF7 cells expressing *pS2* at a high level and MDA MB231 a *pS2* negative cell line (**Fig. 1A**). Bisulphite conversion of DNA and sequencing of cloned PCR fragments, indicated that this region is unmethylated in MCF7 and fully methylated in MDA MB231 cells (**Fig. 1B**). A screening failed to detect a human breast cancer cell lines exhibiting intermediate methylation patterns similar to that observed in breast cancer biopsies by Southern blot experiments (8). Nevertheless, some of these patterns, associated with low level of *pS2* transcripts (Fig. 1A), are very similar to that observed in HeLa cells (8). Thus, these cells were chosen for further analysis. HeLa cells exhibit an intermediate DNA methylation pattern, the CpGs spanning the -464 to -84 region, which includes the ERE are unmethylated, while the TATA-box region is methylated (Fig. 1B). These data confirm the inverse correlation between *pS2* expression and the density of the methylation of its 5'end, suggesting that the methylation patterns around the transcription start site impact in the activity of *pS2* promoter in these cells.

Specific binding of MBD2 to the methylated *pS2* promoter

Among the proteins involved in the methylation-dependent repression of transcription, MBD proteins seem to play a major role. Therefore, we assessed the presence of MBD proteins on *pS2* promoter by chromatin immunoprecipitation (ChIP) assays using antibodies directed against MBD1, MBD2 and MeCP2.

Representative experiments from at least three independent assays for each antibody are shown in **Fig. 2A**. As a control, the fractions immunoprecipitated with a non-MBD protein-specific antibody (anti-mouse IgG) were also analyzed. In order to determine *pS2* DNA fragment enrichment in MBD immunoprecipitated fractions, a dose-dependent and quantitative (Q-PCR) amplifications (**Fig. 2 A and B**) using an equal

quantity of DNA (0.5 ng) per PCR assay, were performed with each fraction obtained from the ChIP procedure. We focused this analysis on the *pS2* methylated promoter region, shared by HeLa and MDA MB231 cells (nt positions -11 to +292).

In the *pS2*-methylated cells, MDA MB231 and HeLa, when antibodies against MBD2 were used, the amount of *pS2* promoter per ng of total DNA in immunoprecipitated fraction (Fig. 2A, “bound”) was greater than in the input, or in the non-retained fractions (Fig. 2A, “input”, “unbound”, and “IgG”), indicating that this methylated region is immunoprecipitated by anti-MBD2 antibodies. In contrast, ChIP assays with anti-MeCP2 or anti-MBD1 antibodies led to a depletion of this DNA segment in the bound fractions (Fig. 2A). Western blot analysis, using antibodies directed against MeCP2 and MBD1, produced a signal of the expected sizes (14), ~85 kDa and ~70 kDa, respectively (data not shown), indicating that both proteins are expressed in MDA MB231 and HeLa cells. As an additional control of MBD2-ChIP assays, we also amplified the -11 to +292 *pS2* region from MCF7-chromatin immunoprecipitated by anti-MBD2 antibodies (Fig. 2A). As expected, no enrichment was observed in the bound fraction, since this region was unmethylated in the MCF7 cell line (Fig. 2A). Taken together, these data strongly suggest that MBD2 binds selectively and specifically the methylated region of this promoter.

High resolution MBD2 binding profiles analysis of *pS2* promoter indicates that MBD2 specifically binds the methylated *pS2* promoter region and does not spread to the unmethylated ERE in HeLa cells

In HeLa cells, the bimodal methylation status of the *pS2* 5' end suggests that only some regions would actually be bound by MBD2. The unmethylated region containing the ERE (nt positions -405 to -393) is very close to the methylated TATA-box region (beginning at nt -9). ChIP experiments are not appropriate to discriminate between these two regions, as they are below the limit of resolution of the assay. Standard sonication of crosslinked chromatin leads to 300-500 bp DNA fragments and attempts to reduce its length (100-200 bp) resulted in a loss of efficiency in immunoprecipitation. Therefore, to precisely map the MBD2 binding sites we used a high-resolution method based on a ChIP-on-chip approach (Chatagnon *et al.*, manuscript in preparation). DNAs obtained from HeLa cell chromatin immunoprecipitated by anti-MBD2 antibodies were hybridized on an Affymetrix Human Promoter 1.0R Array (ChIP-on-chip).

ChIP-on-chip experiments indicated that MBD2 associated specifically the region containing the methylated *pS2* TATA-box, where a strong positive signal (red bars) is observed, while the region containing the unmethylated ERE is devoid of MBD2. Thus, the positive signals for MBD2 binding parallels the methylation status of the *pS2* 5' end and indicates that MBD2 does not spread outside the methylated region on *pS2* promoter (**Fig. 3A**). As a control, results obtained for a previously identified MBD2 free promoter (26), *BRCA1*, are also shown on **Fig. 3B**. Consistent with previous findings, no MBD2 positive signal was observed in the region spanning the nucleotides -1000 to +1000 of *BRCA1* (Fig. 3B).

MBD2 acts as a methylation-dependant transcriptional repressor of *pS2* transcription

The correlation between levels of *pS2* expression and the presence of MBD2 in the TATA-box region argues in favour of a repressive effect of MBD2 on *pS2* transcription. To examine this further, we depleted cells from MBD2 by transient transfection of siRNA targeted *MBD2* transcripts. Quantitative competitive RT-PCR

assays indicated a significant reduction of the *MBD2* mRNA level (by 87-93%) (Supplementary **Fig. S1A**). Moreover, in HeLa cells, western blot analysis also revealed a dramatically lower abundance of MBD2 proteins in the MBD2 siRNA-treated cells compared with control cells (Supplementary **Fig. S1B**). Furthermore, the expression of MeCP2 and MBD1 was not different in *MBD2* knockdown HeLa cells than in wild-type or mock-treated cells (Supplementary Fig. S1B).

In the *pS2*-fully methylated cells MDA MB231, MBD2 depletion (about 90%), did not induce *pS2* expression (Supplementary **Fig. S1C**). However, in MBD2 siRNA-treated HeLa cells, *pS2* expression is stimulated approximately 3-fold (**Fig. 4**), while the methylation level of *pS2* TATA box region and ER α expression remain unaffected (data not shown). In MBD2 siRNA-treated HeLa cells, transient expression of an *Mbd2* cDNA, refractory to siRNA-mediated decay (26), shifted down the *pS2* mRNA level (Fig. 4). Additional dose of *Mbd2* in HeLa cells, containing normal levels of MBD2 proteins, did not affect *pS2* expression (Fig. 4). Thus, the amount of MBD2 protein is not a limiting factor in the transcriptional repression of *pS2* in these cells. In MCF7 cells, quantitative RT-PCR showed that the level of *pS2* expression is unaffected by MBD2 depletion, indicating that MBD2 siRNA did not elevate *pS2* expression by an off-target effect since *pS2* is not bound by MBD2 in these cells (Supplementary Fig. S1C).

ER α only bound *pS2* ERE when unmethylated in cell lines

To determine whether ER α can be recruited on the *pS2* ERE sequence when this region or the adjacent region is methylated, we artificially manipulated the level of ER α in MDA MB231 and HeLa cells, which are deficient in this protein.

ChIP assays, using anti-ER α antibodies, were performed from, HeLa and MDA MB231 cells transiently transfected with the vector HEG0 encoding ER α . ER α -rich MCF7 cells were used as a positive control and untransfected HeLa and MDA MB231 cells as negative controls. As expected, ChIP assays performed from MCF7 chromatin indicated that the amount of *pS2* DNA per ng of total DNA in immunoprecipitated fraction (**Fig. 5**, "bound") is higher (about 8-fold, Q-PCR assays) than in input, or non-retained fractions (Fig. 5, "input", "unbound", and "IgG") while no enrichment in *pS2* sequence was observed in immunoprecipitated fraction obtained from untransfected HeLa and MDA MB231 cells (Fig. 5). All together, these data indicate that anti-ER α antibodies specifically precipitated chromatin bound by ER α .

In HeLa cells, transient expression of the vector HEG0 coding for ER α , leads to enrichment in *pS2* sequence in the immunoprecipitated fraction (Fig. 5). This enrichment (about 10 fold, Q-PCR assays) was comparable to that observed in MCF7 cells, indicating that ER α is efficiently recruited on the *pS2* ERE site in HeLa cells. In contrast, in MDA MB231 cells, despite ectopic expression of ER α , *pS2* sequence was not selectively immunoprecipitated by the anti-ER α antibodies (Fig. 5). Thus, ER α does not bind the methylated *pS2* ERE in MDA MB231 cells, suggesting that full DNA methylation induces chromatin changes that prevent ER α binding.

Ectopic expression of ER α enhances *pS2* gene expression only when its 5' end region is partially methylated, in ER α negative cells

The ERE of the *pS2* promoter can act as a strong enhancer in the presence of E₂ and ER α (29, 33). To analyze the potential antagonistic activity of MBD2 and ER α on *pS2*, ectopic expression of ER α was induced in MDA MB231 and HeLa cells.

Transient expression of ER α elevated *pS2* expression by a 4-fold (**Fig. 6**), in HeLa cells. This stimulation by ER α of *pS2* transcription did not affect the methylation status of HeLa *pS2* promoter (data not shown). ER α stimulation of *pS2* expression was fully reversed by antiestrogen (4-hydroxytamoxifen, OHT) treatments (Fig. 6), while the basal level of *pS2* expression was conserved. These results indicate the existence of estrogen-dependent transactivation of *pS2* in HeLa cells. As expected, *pS2* expression was not induced in MDA MB231 cells (data not shown), since ER α did not bound *pS2*-ERE sequence in this cell line (Fig. 5). These results suggest that demethylation of ERE region allows the estrogen response of *pS2* in HeLa cells.

MBD2 is not displaced from the *pS2*-methylated promoter region by ER α transactivation, in HeLa cells

HeLa cells expressing the vector encoding ER α were used to identify the proteins bound to the 5' end of *pS2*. Dose-dependent and quantitative PCR amplifications of each fraction obtained from the ChIP procedure were performed. These assays showed that MBD2 was still present on the methylated region of *pS2* promoter (**Fig. 7A**), and the enrichment in the bound fraction was not modified by the presence of ER α on the ERE (Fig. 7A). These results provide evidence that ER α can overcome, at least partially, the inhibitory effect of MBD2 binding to *pS2* promoter and imply that both proteins can occupy the 5' end of the *pS2* gene.

To address this matter, we performed serial ChIP assays. A first round of immunoprecipitation was carried out with an anti-ER α antibody from HeLa cells transiently transfected with the vector HEG0 encoding ER α . Then, immunoprecipitated cross-linked DNA-protein complexes were isolated and subjected to reimmunoprecipitation using antibodies directed against MBD2. PCR amplification of *pS2* promoter region from the fraction reimmunoprecipitated with anti-MBD2 antibodies gave a positive signal (**Fig. 7B**). In control reactions, as expected, no signal was detected with non-specific antibodies, while a positive signal was observed in the fraction reimmunoprecipitated with anti-ER α antibodies (Fig. 7B). Thus, the binding of ER α on the ERE of *pS2* does not displace MBD2 from the methylated TATA-box region, since both proteins were present on the same DNA molecules.

Synergic activity of MBD2 depletion and ectopic ER α expression on *pS2* transcription, in HeLa cells

The opposite effects of MBD2 and ER α proteins on *pS2* expression suggest an antagonistic action between these two transcriptional regulators, in HeLa cells. To investigate this possibility, the concentrations of MBD2 and ER α proteins were artificially manipulated in these cells. After MBD2 depletion mediated by RNA interference, ectopic ER α expression resulted in a dramatic (approximately 31-fold) enhancement of *pS2* mRNA concentration, approaching the level to that observed in MCF7 (**Fig. 8A, B**). Thus, *pS2* responses to ER α activation (4-fold increase) and MBD2 depletion (3-fold increase) are not additive and suggest a cross-

talk between these two transcriptional regulators. Concomitant exposure to OHT knocked down *pS2* expression to the level observed in HeLa cells transfected by MBD2 siRNA alone, (about 3-fold) when compared with control HeLa cells (Fig. 8A, B). It should be noted that *pS2* transcription cannot be induced by concomitant ectopic expression of ER α and MBD2 depletion when its 5' end is fully methylated, as observed in MDA MB231 cells (data not shown). In cells exhibiting a bimodal methylation profile as HeLa cells, a synergic activation was observed. Thus, the binding of MBD2 to the methylated TATA-box of *pS2* reduces but does not abolish *pS2* response to ER α , suggesting that as a result of regional demethylation, *pS2* is poised for transcription.

Post-translational modifications of histone H3 are associated with *pS2* expression induction

To get further insight on the mechanism involved in the opposite effect of MBD2 and ER α on *pS2* transcription, we investigated histone modifications in HeLa cells. It is well known that both proteins, MBD2 and ER α , regulate the transcription by the recruitment of chromatin remodeling complexes (15, 38). Importantly, ER α has been shown to interact with several coactivators with histone acetyltransferase activity (CBP, p300, p/CAF and the members of p160 family) (38), or histone demethylase (LSD1) (39). Conversely, MBD2 recruits corepressors with histone deacetylase activity (Mi2/NurD) (17). Histone H3 acetylation (H3Ac) and histone H3 lysine 9 (H3K9) trimethylation chromatin marks have been the subject of intense investigation during the past few years and appear to be associated with active and silent promoters, respectively.

In our study, ChIP assays indicated that ER α *pS2* stimulation was associated with increase in histone H3 acetylation (~2.5 fold) and enhanced the demethylation of H3K9 (~500 fold) at *pS2* promoter, when compared with wild type HeLa cells (**Fig. 9**). Moreover, in HeLa cells, the synergic activity of MBD2 depletion and ectopic ER α expression on *pS2* transcription led to a stronger induction of histone H3 acetylation (~28 fold) at *pS2* promoter, while H3K9 methylation was still lowered (~10 fold), (Fig. 9). From these findings we conclude that the transcriptional MBD2 repressor and ER α transactivator co-participate to the regulation of *pS2* expression by mediating a balance between repressive histone H3 lysine 9 trimethylation and active histone H3 acetylation marks at *pS2* promoter. Thus, the repressive effect of MBD2 on the transactivation of *pS2* mediated by ER α is linked to histone modifications.

DISCUSSION

In cancer tissues and cell lines, transcriptional silencing associated with aberrant methylation of promoter regions is now regarded as an almost universal epigenetic marker of malignant transformation (1-3). Since the first experiments showing that the MBD2 binds *in vivo* to the methylated regulatory regions of *p16* and *p14* and could thereby contribute to gene silencing in colon carcinoma cell lines (40), a body of evidence has accumulated concerning associations between MBD proteins and hypermethylated promoter regions (41-43). In non-pathological situations, MBD proteins are also directly involved in the repression of imprinted genes and differentiation-dependent gene expression (17).

In unmethylated MCF7, methylated MDA MB231, and regionally methylated HeLa cells, we found that MBD2 binding profiles parallel the methylation patterns of the *pS2* 5' end, while MeCP2 and MBD1 were not detected in this region. Furthermore in HeLa cells, high resolution mapping of MBD2 binding sites indicated that MBD2 only associated the methylated region close to the TATA-box, whereas the unmethylated region, including the *pS2* ERE, was not targeted by this repressor.

MBD2 depletion by siRNA targeting *MBD2* transcripts elevated *pS2* transcription by a factor of ~3 in HeLa cells, while, in unmethylated cells (MCF7), *pS2* expression was not affected by MBD2-specific siRNA transfection suggesting a direct relationship between *pS2* repression and MBD2 binding.

Injection in *Xenopus laevis* oocytes of regionally methylated plasmids has shown that a few methylated cytosines can inhibit a flanking promoter but a threshold of modified sites is required to organize a stable, diffusible chromatin structure. From these data and results obtained with chemical inhibitor of histone deacetylase, these authors have proposed that a specialized chromatin structure, formed not only by MBD proteins but also by other structural and remodelling activities, is organized on the modified DNA, when the number of methylated sites is increased and reaches the threshold that leads to diffusion of gene silencing on the DNA fiber (28). In agreement with this hypothesis, MBD2 depletion did not induce *pS2* transcription in MDA MB231 cells exhibiting fully methylated *pS2* 5' end.

The present study also indicates that ER α only associates the unmethylated *pS2* ERE independently of the methylation status of the TATA-box region, since the same level of ER α was observed at the ERE region in MCF7 cells and in HeLa cells transiently transfected with the HEG0 vector encoding this receptor. In contrast, strong expression of ER α upon transient transfection with HEG0, did not lead to ER α binding in MDA MB231 cells, suggesting that full methylation of the 5' end of *pS2* prevents its binding. Although a direct effect cannot be totally excluded, we have previously shown, using electrophoretic mobility assays, that methylated oligonucleotides containing the *pS2* ERE are efficiently recognized by ER α (44). *In vivo* experiments also suggest an indirect effect of DNA methylation. In the HE5 cell line derived from MDA MB231 that expresses functional ER α , but not *pS2*, DNase I hypersensitive sites are not modified by ER α expression, while in the ER α and *pS2* positive MCF7 cells display hormono-dependent hypersensitive DNase sites at the *pS2* ERE region (45). Thus, the methylation of TATA-box region does not seem to lead to diffusible alteration of chromatin structure, in HeLa cells.

As expected from the analysis of methylation and ER α binding sites profiles, ectopic expression of ER α in MDA MB231 cells did not stimulate *pS2* expression. In HeLa cells, ER α induction of *pS2* expression was observed suggesting that the demethylation of ERE region seems to be a prerequisite for estrogen-

dependent $pS2$ stimulation. Nevertheless, the level of $pS2$ transcript remained relatively low when compared with that observed in E_2 treated MCF7 cells. The present study indicates that high levels of $ER\alpha$ can at least partially overcome the transcriptional repression mediated by MBD2 without affecting the methylation status of the $pS2$ promoter. Thus, the binding of MBD2 to the methylated TATA-box of $pS2$ reduces but does not abolish $pS2$ response to $ER\alpha$.

The mapping of MBD2 binding sites at $pS2$ locus indicated that MBD2 proteins lay downstream the initiation start site. The analysis of the 5' region of the endothelin receptor B gene in human cell lines shows that extensive methylation closely downstream of the initiation site does not abolish gene expression (46). However, the impact of intragenic methylation has been studied from transgenes methylated exclusively in a region downstream of the promoter, into a specific genomic site. This methylation pattern induces a close chromatin conformation and decrease transcription levels, suggesting that this epigenetic mark may reduce the efficiency RNA polymerase II elongation (25). Thus, we cannot exclude that DNA methylation and MBD2 binding downstream $pS2$ promoter region may impact elongation rate. However, we observed post-translational modifications of histone H3 (acetylation and demethylation) at the promoter region, when $pS2$ transcription is induced by MBD2 siRNA and/or $ER\alpha$ expression, suggesting that MBD2 depletion influences chromatin conformation at $pS2$ promoter.

Recently, it has been published that, upon E_2 induction, synchronized human cell lines exhibit a cyclical methylation/demethylation of the $pS2$ ERE region correlated with cyclical binding of transcriptional repressors/activators (47, 48), when the 5' end of $pS2$ is unmethylated (35, 48). Although the maintenance of DNA methylation patterns begin to be well described, it will also be important to consider mechanisms that enable the removal of these marks to fully comprehend the dynamic behavior of DNA methylation, as suggested by recent reports (47, 48). Nevertheless, the mechanisms and enzymatic activities that are responsible for DNA demethylation in mammals although potentially linked to DNA repair are controversial (47-53).

Transcriptional repression mediated by MBD proteins can be reversed by various mechanisms. In mouse and rat, *Mecp2* is directly involved in a depolarization-controlled repression of the *brain-derived neurotrophic factor (Bdnf)* gene in neurons (54, 55). This protein, associated with the corepressor Sin3a, binds to a CpG-poor methylated region of *Bdnf* promoters. Upon the initiation of Ca^{++} signaling, *Mecp2* becomes phosphorylated and is liberated from the promoter as *Bdnf* is activated. *Mbd2* is also able to repress CpG-poor methylated promoter. In *Mbd2* null mice, ectopic expression of interleukin-4 (IL4) disrupts T-helper cell differentiation, suggesting that *Mbd2* is a transcriptional repressor of IL4 in naïve T cells. Indeed, in naïve wild type T cells, overexpression of the transcription factor GATA-3, normally required for IL4 expression, displaces *Mbd2* from the promoter and activates IL4 transcription (56).

The interplay between $ER\alpha$ and MBD2 in $pS2$ transcription indicates that the partial reversion of transcriptional repression mediated by MBD2 does not necessarily involve the displacement of this repressor from its CpG-poor promoter region. In the model studied, the amount of $pS2$ gene immunoprecipitated by anti-MBD2 antibodies was not affected by the binding of $ER\alpha$. In addition, serial ChIP assays showed that $pS2$ promoter region can be simultaneously bound by $ER\alpha$ and MBD2 proteins. Furthermore, the synergic effects of ectopic $ER\alpha$ expression and depletion of MBD2 on $pS2$ transcription also suggest that both proteins do not compete for $pS2$ promoter occupancy.

Data, obtained from experiments performed on cell lines, indicate that methylation-dependent repression

of *pS2* expression is mediated by MBD2. Nevertheless, ER α binding can counteract the inhibitory effect of DNA methylation without displacing MBD2 proteins from the TATA-box region. Taken together these data might explain *pS2* expression in some ER α -rich breast cancers despite the methylation of its TATA-box.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Prof. Pierre Chambon for critical reading of this manuscript and his help with this project. The present work was supported by the Ligue Nationale contre le Cancer (Comité du Rhône and Comité de la Loire), the Institut National contre le Cancer (EpiPro and CircBio).

REFERENCES

1. Ehrlich, M. (2002) DNA methylation in cancer: too much, but also too little. *Oncogene* 21, 5400-5413
2. Esteller, M. (2007) Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps. *Nat Rev Genet* 8, 286-298
3. Baylin, S. B., and Ohm, J. E. (2006) Epigenetic gene silencing in cancer - a mechanism for early oncogenic pathway addiction? *Nat Rev Cancer* 6, 107-116
4. Masiakowski, P., Breathnach, R., Bloch, J., Gannon, F., Krust, A., and Chambon, P. (1982) Cloning of cDNA sequences of hormone-regulated genes from the MCF-7 human breast cancer cell line. *Nucleic Acids Res* 10, 7895-7903
5. Brown, A. M., Jeltsch, J. M., Roberts, M., and Chambon, P. (1984) Activation of pS2 gene transcription is a primary response to estrogen in the human breast cancer cell line MCF-7. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81, 6344-6348
6. Perry, J. K., Kannan, N., Grandison, P. M., Mitchell, M. D., and Lobie, P. E. (2008) Are trefoil factors oncogenic? *Trends Endocrinol Metab* 19, 74-81
7. Amiry, N., Kong, X., Muniraj, N., Kannan, N., Grandison, P. M., Lin, J., Yang, Y., Vouyovitch, C. M., Borges, S., Perry, J. K., Mertani, H. C., Zhu, T., Liu, D., and Lobie, P. E. (2009) Trefoil factor-1 (TFF1) enhances oncogenicity of mammary carcinoma cells. *Endocrinology*
8. Martin, V., Ribieras, S., Song-Wang, X. G., Lasne, Y., Frappart, L., Rio, M. C., and Dante, R. (1997) Involvement of DNA methylation in the control of the expression of an estrogen-induced breast-cancer-associated protein (pS2) in human breast cancers. *J Cell Biochem* 65, 95-106
9. Dietrich, D., Lesche, R., Tetzner, R., Krispin, M., Dietrich, J., Haedicke, W., Schuster, M., and Kristiansen, G. (2009) Analysis of DNA methylation of multiple genes in microdissected cells from formalin-fixed and paraffin-embedded tissues. *J Histochem Cytochem* 57, 477-489
10. Cedar, H. (1988) DNA methylation and gene activity. *Cell* 53, 3-4
11. Huang, L. H., Wang, R., Gama-Sosa, M. A., Shenoy, S., and Ehrlich, M. (1984) A protein from human placental nuclei binds preferentially to 5-methylcytosine-rich DNA. *Nature* 308, 293-295
12. Meehan, R. R., Lewis, J. D., McKay, S., Kleiner, E. L., and Bird, A. P. (1989) Identification of a mammalian protein that binds specifically to DNA containing methylated CpGs. *Cell* 58, 499-507
13. Keshet, I., Lieman-Hurwitz, J., and Cedar, H. (1986) DNA methylation affects the formation of active chromatin. *Cell* 44, 535-543
14. Hendrich, B., and Bird, A. (1998) Identification and characterization of a family of mammalian methyl-CpG binding proteins. *Mol Cell Biol* 18, 6538-6547
15. Bird, A. P., and Wolffe, A. P. (1999) Methylation-induced repression--belts, braces, and chromatin. *Cell* 99, 451-454
16. Fatemi, M., and Wade, P. A. (2006) MBD family proteins: reading the epigenetic code. *J Cell Sci* 119, 3033-3037
17. Klose, R. J., and Bird, A. P. (2006) Genomic DNA methylation: the mark and its mediators. *Trends Biochem Sci* 31, 89-97
18. Saito, M., and Ishikawa, F. (2002) The mCpG-binding domain of human MBD3 does not bind to mCpG but interacts with NuRD/Mi2 components HDAC1 and MTA2. *J Biol Chem* 277, 35434-35439
19. Wade, P. A., Geggion, A., Jones, P. L., Ballestar, E., Aubry, F., and Wolffe, A. P. (1999) Mi-2 complex couples DNA methylation to chromatin remodelling and histone deacetylation. *Nat Genet* 23, 62-66
20. Zhang, Y., Ng, H. H., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Bird, A., and Reinberg, D. (1999) Analysis of the NuRD subunits reveals a histone deacetylase core complex and a connection with DNA methylation. *Genes Dev* 13, 1924-1935
21. Hendrich, B., Hardeland, U., Ng, H. H., Jiricny, J., and Bird, A. (1999) The thymine glycosylase MBD4 can bind to the product of deamination at methylated CpG sites. *Nature* 401, 301-304
22. Delaval, K., and Feil, R. (2004) Epigenetic regulation of mammalian genomic imprinting. *Curr Opin Genet Dev* 14, 188-195
23. Barr, H., Hermann, A., Berger, J., Tsai, H. H., Adie, K., Prokhortchouk, A., Hendrich, B., and Bird, A. (2007) Mbd2 CONTRIBUTES TO DNA METHYLATION-DIRECTED REPRESSION OF THE Xist GENE. *Mol Cell Biol*
24. Jaenisch, R., and Bird, A. (2003) Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nat Genet* 33 Suppl, 245-254
25. Lorincz, M. C., Dickerson, D. R., Schmitt, M., and Groudine, M. (2004) Intragenic DNA methylation alters chromatin structure and elongation efficiency in mammalian cells. *Nat Struct Mol Biol* 11, 1068-1075
26. Auriol, E., Billard, L. M., Magdinier, F., and Dante, R. (2005) Specific binding of the methyl binding domain protein 2 at the BRCA1-NBR2 locus. *Nucleic Acids Res* 33, 4243-4254

27. Boyes, J., and Bird, A. (1992) Repression of genes by DNA methylation depends on CpG density and promoter strength: evidence for involvement of a methyl-CpG binding protein. *Embo J* 11, 327-333
28. Curradi, M., Izzo, A., Badaracco, G., and Landsberger, N. (2002) Molecular mechanisms of gene silencing mediated by DNA methylation. *Mol Cell Biol* 22, 3157-3173
29. Rio, M. C., Bellocq, J. P., Gairard, B., Rasmussen, U. B., Krust, A., Koehl, C., Calderoli, H., Schiff, V., Renaud, R., and Chambon, P. (1987) Specific expression of the pS2 gene in subclasses of breast cancers in comparison with expression of the estrogen and progesterone receptors and the oncogene ERBB2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84, 9243-9247
30. Perrin, D., Ballestar, E., Fraga, M. F., Frappart, L., Esteller, M., Guerin, J. F., and Dante, R. (2006) Specific hypermethylation of LINE-1 elements during abnormal overgrowth and differentiation of human placenta. *Oncogene*
31. Metzger, D., Berry, M., Ali, S., and Chambon, P. (1995) Effect of antagonists on DNA binding properties of the human estrogen receptor in vitro and in vivo. *Mol Endocrinol* 9, 579-591
32. Billard, L. M., Magdinier, F., Lenoir, G. M., Frappart, L., and Dante, R. (2002) MeCP2 and MBD2 expression during normal and pathological growth of the human mammary gland. *Oncogene* 21, 2704-2712
33. Nunez, A. M., Berry, M., Imler, J. L., and Chambon, P. (1989) The 5' flanking region of the pS2 gene contains a complex enhancer region responsive to oestrogens, epidermal growth factor, a tumour promoter (TPA), the c-Ha-ras oncoprotein and the c-jun protein. *Embo J* 8, 823-829
34. Metivier, R., Penot, G., Hubner, M. R., Reid, G., Brand, H., Kos, M., and Gannon, F. (2003) Estrogen receptor-alpha directs ordered, cyclical, and combinatorial recruitment of cofactors on a natural target promoter. *Cell* 115, 751-763
35. Metivier, R., Penot, G., Carmouche, R. P., Hubner, M. R., Reid, G., Denger, S., Manu, D., Brand, H., Kos, M., Benes, V., and Gannon, F. (2004) Transcriptional complexes engaged by apo-estrogen receptor-alpha isoforms have divergent outcomes. *Embo J* 23, 3653-3666
36. Zinn, R. L., Pruitt, K., Eguchi, S., Baylin, S. B., and Herman, J. G. (2007) hTERT is expressed in cancer cell lines despite promoter DNA methylation by preservation of unmethylated DNA and active chromatin around the transcription start site. *Cancer Res* 67, 194-201
37. Renaud, S., Loukinov, D., Abdullaev, Z., Guilleret, I., Bosman, F. T., Lobanenkova, V., and Benhattar, J. (2007) Dual role of DNA methylation inside and outside of CTCF-binding regions in the transcriptional regulation of the telomerase hTERT gene. *Nucleic Acids Res* 35, 1245-1256
38. Sahar, S., and Sassone-Corsi, P. (2007) Circadian clock and breast cancer: a molecular link. *Cell Cycle* 6, 1329-1331
39. Garcia-Bassets, I., Kwon, Y. S., Telese, F., Prefontaine, G. G., Hutt, K. R., Cheng, C. S., Ju, B. G., Ohgi, K. A., Wang, J., Escoubet-Lozach, L., Rose, D. W., Glass, C. K., Fu, X. D., and Rosenfeld, M. G. (2007) Histone methylation-dependent mechanisms impose ligand dependency for gene activation by nuclear receptors. *Cell* 128, 505-518
40. Magdinier, F., and Wolffe, A. P. (2001) Selective association of the methyl-CpG binding protein MBD2 with the silent p14/p16 locus in human neoplasia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 4990-4995
41. Nguyen, C. T., Gonzales, F. A., and Jones, P. A. (2001) Altered chromatin structure associated with methylation-induced gene silencing in cancer cells: correlation of accessibility, methylation, MeCP2 binding and acetylation. *Nucleic Acids Res* 29, 4598-4606
42. Lopez-Serra, L., Ballestar, E., Fraga, M. F., Alaminos, M., Setien, F., and Esteller, M. (2006) A Profile of Methyl-CpG Binding Domain Protein Occupancy of Hypermethylated Promoter CpG Islands of Tumor Suppressor Genes in Human Cancer. *Cancer Res* 66, 8342-8346
43. Ballestar, E., Paz, M. F., Valle, L., Wei, S., Fraga, M. F., Espada, J., Cigudosa, J. C., Huang, T. H., and Esteller, M. (2003) Methyl-CpG binding proteins identify novel sites of epigenetic inactivation in human cancer. *Embo J* 22, 6335-6345
44. Martin, V., Ribieras, S., Rio, M. C., and Dante, R. (1998) The estrogen responsive element of the pS2 gene is recognized by a methylation sensitive DNA binding protein. *Biol Chem* 379, 409-416
45. Giamarchi, C., Solanas, M., Chailleux, C., Augereau, P., Vignon, F., Rochefort, H., and Richard-Foy, H. (1999) Chromatin structure of the regulatory regions of pS2 and cathepsin D genes in hormone-dependent and -independent breast cancer cell lines. *Oncogene* 18, 533-541
46. Pao, M. M., Tsutsumi, M., Liang, G., Uzvolgyi, E., Gonzales, F. A., and Jones, P. A. (2001) The endothelin receptor B (EDNRB) promoter displays heterogeneous, site specific methylation patterns in normal and tumor cells. *Hum Mol Genet* 10, 903-910
47. Kangaspeska, S., Stride, B., Metivier, R., Polycarpou-Schwarz, M., Ibberson, D., Carmouche, R. P., Benes, V., Gannon, F., and Reid, G. (2008) Transient cyclical methylation of promoter DNA. *Nature* 452, 112-115

48. Metivier, R., Gallais, R., Tiffoche, C., Le Peron, C., Jurkowska, R. Z., Carmouche, R. P., Ibberson, D., Barath, P., Demay, F., Reid, G., Benes, V., Jeltsch, A., Gannon, F., and Salbert, G. (2008) Cyclical DNA methylation of a transcriptionally active promoter. *Nature* 452, 45-50
49. Probst, A. V., Dunleavy, E., and Almouzni, G. (2009) Epigenetic inheritance during the cell cycle. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10, 192-206
50. Morgan, H. D., Santos, F., Green, K., Dean, W., and Reik, W. (2005) Epigenetic reprogramming in mammals. *Hum Mol Genet* 14 Spec No 1, R47-58
51. Jin, S. G., Guo, C., and Pfeifer, G. P. (2008) GADD45A does not promote DNA demethylation. *PLoS Genet* 4, e1000013
52. Barreto, G., Schafer, A., Marhold, J., Stach, D., Swaminathan, S. K., Handa, V., Doderlein, G., Maltry, N., Wu, W., Lyko, F., and Niehrs, C. (2007) Gadd45a promotes epigenetic gene activation by repair-mediated DNA demethylation. *Nature* 445, 671-675
53. Ooi, S. K., and Bestor, T. H. (2008) The colorful history of active DNA demethylation. *Cell* 133, 1145-1148
54. Martinowich, K., Hattori, D., Wu, H., Fouse, S., He, F., Hu, Y., Fan, G., and Sun, Y. E. (2003) DNA methylation-related chromatin remodeling in activity-dependent BDNF gene regulation. *Science* 302, 890-893
55. Chen, W. G., Chang, Q., Lin, Y., Meissner, A., West, A. E., Griffith, E. C., Jaenisch, R., and Greenberg, M. E. (2003) Derepression of BDNF transcription involves calcium-dependent phosphorylation of MeCP2. *Science* 302, 885-889
56. Hutchins, A. S., Mullen, A. C., Lee, H. W., Sykes, K. J., High, F. A., Hendrich, B. D., Bird, A. P., and Reiner, S. L. (2002) Gene silencing quantitatively controls the function of a developmental trans-activator. *Mol Cell* 10, 81-91

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Expression of endogenous *pS2* gene and DNA methylation patterns of its 5' sequence in MCF7, HeLa and MDA MB231 cells. (A) The expression of endogenous *pS2* gene in MCF7, HeLa and MDA MB231 cell lines. *pS2* mRNA levels were monitored by relative RT-PCR. Briefly, *pS2* transcripts were simultaneously amplified with *β -actin* transcripts as a loading control and expression standard. (B) Methylation patterns at CpG sites of *pS2* 5' flanking sequence from nt positions -464 to +314 in MCF7, HeLa, and MDA MB231 cell lines. A schematic representation of the human *pS2* gene is shown. The transcription start site is indicated by a black arrow. Black box, AP1 site; dark-grey box, Estrogen-Responsive Element (ERE); light-grey box, TATA-box; hatched boxes, *pS2* exons. The studied region (from nt positions -464 to +314) is presented on an expanded scale. This region contains 20 CpG sites, represented by white circles. The bisulphite-sequencing status of this 5' *pS2* region in MCF7, HeLa and MDA MB231 cells (number of analyzed clones, n=10) is represented. Each line corresponds to a single DNA template molecule. Black and open circles represent methylated and unmethylated CpGs, respectively.

Figure 2. Specific association of MBD2 to the methylated promoter region of *pS2* gene. Detail of the *pS2* gene region analyzed (from nt positions -464 to +314). CpG sites are represented by circles. The black line represents the position of the fragment amplified by dose-dependent and quantitative PCR after ChIP. MBD proteins binding to the methylated region of the *pS2* promoter (from nt positions -11 to +292) was analyzed by ChIP in MDA MB231, HeLa and MCF7 cells. Cross-linked chromatin was immunoprecipitated using rabbit polyclonal anti-MBD2, anti-MeCP2 and anti-MBD1 antibodies. Purified DNAs from the input, unbound, bound or IgG fractions were quantified and an equal quantity of each fraction (0.5 ng) of this DNA was amplified by dose-dependent (A) or quantitative (B) PCR. (A) Representative experiments of MBD occupancy in the *pS2* promoter are shown. (B) Relative amounts of immunoprecipitated *pS2* promoter to the input fraction measured by quantitative PCR. Each bar represents the mean \pm standard deviation of at least three independent experiments.

Figure 3. ChIP-on-chip analysis of MBD2-binding sites on *pS2* 5' end regionally methylated in HeLa cells. (A) Array peaks on *pS2* 5' end of MBD2 log₂ signal ratio (MBD2 / Input) values are shown below the Affymetrix' Integrated Genome Browser (IGB) window. Red peaks, MBD2 binding sites; yellow peak, MBD2 free sites. Genes are transcribed from right to left. *pS2* methylation status from nt positions -464 to +314 is shown by a diagram. "*pS2* ERE fragment" and "*pS2* promoter fragment" analyzed by PCR following ChIP are represented by a white box. (B) *BRCA1* 5' end viewed as a MBD2 free control.

Figure 4. MBD2 specifically and directly represses *pS2* transcription. Real time RT-PCR analysis of *pS2* transcripts in HeLa and *MBD2*-depleted HeLa cells (HeLa cells pretreated for 72 h with MBD2 siRNA) transfected with an MBD2 vector expressing a transcript resistant to RNAi (pRev-MBD2 vector) or with an empty basic vector pGL3. Transcriptional expression of *pS2* was analyzed 24 h after transfection. The fold change of *pS2* expression was calculated from the relative *pS2* mRNA in pRev-MBD2-transfected cells compared to pGL3-transfected cells. Values are presented as the mean \pm standard deviation of at least three

independent transfection experiments. A significant difference between the two cell groups is represented by an asterisk * ($P < 0.05$).

Figure 5. ER α only associates hypomethylated ERE region. Representative experiments of ER α ChIP assays in ER α -rich MCF7 cells, in ER α -negative HeLa and MDA MB231 cells, and in HeLa and MDA MB231 expressing the vector HEG0 encoding ER α (HeLa::ER α , and MDA MB231::ER α). ChIP assays were performed as described in Fig. 2. The position of the “*pS2* ERE fragment” analyzed by PCR are represented on the *pS2* 5' end schema.

Figure 6. ER α stimulates *pS2* transcription in HeLa cells. Real time PCR quantification of *pS2* mRNA in HeLa cells ectopically expressing ER α . HeLa cells were transfected with the vector HEG0 coding for ER α and *pS2* expression was monitored 24h after. To investigate the estrogen dependence of *pS2* expression, cells were exposed to 5 μ M of antiestrogen (4-hydroxytamoxifen or OHT). Bar chart show the fold change of *pS2* expression calculated from the relative *pS2* mRNA in HEG0-transfected cells compared to pSG5, empty vector-transfected cells. Each bar represents the mean \pm standard deviation of three analyses. A significant difference between the two cell groups is represented by an asterisk * ($P < 0.05$).

Figure 7. The transactivators ER α and the methylation-dependant repressor MBD2 can simultaneously bound the *pS2* promoter in HeLa cells. (A) MBD2 ChIP assays in HeLa cells expressing ER α (HeLa::ER α). Relative amounts of immunoprecipitated *pS2* promoter measured by quantitative PCR from HeLa or HeLa::ER α cells. Each bar represents the mean \pm standard deviation of at least three independent experiments. (B) Serial ER α -MBD2 ChIP assays to *pS2* promoter. Chromatin prepared from HeLa cells transfected with a human ER α expression vector was subjected to the ChIP procedure with the anti-ER α antibody, and again immunoprecipitated using antibodies as indicated at the top of the figure (Non-specific antibody, IgG; anti-ER α antibody, ER; anti-MBD2 antibody, MBD2).

Figure 8. MBD2 modulates the estrogen response of *pS2* gene. (A) Transcriptional expression of *pS2* was analyzed using relative RT-PCR in HeLa cells expressing ER α and/or depleted in MBD2. Mock, mock-treated HeLa cells. ER, HeLa cells 24 h after transfection with a human ER α expression vector, HEG0. MBD2 siRNA, HeLa cells pretreated for 72 h with MBD2 siRNA and again for 24 h. MBD2 siRNA + ER, HeLa cells pretreated for 72 h with MBD2 siRNA, then cotransfected with MBD2 siRNA and HEG0 for 24 h. OHT, 24 h treatment with 4-hydroxytamoxifen. MCF7, MCF7 cells. (B) Bar chart showing the fold change of *pS2* expression in HeLa cells expressing ER α and/or depleted in MBD2. *pS2* transcripts were quantified by real time RT-PCR. The fold change was calculated from the relative *pS2* mRNA in treated compared to mock-treated cells. Each bar represents the mean \pm standard deviation of three analyses. A significant difference between the two cell groups is represented by an asterisk * ($P < 0.05$).

Figure 9. Histone H3 acetylation and histone H3 trimethylation marks on *pS2* promoter in presence or absence of MBD2 and/or ER α in HeLa cells. HeLa cells, wild type (HeLa), expressing ectopically ER α (HeLa::ER α) and depleted in MBD2 and expressing ectopically ER α (MBD2 KD HeLa::ER α), were subjected

to ChIP analysis using anti-histone H3 acetylation (H3Ac) or an anti-histone H3 lysine 9 trimethylation (H3K9me3) antibodies. The *pS2* promoter was amplified by real-time PCR from an equal amount (0,5 ng) of total DNA immunoprecipitated by the different antibodies. Relative amounts of H3Ac or H3K9me3 marks were measured by comparing fractions immunoprecipitated by the anti-H3Ac or anti-H3K9me3 antibodies to fractions immunoprecipitated by the anti-histone H3 pan antibody. Each bar represents the mean \pm standard deviation.

Supplementary Data

Figure S1. MBD2 siRNA treatments, supplementary data. (A) *MBD2* expression in MBD2 siRNA transfected cells. Bar chart representing the efficiency of MBD2 siRNA in HeLa, MCF7 and MDA MB231 In mock treated cells, the initial amount of *MBD2* molecules / μg of total RNA was : $7.4 \times 10^6 \pm 1.3 \times 10^6$, in HeLa cells; $5.8 \times 10^6 \pm 1 \times 10^6$, in MDA MB231 cells and $3.2 \times 10^6 \pm 0.6 \times 10^6$, in MCF7 cells. The efficiency of MBD2 siRNA was calculated from the *MBD2* mRNA in treated cells compared with mock-treated cells. Each bar represents the mean \pm standard deviation of, at least, three independent analyses. (B) MBD1, MBD2 and MeCP2 protein quantifications in HeLa cells expressing transient MBD2 siRNA. HeLa cells were pretreated for 72 h with MBD2 siRNA and again for 24 h. Mock-treated cells were transfected with a non-specific siRNA. Immunoblot analysis of MBD2, MBD1 and MeCP2 proteins in mock-treated and in MBD2 siRNA-treated HeLa cells. MBD2, MBD1 and MeCP2 proteins were probed using rabbit polyclonal antibodies. The same membrane was then stripped and probed using a mouse β -tubulin antibody as a loading control. (C) Bar chart showing the fold change of *pS2* expression in MCF7 and MDA MB231 cells depleted in MBD2. *pS2* transcripts were quantified by real-time RT-PCR. The fold change was calculated from the amount of *pS2* mRNA in treated cells compared with mock-treated cells. Each bar represents the mean \pm standard deviation of, at least, three independent analyses.

Figure 1 Chatagnon et al.

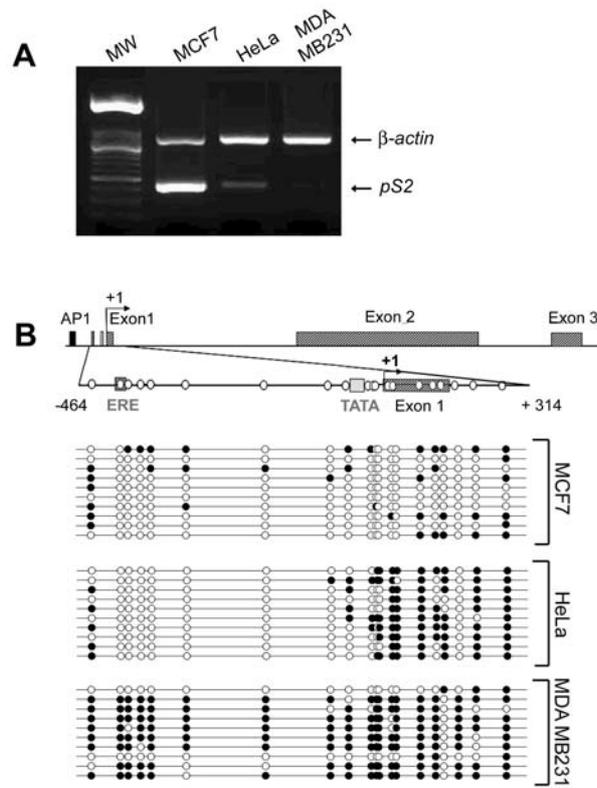
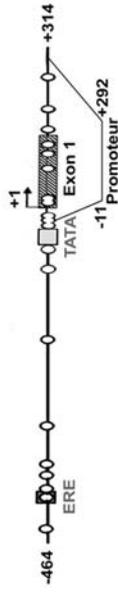


Figure 2 Chatagnon et al.



pS2 promoter (nt -11 to +292)

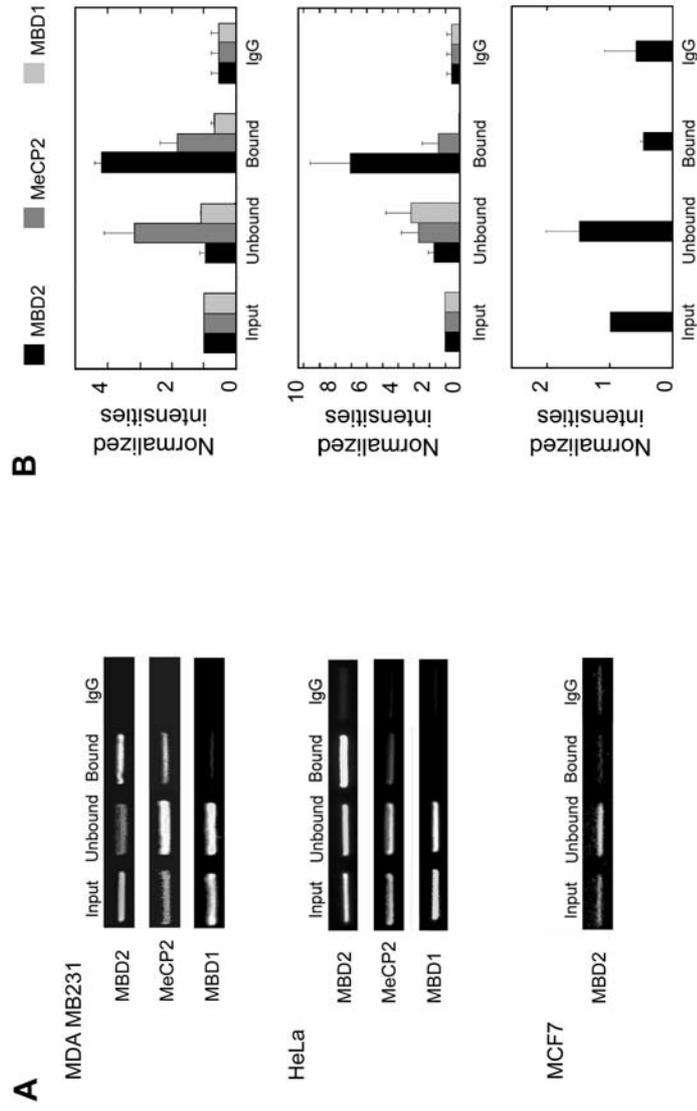


Figure 3 Chatagnon et al.

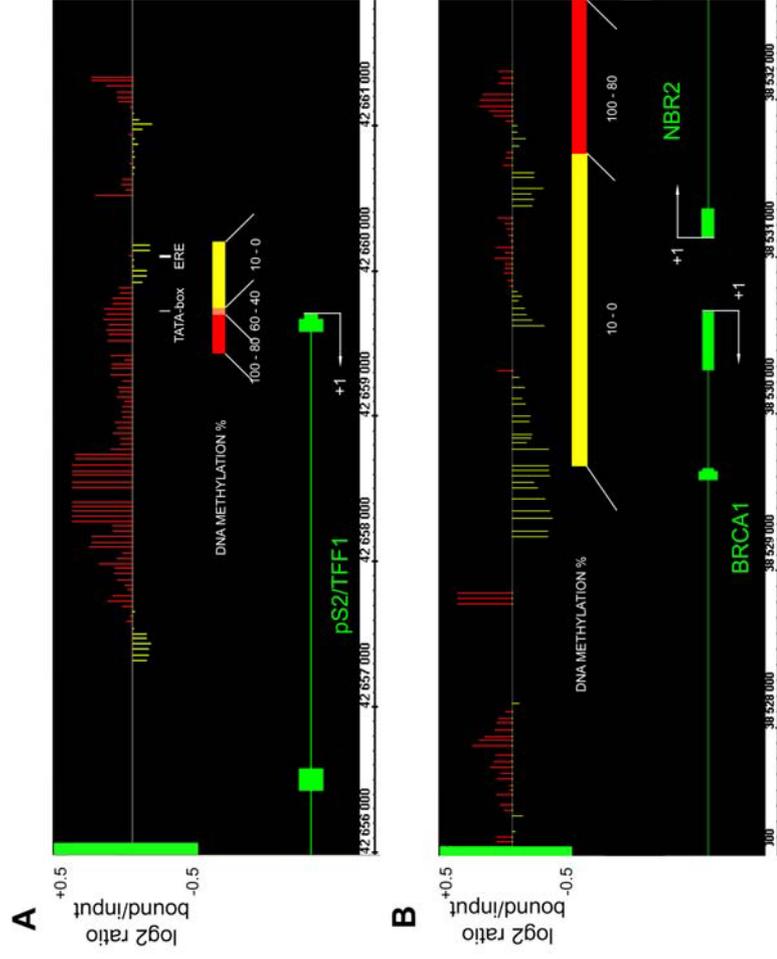


Figure 4 Chatagnon et al.

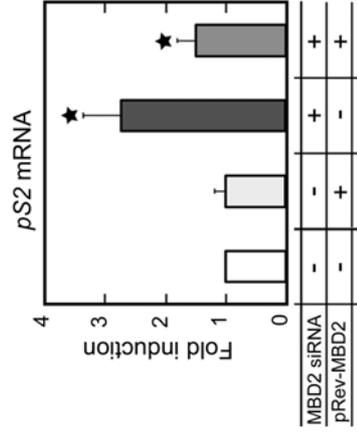
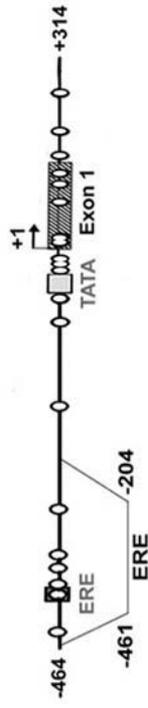


Figure 5 Chatagnon et al.



pS2 ERE (nt -461 to -204)

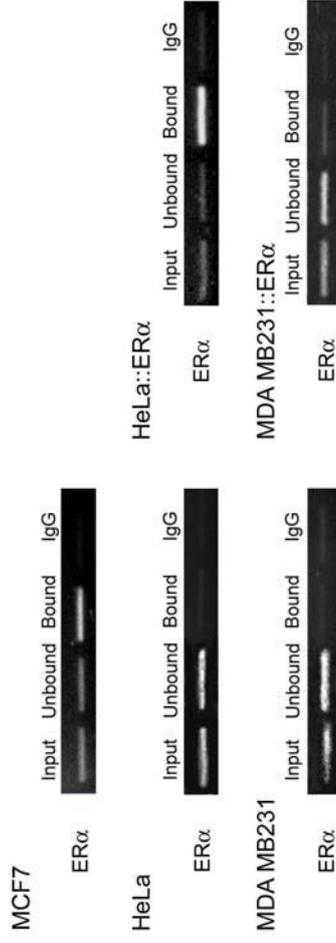


Figure 6 Chatagnon et al.

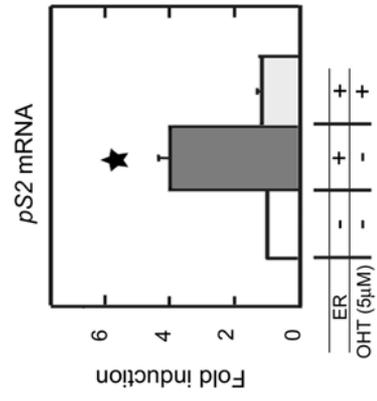


Figure 7 Chatagnon et al.

HeLa::ER α
pS2 promoter (nt -11 to +292)

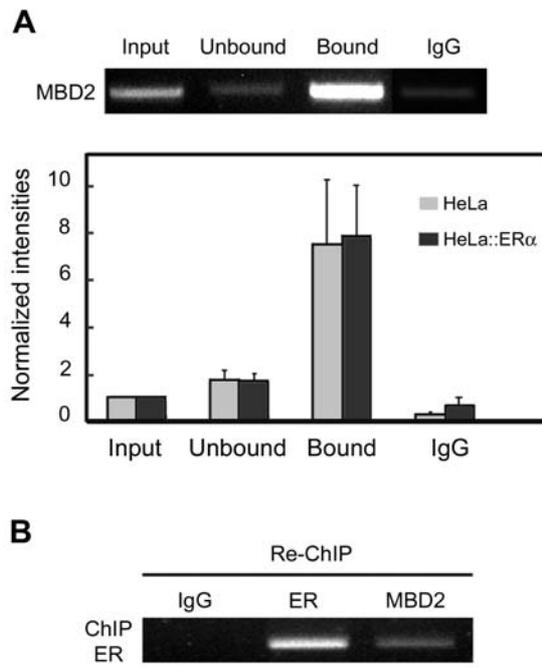


Figure 8 Chatagnon et al.

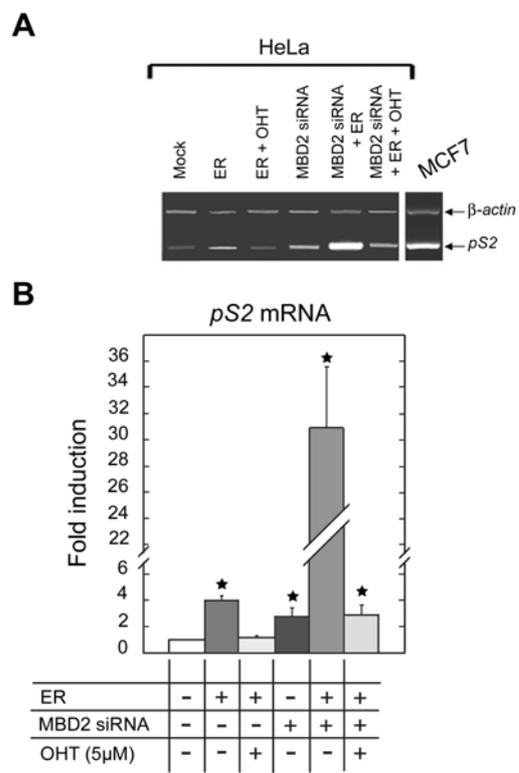


Figure 9 Chatagnon et al.

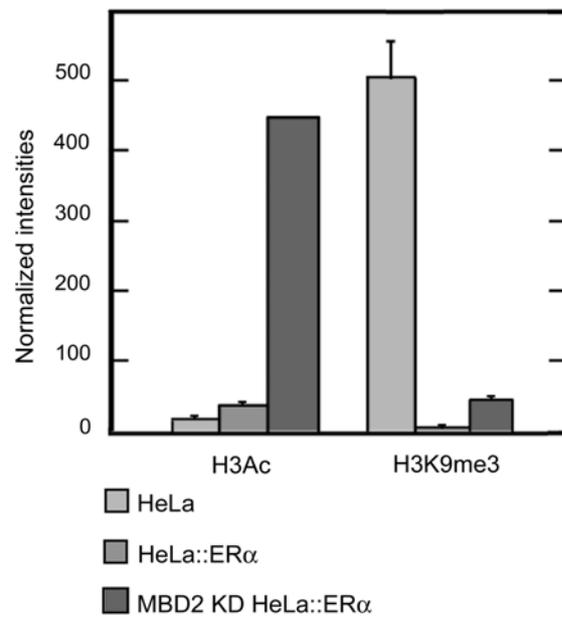
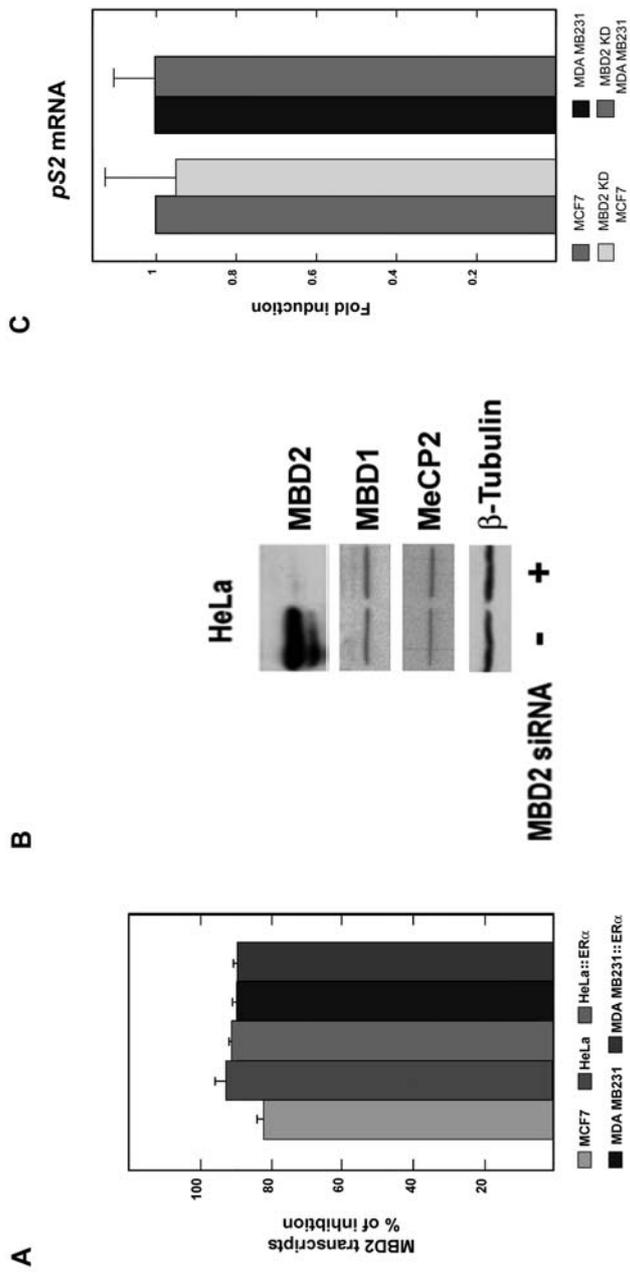


Table S1. Primers used in the PCR and RT-PCR reactions

Name	Forward	Reverse
PCR bisulphite pS2 -464 to +67	5'-AGA ATT AGT TTA GGT TTA GA-3'	5'-AAT CAC CTT ATT CTC CAT AA-3'
PCR bisulphite pS2 +37 to +314	5'-GGG TTT TGT TAT TTT GAG TTA-3'	5'-AAC AAT AAC CAC CAT AAA AAA C-3'
ChIP pS2 ERE	5'-ATT AGC TTA GGC CTA GAC-3'	5'-CTG AGG GAT CTG AGA TTC A-3'
ChIP pS2 promoter	5'-CTA TAA AAT CCG GGG CTC GG -3'	5'-CCC TGC CAC CCT GAG TTA CT -3'
pS2 RT-PCR	5' GAG-AAC-AAG-GTG-ATC-TGC-GC 3'	5' TGG-TAT-TAG-GAT-AGA-AGC-ACC 3'
pS2 RT-PCR Q	5' ATA-CCA-TCG-ACG-TCC-CTC-CA 3'	5' AAG-CGT-GTC-TGA-GGT-GTC-CG 3'
β-actin RT-PCR	5' ACA-CTG-TGC-CCA-TCT-ACG-AGG 3'	5' AGG-GGC-CGG-ACT-CGT-CAT-ACT 3'
β-actin RT-PCR Q	5' AGG-CCA-ACC-GCG-AGA-AGA-TGA 3'	5' GCC-GTG-GTG-GTG-AAG-CTG-TAG 3'
MBD2 RT-PCR	5' TCA-GAA-GCA-AGC-CTC-AGT-TG 3'	5' CAG-AGC-TTG-TGT-GCA-AAG-CA 3'

Table S1 Chatagnon et al.

Figure S1 Chatagnon et al.



ARTICLE 3

**Genome wide distribution of MBD2 binding sites,
DNA methylation profiles and silencing potential.**

Chatagnon A, Perriaud L, Nazaret N, Benhattar J, Lachuer J, Dante R.

En préparation.

ARTICLE 3

**ROLE PREPONDERANT DE MBD2 DANS LA REPRESSION TRANSCRIPTIONNELLE
METHYLATION-DEPENDANTE DES CELLULES CANCEREUSES HeLa**

Au cours des deux précédentes études, nous avons pu démontrer une réelle spécificité de la protéine MBD2 pour les loci *hTERT* et *pS2*, et caractériser son rôle dans leur régulation transcriptionnelle méthylation-dépendante. L'association de ce répresseur aux promoteurs hyperméthylés dans les cancers a déjà été largement constatée (Nguyen *et al.*, 2001; Bakker *et al.*, 2002; Koizume *et al.*, 2002; Ballestar *et al.*, 2003; Lin and Nelson, 2003; Kondo *et al.*, 2005; Auriol *et al.*, 2005; Lopez-Serra *et al.*, 2006). De plus, une étude réalisée par l'équipe du Dr Esteller, en collaboration avec notre équipe, a montré que MBD2 serait de loin le répresseur méthylation-dépendant réprimant le plus grand nombre de gènes (~900 gènes sur 967) dans les cancers (Lopez-Serra *et al.*, 2008). Toutefois, tous ces résultats sont issus d'études réalisées sur un nombre restreint de gènes, il apparaissait donc intéressant d'élargir l'**analyse des profils de fixation de la protéine MBD2 à l'ensemble des promoteurs du génome afin de vérifier si cette protéine est réellement un répresseur méthylation-dépendant important.**

1- INTRODUCTION

Le premier rôle attribué à la protéine MBD2 a été son rôle dans la répression transcriptionnelle méthylation-dépendante (Ng *et al.*, 1999). Toutefois, quatre études récentes ont montré que MBD2 serait également un activateur transcriptionnel (Fujita *et al.*, 2003; Ego *et al.*, 2005; Angrisano *et al.*, 2006; Wischnewski *et al.*, 2007). De plus, dans des neurones, la carte de liaison de la protéine à MBD, MeCP2, aussi initialement décrite comme un répresseur transcriptionnel, a montré que 63% des sites MeCP2 sont des promoteurs de gènes actifs (Yasui *et al.*, 2007).

Par ailleurs, la protéine MBD2, *via* la régulation de l'expression de gènes spécifiques, posséderait un rôle central et important au cours de la tumorigenèse, faisant d'elle une nouvelle

cible thérapeutique potentielle en cancérologie (Slack *et al.*, 2002; Sansom *et al.*, 2003; Campbell *et al.*, 2004; Shukeir *et al.*, 2006; Wischnewski *et al.*, 2007; Phesse *et al.*, 2008).

Dans ce contexte, caractériser spécifiquement le rôle de MBD2 dans la régulation génique des cellules cancéreuses apparaît être important. Nous avons donc voulu mettre en parallèle les profils de méthylation de l'ADN, de fixation de MBD2 et de l'ARN polymérase II pour l'ensemble des promoteurs du génome. Pour se faire, l'utilisation de **techniques de MeDP-on-ChIP** ou de **ChIP-on-chip**, soit d'hybridation d'ADN spécifiquement précipité pour son statut de méthylation (MeDP, Methylation DNA Precipitation) ou de liaison à MBD2 ou à l'ARN polymérase II (ChIP-on-chip) sur des puces à ADN génomique, semble les plus adaptées. Ce travail a été réalisé en collaboration avec la plateforme ProfilExpert de Lyon, qui a effectué les hybridations sur puces et nous a aidés dans l'analyse bioinformatique de nos données. Les cellules cancéreuses HeLa ont été choisies comme modèle d'étude.

2- RESULTATS

Afin de **sélectionner les régions génomiques spécifiques associées à la protéine MBD2 et à l'ARN polymérase II**, des expériences de **ChIP** ont été réalisées avec des anticorps anti-MBD2 et des anticorps anti-ARN polymérase II.

Nous avons choisi l'absence d'ARN polymérase II comme indicateur de répression transcriptionnelle. En effet, la fixation d'ARN polymérase II sur l'ADN n'induit pas forcément la transcription (Sandelin *et al.*, 2007). Néanmoins, cette protéine est indispensable à la transcription, donc si l'ARN polymérase II est absente, le gène est silencieux.

La spécificité des ChIP MBD2 et ARN polymérase II ont été vérifiées et validées par l'analyse de régions réprimées ou non, connues pour être fixées ou pas par la protéine MBD2 dans les cellules HeLa, tels que les promoteurs *BRCA1*, *RASSF1A* et *GAPDH* actifs et non fixés par MBD2, les promoteurs *hTERT* et *pS2* actifs et fixés par MBD2, le promoteur *NBR2* réprimé et fixé par MBD2 et le promoteur *PARVG* réprimé et non fixé par MBD2 (Auriol *et al.*, 2005; Lopez-Serra *et al.*, 2006; Chatagnon *et al.*, 2009; Chatagnon *et al.*, 2009 en soumission).

Les fragments d'ADN méthylés ont eux été sélectionnés grâce à l'utilisation d'une protéine recombinante contenant 4 domaines MBD (4xMBD), clonés à partir du domaine MBD de MBD1 (Jorgensen *et al.*, 2006). Cette protéine est capable d'immunoprécipiter de l'ADN double brin

méthylé avec une forte affinité ($0,5 \times 10^{-6}$ M à $0,2 \times 10^{-7}$ M, dépendant du nombre de CpG méthylés) (Jorgensen *et al.*, 2006). La spécificité de cette protéine recombinante 4xMBD pour l'ADN méthylé, dans nos conditions d'expérimentation, a été testée par gel retard. Pour cela, nous avons utilisé des oligonucléotides double brin de 43 pb contenant 5 CpG méthylés ou non et effectué des contrôles négatifs *via* une protéine 4xMBD porteuse d'une mutation ponctuelle R22A inhibant son activité de liaison à l'ADN méthylé (Jorgensen *et al.*, 2006). Puis, nous avons vérifié l'effet potentiel de la densité en CpG sur l'interaction de la protéine 4xMBD aux fragments d'ADN méthylés. L'ADN extrait de cellules HeLa fragmenté (~400pb) a été ainsi incubé avec la protéine 4xMBD puis les fragments d'ADN associés à cette protéine ont été purifiés. L'enrichissement relatif des fragments spécifiquement retenus par la protéine par rapport à l'ADN total a été par la suite déterminé par PCR quantitative. Pour valider cette expérience, nous avons utilisé des gènes à promoteurs pauvres en CpG ou riches en CpG connus pour être méthylés ou non dans les cellules HeLa, tels que les promoteurs *BRCA1* et *RASSF1A* contenus dans des îlots de CpG et non-méthylés, les promoteurs *NBR2* et *hTERT* contenus dans des îlots de CpG et méthylés, les promoteurs *GAPDH* et *pS2* pauvres en CpG et méthylés (Auriol *et al.*, 2005; Lopez-Serra *et al.*, 2006; Chatagnon *et al.*, 2009; Chatagnon *et al.*, 2009 en soumission). Ainsi nous avons pu montrer que la **protéine 4xMBD est aussi bien capable de reconnaître spécifiquement des fragments d'ADN endogènes riches en CpG et méthylés que des fragments méthylés pauvres en CpG.**

La quantité d'ADN immunoprécipité par ChIP ou par précipitation sélective d'ADN méthylé (MeDP) étant très faible (~3 à 5 ng), deux **étapes d'amplification**, par PCR aléatoire (random PCR) de ces ADN ont été réalisées avant hybridation sur puces. Après **vérification et validation de ces étapes d'amplification** (efficacité, conservation de la complexité et de la diversité de la population initiale, fixation et non-fixation de MBD2 et de l'ARN polymérase, statut de méthylation des zones connues), les **échantillons « ADN total » et « ADN spécifiquement précipité »** ont été **déposés sur puces à promoteurs Affymetrix** (GeneChip® Human Promoter 1.0R Array, Affymetrix). Ces puces comprennent 4,6 millions de sondes et couvrent environ 25,500 promoteurs humains. Les sondes sont réparties entre -7,5 Kb et +2,45 Kb par rapport au site d'initiation de la transcription ; et pour 1,300 gènes associés au cancer 2,5 Kb supplémentaire en amont des -7,5 Kb sont également représentés. Les sondes font 25 pb de long et sont espacées tous les 10 pb.

Les **données ainsi générées** ont été **traitées par différents logiciels**. L'une des premières étapes a consisté, à partir des données brutes issues du scanner Affymetrix, à créer un fichier

contenant l'**intensité des signaux** et leurs **positions sur le génome**. Ceci a été effectué par le logiciel proposé par Affymetrix, **GCOS** (Affymetrix® GeneChip Operating Software). Puis, le logiciel **TAS** (Affymetrix® Tiling Analysis Software) a permis de **normaliser les signaux** des puces sur lesquelles l'ADN spécifiquement immunoprécipité avait été hybridé par rapport aux signaux obtenus par les puces contrôles où les échantillons d'ADN total ont été déposés. Puis, par ce même logiciel, les **régions statistiquement appauvries ou enrichies par rapport à l'ADN total ont été définies**. Pour cela, un **seuil propre à chaque critère, méthylation ($\log_2 > 0,1$), fixation de MBD2 ($\log_2 > 0,3$) et absence d'ARN polymérase II ($\log_2 < -0,1$), a été déterminé** expérimentalement en visualisant, sous le logiciel **IGB** (Integrated Genome Browser), les données obtenues pour les régions utilisées lors de la validation des ChIP et des MeDP (*BRCA1*, *NBR2*, *hTERT*, *pS2*, *GAPDH*, *RASSF1A*, et *PARVG*). Ensuite, les **régions** ont été **annotées** par le logiciel **CisGenome** afin de pouvoir associer ces régions aux gènes. Les **données** ont été par la suite **filtrées** suivant quelques critères : chromosomes, distance par rapport aux sites d'initiation de la transcription... Les données du chromosome X ont été éliminées car les cellules HeLa sont des cellules femelles donc elles possèdent un chromosome X inactif qui pourrait induire un biais dans notre analyse. De plus, dans les cellules HeLa des anomalies et des duplications du chromosome X ont été observées (Macville *et al.*, 1999). Enfin, les **données** obtenues pour chacun des trois critères, méthylation, fixation de MBD2 et absence d'ARN polymérase II, ont été **croisées** grâce au logiciel commercial de création et de gestion de bases de données, **Microsoft Access**, **afin d'établir s'il existe des corrélations entre la méthylation de l'ADN, la fixation de MBD2 et la répression transcriptionnelle**.

Dans ce but, nous avons tout d'abord étudié la répartition des signaux de méthylation, de fixation de MBD2 et d'absence d'ARN polymérase II par rapport aux sites d'initiation de la transcription pour savoir si ces trois signaux co-localisent. Cette étude a été effectuée sur l'ensemble des gènes du chromosome 1. La distribution des signaux a été déterminée par le ratio du nombre de sondes « positives » *versus* le nombre de sondes présentes sur la puce dans la région correspondante car les sondes ne sont pas également réparties sur la puce. Ces pourcentages ont été ensuite normalisés par la valeur de la médiane pour chaque paramètre et ont été reportés par rapport à leur distance au site d'initiation de la transcription avec une résolution de 50 pb. Cette analyse a ainsi révélé une **co-localisation de l'enrichissement en sites méthylés, MBD2 positifs, et ARN polymérase négatifs sur une région comprise entre -700 pb et + 200 pb autour du site d'initiation de la transcription**. Ces résultats suggéraient donc une certaine corrélation entre ces trois paramètres sur cette région, qui fut donc retenue pour la suite des analyses.

A partir des seuils et de la zone d'étude retenus, nous avons validé de manière plus approfondie nos résultats obtenus par ChIP-on-Chip MBD2 et MeDP-on-Chip grâce à des données publiées ou obtenues par des laboratoires indépendants. Nous avons ainsi trouvé 80% (15 sur 19 gènes) de concordance entre nos résultats de ChIP-on-chip MBD2 et ceux de ChIP MBD2 publiés par l'équipe du Dr Esteller (Lopez-Serra *et al.*, 2006). En outre, plus de 80% d'analogie a été observée entre nos résultats de MeDP-on-chip et des données obtenues par l'équipe du Dr Benhattar sur les profils de méthylation de promoteurs dans les cellules HeLa réalisées par de digestions aux enzymes de restriction sensibles à la méthylation de l'ADN. Par ailleurs, la liste des gènes silencieux, identifiés par l'absence d'ARN polymérase II en ChIP-on-chip, a été comparée à une analyse du transcriptome des cellules HeLa sur puce d'expression CodeLink, effectuée par nos soins. 76% de concordance entre les deux listes obtenues par ces deux différentes techniques a été observée, validant notre approche de ChIP-on-chip ARN polymérase II. La validation de nos approches de ChIP-on-chip MBD2, ARN polymérase II et MeDP effectuée, nous avons recherché les potentielles corrélations entre la fixation de MBD2, la méthylation de l'ADN et la répression transcriptionnelle,

Parmi les gènes méthylés sur la région de -700 à +200 pb, 71% (10,355 sur 14,532) ont été trouvés ARN polymérase II négatifs. Cette association significative (test $\chi^2 = 7,87 \times 10^{-212}$) est en accord avec les données de la littérature qui décrivent une **corrélation inverse entre la méthylation de l'ADN et l'expression génique** (Bird, 2002). De plus, 70,5% des gènes ARN polymérase II négatifs, donc silencieux, sont méthylés, suggérant que la **méthylation de l'ADN est un mécanisme important de répression transcriptionnelle**.

Comme attendu pour les protéines à MBD, la majorité des sites de liaison de MBD2 (74%, 6,108 sur 8,257) sont associés à la méthylation des promoteurs. L'analyse statistique a indiqué que cette association n'est pas le fruit du hasard (test $\chi^2 = 1,08 \times 10^{-145}$), suggérant un **recrutement spécifique de MBD2 sur les sites méthylés**. La liste des gènes MBD2 positifs a également été croisée par celle des gènes non associés à l'ARN polymérase II. Une **association non-aléatoire entre les gènes fixés par MBD2 et non liées par l'ARN polymérase II** a été observée (test $\chi^2 = 7,7 \times 10^{-3}$). En effet, la majorité des gènes MBD2-positifs (65%, 5,355 sur 8,257) sont silencieux, comme déterminé par l'absence d'ARN polymérase, **suggérant que MBD2 est impliquée dans la répression transcriptionnelle de ces gènes**.

Enfin, lorsque les trois paramètres ont été croisés, 51% des gènes fixés par MBD2 ont été trouvés méthylés et silencieux. De plus, parmi les promoteurs méthylés et silencieux, ~41%

sont liés par MBD2, démontrant une grande importance de cette protéine dans la répression transcriptionnelle méthylation-dépendante. Ces données indiquent par ailleurs une interdépendance entre ces trois paramètres (analyse des correspondances multiples, $p < 0,0001$). En outre, parmi les 23,054 régions promotrices représentées sur la puce Affymetrix et trouvées associées à des gènes par CisGenome, environ 18% sont MBD2 positives, méthylées et ARN polymérase II négatives. De plus, il est à noter que parmi ces gènes environ la moitié (2,290 sur 4,201) possède un promoteur inclus dans un îlot de CpG et l'autre moitié (1,911 sur 4,201) possède un promoteur dit « pauvre en CpG », suggérant que la densité en CpG n'est pas un élément discriminant dans cette répression épigénétique, dans les cellules HeLa.

3- CONCLUSION

En définitive, nous avons développé des approches globales de MeDP-on-chip et de CHIP-on-chip, nous permettant d'analyser les profils de méthylation de l'ADN et de fixation de MBD2 et de l'ARN polymérase II pour l'ensemble des promoteurs du génome. Ainsi, nous avons pu mettre en évidence une association significative entre la méthylation de l'ADN, la fixation de MBD2 et l'absence d'ARN polymérase II, soit la répression transcriptionnelle. La méthylation de l'ADN apparaît ainsi être un mécanisme largement impliqué dans la répression transcriptionnelle et ce en grande partie *via* MBD2. Ces données démontrent ainsi que MBD2 possède toutes les caractéristiques d'un répresseur transcriptionnel méthylation-dépendant et qu'il apparaît être le répresseur méthylation-dépendant le plus utilisé dans les cellules cancéreuses HeLa, comme le suggérait les travaux antérieurs (Lopez-Serra *et al.*, 2008).

**Genome wide distribution of MBD2 binding sites,
DNA methylation profiles and silencing potential.**

Amandine Chatagnon¹, Laury Perriaud¹, Nicolas Nazaret³, Jean Benhattar², Joël Lachuer³, and Robert Dante¹

¹ INSERM, U590, Lyon, F-69008, France;

² Institut de Pathologie, Centre Hospitalier, Universitaire Vaudois and University of Lausanne, Lausanne, Switzerland ;

³ ProfileXpert/Neurobiotec Service, INSERM U842, Bron, F-69676, France.

Correspondence to: Dr R. Dante, INSERM U590, Oncogenèse et Progression Tumorale, Centre Léon Bérard, 28 rue Laënnec, 69373 Lyon Cedex 08, FRANCE.

E-mail: dante@univ-lyon1.fr

Key words: DNA methylation/ MBD2/ transcriptional regulation/ MeDP/ ChIP and MeDP on chip

ABSTRACT

The Methyl-CpG-Binding Domain proteins (MBD) are thought to be key molecules in the interpretation of DNA methylation signals leading to gene silencing through recruitment of chromatin remodeling complexes. In cancer, one member of this protein family, Methyl-CpG-Binding Domain protein 2 (MBD2), seems to play an important role in loss of expression of aberrantly methylated genes. To determine at whole genome level the potential relationship MBD2 and transcriptional repression, we analyzed DNA methylation patterns, MBD2 and RNA polymerase II (POLR2) binding sites on microarray representing 25,500 promoters regions spanning from 7.5 kb upstream to 2.5 kb downstream the 5' transcription start sites (TSS). This first whole genome mapping of MBD2 binding sites indicated that MBD2 associated methylated regions ($p = 1.1 \times 10^{-145}$), in HeLa cells. Transcriptional silencing was also correlated with DNA methylation ($p = 7.9 \times 10^{-212}$) and a non-random association ($p < 0.0001$) between silent genes, DNA methylation and MBD2 binding was observed. Furthermore, distance of MBD2 binding sites from TSSs, lessened the strength of this association, suggesting that MBD2 may repress transcriptional initiation. Among the silent genes, about 42% of them exhibited methylated sites bound by MBD2 in the TSS regions, indicating that MBD2 may be predominant in repression associated with DNA methylation. Categorization of these genes revealed that the emerging groups (cell death and cell cycle) were directly related to cancer, suggesting that MBD2 is involved in the neoplastic process.

INTRODUCTION

Since the discovery of an inverse correlation between the methylation of the cytosine in 5'-C-G-3' dinucleotide (also called CpG) and transcriptional activity, the potential relationship between DNA methylation and gene silencing has been investigated in many organisms [Bird and Tweedie 1995]. A large part of these studies has been performed from human and mouse cell lines and has shown that specific proteins or complexes can recognize methylated DNA and mediate transcriptional repression by changing the local chromatin structure [Bird and Wolffe 1999].

The first protein, able to associate methylated CpGs, independently of the surrounding sequences, was identified over 15 years ago and called MeCP2 [Nan *et al.* 1997]. Further studies have shown that MeCP2 belongs to a protein family of 5 members sharing, with the exception of MBD3, a same functional methyl-CpG-binding domain (MBD) responsible of this binding specificity [Hendrich and Bird 1998]. Among this family, 3 of them, MBD1, MBD2, and MeCP2, mediate transcriptional repression by targeting chromatin remodeling co-repressors complexes to methylated DNA sequences [Dhasarathy and Wade 2008; Klose and Bird 2006; Sasai and Defossez 2009]. Although MBD3 lacks methyl-CpG-binding activity because of amino acid changes at critical positions [Hendrich and Bird 1998], this protein is part of the histone deacetylase (HDAC) and chromatin remodeling Mi2/NuRD complex [Sakai *et al.* 2002; Wade *et al.* 1999]. MBD4 was first identified as thymine glycosylase primarily involved in DNA repair [Hendrich *et al.* 1999]. However, recent works indicate that this last member of MBD protein family is also involved in gene silencing [Kondo *et al.* 2005; Majumder *et al.* 2006]. MBD proteins do not exhibit a strict specificity toward DNA interacting complexes and DNA sequences. MeCP2 interacts with the Sin3A/HDAC complex, the nucleosome remodeler ATRX, and also associates with an H3K9 methyltransferase activity [Fuks *et al.* 2003; Jones *et al.* 1998; Nan *et al.* 1998]. MBD2 recruits the histone deacetylase NurD complex, while MBD1 interacts with the H3-K9 histone methyltransferases SETDB1 and SUV39H1, and the heterochromatin-binding protein HP1 [Fujita *et al.* 2003b; Sarraf and Stancheva 2004]. Furthermore, MBD4 seems to associate the Sin3A/HDAC complex [Kondo *et al.* 2005]. DNA sequence specificity has not been described for the MBD protein binding sites, with the exception of MeCP2 which preferentially associates methylated CpG in DNA stretches surrounded by A/T rich sequences [Klose *et al.* 2005]. However, in human cell lines, MBD1, MBD2, and MeCP2 associate different genes, independently on their relative concentrations [Lopez-Serra *et al.* 2006]. Moreover, in MBD2 depleted HeLa cells, neither MeCP2 nor MBD1 bind the MBD2 binding sites at the methylated area of the *BRCA1* CpG island [Lopez-Serra *et al.* 2006].

Although the MBD proteins seem to be directly involved in transcriptional repression, *Mbd1*, *Mbd2*, and *Mecp2*, knockout experiments indicate that the loss of these genes is not associated with global misexpression of methylated genes [Guy *et al.* 2001; Hendrich *et al.* 2001; Zhao *et al.* 2003]. Nevertheless, *Mbd1* depletion leads to neuronal maturation deficits and significant increase in the expression of the endogenous virus, IAP, associated with chromosome instability in cultured neuron cells [Zhao *et al.* 2003]. In mouse, *Mecp2* deletion also induces neurological disorders. *Mecp2*^{-/-} mice

exhibit phenotypes that resemble some of the symptoms observed in the RETT syndromes [Guy *et al.* 2001]. This human pathology is caused by *MeCP2* mutations and represents one of the most common causes of mental retardation in females [Amir *et al.* 1999]. Furthermore, several neuronal genes are silenced by *Mecp2*, when they are methylated [Sasai and Defossez 2009] and methylation-dependent binding of MeCP2 at methylated loci have been described from many *in vivo* analysis of chromatin [Klose and Bird 2006].

The involvement of MeCP2 in the RTT syndrome has stimulated the interest of the scientific community. Recently ChIP on chip analysis of MeCP2 binding sites in neuroblastoma cell lines on tiling array [Yasui *et al.* 2007] and identification of new partners [Chahrour *et al.* 2008] have suggested that MeCP2 may have a dual role and can activate silent genes. Thus, further studies are needed for a full understanding of the role of MeCP2 in mental retardation.

Loss of *Mbd2* does not induce specific phenotypes in mouse, with the exception of an abnormal maternal behavior [Hendrich *et al.* 2001]. Nevertheless, transcriptomic analysis, using either gene-candidate or microarray approaches, indicates that *Mbd2* is a methylation-dependent transcriptional repressor of many genes, including, *interleukin-4*, during T helper cell differentiation [Hutchins *et al.* 2002]; exocrine pancreatic genes [Barr *et al.* 2007], in colon; and *Xist* on the active X-chromosome [Barr *et al.* 2007].

In human cell lines, MBD2 protein deletion also induces gene expression. For example, MBD2 knock down, mediated by RNA interference, alleviates methylation-dependent repression of *GSTP1* [Lin *et al.* 2001], *NBR2* [Auriol *et al.* 2005; Chatagnon *et al.* 2009], *hTERT* [Chatagnon *et al.* 2009], *p14ARF* [Martin *et al.* 2008], *TFF1* [Chatagnon *et al.* submitted], and in human colon cancer cell line, HCT116, MBD2 depletion activates exocrine pancreatic genes as observed in *Mbd2*^{-/-} mice [Berger *et al.* 2007].

Although MBD2 is not, as MeCP2, directly involved in a specific human pathology, data obtained from mouse models are in favor of an important role of MBD2 in cancer cell survival and/or proliferation. Strong reduction of intestinal adenomas have been observed in *Mbd2* knockout mice derived from *Apc*^{Min/-} mice [Sansom *et al.* 2003], suggesting that loss of *Mbd2* protects the mice from gene-hypermethylations associated with *Apc* mutation [Eads *et al.* 2002]. In human cell lines, MBD2 antisense inhibitors suppress tumorigenesis *in vitro* and *in vivo*, when these cells are implanted in nude mice as a model [Campbell *et al.* 2004]. The anti-tumoral action of MBD2 depletion is not due to intrinsic cellular toxicity, since morpholino, antisense RNA [Campbell *et al.* 2004] or siRNA targeting MBD2 (~ 10 cell lines analyzed, unpublished data) affect neither cell survival nor growth cell rate. Taken together, these data suggest that MBD2 protein is involved in the complex steps leading to the outgrowth of malignant cells in a new organ environment.

Aberrant hypermethylation of CpG islands at the 5' end of tumor-suppressor genes, leading to transcriptional repression, seems to be a characteristic of cancer cell lines and tumor tissues [Baylin and Ohm 2006; Ehrlich *et al.* 2002; Esteller 2007]. Furthermore, ChIP on chip experiments from limited number of genes (7,776) indicate that MBD proteins are associated with hypermethylated silenced genes in human breast cancer cell lines. Among the 3 MBD proteins analyzed (*MeCP2*, MBD1, and MBD2), MBD2 exhibit the widest binding profile [Ballestar *et al.* 2003]. In HeLa cells, a human uterine

cervical cancer cell line, depletion of MBD proteins by RNAi induces a release of transcriptional silencing of hypermethylated genes. In addition, the data indicate that for single MBD interference, MBD2 depletion is the protein most commonly involved in the observed release of gene silencing by far [Lopez-Serra *et al.* 2008]. All together, these studies are in favor of prominent role of MBD2 in silencing hypermethylated genes in cancer cell lines. I

Nevertheless, some data suggest that MBD2 may act as a gene activator. Yeast two-hybrid interaction screening has led to the discovery of two interacting proteins: TACC3 (transforming-acid-coiled-coil) [Angrisano *et al.* 2006] and MBD2in [Lembo *et al.* 2003], data obtained from methylated expression vectors indicate both proteins are able to relieve MBD2 repression [Angrisano *et al.* 2006]. Association between MBD2 and a viral transcriptional stimulator (Tax) of the human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) has been reported [Ego *et al.* 2005]. Moreover, the authors have also found that the complex MBD2-Tax activates methylated expression vectors containing the HTLV-1 long terminal repeat as a promoter [Ego *et al.* 2005]. A role of MBD2 in activation of unmethylated expression vectors has been also suggest from a study indicating that MBD2a (the long isoform of MBD2 transcripts) selectively interacts with RNA helicase A (RHA), a component of CREB transcriptional coactivator complexes [Fujita *et al.* 2003a].

Taken together these data raise the question of the major role of MBD2 in transcriptional expression in cancer cells. In order to address this point, we have analyzed the characteristic of MBD2 binding sites in HeLa cells, a human cervix carcinoma cell line. Fragmented chromatin segments were selected by immunoprecipitation by antibodies directed against MBD2 and the corresponding DNA fragments were analyzed on high-density tilling array representing the transcription start site regions (7.5 kb upstream and 2.5 kb downstream) of about 25,000 human promoters (ChIP on chip). The map of MBD2 binding sites were, then, compared with the map of methylated DNA sites and RNA polymerase II (POLR2) binding sites determined using methylated DNA precipitation (MeDP) and ChIP on chip approach, respectively. This genome wide analysis has correlated the MBD2 binding sites with DNA methylation and silent genes, indicating that MBD2 behaves like a true methylation-dependent transcriptional repressor in the human cancer HeLa cells.

RESULTS

Chromatin immunoprecipitation assays

DNA fragments (about 300 bp in length) associated with MBD2 or POLR2 were analyzed by chromatin immunoprecipitation (ChIP). ChIP experiments were performed from cross-linked chromatin as previously described [Auriol *et al.* 2005; Chatagnon *et al.* 2009]. We used antibodies directed against MBD2 and antibodies directed against POLR2. In order to identify silent genes we used the absence of POLR2 as an indicator of the absence of transcriptional activity. The quality of each ChIP experiment was evaluated using a set of genes (*BRCA1*, *pS2*, and *hTERT*) previously analyzed in our own laboratory [Auriol *et al.* 2005; Chatagnon *et al.* 2009] and data (*PARVG*, *RASSF1A*, and *GAPDH*) previously published [Lopez-Serra *et al.* 2008] (**Figure 1**).

Selective precipitation of methylated DNA fragments

Methylated DNA fragments were selected using a recombinant protein (4xMBD) containing four Methyl-CpG-Binding Domain (MBD) cloned from the Methyl-CpG-Binding Domain protein 1 (MBD1). This protein associates methylated double-stranded (ds) DNA and binds ds-oligonucleotides with high affinity (0.5×10^{-6} M to 0.2×10^{-7} M, depending on the number of methylated CpG) [Jorgensen *et al.* 2006]. Thus, the 4xMBD represents an interesting tool for selecting methylated DNA fragments.

The specificity of this protein for methylated CpGs, in our own experimental conditions, was determined by band-shift assays using a double-stranded 43-bp probe, containing 5 CpGs. The methylated oligonucleotide was efficiently recognized by the 4xMBD protein, while the 4xMBD protein did not interact with the unmethylated probe (**Figure 2**). Moreover, negative controls were performed with the 4xMBD-R22A protein which carried a R22A point mutation that disrupts its DNA binding activity [Jorgensen *et al.* 2006]. As expected, the mutated recombinant protein interacted neither with the methylated nor with the unmethylated probes (**Figure 2**).

Next, we investigated the potential effect of CpG density on the interaction between the 4xMBD and methylated genomic DNA fragments. Sonicated DNA was incubated with 4xMBD proteins and DNA fragments associated with these proteins were purified. The relative amounts of a set of genes, previously analyzed by bisulfite sequencing [Auriol *et al.* 2005; Chatagnon *et al.* 2009; Lopez-Serra *et al.* 2006], were determined by quantitative PCR (Q-PCR). We chosen three methylated DNA fragments: a segment of the *BRCA1* 5' end embedded in a CGi ($\text{CpG}_{\text{obs/exp}} = 0.65$; G+C = 57%), a segment of a non-CGi *PARVG*, and a segment of *pS2/TFF1* 5' end not included in a CpG island. Three unmethylated DNA segments were also quantified: a segment including the exon 1 of *BRCA1* (also included in the *BRCA1* CGi), a segment of the 5' end of *GAPDH* included in a CGi ($\text{CpG}_{\text{obs/exp}} = 0.72$; G+C = 67.4%), and a segment of the 5' end of *RASSF1A* CGi ($\text{CpG}_{\text{obs/exp}} = 0.79$; G+C = 62%). Q-PCR analysis (**Figure 1**) indicated a significant enrichment in methylated DNA segments (*BRCA1*, $p = 0.0017$; *PARVG*, $p = 0.0028$; and *pS2/TFF1*, $p = 0.02$) and a significant depletion in unmethylated DNA sequences (*BRCA1* exon1, $p = 0.002$; *GAPDH*, $p = 0.02$; *RASSF1A*, $p = 0.01$), in the bound fractions. Thus, the CpG density does not seem to affect selection efficiency of methylated DNA fragments.

MBD2, DNA methylation and POLR2 free sites colocalized around the TSS regions

We performed 6 independent ChIP assays from 6 independent batches of HeLa cells for each parameter (MBD2 sites, POLR2 sites, and DNA methylation). DNAs were divided into two independent pools and separately amplified. Control experiments indicated that the PCR amplification step had retained the specificity of the starting ChIP samples (data not shown). Therefore, we analyzed selected DNA fragments using a promoter-array containing 4.6×10^6 25 mer probes. Each promoter region covers approximately 7.5 kb upstream through 2.45 kb downstream of the putative transcription start sites. In this analysis the probes corresponding to the promoter regions of the chromosome X were excluded, since HeLa cells were derived from a female donor and contains three copies of chromosome X [Macville *et al.* 1999], and, this abnormal copy number may induce bias, due to X inactivation, in the determination of its methylation patterns.

In order to gain insight on the colocalization of the signals corresponding to MBD2 binding sites, absence of POLR2, and DNA methylation positive regions, we first analyzed their distributions relative to the transcription starting sites (TSS). This study was performed using the chromosome 1 as a model. The distribution of the signals were determined by the ratio between the number of “positive” probes *versus* the number of the probes present on the array in the corresponding regions, since the probes were not equally distributed on the arrays. These percentages were, then, normalized using the median value for each parameter and plotted against the distance to the TSS at a 50 bp resolution (**Figure 3**).

This genome-wide averaging analysis revealed enrichment of MBD2 binding sites that peaked just inside the TSS (**Figure 3**). Furthermore, as expected from transcriptional repressor, the MBD2 binding site peak colocalized with the silent gene peak, defined by the absence of POLR2 at their 5' end (**Figure 3**). These two peaks are also associated with enrichment in methylated DNA fragments at TSS regions (**Figure 3**). Indeed, these data indicated that MBD2 binding sites are preferentially localized at methylated DNA regions and silent genes, inside TSS regions. The positive signals, for each parameter, grown up at a distance ~ 700 bp upstream the TSS and exhibited maximum values between 0 and ~ 200 bp downstream the TSS. This region (position -700 bp to +200) was, thus, used for further analysis.

Validation of data obtained from microarray analysis of promoter regions in HeLa cells

As a training set, we used the data previously obtained during control experiments of PCR amplification step for *BRCA1/NBR2*, *TFF1*, *RASSF1A*, *GAPDH*, *hTERT*, and *PARVG*. We visualized the microarray signals using the integrated genome browser (IGB) and we determined the thresholds ($\log_2 > 0.3$ for MBD2; $\log_2 > 0.1$ for DNA methylation, and $\log_2 < -0.1$ for the absence of POLR2) providing the expected negative and positive regions. These threshold values were, then, used for the analysis of microarray data. We validated new regions identified with these threshold values, using data published from an independent laboratory for MBD2 sites [Lopez-Serra *et al.* 2006] or data obtained from methylation sensitive restriction enzyme (*CfoI*) digestion, and expression profiles determined from microarray analysis of two independent batches of HeLa cells. We found a good

concordance (80%, 15/19) between MBD2 sites independently identified by direct CHIP assays [Lopez-Serra *et al.* 2006] and our own microarray analyses. Among the 38 genes exhibiting a methylated 5' end, determined from a method based on a Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification protocol (MLPA), more than 80% of them were also found methylated using the CHIP on chip approach. The list of silent genes identified by the absence of POLR2 was compared with the analysis of HeLa cell transcripts using CodeLink microarray. Among this list, 5,250 genes were unambiguously identified on the list generated by the transcriptomic method. We find that the transcripts corresponding to 3,987 of them (76% of concordance) were not detected using this latter method. All together these data (**supplementary data, Table S1, S2, and S3**) indicated that we have established a reliable approach to MBD2 binding sites identification and their potential relationship with DNA methylation and POLR2 binding sites.

Mapping of methylated DNA regions

Among the genes methylated at their 5' end (from position -700 to +200 bp) 71% (10,370 out of 14,532) also exhibited a POLR2 free 5' end (**Figure 4**). This significant association (χ^2 test = 7.7×10^{-212}) was in line with many studies reporting an inverse correlation between DNA methylation and gene expression. Furthermore, more than 70% of POLR2 negative regions were methylated, suggesting that DNA methylation is a crucial event in gene silencing.

Bisulfite DNA sequencing has indicated that TSS regions of chromosomes 6, 20, 21, and 22, exhibit low amounts of methylated CpGs [Eckhardt *et al.* 2006; Zhang *et al.* 2009]. Nevertheless the presence of a methylated DNA peak in the TSS regions might suggest that these regions were more methylated than the surrounding sequences, in HeLa cells. In order to address this question, the percentage of methylated probes was normalized by their CpG density, since the amounts of methylated DNA fragments do not represent the number of methylated CpG. To obtain a reliable estimation of the methylated CpG density, the ratio CpGs observed *versus* CpG expected was determined. When the percentage of methylated probes was normalized by the CpG density and plotted, at a 200 bp resolution, against the distance to the TSS regions. We observed that the relative DNA methylation gradually decreased when approaching the TSS regions both from upstream and downstream and reached its minimum value at the TSS position (**Figure 5**). Therefore, this analysis suggests that the TSS region of chromosome 1 is hypomethylated as it was observed at the TSS regions of chromosomes 6, 20, 21, and 22 in normal and transformed cells [Eckhardt *et al.* 2006; Zhang *et al.* 2009].

MBD2 preferentially associated methylated and POLR2 free sites, in HeLa cells

As expected for a methyl-CpG-binding protein, the majority of the MBD2 binding sites (74%; 6,108 out of 8,257) associated genes methylated at their 5' end (-700 to +200). Statistic analysis indicated that this association was not the result of a random process (χ^2 test = 1.1×10^{-145}) suggesting a specific recruitment of MBD2 at methylated sites. The list of MBD2-positive genes was also compared with the genes exhibiting a POLR2 free TSS region (**Figure 4**). A non-random association between MBD2-positive genes and POLR2 free genes was observed (χ^2 = 7.7×10^{-3}). Indeed, the majority of MBD2-

positive genes (65%, 5,365/8,273) were silenced, as determined by the absence of POLR2, suggesting that MBD2 is involved in the transcriptional repression of these genes. Finally, when data obtained from the analysis of the regions (-700 to +200) surrounding the TSSs are compared we find that 51% of MBD2-positive genes were also methylated and silenced. These data indicate a non-random association (multiple correspondence analysis; $p < 0.0001$) between these parameters (**Figure 4**) and that among the 23,054 promoter regions represented on the microarray, about 18% of them exhibit MBD2-positive, methylated, and POLR2 free TSS regions.

MBD2-positive, methylated, and POLR2 free sites were not biased towards CpG islands

CpG sites are under-represented, about 1/5 of the frequency that can be expected from base composition of human genome. The majority of CpG sites dispersed throughout the genome are generally methylated [Klose and Bird 2006]. In contrast, short sequences (0.5 kb to ~3 kb) exhibiting a relatively high C+G content and little CpG suppression are generally unmethylated in normal cells. However these sequences, called CpG islands, are frequently methylated in cancer cells and lead to gene silencing [Baylin and Ohm 2006; Ehrlich *et al.* 2002; Esteller 2007]. Using the criteria defined by Takai and Jones: regions of DNA of greater than 500 bp with a G+C equal to or greater than 50% and observed CpG expected CpG of 0.65 or greater [Takai and Jones 2002] and the data from USCS data bank, we identified genes exhibiting a CpG island at TSS regions (from position -700 to +200).

The analysis of ChIP on chip experiments performed from HeLa cells indicated that about 19% (2,290/1,1846) of the genes, possessing a CpG island at their 5' end, were MBD2-positive, methylated and silent. However, these characteristics were also observed for about the same number (1,911) of genes without CpG island, suggesting that the presence of a CpG island is not a discriminating factor for these epigenetic modifications, in HeLa cells.

Relationship between distance from transcription start sites of the MBD2 binding sites and gene silencing

Although both MeCP2 and MBD1 exhibit a long-range effect on gene expression, the efficiency of the transcriptional repression mediated by the transcriptional repression domains (TRD) of MeCP2 and MBD1 is differentially affected by distance from TSS of reporter genes carried by expression vectors [Nan *et al.* 1997; Ng *et al.* 2000]. The strength of the repression driven by the MBD1-TRD is not affected by distance even when it is more than 2,000 bp distant from the TSS [Ng *et al.* 2000], while the repressive effect of MeCP2-TRD progressively declines with distance from TSS in the regions analyzed, -400 to -2,200 bp [Nan *et al.* 1998].

In the course of these experiments we have mapped the MBD2 binding sites in large regions (10 kb) around the TSSs. We have taken this opportunity to investigate the effect of distance from TSSs on repression linked to MBD2. The percentage of genes deprived of POLR2 at their TSS and exhibiting a methylated region bound by MBD2, was plotted against distance of MBD2 binding sites from their TSSs (**Figure 6**). We observed a progressive decrease of the percentage of silenced gene with distance from TSSs. In addition the numbers of silent genes also lessened with distance, we identified 498, and 1,129 silent genes associated with MBD2 binding located in the intervals, -1,600 to

-2,500 and +1,100 to +2,000, respectively, while 4,201 were deprived in POLR2 when MBD2 binding sites are located in the -700 to +200 region. These data indicated that a MBD2 binding near the TSSs had a predominant role in gene silencing.

MBD2 preferentially associated genes involved in cell death and cell cycle in HeLa cells

The biological functions of silent genes exhibiting methylated 5' end region and bound by MBD2 (-700 to +200 interval) were analyzed using Ingenuity Pathway Analysis software. Categorization by molecular and cellular function of these genes leads to 3 majors groups (**Table 1**), gene expression, cell death, and cell cycle. Therefore, among the 62 categories analyzed, the emerging groups are directly related to biological functions altered in cancer cells, suggesting that MBD2 is involved in the neoplastic process.

DISCUSSION

Evidences for an involvement in gene silencing of proteins possessing a methyl-CpG-binding domain have been obtained from a large variety of cell lines [Esteller 2007]. However, recent reports suggest a dual role for these MBD proteins. Several experiments, using different approaches (identification of interacting proteins, expression of transfected vectors...) have suggested that MBD2 may act as a gene activator. Furthermore, genome-wide promoter analysis has failed to correlate MeCP2 binding sites with silent genes [Yasui *et al.* 2007]. In order to define the major role of MBD2, at whole genome level, we have analyzed in a cancer cell line, HeLa cells, the characteristics of MBD2 binding sites.

Distribution of MBD2, POLR2, and methylation sites on the promoter region of chromosome 1

MBD2, POLR2, and methylation sites were mapped on microarray representing more than 25,000 promoter regions. Using chromosome 1 as a model, the position relative to TSS of MBD2 binding sites were determined. The percentage of probes hybridized to DNA fragments selected by ChIP assays, using antibodies directed against MBD2, reached a maximum value at TSSs, suggesting that MBD2 is involved in the regulation of the transcription initiation process. Nevertheless small variations were observed throughout the regions (-7,500 to +2,450) represented on the array. Recent study of *GATA-4* locus has shown that MBD2 may participate to long-range chromatin interaction mediated by loops structure and leads to gene silencing [Tiwari *et al.* 2008]. Thus, we cannot exclude that these MBD2 binding sites were not involved in the transcriptional process. Full understanding of these patterns awaits technological development allowing a genome-wide analysis of chromatin loops.

When the map of MBD2 binding sites was compared with POLR2 binding sites, we observed a correlation between the presence of MBD2 and the absence of POLR2. Although the absence of POLR2 does not mark all the silent genes, since POLR2 needs to be assembled in a complex prior initiating transcription [Sandelin *et al.* 2007], we choose this criterion for two reasons. Comparison between the presence of MBD2 with the absence of POLR2 avoids potential biases due to hybridization kinetics and/or probes present on the array, since we compared a positive signal with a negative signal. The absence of POLR2 unambiguously indicates that the gene is not transcribed at the sites analyzed. Therefore, the colocalization between the presence of MBD2 and the absence of POLR2 is also in favor of a repressive role of MBD2 in the transcriptional initiation process.

Methylated DNA sites also colocalized with MBD2 binding sites, as expected from a protein containing a methyl-CpG-binding domain. The method used for selecting DNA fragments is based the affinity of a recombinant protein (4xMBD) containing four MBD domain derived from MBD1. Gel shift assays and quantification of the efficiency of 4xMBD to recognize methylated DNA fragments indicated that methylated DNA fragments were targeted by 4xMBD protein independently of their CpG density. For example, the 5' end of *pS2* [Chatagnon *et al.* submitted] and the methylated part of the *BRCA1* CGi [Auriol *et al.* 2005] were efficiently selected, while the bound fraction was depleted in the unmethylated part of *BRCA1* CGi.

The intensity of the signals obtained from DNA fragments analyzed on the array did not allow an accurate quantification of methylation levels. As illustrated by the experiments mentioned above, the

4xMBD protein binds DNA fragments containing a few methylated CpG as well as fully methylated fragments from CGI. Mapping DNA methylation regions using this method should not alter the potential correlation between MBD2 binding sites and DNA methylation. Indeed, it has been previously shown that MBD2 can bind oligonucleotides containing only one CpG site [Hendrich and Bird 1998] and, *in vivo*, MBD2 associates methylated CpG in a non-CGI context [Hutchins *et al.* 2002]. Thus, it is likely that the methylated DNA fragments selected by the use of the 4xMBD protein contain enough methylated CpG to associate MBD2.

The DNA methylation peaks observed at TSSs of chromosome 1 might suggest that these regions were hypermethylated. However, DNAs were fragmented at random by sonication to a median length of 300 bp. Thus, if the majority of CpGs were methylated in fragments selected by the 4xMBD protein in an interval containing several probes, the percentage of probes hybridizing with the bound fractions should be proportional to the CpG density. In order to evaluate this hypothesis, the percentage of probes hybridizing to DNA fragments were normalized by the CpG density at a 200 bp resolution. We choose this interval because it corresponds to about 6 probes, which can, therefore, hybridize to different DNA fragments. Data obtained indicated that the percentage of methylated probes, normalized by CpG density, was lower at TSSs than in surrounding sequences. As expected from bisulfite sequence data obtained from the analysis of genomic region from chromosomes 6, 20, 21, and 22 and whole genome sequencing [Eckhardt *et al.* 2006; Zhang *et al.* 2009], this analysis indicated that the percentage of methylated CpG reached is lowest value at TSSs.

MBD2 preferentially associated methylated and POLR2 free sites, in HeLa cells

The analysis of the distribution of MBD2, POLR2, and DNA methylation on the promoter regions of chromosome 1 (-7,500 to +2,450; 2,547 genes) indicated that the corresponding signals peak at the TSS region, -700 to +200. In addition, this region include the majority of the first exons, since the medium length of an exon 1, in the human genome, is inferior to 200 bp and, consequently, the absence of POLR2 is a marker of silent genes. Therefore, we have identified the genes exhibiting MBD2 binding sites and/or absence of POLR2 and/or methylated regions, in the -700 to +200 interval, to determine the potential correlation between these signals at each promoter region of autosomes represented on the array (23045 genes).

The large majority (74%) of the genes bound by MBD2 also exhibited methylated sites. Thus, at whole genome level the correlation between DNA methylation and MBD2 binding sites was still observed. We also found MBD2 binding sites in DNA methylation free regions, and we cannot exclude that some unmethylated DNA sequences were targeted by MBD2. It had been suggested that MBD2 may interact with DNA binding proteins which associate DNA sequences independently of their methylation status and recruit MBD2 at unmethylated sites [Fujita *et al.* 2003a]. Nevertheless, it should be noted that microarray data were analyzed using a software (TAS) that excluded potentially non-significant signals. For example, 1 or 2 positive probes are not taken in account if they are surrounded by negative probes. Although this analysis leads to a reliable identification of positive regions, some DNA fragments with only one methylated CpG may be missed in this analysis, whereas MBD2 can associate DNA sequences containing one methylated CpG [Hendrich and Bird 1998]. Taken together,

these data indicate that the major mechanism involved in the association of MBD2 with DNA is the methylation of the targeted regions.

This analysis has also confirmed the correlation between DNA methylation and gene silencing, 72% of methylated genes were deprived in POLR2 and 72% of silent genes exhibited methylated sequences in the -700 to +200 region. As expected from the data described above, MBD2 binding sites were non-randomly distributed ($p < 0.0001$) among the methylated and the silent genes. The percentage (51%) of genes exhibiting MBD2 binding sites, methylated at their 5' ends and silent, may be under-evaluated, since the criterion used for the identification of untranscribed genes is the absence of POLR2. However, a comparison between TAF-1 (TATA box binding protein associated factor) and POLR2-bound promoters have indicated a marked concordance between these two parameters [Weber *et al.* 2007]. Taken together, these data indicated that about 18% of 23,045 autosomic promoter sequences, represented on the array, are silent, methylated and targeted by MBD2, in HeLa cells.

Distance of MBD2 binding sites, from TSSs, lessened the strength of association between the presence MBD2 and gene silencing

We observed a significant association between MBD2 binding, DNA methylation and gene silencing, in TSS regions (-700 to +200). The number of silent genes associated with MBD2-methylated regions gradually decreased with distance, of positive MBD2-methylated regions, from TSSs. These data suggest that the strength of transcriptional repression mediated by MBD2 is lessened with distance. The effect of distance on the repressive activity of MBD1 and MeCP2 has been investigated in upstream regions of the TSS of reporter genes [Nan *et al.* 1997; Ng *et al.* 2000], in this study we also show that MBD2 binding in the downstream regions may impact gene activity in a distance-dependent manner. The association between MBD2 binding and silent gene was predominantly observed at the TSS regions and, therefore, suggest that MBD2 inhibits the initiation of the transcription. Nevertheless, we cannot exclude that MBD2 binding at downstream region from the TSSs alters transcriptional elongation. In line with this hypothesis, it was shown that intragenic methylation strongly reduces the efficiency of POLR2 elongation [Lorincz *et al.* 2004].

MBD2 a major actor in methylation-dependent gene silencing

Among the silent genes, about 42% of them exhibited methylated sites in the -700 to +200 region and were also bound by MBD2, suggesting that MBD2 is predominant in the transcriptional repression mediated by DNA methylation, in HeLa cells. Moreover, 41% of the methylated and silent promoters were also targeted by MBD2 indicating that this protein account for almost half of the genes silenced in a methylation- dependent manner. This value is relatively high, since the other MBD proteins, MBD1 and MeCP2, were expressed in HeLa cells [Chatagnon *et al.* 2009] and methylation-dependent repressors, such as Kaiso, were also present [Sasai and Defossez 2009]. In addition, methylation-dependent repression may be also driven by other proteins, for example, it has been shown that DNA-Methyl Transferase 1 may recruits HDAC activities and represses transcription [Robertson *et al.* 2000].

The analysis of gene transcription also indicated that MBD2 may play a major in gene silencing.

Using an array representing a limited number of genes (7,327 cDNA sequences), a release of transcriptional silencing upon depletion of MBD proteins by RNAi was observed and MBD2 depletion was the protein most commonly involved in gene re-activation in HeLa cells [Lopez-Serra *et al.* 2008]. Furthermore, Mbd2 seems to be the most prominent methylation-dependent repressor. In mouse-tail fibroblast cell lines lacking *Mbd2*, *in vitro* methylated expression vectors are inefficiently repressed, while *Mecp2* deletion does not affect the repression of transiently transfected methylated templates [Hendrich *et al.* 2001].

Thus, genome-wide analysis and experimental manipulation of MBD2 levels argue in favor of a predominant role of MBD2 in methylation-dependent gene silencing in epithelial cancer cells.

MATERIALS AND METHODS

Cell culture

The cervical cancer cell line HeLa was obtained from ATCC (Rockville, MD) and grown in DMEM (Eagle, Sigma, L'isle d'Abeau, France) supplemented with 10% fetal bovine serum. Cells were grown at 37°C in a humidified 5% CO₂ atmosphere.

Recombinant 4xMBD proteins production and purification

pET-4xMBD and pET-4xMBD-R22A plasmids encoding in bacterial system recombinant wild type His₆-tagged 4xMBD and mutant His₆-tagged 4xMBD-R22A proteins, respectively, were kindly provided by Dr. A. Bird [Jorgensen *et al.* 2006]. Both recombinant proteins were purified, from induced *E. coli* Rosetta (DE3 pLysS) cultures, on Ni-NTA agarose (Qiagen, Courtaboeuf, France) using denaturation and renaturation by stepwise dialysis.

Electrophoretic mobility shift assays

Electrophoretic mobility shift assays were performed using LightShift Chemiluminescent EMSA kit (Thermo Scientific, Rockford) in accordance to manufacturer's instructions. Briefly, 200 ng purified His₆-tagged 4xMBD protein in 1X binding buffer, 5 % glycerol, 5 mM MgCl₂, 50 ng/μL poly dI.dC, 0.05% NP-40, and 0.5 M Urea were pre-incubated 20 minutes in room temperature before the addition of 0,25 fmol biotin-5'end-labeled double-strand probes corresponding to the sequence ATC-AGA-CGT-TCG-CCG-GCG-GAT-TGG-CTT-GGC-TGC-GAA-GAA-GAT-A, either symmetrically methylated at CpG sites or unmethylated (Eurogentec, Seraing, Belgium). After further 20 min incubation at room temperature, binding reactions were loaded on a 6% polyacrylamide gel in 0.5X TBE and ran at 100V for about 50 minutes. Binding reactions were then transferred (1 hour, 230 mA, 4°C) to nylon membrane and UV cross-linked for 12.5 minutes. Biotin-labelled probe was detected by chemiluminescence.

Methyl DNA precipitation (MeDP)

Fifteen μg of His₆-tagged 4xMBD proteins and 500 ng of HeLa DNA sheared to an average length of 300 - 600 bp were incubated 1 hour at room temperature in interaction buffer containing 10 mM Tris pH 7.8, 50 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 0.05 % NP-40, 0.5 mM DTT, 0.5 M urea and 5 % glycerol. Ni-NTA magnetic agarose beads (Qiagen) were added 1 hour. Then, beads were washed four times with the interaction buffer plus 0.3 M NaCl and eluted in 40 mM Tris pH 7.8, 10 mM EDTA, 0.5 % SDS. A digestion with proteinase K (400 μg) was performed before purification of precipitated DNA by two phenol-chloroform. This bound fraction was compared with input fraction which corresponds to sonicated DNA that was only digested and purified. To test for enrichment of methylated sites, PCR amplifications of *BRCA1-NBR2* [Auriol *et al.* 2005], *hTERT* [Chatagnon *et al.* 2009], *pS2* and *GAPDH* promoters were performed on each MeDP samples. Five independent MeDP experiments were performed and DNA from input and bound fractions were collected.

Chromatin Immunoprecipitation (ChIP)

ChIP assays were carried out as previously described [Auriol *et al.* 2005]. Nucleoprotein complexes, sheared to an average length of 300 - 600 bp, was immunoprecipitated with 15 μ l of two different polyclonal anti-MBD2 antibodies (kindly provided by Dr. P. Wade and Dr. E. Ballestar); and 20 μ l of polyclonal anti-RNAPolIII (8WG16, Covance, California). The relative concentrations in the bound and input fractions of immunoprecipitated DNAs were assessed by real-time PCR amplification of *BRCA1-NBR2*, *hTERT*, *pS2*, and *GAPDH* DNA segments. Three independent ChIP experiments were performed for each antibody and DNA from input and bound fractions were collected and pooled. This procedure was performed twice time to obtain 2 pools of input fraction and 2 pools of bound fraction for each antibody.

ChIP-on-Chip and MeDP-on-Chip

The ChIP and MeDP DNAs from the input and bound fractions were amplified, labelled and hybridized on microarrays by ProfileXpert service according to Affymetrix™ protocols. Briefly, DNA fragments from ChIP and MeDP experiments were independently amplified by random PCR. The conservation of relative concentrations, in the bound and input fractions, DNA fragment precipitated by anti-MBD2, anti-RNAPolIII antibodies and 4XMBD was assayed by real-time PCR amplification of *BRCA1-NBR2*, *hTERT*, *pS2* and *GAPDH* promoters, on each ChIP or MeDP samples before and after amplification. The amplified DNAs from each ChIP and MeDP fractions were pooled to obtain only one bound and one input fractions from MBD2-ChIP, RNAPolIII-ChIP or MeDP. These 6 samples were then labelled using the GeneChip® WT Double - Stranded DNA Terminal Labelling Kit and hybridized to the human tiling arrays (Human Promoter 1.0R Arrays), which were then washed and scanned.

ARRAY analysis

Raw data from the scans were analyzed using Affymetrix® Tiling Analysis Software (TAS) and the results were viewed in Affymetrix' Integrated Genome Browser (IGB) Software. Data were analyzed using CisGenome software (www.biostat.jhsph.edu/~hji/cisgenome) and Ingenuity Pathway Analysis software (Redwood City, CA, USA).

REFERENCES

- Amir, R. E., I. B. Van den Veyver, M. Wan, C. Q. Tran, U. Francke, and H. Y. Zoghbi. 1999. Rett syndrome is caused by mutations in X-linked MECP2, encoding methyl-CpG-binding protein 2. *Nat Genet* 23:185-8.
- Angrisano, T., F. Lembo, R. Pero, F. Natale, A. Fusco, V. E. Avvedimento, C. B. Bruni, and L. Chiariotti. 2006. TACC3 mediates the association of MBD2 with histone acetyltransferases and relieves transcriptional repression of methylated promoters. *Nucleic Acids Res* 34:364-72.
- Auriol, E., L. M. Billard, F. Magdinier, and R. Dante. 2005. Specific binding of the methyl binding domain protein 2 at the BRCA1-NBR2 locus. *Nucleic Acids Res* 33:4243-54.
- Ballestar, E., M. F. Paz, L. Valle, S. Wei, M. F. Fraga, J. Espada, J. C. Cigudosa, T. H. Huang, and M. Esteller. 2003. Methyl-CpG binding proteins identify novel sites of epigenetic inactivation in human cancer. *Embo J* 22:6335-45.
- Barr, H., A. Hermann, J. Berger, H. H. Tsai, K. Adie, A. Prokhortchouk, B. Hendrich, and A. Bird. 2007. Mbd2 contributes to DNA methylation-directed repression of the Xist gene. *Mol Cell Biol* 27:3750-7.
- Baylin, S. B., and J. E. Ohm. 2006. Epigenetic gene silencing in cancer - a mechanism for early oncogenic pathway addiction? *Nat Rev Cancer* 6:107-16.
- Berger, J., O. Sansom, A. Clarke, and A. Bird. 2007. MBD2 is required for correct spatial gene expression in the gut. *Mol Cell Biol* 27:4049-57.
- Bird, A., and S. Tweedie. 1995. Transcriptional noise and the evolution of gene number. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 349:249-53.
- Bird, A. P., and A. P. Wolffe. 1999. Methylation-induced repression--belts, braces, and chromatin. *Cell* 99:451-4.
- Campbell, P. M., V. Bovenzi, and M. Szyf. 2004. Methylated DNA-binding protein 2 antisense inhibitors suppress tumorigenesis of human cancer cell lines in vitro and in vivo. *Carcinogenesis* 25:499-507.
- Chahrour, M., S. Y. Jung, C. Shaw, X. Zhou, S. T. Wong, J. Qin, and H. Y. Zoghbi. 2008. MeCP2, a key contributor to neurological disease, activates and represses transcription. *Science* 320:1224-9.
- Chatagnon, A., S. Bougel, L. Perriaud, J. Lachuer, J. Benhattar, and R. Dante. 2009. Specific association between the methyl-CpG-binding domain protein 2 and the hypermethylated region of the human telomerase reverse transcriptase promoter in cancer cells. *Carcinogenesis* 30:28-34.
- Dhasarathy, A., and P. A. Wade. 2008. The MBD protein family-reading an epigenetic mark? *Mutat Res* 647:39-43.
- Eads, C. A., A. E. Nickel, and P. W. Laird. 2002. Complete genetic suppression of polyp formation and reduction of CpG-island hypermethylation in Apc(Min/+) Dnmt1-hypomorphic Mice. *Cancer Res* 62:1296-9.

- Eckhardt, F., J. Lewin, R. Cortese, V. K. Rakyan, J. Attwood, M. Burger, J. Burton, T. V. Cox, R. Davies, T. A. Down, C. Haefliger, R. Horton, K. Howe, D. K. Jackson, J. Kunde, C. Koenig, J. Liddle, D. Niblett, T. Otto, R. Pettett, S. Seemann, C. Thompson, T. West, J. Rogers, A. Olek, K. Berlin, and S. Beck. 2006. DNA methylation profiling of human chromosomes 6, 20 and 22. *Nat Genet* 38:1378-85.
- Ego, T., Y. Tanaka, and K. Shimotohno. 2005. Interaction of HTLV-1 Tax and methyl-CpG-binding domain 2 positively regulates the gene expression from the hypermethylated LTR. *Oncogene* 24:1914-23.
- Ehrlich, M., G. Jiang, E. Fiala, J. S. Dome, M. C. Yu, T. I. Long, B. Youn, O. S. Sohn, M. Widschwendter, G. E. Tomlinson, M. Chintagumpala, M. Champagne, D. Parham, G. Liang, K. Malik, and P. W. Laird. 2002. Hypomethylation and hypermethylation of DNA in Wilms tumors. *Oncogene* 21:6694-702.
- Esteller, M. 2007. Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps. *Nat Rev Genet* 8:286-98.
- Fujita, H., R. Fujii, S. Aratani, T. Amano, A. Fukamizu, and T. Nakajima. 2003a. Antithetic effects of MBD2a on gene regulation. *Mol Cell Biol* 23:2645-57.
- Fujita, N., S. Watanabe, T. Ichimura, S. Tsuruzoe, Y. Shinkai, M. Tachibana, T. Chiba, and M. Nakao. 2003b. Methyl-CpG binding domain 1 (MBD1) interacts with the Suv39h1-HP1 heterochromatic complex for DNA methylation-based transcriptional repression. *J Biol Chem* 278:24132-8.
- Fuks, F., P. J. Hurd, D. Wolf, X. Nan, A. P. Bird, and T. Kouzarides. 2003. The methyl-CpG-binding protein MeCP2 links DNA methylation to histone methylation. *J Biol Chem* 278:4035-40.
- Guy, J., B. Hendrich, M. Holmes, J. E. Martin, and A. Bird. 2001. A mouse *Mecp2*-null mutation causes neurological symptoms that mimic Rett syndrome. *Nat Genet* 27:322-6.
- Hendrich, B., and A. Bird. 1998. Identification and characterization of a family of mammalian methyl-CpG binding proteins. *Mol Cell Biol* 18:6538-47.
- Hendrich, B., J. Guy, B. Ramsahoye, V. A. Wilson, and A. Bird. 2001. Closely related proteins MBD2 and MBD3 play distinctive but interacting roles in mouse development. *Genes Dev* 15:710-23.
- Hendrich, B., U. Hardeland, H. H. Ng, J. Jiricny, and A. Bird. 1999. The thymine glycosylase MBD4 can bind to the product of deamination at methylated CpG sites. *Nature* 401:301-4.
- Hutchins, A. S., A. C. Mullen, H. W. Lee, K. J. Sykes, F. A. High, B. D. Hendrich, A. P. Bird, and S. L. Reiner. 2002. Gene silencing quantitatively controls the function of a developmental trans-activator. *Mol Cell* 10:81-91.
- 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* 19:187-91.
- Jorgensen, H. F., K. Adie, P. Chaubert, and A. P. Bird. 2006. Engineering a high-affinity methyl-CpG-binding protein. *Nucleic Acids Res* 34:e96.
- Klose, R. J., and A. P. Bird. 2006. Genomic DNA methylation: the mark and its mediators. *Trends Biochem Sci* 31:89-97.

- Klose, R. J., S. A. Sarraf, L. Schmiedeberg, S. M. McDermott, I. Stancheva, and A. P. Bird. 2005. DNA binding selectivity of MeCP2 due to a requirement for A/T sequences adjacent to methyl-CpG. *Mol Cell Biol* 19:667-78.
- Kondo, E., Z. Gu, A. Horii, and S. Fukushige. 2005. The thymine DNA glycosylase MBD4 represses transcription and is associated with methylated p16(INK4a) and hMLH1 genes. *Mol Cell Biol* 25:4388-96.
- Lembo, F., R. Pero, T. Angrisano, C. Vitiello, R. Iuliano, C. B. Bruni, and L. Chiariotti. 2003. MBDin, a novel MBD2-interacting protein, relieves MBD2 repression potential and reactivates transcription from methylated promoters. *Mol Cell Biol* 23:1656-65.
- Lin, X., K. Asgari, M. J. Putzi, W. R. Gage, X. Yu, B. S. Cornblatt, A. Kumar, S. Piantadosi, T. L. DeWeese, A. M. De Marzo, and W. G. Nelson. 2001. Reversal of GSTP1 CpG island hypermethylation and reactivation of pi-class glutathione S-transferase (GSTP1) expression in human prostate cancer cells by treatment with procainamide. *Cancer Res* 61:8611-6.
- Lopez-Serra, L., E. Ballestar, M. F. Fraga, M. Alaminos, F. Setien, and M. Esteller. 2006. A profile of methyl-CpG binding domain protein occupancy of hypermethylated promoter CpG islands of tumor suppressor genes in human cancer. *Cancer Res* 66:8342-6.
- Lopez-Serra, L., E. Ballestar, S. Ropero, F. Setien, L. M. Billard, M. F. Fraga, P. Lopez-Nieva, M. Alaminos, D. Guerrero, R. Dante, and M. Esteller. 2008. Unmasking of epigenetically silenced candidate tumor suppressor genes by removal of methyl-CpG-binding domain proteins. *Oncogene* 27:3556-66.
- Lorincz, M. C., D. R. Dickerson, M. Schmitt, and M. Groudine. 2004. Intragenic DNA methylation alters chromatin structure and elongation efficiency in mammalian cells. *Nat Struct Mol Biol* 11:1068-75.
- Macville, M., E. Schrock, H. Padilla-Nash, C. Keck, B. M. Ghadimi, D. Zimonjic, N. Popescu, and T. Ried. 1999. Comprehensive and definitive molecular cytogenetic characterization of HeLa cells by spectral karyotyping. *Cancer Res* 59:141-50.
- Majumder, S., H. Kutay, J. Datta, D. Summers, S. T. Jacob, and K. Ghoshal. 2006. Epigenetic regulation of metallothionein-i gene expression: differential regulation of methylated and unmethylated promoters by DNA methyltransferases and methyl CpG binding proteins. *J Cell Biochem* 97:1300-16.
- Martin, V., H. F. Jorgensen, A. S. Chaubert, J. Berger, H. Barr, P. Shaw, A. Bird, and P. Chaubert. 2008. MBD2-mediated transcriptional repression of the p14ARF tumor suppressor gene in human colon cancer cells. *Pathobiology* 75:281-7.
- Nan, X., F. J. Campoy, and A. Bird. 1997. MeCP2 is a transcriptional repressor with abundant binding sites in genomic chromatin. *Cell* 88:471-81.
- Nan, X., H. H. Ng, C. A. Johnson, C. D. Laherty, B. M. Turner, R. N. Eisenman, and A. Bird. 1998. Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. *Nature* 393:386-9.
- Ng, H. H., P. Jeppesen, and A. Bird. 2000. Active repression of methylated genes by the chromosomal protein MBD1. *Mol Cell Biol* 20:1394-406.

- Robertson, K. D., S. Ait-Si-Ali, T. Yokochi, P. A. Wade, P. L. Jones, and A. P. Wolffe. 2000. DNMT1 forms a complex with Rb, E2F1 and HDAC1 and represses transcription from E2F-responsive promoters. *Nat Genet* 25:338-42.
- Sakai, H., T. Urano, K. Ookata, M. H. Kim, Y. Hirai, M. Saito, Y. Nojima, and F. Ishikawa. 2002. MBD3 and HDAC1, two components of the NuRD complex, are localized at Aurora-A-positive centrosomes in M phase. *J Biol Chem* 277:48714-23.
- Sandelin, A., P. Carninci, B. Lenhard, J. Ponjavic, Y. Hayashizaki, and D. A. Hume. 2007. Mammalian RNA polymerase II core promoters: insights from genome-wide studies. *Nat Rev Genet* 8:424-36.
- Sansom, O. J., J. Berger, S. M. Bishop, B. Hendrich, A. Bird, and A. R. Clarke. 2003. Deficiency of Mbd2 suppresses intestinal tumorigenesis. *Nat Genet* 34:145-7.
- Sarraf, S. A., and I. Stancheva. 2004. Methyl-CpG binding protein MBD1 couples histone H3 methylation at lysine 9 by SETDB1 to DNA replication and chromatin assembly. *Mol Cell* 15:595-605.
- Sasai, N., and P. A. Defossez. 2009. Many paths to one goal? The proteins that recognize methylated DNA in eukaryotes. *Int J Dev Biol* 53:323-34.
- Takai, D., and P. A. Jones. 2002. Comprehensive analysis of CpG islands in human chromosomes 21 and 22. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:3740-5.
- Tiwari, V. K., K. M. McGarvey, J. D. Licchesi, J. E. Ohm, J. G. Herman, D. Schubeler, and S. B. Baylin. 2008. PcG proteins, DNA methylation, and gene repression by chromatin looping. *PLoS Biol* 6:2911-27.
- Wade, P. A., A. Geggion, P. L. Jones, E. Ballestar, F. Aubry, and A. P. Wolffe. 1999. Mi-2 complex couples DNA methylation to chromatin remodelling and histone deacetylation. *Nat Genet* 23:62-6.
- Weber, M., I. Hellmann, M. B. Stadler, L. Ramos, S. Paabo, M. Rebhan, and D. Schubeler. 2007. Distribution, silencing potential and evolutionary impact of promoter DNA methylation in the human genome. *Nat Genet* 39:457-66.
- Yasui, D. H., S. Peddada, M. C. Bieda, R. O. Vallero, A. Hogart, R. P. Nagarajan, K. N. Thatcher, P. J. Farnham, and J. M. Lasalle. 2007. Integrated epigenomic analyses of neuronal MeCP2 reveal a role for long-range interaction with active genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:19416-21.
- Zhang, Y., C. Rohde, S. Tierling, T. P. Jurkowski, C. Bock, D. Santacruz, S. Ragozin, R. Reinhardt, M. Groth, J. Walter, and A. Jeltsch. 2009. DNA methylation analysis of chromosome 21 gene promoters at single base pair and single allele resolution. *PLoS Genet* 5:e1000438.
- Zhao, X., T. Ueba, B. R. Christie, B. Barkho, M. J. McConnell, K. Nakashima, E. S. Lein, B. D. Eadie, A. R. Willhoite, A. R. Muotri, R. G. Summers, J. Chun, K. F. Lee, and F. H. Gage. 2003. Mice lacking methyl-CpG binding protein 1 have deficits in adult neurogenesis and hippocampal function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:6777-82.

Figure 1. Chatagnon et al.

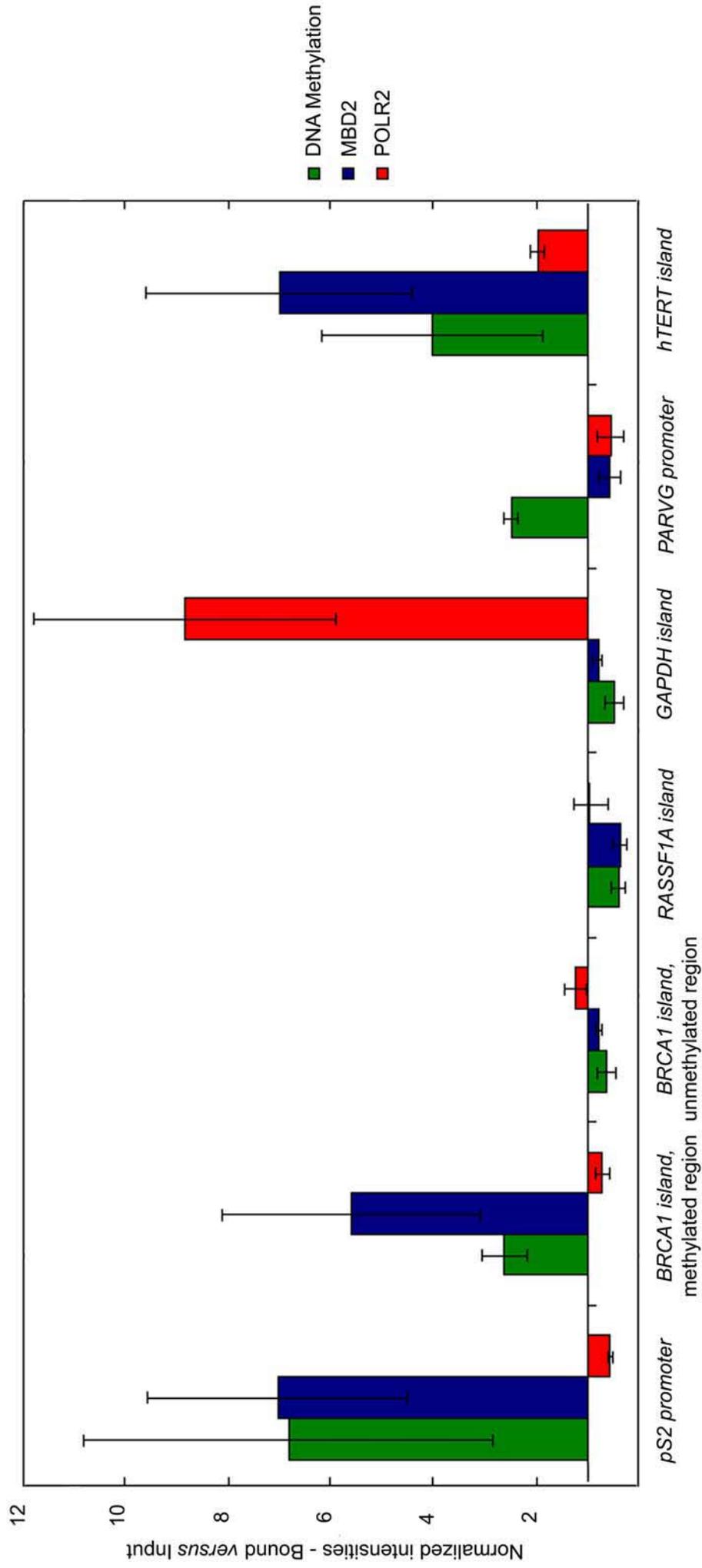


Figure 2. Chatagnon *et al.*

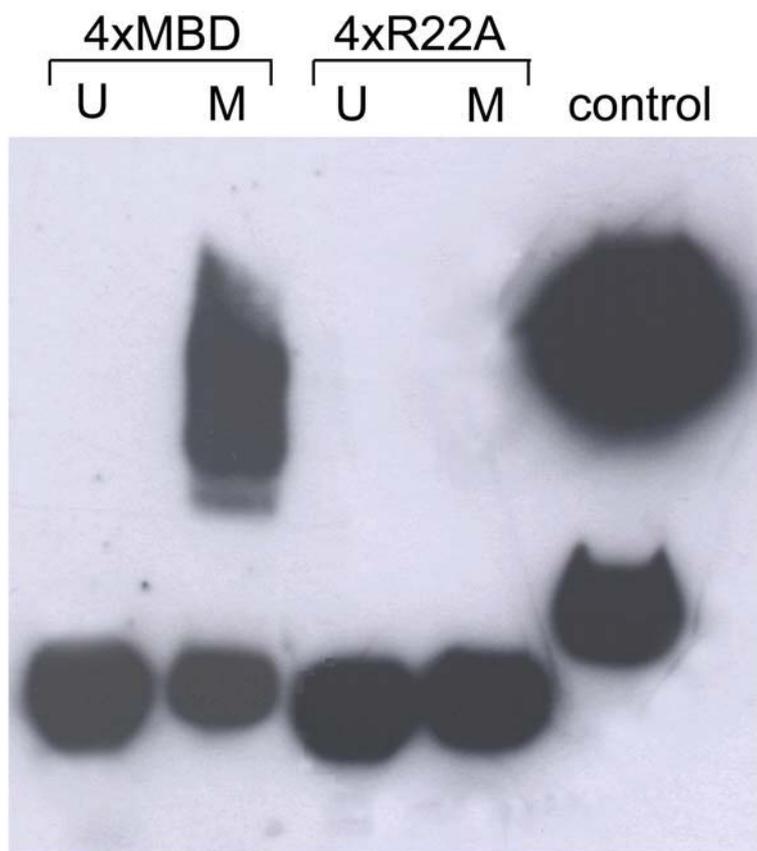


Figure 3. Chatagnon *et al.*

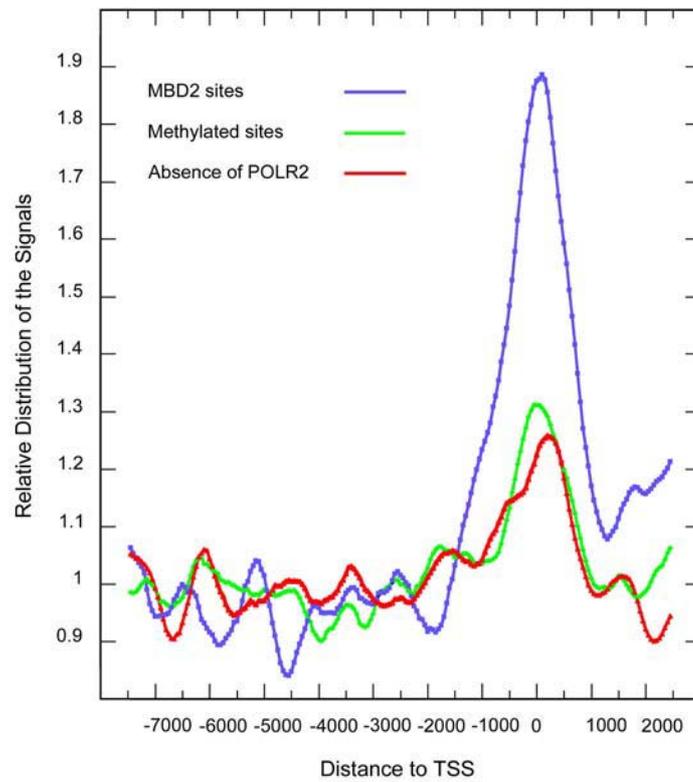


Figure 4. Chatagnon et al.

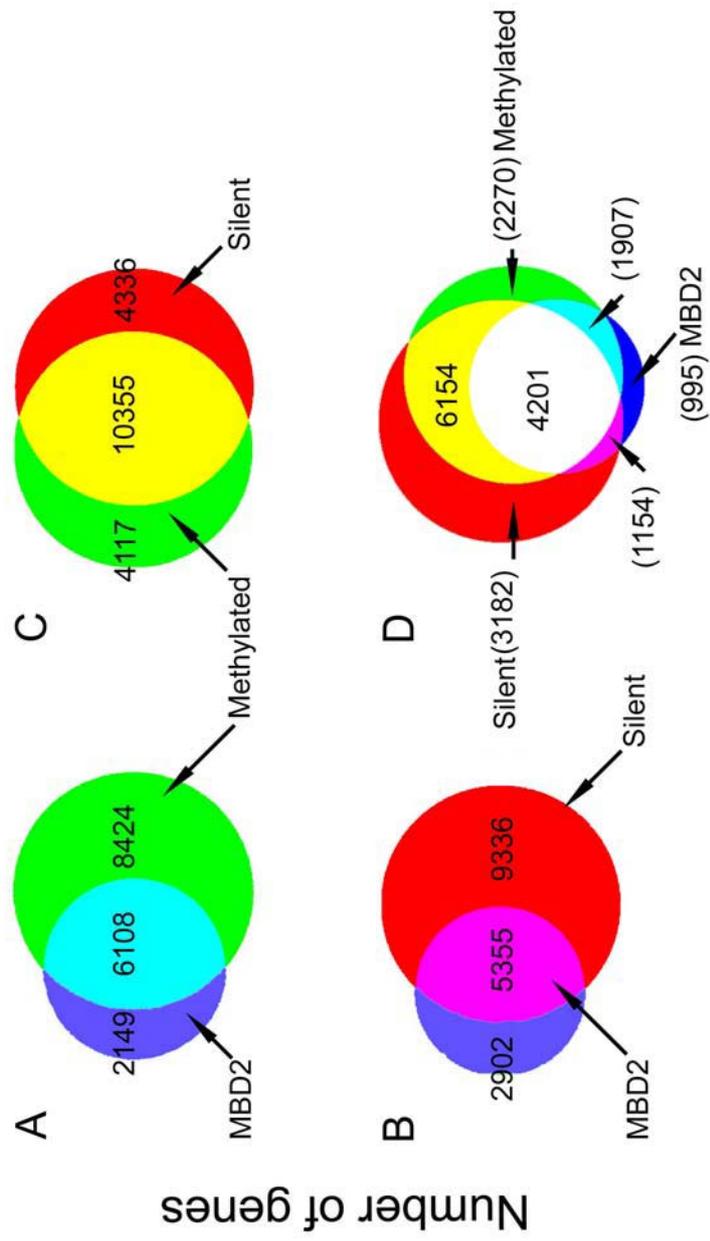


Figure 5. Chatagnon *et al.*

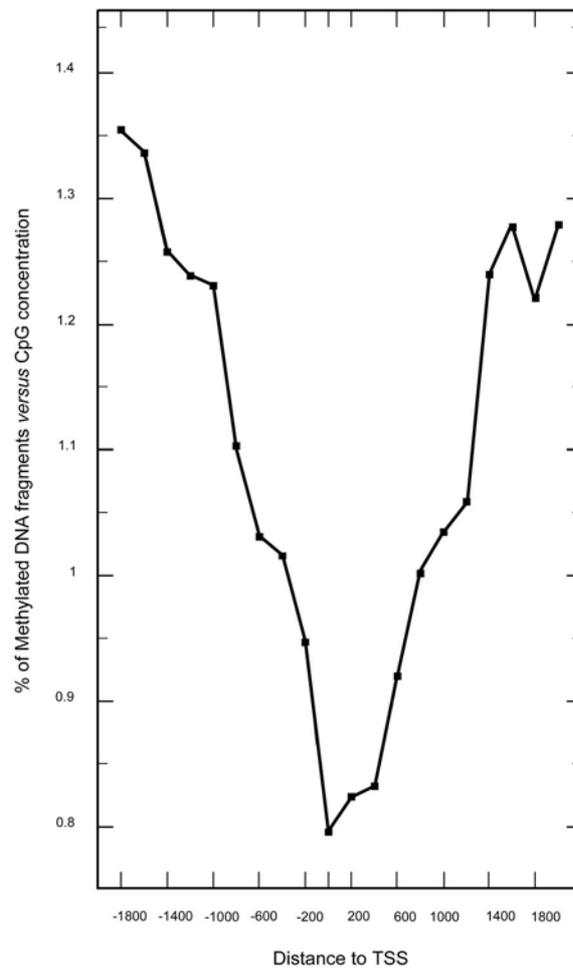


Figure 6. Chatagnon *et al.*

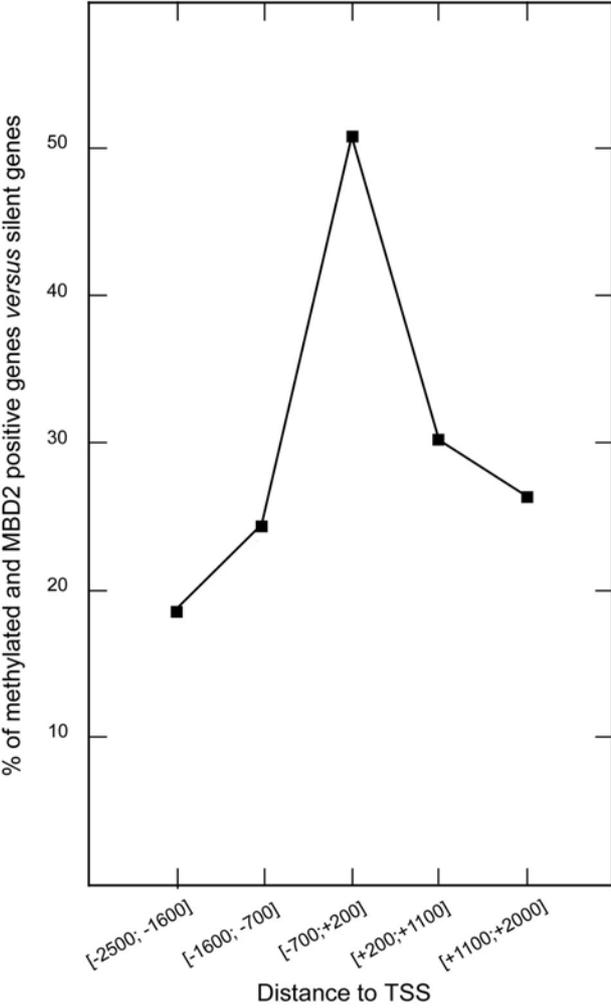


Table 1. Chatagnon *et al.*

Name	p-value	Number of molecules
Gene expression	$1.81 \times 10^{-08} - 1.66 \times 10^{-02}$	469
Cell death	$1.43 \times 10^{-07} - 1.66 \times 10^{-02}$	589
Cell cycle	$2.37 \times 10^{-06} - 1.66 \times 10^{-02}$	270
Cellular assembly and organization	$2.60 \times 10^{-06} - 1.60 \times 10^{-02}$	195
DNA replication, recombination, and repair	$3.55 \times 10^{-06} - 1.25 \times 10^{-02}$	162

Table 1. Top Molecular and Cellular Functions.

The silent genes exhibiting a methylated 5' end bound by MBD2 were analyzed using the Ingenuity Pathway Analysis software.



DISCUSSION

DISCUSSION

1- CHOIX DES MODELES GENIQUES POUR L'ANALYSE DE L'IMPLICATION DES PROTEINES A MBD DANS LA REPRESSION TRANSCRIPTIONNELLE

Les protéines à MBD sont depuis longtemps impliquées dans la répression-transcriptionnelle méthylation-dépendante (Bakker *et al.*, 2002; Lin and Nelson, 2003; Auriol *et al.*, 2005; Lopez-Serra *et al.*, 2008). Néanmoins, toutes les études portant sur la répression de gènes endogènes ont été principalement effectuées sur des gènes à îlots de CpG hyperméthylés dans les cancers. Nous avons donc décidé d'analyser l'implication des protéines à MBD dans la répression transcriptionnelle de deux promoteurs présentant des profils de méthylation « atypiques » dans certaines cellules cancéreuses : le gène *hTERT* possédant un îlot de CpG hyperméthylé mais régionalement non-méthylé et le gène *pS2* ayant un promoteur dit pauvre en CpG c'est-à-dire non inclus dans un îlot de CpG.

1.1- *hTERT*, UN MODELE D'ÎLOT DE CPG HYPERMETHYLE MAIS REGIONALEMENT NON-METHYLE

La plupart des îlots de CpG (~96%) sont non méthylés dans les cellules « normales » (Weber *et al.*, 2007), tandis que l'hyperméthylation de ces séquences est une caractéristique des cellules cancéreuses (Ehrlich, 2002). La méthylation aberrante des îlots de CpG est corrélée à la répression transcriptionnelle des gènes associés. Le gène *hTERT* représente une exception à cette règle. En effet, une hyperméthylation de son îlot de CpG est observée dans les cellules cancéreuses. Toutefois, cette altération est associée à son expression dans ~85% des cellules cancéreuses (Kim *et al.*, 1994; Stampfer and Yaswen, 2003). L'analyse détaillée du profil de méthylation de cet îlot de CpG dans différentes cellules cancéreuses et différents tissus cancéreux exprimant *hTERT* a montré que ce grand îlot de 2,6 Kb de long, situé de -1102 à +1519 à partir du site d'initiation de la transcription (+1), est globalement hyperméthylé à l'exception d'une petite région (de -165 à -80), située dans la région promotrice minimale, qui est non-méthylée ou partiellement méthylée (Guilleret and Benhattar, 2004; Zinn *et al.*, 2007). Des expériences d'immunoprécipitation de

chromatine ont, par ailleurs, montré que les marques d'une chromatine active sont associées à cette région non-méthylée (Zinn *et al.*, 2007). De plus, des expériences utilisant des vecteurs d'expression démontrent que le promoteur minimal d'*hTERT* n'a aucune activité lorsqu'il est totalement méthylé (Renaud *et al.*, 2007). En revanche, la déméthylation sélective d'une petite région en amont du site d'initiation de la transcription entraîne une activation significative du promoteur *hTERT*. Toutefois, cette activité est significativement plus faible que celle observée lorsque le promoteur *hTERT* est complètement déméthylé. Dès lors, le gène *hTERT* ne semble pas être une exception au modèle général de répression transcriptionnelle initiée par la méthylation de l'ADN. En outre, ces résultats laissent supposer que les zones hyperméthylées entourant la région non-méthylée jouent un rôle répressif dans la régulation du gène *hTERT* (Zinn *et al.*, 2007). Ce profil de méthylation particulier apparaît donc être crucial pour l'établissement de l'expression du gène *hTERT* à un niveau basal et semble être le résultat de pressions antagonistes entre les mécanismes menant à l'hyperméthylation des îlots de CpG et le « besoin » des cellules cancéreuses d'exprimer le gène *hTERT*. Nous avons ainsi voulu voir l'implication des protéines à MBD dans la régulation fine de l'expression du gène *hTERT* dans des cellules cancéreuses *hTERT*-positives.

1.2- *PS2*, UN MODELE DE GENE NON A ILOT DE CPG DIT PAUVRE EN CPG

Dans les tissus et cellules cancéreuses, la répression transcriptionnelle associée à l'hyperméthylation des îlots de CpG est maintenant regardée comme une marque épigénétique universelle de la transformation maligne (Ehrlich, 2002; Baylin and Chen, 2005; Esteller, 2007). Toutefois, dans les cellules cancéreuses, l'altération de la méthylation de l'ADN ne se restreint pas à l'aberrante méthylation des îlots de CpG. En effet, dans plusieurs cancers les séquences répétées sont moins méthylées que dans les tissus normaux équivalents et certains gènes à copie unique subissent une déméthylation (Gama-Sosa *et al.*, 1983). De plus, dans les cellules cancéreuses, une corrélation entre l'hypométhylation des régions promotrices et l'activation de la transcription génique a été établie pour plusieurs gènes (Ehrlich, 2002).

Dans le cancer du sein, notre équipe avait montré que l'hypométhylation du site CCGG situé près de l'ERE du gène *pS2* corrèle avec son expression dans les biopsies de tumeurs humaines mammaires (Martin *et al.*, 1997). Ce gène dont le promoteur est dit pauvre en CpG car non contenu dans un îlot de CpG est un exemple caractéristique d'hypométhylation dans les cancers (Martin *et al.*, 1997; Dietrich *et al.*, 2009). Toutefois, les expériences d'une part de Southern blot réalisées avec une enzyme sensible à la méthylation et d'autre part de bisulfite de sodium couplé au

séquençage ont indiqué que les tumeurs mammaires analysées possèdent des profils de méthylation hétérogènes au niveau de la région 5' régulatrice du gène *pS2* (Martin *et al.*, 1997). Ces biopsies peuvent, en effet, présenter une région 5' *pS2* méthylée, non-méthylée ou partiellement méthylée (Martin *et al.*, 1997). Par ailleurs, l'expression de ce gène est régulée par les œstrogènes et est hautement corrélée à la présence des RE dans les tumeurs mammaires (Perry *et al.*, 2008; Dietrich *et al.*, 2009). Dans quelques biopsies tumorales mammaires exprimant les RE, l'expression du gène *pS2* est observée malgré la méthylation de sa région promotrice (Martin *et al.*, 1997). Il nous semblait donc intéressant d'explorer les effets antagonistes de la méthylation de l'ADN et des RE sur l'activité du promoteur *pS2* pauvre en CpG. Notre équipe avait précédemment démontré qu'*in vitro* la liaison des RE à l'ERE n'est pas inhibée par la méthylation de l'ADN (Martin *et al.*, 1998). Par ailleurs, des expériences de protection aux nucléases ont montré que la région 5' du gène *pS2*, lorsqu'elle est méthylée, est associée à une structure chromatinienne condensée (Giamarchi *et al.*, 1999). Deux études ont également démontré que dans certains cas, la répression du gène *pS2* est induite par la formation d'une chromatine inactive impliquant les complexes HDAC Sin3 et NuRD (Metivier *et al.*, 2004; Liu and Bagchi, 2004), complexes connus comme pouvant être recrutés par les protéines à MBD. Toutes ces données suggéraient donc que la méthylation participait de façon indirecte au contrôle de l'expression du gène *pS2* et que cette région pouvait être la cible des protéines à MBD. Dans le but de déterminer l'implication des protéines à MBD dans le contrôle hormono-dépendant de l'expression du gène *pS2*, nous avons choisi trois lignées cellulaires possédant chacune un profil de méthylation de la région 5' régulatrice caractéristique des biopsies tumorales mammaires, non-méthylé pour les cellules MCF7, partiellement méthylé pour les cellules HeLa, et méthylée pour les cellules MDA MB231. L'utilisation de ces lignées nous a permis de nous affranchir de l'hétérogénéité cellulaire des tissus tumoraux. De plus, dans ces cellules, il nous était facile de manipuler artificiellement les taux en protéines à MBD et en RE.

2- SPECIFICITE DE LIAISON DE LA PROTEINE MBD2 AUX PROMOTEURS METHYLES *HTERT* ET *PS2*

La technique d'immunoprecipitation de chromatine (ChIP) nous a permis de caractériser *in vivo* les profils de fixation des trois principaux répresseurs méthylation-dépendant, MeCP2, MBD1 et MBD2, sur les régions promotrices *hTERT* et *pS2*. Nous avons pu ainsi détecter la présence exclusive de MBD2 sur ces deux régions promotrices dans les cellules HeLa. La spécificité des ChIP MBD2 ont été vérifiées et validées par l'analyse de régions méthylées ou non, connues pour être

fixées ou pas par la protéine MBD2, dans les cellules HeLa, telles que l'exon1 du gène *BRCA1* et les promoteurs *GAPDH* et *RASSF1A* non-méthylés et non fixés par MBD2, le promoteur *NBR2* méthylé et fixé par MBD2 et le promoteur *PARVG* méthylé mais non fixé par MBD2. De plus, la protéine MBD2 n'est pas fixée au promoteur *pS2* non méthylé dans les cellules MCF7, ce qui valide nos expériences de CHIP et confirme la spécificité de cette protéine pour des séquences génomiques méthylées. Par ailleurs, l'appauvrissement relatif en fragments de ces régions méthylées dans les fractions retenues par les anticorps dirigés contre MeCP2 et MBD1 suggère que d'autres régions ont été efficacement immunoprécipitées par ces anticorps.

La fixation exclusive de la protéine MBD2 au promoteur méthylé *pS2* a été mise en évidence dans deux autres lignées cellulaires MDA MB231 et BT20 (résultats non publiés pour les cellules BT20), suggérant une certaine spécificité de ce répresseur pour ce locus. En outre, dans des clones cellulaires HeLa n'exprimant plus la protéine *MBD2*, établis par notre équipe (Auriol *et al.*, 2005), la disparition de la protéine MBD2 sur le promoteur hyperméthylé *hTERT* n'entraîne pas la fixation de MeCP2 ou de MBD1. Dans les cellules HeLa, la protéine MBD2 est plus exprimée que les protéines MeCP2 et MBD1. Ces données démontrent donc que l'abondance relative des protéines à MBD ne peut expliquer la fixation exclusive de MBD2 sur l'îlot de CpG *hTERT* hyperméthylé et attestent de l'existence d'une réelle spécificité de la protéine MBD2 pour cette région génomique. La spécificité de la protéine MBD2 pour le promoteur *pS2* n'a pu être testée par ce système car lors de la vérification des profils de méthylation, cette région s'est révélée déméthylée dans les clones cellulaires HeLa n'exprimant plus la protéine *MBD2*. Des explications possibles à ce phénomène pourraient être soit la dérive des clones cellulaires, soit l'absence prolongée en protéines MBD2. En effet, la réexpression prolongée des gènes cibles de MBD2 pourrait à terme mener à leur déméthylation. D'après nos résultats, il semblerait que ce phénomène touche préférentiellement les régions peu méthylées.

Les analyses de CHIP-on-chip ont confirmé la présence de MBD2 sur les promoteurs *hTERT* et *pS2*. Elles ont par ailleurs montré que la protéine MBD2 est présente tout le long des 2,6Kb de l'îlot de CpG du gène *hTERT*, montrant que ce répresseur peut recouvrir une très grande région génomique. A l'inverse, la fixation de MBD2 au promoteur *pS2* se limite à la région méthylée dans les cellules HeLa, prouvant ici encore la spécificité de MBD2 pour les régions génomiques méthylées mais également que l'association de MBD2 à l'ADN ne s'étend pas en dehors des régions méthylées. L'association de MBD2 à l'ADN est parfaitement en phase et est spécifique de la distribution de la méthylation des CpG.

Nos résultats ont donc démontré une réelle spécificité de cible du répresseur MBD2 pour les loci *hTERT* et *pS2/TFF1* et sont en faveur de l'hypothèse « un gène - une protéine à MBD », au moins pour certains gènes. L'analyse des profils de liaison des répresseurs à MBD sur les promoteurs hyperméthylés de différents promoteurs gènes suppresseurs de tumeur avait déjà montré la possibilité d'une telle présence exclusive d'une protéine à MBD sur une portion génomique méthylée (Ballestar *et al.*, 2003; Auriol *et al.*, 2005; Lopez-Serra *et al.*, 2006). Cette spécificité apparente semblait par ailleurs être conservée d'une lignée cellulaire à une autre (Ballestar *et al.*, 2003). Néanmoins, dans la mesure où nous n'avons immunoprécipité que les protéines MBD2, MBD1 et MeCP2, nous ne pouvons pas exclure la présence d'autres répresseurs à affinité pour l'ADN sur ces régions méthylées. Nous avons fait le choix de centrer notre analyse sur ces trois répresseurs à MBD dans la mesure où (i) MBD3 est un répresseur transcriptionnel mais est incapable de se lier directement à l'ADN méthylé, (ii) MBD4 a été jusqu'à maintenant principalement impliquée dans la réparation de l'ADN, et (iii) Kaiso est faiblement exprimée dans notre principal modèle cellulaire, HeLa (Prokhortchouk *et al.*, 2001).

3- MBD2, UN REPRESSEUR MAIS AUSSI UN MODULATEUR DE LA TRANSCRIPTION

3.1- MBD2 EXERCE UNE REPRESSION TRANSCRIPTIONNELLE DIRECTE, SPECIFIQUE ET DEPENDANTE DE LA METHYLATION SUR LES GENES *HTERT* ET *PS2* ENDOGENES

Un nombre important d'études s'est dernièrement accumulé concernant l'association entre la méthylation des promoteurs, la fixation des protéines à MBD et la répression transcriptionnelle (Bakker *et al.*, 2002; Lin *et al.*, 2003; Auriol *et al.*, 2005; Lopez-Serra *et al.*, 2008). Nos expériences de CHIP et de CHIP-on-chip ont montré une fixation spécifique de MBD2 aux promoteurs méthylés des gènes *hTERT* et *pS2*. De plus, différentes études ont décrit l'effet répresseur de ces régions promotrices méthylées sur la transcription de ces deux gènes (Martin *et al.*, 1997; Renaud *et al.*, 2007). Dans ce contexte, il était possible que MBD2 participe à la régulation négative de l'expression de ces deux gènes.

Plusieurs études ont montré que la répression transcriptionnelle pouvait être levée par l'appauvrissement en protéines à MBD induite par ARN interférence (RNAi) (Auriol *et al.*, 2005; Lopez-Serra *et al.*, 2008). Une analyse transcriptomique à grande échelle (microarray) a indiqué que 15% de 6386 gènes analysés subissent une augmentation de leur expression suite à la triple déplétion MeCP2, MBD1 et MBD2 (Lopez-Serra *et al.*, 2008). Il est par ailleurs à noter que

pour les simples invalidations par RNAi d'une protéine à MBD particulière, l'appauvrissement en protéine MBD2 est celle qui réactive le plus grand nombre de gènes (Lopez-Serra *et al.*, 2008). Ces données suggèrent que MBD2 joue un rôle important dans la répression transcriptionnelle méthylation-dépendante.

L'appauvrissement en MBD2 induite par RNAi stimule l'expression des gènes *hTERT* et *pS2* dans les cellules HeLa. Suite à la forte réduction en protéine MBD2, des stimulations d'environ 2 fois de l'expression du gène *hTERT* et d'environ 3 fois de l'expression du gène *pS2* ont été observées, suggérant un rôle important du répresseur MBD2 dans la régulation de ces gènes. En effet, dans les cellules humaines, l'induction de l'expression génique suite à un RNAi anti-MBD2 est du même ordre. Une stimulation de 2 fois de l'expression du gène *NBR2* a été observée suite à l'expression de siRNA *MBD2* (Auriol *et al.*, 2005), et une analyse par microarray de cellules appauvries en *MBD2* montre une moyenne de changement d'expression génique de l'ordre de 7 fois (Lopez-Serra *et al.*, 2008). De plus, les stimulations de l'expression génique observée dans les cellules de souris *Mbd2*^{-/-} sont du même ordre. Par exemple, une augmentation de 3 fois du niveau d'expression du *Xist* dans des fibroblastes *Mbd2*^{-/-} par rapport au cellules sauvages a été observée (Barr *et al.*, 2007).

Afin de vérifier si l'augmentation des gènes *hTERT* et *pS2* était bien la conséquence de la très faible présence en protéine MBD2 dans les cellules HeLa, et non à un effet indirect, nous avons dans un premier temps vérifié et confirmé que les profils de méthylation de la région régulatrice de ces deux gènes étaient inchangés dans les cellules HeLa traitées aux siRNA *MBD2*. Puis dans un second temps, nous avons réintroduit le répresseur MBD2 dans ces cellules. Ainsi les cellules HeLa n'exprimant plus MBD2 ont été transfectées par un vecteur d'expression codant un transcrit *Mbd2*, dont la complémentarité vis-à-vis des siRNA *MBD2* a été préalablement modifiée (Auriol *et al.*, 2005). L'expression transitoire de *Mbd2* dans les cellules HeLa appauvries en MBD2 conduit à une baisse des transcrits *hTERT* et *pS2* à un niveau proche de celui observé dans la lignée HeLa sauvage. Ces résultats démontrent donc un effet répresseur direct de cette protéine à MBD sur la transcription des gènes *hTERT* et *pS2*.

Dans les cellules HeLa sauvage, des expressions faibles des gènes *hTERT* et *pS2* sont détectées. Ces expressions ont été attribuées à la non-méthylation de certaines zones de leur région 5' régulatrice. Pour confirmer cette hypothèse, nous avons transitoirement surexprimé la protéine MBD2 en transfectant le vecteur d'expression codant les transcrits *Mbd2* résistants aux siRNA *MBD2* dans les cellules HeLa sauvage. Ces expériences n'ont pas entraîné de variations de

l'expression des gènes *hTERT* et *pS2*, suggérant que, dans les cellules HeLa, la concentration en protéine MBD2 ne semble pas être un facteur limitant. Dans ce contexte, MBD2 semble atténuer, limiter la stimulation de l'expression des gènes *hTERT* et *pS2* plutôt qu'exercer un rôle répresseur transcriptionnel strict.

En outre, la levée transcriptionnelle du gène *hTERT* due à la déplétion en MBD2 n'est pas restreinte aux cellules HeLa. En effet, cet effet a également été observé dans des cellules du cancer du sein, du foie et de neuroblastomes, toutes *hTERT*-méthylées télomérase-positives, indiquant que MBD2 serait un répresseur général du gène *hTERT*. Des expériences de RNAi dans des cellules présentant un îlot de CpG *hTERT* non-méthylé (cellules MRC5 et NCCIT) ou un promoteur *pS2* non-méthylé (cellules MCF7) n'induisent pas respectivement de changement d'expression des gènes *hTERT* et *pS2*, indiquant que MBD2 réprime spécifiquement et directement l'expression de ces deux gènes de manière méthylation dépendante.

Ainsi, la protéine MBD2 apparaît être un répresseur transcriptionnel spécifique des gènes *hTERT* et *pS2* méthylés dans les cellules cancéreuses. L'ensemble de ces données constitue donc une nouvelle preuve que MBD2 exerce, sur des séquences génomiques endogènes, une répression transcriptionnelle directe, spécifique et dépendante de la méthylation. Ces résultats montrent aussi que cette répression spécifique et directe peut être rendue réversible par inactivation de ce répresseur.

3.2- IMPACT DE L'ABSENCE PROLONGEE DU REPRESSEUR MBD2 SUR LES PROFILS DE METHYLATION DE L'ADN ET DE COMPACTION DE LA CHROMATINE

Une cinétique de l'effet de cette diminution du taux de protéine MBD2 sur la transcription des gènes *hTERT* et *pS2* a été réalisée (résultats non montrés pour le gène *pS2*). Les résultats montrent qu'une diminution importante des transcrits *MBD2* est observée dès 24h après transfection des siRNA *MBD2* et ce jusqu'à 96h. En parallèle, une élévation significative des taux de transcrits *hTERT* et *pS2* est induite dès 48h après transfection des siRNA *MBD2* dans les cellules HeLa. Cette hausse des transcrits augmente au cours du temps pour atteindre un maximum de stimulation dans les cellules HeLa à 72h-96h après traitement aux siRNA *MBD2* en comparaison aux cellules HeLa témoins. Dès lors, il semble que la ré-expression d'un gène suite à l'inactivation d'un répresseur à MBD peut être un processus relativement rapide. Toutefois, le décalage de 48h à 72h, soit d'environ de 2 à 3 générations, observée entre l'effet des siRNA *MBD2* sur le niveau de transcrits *MBD2* et

leur effet sur le taux de transcrits *hTERT* et *pS2* pourrait s'expliquer par le temps nécessaire à la structure chromatinienne pour s'adapter à ce nouvel environnement dépourvu en protéine MBD2. En effet, les protéines liant les histones et l'ADN permettent le maintien des nucléosomes en leur position (Vermaak *et al.*, 2003). Toutefois, comme le suggère nos données, l'absence de MBD2, n'aurait pas un impact immédiat sur la structure nucléosomique. Le répresseur MBD2 initie la répression transcriptionnelle au niveau de séquences méthylées *via* le recrutement de complexes enzymatiques de compaction de la chromatine. En l'absence de ce répresseur, ces complexes ne doivent donc plus être recrutés. Néanmoins, il semblerait que les marques chromatiniennes de compaction et de répression, engendrées par de tels complexes, seraient perdues passivement au cours des divisions cellulaires et non activement.

Cependant, les stimulations de l'expression du gène *hTERT* induites par interférence à l'ARN transitoire et constitutive sont similaires, suggérant qu'un certain statut de compaction de la chromatine tout comme le statut de méthylation de l'ADN de l'îlot de CpG du gène *hTERT* serait maintenu et entretenu malgré l'absence prolongée en protéine MBD2. Dans les clones cellulaires stables HeLa n'exprimant plus MBD2, la stimulation de l'expression du gène *pS2* est plus forte que dans les cellules HeLa traitées transitoirement par un siRNA *MBD2*, stimulation d'un facteur 6 contre 3. Ce résultat peut s'expliquer par l'entière déméthylation de la région 5' régulatrice du gène *pS2*, dans les clones cellulaires stables HeLa n'exprimant plus MBD2 (comme nous l'avons vu dans le paragraphe 2 de cette discussion). Cette stimulation est donc le résultat de l'effet combinatoire de l'absence de répresseur MBD2 et de la déméthylation. Dans les cellules HeLa n'exprimant plus MBD2 de façon stable, le profil de méthylation de la région 5' régulatrice du gène *pS2* n'est donc pas conservé. Comme nous l'avons dit précédemment, ceci peut être dû soit à la dérive clonale, soit à l'absence prolongée en protéine MBD2. Si cette dernière hypothèse est la cause de la déméthylation de la région 5' régulatrice du gène *pS2*, ces résultats suggèrent que le statut de méthylation de l'ADN serait maintenu et entretenu seulement pour certaines régions, attestant soit de l'importance pour ces régions à être réprimées, soit que les marques répressives de certaines régions sont plus facilement perdues que d'autres. En effet, le gène *pS2* possède une région régulatrice pauvre en CpG partiellement méthylée alors que la région régulatrice du gène *hTERT* est incluse dans un îlot de CpG, donc riche en CpG, et globalement méthylée. Ces données peuvent donc laisser penser qu'une méthylation de l'ADN plus dense est plus difficilement effaçable. Les résultats publiés par l'équipe du Dr Schübeler en 2007 montrent que les promoteurs peuvent être répertoriés en 3 classes suivant leur densité en CpG : les promoteurs pauvres en CpG, les promoteurs riches en CpG et les promoteurs avec une densité de CpG intermédiaire (Weber *et al.*,

2007). Mais une des informations intéressante de cette publication est que c'est cette dernière classe de promoteurs dits « CpG intermédiaires » qui subit le plus facilement des changements de statut de méthylation. Le promoteur *pS2* est un promoteur CpG intermédiaire. En outre, des résultats obtenus au sein de notre équipe mais non publiés ont montré que certains gènes se reméthylaient plus rapidement que d'autres après un traitement des cellules HeLa à la 5azadC. En effet, le profil de méthylation de l'îlot de CpG du locus *BRCAl/NBR2* effacé par un traitement à la 5azadC est rétabli après 3 à 4 générations alors que celui de l'îlot de CpG du gène *p16* met 3 fois plus de temps à se reméthyliser, suggérant ici aussi l'importance de certains profils de méthylation par rapport à d'autres. Ainsi, la préservation du profil de méthylation de l'îlot de CpG du gène *hTERT* et la déméthylation de la région 5' régulatrice du gène *pS2* dans les cellules HeLa n'exprimant plus MBD2 de façon stable pourraient être le résultat de l'importance du profil de méthylation du gène *hTERT* par rapport à celui du gène *pS2* et/ou la conséquence de leur appartenance à deux différentes classes de promoteurs.

3.3- LA FORCE DE REPRESSION DE MBD2 DEPEND DE LA DENSITE EN CPG

La densité de méthylation apparaît donc être un paramètre important dans la répression transcriptionnelle. Cette hypothèse semble par ailleurs être appuyée par les expériences de RNAi spécifique des transcrits *MBD2* réalisées dans les cellules MDA MB231 possédant une région 5' régulatrice *pS2* entièrement méthylée. En effet, dans ces cellules l'invalidation transitoire de *MBD2*, même très prolongée (3 traitements successifs de 72h, résultats non montrés), ne conduit pas à la ré-expression du gène *pS2*, suggérant que la méthylation totale de la région 5' régulatrice du gène *pS2* induit des changements chromatinien importants qui préviennent de toute stimulation. Dans les cellules HeLa, l'absence de méthylation d'une partie de sa région régulatrice non-méthylée, celle contenant l'ERE, permettrait au gène *pS2* de répondre à la déplétion transitoire de MBD2. Le gène *hTERT* possède également une petite région dans son promoteur minimal non méthylée et non compactée au niveau chromatinien, qui lui permettrait tout comme au gène *pS2* de répondre plus facilement à l'appauvrissement transitoire en protéine MBD2. La non-méthylation de certaines zones de la région régulatrice pourrait donc « préparer » la transcription des gènes *hTERT* et *pS2*. Des expériences utilisant différents plasmides méthylés *in vitro* ont en effet montré que la densité en CpG méthylés mais aussi la force de certaines régions régulatrices modulent la répression transcriptionnelle induite par le complexe MeCP1 contenant MBD2 (Boyes and Bird, 1992). Dans ce contexte, MBD2 semblerait alors avoir plus un rôle de facteur limitant, modulateur, plutôt qu'un répresseur transcriptionnel strict. En outre, l'injection dans des ovocytes de *Xenopus laevis* de

plasmides régionalement méthylés a montré que la méthylation de peu de cytosines peut mener à l'inhibition d'un promoteur mais qu'il existe un seuil de sites modifiés requis pour qu'une structure chromatinienne compactée stable s'organise et se répande (Curradi *et al.*, 2002). De ces données, les auteurs ont proposé une structure chromatinienne spécialisée. Cette conformation chromatinienne spécifique serait composée de non seulement de protéines à MBD mais serait également porteuse d'activité de remodelage de la chromatine. Nos données seraient donc en accord avec cette littérature, expliquant pourquoi le gène *pS2* n'est pas ré-exprimé dans les cellules MDA MB231 suite à l'inactivation transitoire de *MBD2* et pourquoi la structure chromatinienne de la région régulatrice *hTERT* semble être préservée en dépit d'une absence prolongée en *MBD2*.

4- ACTIONS ANTAGONISTES ENTRE UN REPRESSEUR A MBD, LA PROTEINE MBD2, ET UN ACTIVATEUR, LE RE α

L'analyse de l'activité transcriptionnelle de plasmides régionalement méthylés micro-injectés dans des ovocytes de *Xenopus* a par ailleurs suggéré une compétition entre les trans-activateurs et les protéines à MBD pour l'établissement d'une conformation chromatinienne « ouverte ». L'ensemble de ces dernières données laissait donc supposer des interactions ou des interférences entre la densité en CpG méthylés, les protéines à MBD et les trans-activateurs.

Le gène *pS2*, dont l'expression dépend de la densité de méthylation de sa région 5' régulatrice, de la présence du répresseur MBD2 et de son trans-activateur naturel RE α , apparaissait donc être un modèle idéal pour étudier ces inter-relations. Dans ce but, nous avons utilisé trois lignées cellulaires possédant différents profils de méthylation de la région 5' régulatrice de ce gène : non-méthylé, pour les cellules MCF7 ; partiellement méthylé pour les cellules HeLa ; et totalement méthylé, pour les cellules MDA MB231.

4.1- LA METHYLATION DE L'ADN INHIBE INDIRECTEMENT L'ASSOCIATION DES RE α A LEUR SEQUENCE CIBLE, LES ERE

Nous avons donc pu montrer que contrairement au répresseur MBD2 dont la fixation corrèle parfaitement avec la méthylation, le RE α ne s'associe à l'ERE uniquement quand il est non-méthylé mais indépendamment du statut de méthylation de la boîte TATA. En effet, le même taux de RE α est observé sur l'ERE des cellules MCF7 possédant une région 5' régulatrice du gène *pS2*

entièrement non-méthylée que sur l'ERE des cellules HeLa exprimant transitoirement les RE α et possédant la région contenant la boîte TATA du gène *pS2* méthylée. Au contraire, l'expression transitoire des RE α dans les cellules MDA MB231 possédant une région 5' régulatrice du gène *pS2* entièrement méthylée n'entraîne pas leur fixation sur l'ERE, suggérant que la méthylation de l'ERE inhibe la fixation des RE α . Bien qu'un effet direct de la méthylation sur la fixation de se trans-activateur ne puisse être exclu, notre équipe avait précédemment montré, par des expériences de gel retard, que la migration d'oligonucléotides méthylés contenant l'ERE du gène *pS2* pouvait être efficacement retardée par les RE α (Martin *et al.*, 1997). Des expériences *in vivo* ont également suggéré un effet indirect de la méthylation de l'ADN. En effet, les sites hypersensibles à la DNase I apparaissent être identiques entre des cellules HE5, dérivées de clones cellulaires stables MDA MB231 exprimant ectopiquement les RE α mais n'exprimant pas le gène *pS2*, et des cellules sauvages MDA MB231 ; alors que des cellules MCF7 exprimant les RE α et *pS2* endogènes présentent les sites hormono-dépendants hypersensibles à la DNase I (Giamarchi *et al.*, 1999). Ces données suggèrent donc qu'une conformation chromatinienne compacte associée à la méthylation de l'ADN préviendrait de la fixation des RE α mais également que la méthylation de la région contenant la boîte TATA du gène *pS2* dans les cellules HeLa n'entraînerait pas une diffusion de la structure chromatinienne « fermée » jusqu'à la région contenant l'ERE.

4.2- LE TRANS-ACTIVATEUR RE α CO-EXISTE SUR LA REGION 5' REGULATRICE *pS2* AVEC LE REPRESSEUR METHYLATION DEPENDANT MBD2 POUR PALLIER PARTIELLEMENT SON EFFET INHIBITEUR

Comme le laissaient pressentir les analyses des profils de méthylation et de fixation des RE α , l'expression ectopique des RE α dans les cellules MDA MB231 ne stimule pas l'expression du gène *pS2*. Dans les cellules HeLa, l'induction du gène *pS2* par les RE α a été observée, suggérant que la déméthylation de la région contenant l'ERE est un pré-requis par la stimulation œstrogène-dépendante du gène *pS2*. Néanmoins, ce niveau de transcrite *pS2* reste faible en comparaison à celui observée dans les cellules MCF7 traitées à l'œstradiol. Cette étude indique donc que l'expression des RE α peut au moins partiellement pallier l'effet inhibiteur de la protéine MBD2, lorsqu'ils lient l'ERE du gène *pS2*, sans affecter le statut de méthylation de son promoteur et l'association de MBD2 à cette région. Ainsi, la fixation du répresseur MBD2 à la région méthylée contenant la boîte TATA du gène *pS2* réduit mais n'abolit pas la réponse de *pS2* aux RE α .

La carte de fixation du répresseur MBD2 sur le gène *pS2* donnée par les expériences de CHIP-on-chip montre que la liaison de MBD2 couvre la région en aval du site d'initiation de la transcription. L'analyse de la région 5' du gène codant le récepteur à l'endothéline B indique que la méthylation intragénique est sans effet sur l'expression du gène (Pao *et al.*, 2001). En revanche, d'autres études, utilisant des séquences exogènes transfectées ou des transgènes méthylés, démontrent une influence de la méthylation en aval du site d'initiation de transcription sur le contrôle de la régulation (Hsieh and Lieber, 1992; Kass *et al.*, 1993; Lorincz *et al.*, 2004). Ces profils de méthylation sont également associés à la compaction de la chromatine et conduirait à l'inhibition de l'élongation de la transcription par l'ARN polymérase II (Lorincz *et al.*, 2004). Dès lors, nous ne pouvons exclure l'impact de la liaison de MBD2 à la région intragénique du gène *pS2* sur l'efficacité de l'élongation de la transcription de ce gène. Toutefois, des modifications post-traductionnelles des histones H3 de décompaction de la chromatine (acétylation et déméthylation) ont été identifiées au niveau de la région promotrice du gène *pS2*, quand l'expression de gène est stimulée par l'expression des RE α et/ou l'inhibition de la synthèse en protéines MBD2, indiquant l'influence de l'absence de MBD2 sur la conformation chromatinienne de la région promotrice du gène *pS2* et suggérant l'impact de MBD2 sur l'initiation de la transcription.

Récemment, des phénomènes cycliques de méthylation/déméthylation, associés à des cycles de fixation de répresseurs/activateurs de la transcription, ont été décrits au niveau de la région contenant l'ERE du gène *pS2* dans des cellules humaines synchronisées présentant une région 5' *pS2* non-méthylée (Metivier *et al.*, 2004; Metivier *et al.*, 2008; Kangaspeska *et al.*, 2008). Bien que les mécanismes de maintenance de la méthylation de l'ADN commencent à être bien décrits, il est aussi important de considérer les mécanismes capable d'enlever cette marque pour parfaitement comprendre les dynamiques de méthylation, comme le suggèrent ces études (Metivier *et al.*, 2008; Kangaspeska *et al.*, 2008). Néanmoins, comme nous l'avons vu dans le paragraphe 3.4.3 du chapitre 1 de l'introduction, ces mécanismes et ces activités déméthylantes sont controversées (Ooi and Bestor, 2008).

La répression initiée par les protéines à MBD peut être levée par divers mécanismes. Chez la souris et le rat, *Mecp2* est directement impliquée dans la répression du gène *Bdnf* dépendante de la dépolarisation des neurones (Martinowich *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2003). Cette protéine, associée au co-répresseur Sin3a, lie la région méthylée pauvre en CpG des promoteurs *Bdnf*. Sous l'influx calcique induit par la dépolarisation, *Mecp2* est phosphorylée, entraînant sa subséquente dissociation au promoteur *Bdnf* dont la transcription devient alors active. Cependant jusqu'à présent

qu'une seule équipe avait étudié les relations entre un répresseur à MBD et un activateur. Cette étude montre que dans les cellules T naïves, la surexpression du facteur de transcription GATA-3, normalement requis pour l'expression du gène *Il4*, délocalise la protéine MBD2 du promoteur *Il4* et active la transcription de ce gène (Hutchins *et al.*, 2002). Dans notre étude, au contraire, nous montrons que la surexpression des RE α et leur fixation sur l'ERE du gène *pS2* conduit à la levée partielle de la répression initiée par la protéine MBD2 sans entraîner la dissociation de ce répresseur au promoteur. En effet, dans le modèle étudié, les quantités en « promoteur *pS2* » immunoprécipitées par CHIP ne sont pas affectées par la liaison des RE α à l'ERE. De plus, les expériences de CHIP re-CHIP ont montré que la région régulatrice *pS2* pouvait être simultanément fixée par les protéines RE α et MBD2. En outre, l'effet synergique de la concomitante expression ectopique des RE α et de l'inactivation par RNAi de *MBD2* sur l'expression du gène *pS2* suggère aussi que les protéines RE α et MBD2 n'entrent pas en compétition pour leur fixation sur la région régulatrice *pS2*. L'ensemble de ces résultats démontre pour la première fois de la co-existence d'un activateur et d'un répresseur sur une même région régulatrice. Différents mécanismes d'actions antagonistes entre les activateurs et les répresseurs transcriptionnels existent donc.

5- LA PROTEINE MBD2 POSSEDE TOUTES LES CARACTERISTIQUES D'UN REPRESSEUR METHYLATION-DEPENDANT

Au cours des études gènes candidats, nous avons pu identifier MBD2 en tant que régulateur négatif des gènes *hTERT* et *pS2*, et caractériser son rôle. L'association de ce répresseur aux promoteurs hyperméthylés dans les cancers avait déjà été largement constatée (Nguyen *et al.*, 2001; Bakker *et al.*, 2002; Koizume *et al.*, 2002; Ballestar *et al.*, 2003; Lin *et al.*, 2003; Kondo *et al.*, 2005; Auriol *et al.*, 2005; Lopez-Serra *et al.*, 2006). En outre, dans des cellules fibroblastiques issues de queues de souris invalidées pour le gène *Mbd2*, l'étude de l'expression de vecteurs méthylés transfectés montre qu'ils sont inefficacement réprimés. En revanche, la réalisation de ces mêmes expériences dans des cellules fibroblastiques issues de queues de souris invalidées pour le gène *Mecp2*, montrent que la répression des vecteurs méthylés transfectés n'est pas affectée par l'absence du répresseur *Mecp2* (Guy *et al.*, 2001). Ces résultats suggèrent donc l'importance de MBD2 par rapport à MeCP2 dans la répression transcriptionnelle méthylation-dépendante. De plus, une étude réalisée par l'équipe du Dr Esteller, en collaboration avec notre équipe, a montré que MBD2 serait de loin le répresseur méthylation-dépendant réprimant le plus grand nombre de gènes (~900 gènes sur 967) dans les cancers (Lopez-Serra *et al.*, 2008). Toutefois, ces résultats sont issus

d'études réalisées sur un nombre restreint de gènes majoritairement à îlot de CpG. Il apparaît donc intéressant d'élargir l'analyse des profils de fixations de la protéine MBD2 à l'ensemble des promoteurs du génome afin de vérifier si cette protéine est réellement un répresseur méthylation-dépendant important. Pour ce faire, nous avons mis au point une technique de ChIP-on-chip et de MeDP-on-chip pour respectivement analyser la distribution de fixation de MBD2 et de l'ARN polymérase II et la distribution de la méthylation sur les 25,500 promoteurs du génome. Le croisement de ces résultats nous a permis de superposer les profils de fixation de MBD2 au profil de méthylation des promoteurs et de les corrélés à l'expression ou à la répression des gènes.

5.1- LA REGION DE -700 PB A +200 PB AUTOUR DU SITE D'INITIATION DE LA TRANSCRIPTION SEMBLE IMPORTANTE POUR LA REGULATION DE L'EXPRESSION GENIQUE

La majorité des signaux d'association de la protéine MBD2, d'absence en ARN polymérase II et de la méthylation se superpose entre -700 pb et +200 pb, suggérant que cette région autour du site d'initiation de la transcription est importante pour la régulation de l'expression génique. Nous avons donc choisi cette région pour nos analyses. Par ailleurs, cet intervalle d'analyse a également été utilisé par une autre équipe étudiant la distribution de la méthylation et son impact sur l'expression génique (Weber *et al.*, 2007). Néanmoins, nous ne pouvons exclure que d'autres régions importantes pour la région génique existent dans la mesure où sont représentées sur la puce à promoteur seulement les zones 5' régulatrices comprises en -7,5 kb et +2,5 kb.

5.2- ETAT DE METHYLATION DES PROMOTEURS A ILOT DE CpG VERSUS NON A ILOT DE CpG

L'utilisation d'une protéine recombinante contenant 4 domaines MBD (4xMBD) pour immunoprécipiter l'ADN méthylé apparaît être un outil très intéressant (Jorgensen *et al.*, 2006). Contrairement aux anticorps anti-méthylcytosine, la protéine 4xMBD reconnaît les cibles *in vivo* de la méthylation de l'ADN dans les cellules somatiques. En effet, l'anticorps anti-méthylcytosine reconnaît uniquement les cytosines méthylées sur de l'ADN simple brin. La protéine recombinante 4xMBD est elle capable d'immunoprécipiter de l'ADN méthylé double brin. De plus, d'après nos résultats, cette protéine immunoprécipite avec une même efficacité des séquences riches ou pauvres en CpG méthylés. Néanmoins, une limite à l'utilisation de cette protéine dans les expériences de MeDP-on-chip serait que cette protéine immunoprécipite spécifiquement l'ADN méthylé mais qu'elle ne permet pas de déterminer le nombre de CpG méthylés au sein de ce fragment

63% des promoteurs apparaissent être méthylés et 77% des îlots de CpG contre 55,5% des promoteurs non à îlots de CpG sont méthylés, confirmant un fort taux de méthylation au niveau des îlots de CpG dans les cellules cancéreuses. Il est toutefois à noter que lorsque nous avons recherché l'appartenance des promoteurs à un îlot de CpG grâce à la base de données d'îlot de CpG de UCSC Genome Browser (<http://genome.ucsc.edu/>), nous avons trouvé que 34% des promoteurs sont inclus dans un îlot de CpG. Ce pourcentage peut paraître faible par rapport à certaines données de la littérature qui estiment à ~60% le nombre de gènes associés à un îlot de CpG (Antequera and Bird, 1993; Heisler *et al.*, 2005). Toutefois, une revue récente faisant le point sur la connaissance des îlots de CpG décrit que beaucoup d'îlots de CpG se situent loin du site d'initiation de la transcription (Illingworth and Bird, 2009), expliquant la différence de pourcentage de promoteurs inclus dans un îlot de CpG entre les différentes études.

Notre analyse montre un pic de méthylation de l'ADN entre -700 pb et +200pb. Toutefois, l'équipe du Dr Beck a publié en 2006 que cette région est globalement moins méthylée que le reste du génome sur les chromosomes 6, 20 et 22 (Eckhardt *et al.*, 2006). En effet, si nous normalisons le pourcentage de sondes méthylées par rapport à leur densité en CpG nous observons le même résultat. Ces résultats suggèrent que les régions comprises entre -700 pb et + 200 pb sont des régions plus riches que le reste du génome en CpG, cibles de la méthylation de l'ADN. Ces données suggèrent encore l'importance de cette zone dans la régulation de l'expression génique *via* la méthylation de l'ADN.

5.3- LA METHYLATION DE L'ADN INHIBE LA TRANSCRIPTION ET CE EN GRANDE PARTIE VIA MBD2

La méthylation des promoteurs est associée à 71% à l'absence d'ARN polymérase II. Il n'y a donc dans ce cas pas de transcription des gènes. Ainsi, dans la majorité des cas, les gènes restent silencieux lorsque leur région promotrice est méthylée. Ces résultats confirment donc l'implication de la méthylation de l'ADN dans la répression transcriptionnelle.

Nous avons ensuite regardé les relations existantes entre la méthylation de l'ADN et la fixation de MBD2. Il ressort que MBD2 se fixe préférentiellement aux promoteurs méthylés. En effet, 74% des promoteurs fixés par MBD2 sont méthylés. Néanmoins, environ un quart (26%) des sites de fixation de MBD2 sont non-méthylés. La première hypothèse pour expliquer ce résultat est que nous ne détectons pas toutes les régions méthylées, la seconde est que MBD2 pourrait se trouver

fixée à certaines régions non-méthylées par son interaction à d'autres protéines. En effet, l'équipe du Dr Nakajima a montré en 2003 que MBD2a par l'intermédiaire de son interaction avec l'ARN hélicase A du complexe CREB pouvait être fixée à des éléments de réponse à l'AMPc (site CRE) non-méthylés (Fujita *et al.*, 2003a). Dans cette étude, la fixation du complexe MBD2a/ARN hélicase A aux sites CRE non méthylés est associée à une activation transcriptionnelle. Dans notre étude, nous voyons que seulement 4,3% des promoteurs sont non-méthylés, liés par MBD2 et également fixés par l'ARN polymérase II, donc potentiellement exprimés. Ces données suggèrent que l'implication de MBD2 dans l'activation transcriptionnelle de promoteurs non-méthylés n'est pas le rôle majeur de MBD2. En outre, seulement 8,3 % des promoteurs apparaissent méthylés, fixés par MBD2 et l'ARN polymérase II, évaluant ainsi à ~13% le nombre total de promoteurs liés par MBD2 et potentiellement actifs. De plus, ce pourcentage est sûrement sur-évalué dans la mesure où la présence d'ARN polymérase II sur un promoteur n'est pas toujours associée à l'activité du promoteur (Sandelin *et al.*, 2007). En définitive, le rôle activateur de la protéine MBD2 est largement minoritaire.

En revanche, 70% des promoteurs méthylés et fixés par MBD2, ne sont pas associés à l'ARN polymérase II, donc non exprimés. Ces résultats confirment donc que MBD2 est principalement un répresseur transcriptionnel méthylation-dépendant. Il était important de confirmer le rôle de MBD2 dans la mesure où un nombre de plus en plus important d'études décrit MBD2 comme un activateur de la transcription (Fujita *et al.*, 2003a; Ego *et al.*, 2005; Angrisano *et al.*, 2006; Wischnewski *et al.*, 2007) et que la carte de liaison de MeCP2 récemment établie dans des neurones a montré que 63% des sites MeCP2 sont des promoteurs actifs, remettant en cause le rôle primaire de répresseur transcriptionnel attribué à MeCP2 (Yasui *et al.*, 2007).

41,6% des promoteurs non fixés par l'ARN polymérase II, donc non exprimés, sont méthylés et liés à MBD2, suggérant que MBD2 *via* la méthylation de l'ADN est impliquée dans un vaste processus de répression transcriptionnelle. En outre, parmi les promoteurs méthylés et silencieux, 40,6% sont liés par MBD2, démontrant une grande importance de cette protéine dans la répression transcriptionnelle méthylation-dépendante. En effet, d'après ces résultats seulement 59,4% de la répression transcriptionnelle engendrée par la méthylation de l'ADN serait à se partager entre les mécanismes impliquant les trois autres membres de la famille des protéines à MBD, MBD1, MBD4 et MeCP2, mais aussi avec les mécanismes impliquant d'autres MBP et les mécanismes impliquant directement la méthylation de l'ADN. MBD2, à elle seule, serait ainsi à l'origine de presque la moitié des mécanismes de répression transcriptionnelle engendrés par la méthylation de l'ADN.

Toutefois, seulement 18% des régions promotrices du génome apparaissent être MBD2 positives, méthylées et ARN polymérase II négatives, suggérant que l'inhibition de MBD2, dans une visée thérapeutique anti-cancéreuse, n'entraînerait pas une réactivation génique massive mais seulement une réactivation d'une partie du génome. L'analyse des transcriptomes des tissus gastriques de souris *Mbd2*^{-/-} par rapport à ceux de souris sauvages, a montré une réactivation de seulement ~3 à 4% des gènes (Berger *et al.*, 2007). Ce même pourcentage de gènes surexprimés en absence de MBD2 a également été observé par notre équipe dans des cellules humaines fibroblastiques embryonnaires normales de poumon, les cellules MRC5, traitées transitoirement par des ARN interférents dirigés contre les transcrits *MBD2* (Perriaud *et al.*, en préparation). La différence du nombre de gènes surexprimés en absence de MBD2 par rapport au nombre de gènes MBD2 positif, méthylé et silencieux pourrait s'expliquer par une certaine redondance entre les mécanismes de répression méthylation-dépendant pour certains loci. Ainsi, l'ensemble des données suggère que MBD2 participe à une régulation spécifique de certains gènes mais qu'une collaboration entre les acteurs des mécanismes de répression méthylation-dépendant existe également pour une régulation globale de la transcription.

5.4- LA REPRESSION GENIQUE VIA MBD2 N'EST PAS SPECIFIQUE DES GENES A ILOTS DE CpG

Dans la mesure où nous avons décrit une spécificité de liaison et de répression du répresseur MBD2 pour un promoteur riche en CpG, *hTERT*, et un promoteur pauvre en CpG, *pS2*, nous avons voulu connaître la répartition de MBD2 sur ces différents promoteurs. Comme le montrent, les résultats de notre analyse globale, MBD2 ne possède pas plus d'affinité pour les promoteurs riches en CpG que pour les promoteurs pauvres en CpG et inversement. L'analyse de la répression des gènes à îlot de CpG hyperméthylés apparaît donc être tout aussi importante que l'analyse de la répression des gènes à promoteur méthylé pauvre en CpG dans les cellules cancéreuses. Dans les cellules saines, les promoteurs à îlots de CpG ne sont pas les cibles préférentielles de MBD2 car ces régions sont majoritairement non-méthylées. Il serait donc intéressant de suivre la redistribution des profils de fixation de MBD2 associée à la redistribution de la méthylation au cours de la cancérogénèse. Notre équipe est en ce moment en train d'analyser ce processus dans un modèle de progression tumorale mammaire établi au sein de l'unité U590 (Morel *et al.*, 2008) et équivalent à celui créé par l'équipe Dr Weinberg (Elenbaas *et al.*, 2001).

5.5- MBD2 EST TRES MAJORITAIREMENT ASSOCIEES AUX PROMOTEURS METHYLES ET SILENCIEUX

En outre, lors de nos deux études gènes candidats, nous avons mis en évidence un rôle de MBD2 dans la modulation, en plus de son rôle dans la répression stricte, de l'expression de gènes endogènes méthylés. Dans notre étude globale, seulement ~8% des gènes possèdent un promoteur méthylé et fixé par MBD2 mais associé à l'ARN polymérase II, donc potentiellement actif. Cette donnée suggère que le rôle de MBD2 en tant que modulateur de la répression génique est minoritaire par rapport à son rôle de répresseur strict. Toutefois, cette hypothèse serait à vérifier car, comme nous l'avons évoqué précédemment, la présence d'ARN polymérase II sur un promoteur n'est pas systématiquement associée à l'activité du promoteur (Sandelin *et al.*, 2007).

5.6- IDENTIFICATION DE NOUVEAUX GENES CIBLES DU REPRESSEUR MBD2 DANS LES CELLULES CANCEREUSES

L'analyse de la distribution de MBD2 sur les promoteurs du génome nous a également permis d'identifier de nouvelles cibles de ce répresseur dans les cellules cancéreuses HeLa. Les résultats ont montré que MBD2 est un répresseur lié à certaines familles de gènes suppresseurs de tumeurs dont en particulier les gènes codant les récepteurs à dépendance. Ces récepteurs gouvernent une double signalisation : ils traduisent un signal de prolifération ou de différenciation en présence de leur ligand respectif, alors qu'en leur absence, ils sont loin d'être inactifs puisqu'ils transduisent un signal de mort cellulaire (Mehlen and Thibert, 2004). De tels récepteurs généreraient ainsi un état de dépendance de la cellule vis-à-vis de son ligand, la perte de relation récepteur-ligand conduisant au suicide de la cellule. Ces récepteurs à dépendance apparaissent comme de nouveaux types de suppresseurs de tumeurs (Bernet and Mehlen, 2007a). Leur fonction de suppresseurs de tumeurs passe par une limitation, *via* l'induction de l'apoptose, de l'échappement de cellules tumorales se développant en dehors du champ d'accessibilité du ligand. Récemment, l'inactivation par hyperméthylation d'un de ces récepteurs, UNC5C, a été démontrée dans les cancers colorectaux (Bernet *et al.*, 2007b). La perte d'expression de ce récepteur assurerait un avantage sélectif pour la progression tumorale. UNC5C fait partie des récepteurs à dépendance trouvés fixés par MBD2 en « ChIP-on-chip ». De plus, 11 gènes codant les récepteurs à dépendance et leurs ligands sur 14 ont été trouvés fixés par MBD2, suggérant que ce répresseur pourrait être un régulateur du pouvoir métastatique d'une tumeur.



CONCLUSIONS & PERSPECTIVES

CONCLUSIONS & PERSPECTIVES

En définitif, l'étude de la spécificité des protéines à MBD nous a permis de **démontrer une réelle spécificité de cible du répresseur MBD2 pour les loci *hTERT* et *pS2/TFF1***. Ce travail a par conséquent apporté des éléments de réponse concernant les mécanismes épigénétiques qui contrôlent l'expression du gène *hTERT* et *pS2* dans les cellules cancéreuses. Ces éléments sont importants lorsque l'on sait que :

(i) l'expression du gène *hTERT* est un pré-requis pour l'immortalisation cellulaire. Un nombre considérable de facteurs de transcription a été proposé comme régulateur négatif de la transcription du gène *hTERT*. Néanmoins, des évidences directes indiquant que la transcription du gène *hTERT* est inhibée restaient à être fermement établies. Ainsi, MBD2 représenterait un nouveau facteur directement impliqué dans la régulation négative de l'expression du gène *hTERT*. Dans les cellules cancéreuses, MBD2 semble jouer un rôle spécifique en se liant d'une part à l'îlot de CpG hyperméthylé du gène *hTERT* et d'autre part en établissant un lien direct entre l'altération de la méthylation de l'ADN des cellules tumorales et la réduction du taux de transcription du gène *hTERT*. La liaison de MBD2 représente un contrôle supplémentaire à l'expression du gène *hTERT*, dès lors surlignant l'importance de la régulation du gène *hTERT* dans les cellules immortalisées et cancéreuses.

(ii) *pS2* est un gène œstrogène-dépendant, dont l'expression dans les cancers du sein permet de mesurer la réceptivité des tumeurs à un traitement hormonal. Il serait par ailleurs un gène suppresseur de tumeurs gastrique spécifique.

Il serait à présent intéressant d'étudier le ou les mécanisme(s) à l'origine de la spécificité de MBD2 pour les promoteurs méthylés *hTERT* et *pS2*. Cette spécificité, ne dépendant pas des concentrations intracellulaires relatives en protéines à MBD, pourrait être de deux types : soit cette protéine a une affinité particulière pour certaines séquences de ces promoteurs, soit elle est ciblée sur cette portion par interaction avec des facteurs ayant une telle affinité. La première hypothèse paraît peu plausible. En effet, aucune spécificité de séquence n'a été à ce jour mise en évidence pour le répresseur MBD2. De plus, la présence de la protéine MBD2 sur les 2,6 Kb de l'îlot de CpG du gène *hTERT* et non sur un site spécifique tend à aller à l'encontre d'une préférence de séquences

de ce répresseur. Néanmoins, il serait tout de même intéressant de comparer toutes les séquences cibles de MBD2 trouvées par l'approche de ChIP-on-chip car MBD2 pourrait posséder une spécificité pour une ou des séquences cibles et se répandre ensuite sur toute une région méthylée à partir de ce site. Une autre possibilité pour expliquer la spécificité de MBD2 pour certains loci est l'implication de partenaires nucléiques possédant eux une spécificité de séquence dans le recrutement de MBD2 sur des sites spécifiques. La comparaison de l'ensemble des séquences fixées par MBD2 mises en évidence par ChIP-on-chip pourrait également nous renseigner sur les potentiels partenaires de MBD2 spécifiques de séquences. De tels partenaires pourraient soit recruter MBD2, soit stabiliser sa fixation, au niveau de cibles spécifiques. Ce type de coopération entre répresseurs à MBD pour une fixation sur de vastes portions de génome a déjà été suggéré par d'autres auteurs (van, V *et al.*, 2000; Stirzaker *et al.*, 2004; Di *et al.*, 2004).

Par ailleurs, nous avons élargi l'analyse des profils de fixation de MBD2 aux promoteurs du génome par une approche globale de ChIP-on-chip afin d'identifier l'ensemble des cibles de ce répresseur. Cependant, pour vérifier si la fixation de MBD2 sur toutes ses cibles est spécifique, des expériences de ChIP-on-chip MeCP2 et MBD1, afin de comparer les sites de fixation de ces trois principaux répresseurs méthylation-dépendant, pourraient être réalisées.

Les études gènes candidats, nous ont par ailleurs permis d'**explorer de nouveaux mécanismes de régulation de l'expression génique par les protéines à MBD**. En effet, les études portant sur la régulation des gènes *hTERT* et *pS2* ont permis de mettre en évidence un **nouveau rôle des protéines à MBD en tant que modulateurs** et non pas de répresseurs stricts de l'expression génique. De plus, l'étude de la régulation transcriptionnelle du gène *pS2* par le répresseur MBD2 a permis d'**analyser les actions antagonistes entre un répresseur à MBD, la protéine MBD2, et un activateur, le RE α** . Une seule étude avait jusqu'à présent étudié les relations entre un répresseur à MBD et un activateur (Hutchins *et al.*, 2002).

Sachant que 50% des tumeurs mammaires sont RE positives mais qu'environ 40% de ces tumeurs ne répondent pas aux hormono-thérapies, il semblerait donc important de continuer l'analyse des relations antagonistes entre le répresseur MBD2 et les RE α . Nous avons montré que la surexpression des RE α et leur fixation sur le promoteur *pS2* n'entraînent pas la dissociation de la protéine MBD2 à ce dernier. Pour savoir si cette observation peut être généralisée à d'autres gènes, il serait par exemple envisageable d'analyser les fragments d'ADN issus des expériences de ChIP

re-ChIP soit par une approche gènes candidats, soit par une approche globale de clonage-séquençage ou d'hybridation sur puces promoteurs.

Enfin, au cours de ce travail **une approche globale de ChIP-on-chip a été développée dans le but (i) de caractériser le rôle de la protéine MBD2 dans la régulation transcriptionnelle et (ii) d'identifier l'ensemble de ses promoteurs cibles au sein du génome.**

L'analyse globale des profils de distribution de MBD2, de la méthylation ainsi que de l'ARN polymérase II sur puces promoteurs a montré que **MBD2 possède toutes les caractéristiques d'un répresseur transcriptionnel méthylation-dépendant.** En effet, 74% des promoteurs fixés par MBD2 sont méthylés et cette liaison est associée dans 65% des cas à une répression transcriptionnelle. De plus, **MBD2 apparaît être le répresseur méthylation-dépendant le plus utilisé** dans les cellules HeLa comme le suggéraient les travaux de nos collaborateurs (Lopez-Serra *et al.*, 2008).

Par ailleurs, cette approche globale de ChIP-on-chip nous a permis **d'isoler de nouveaux gènes suppresseurs de tumeurs fixés par le répresseur MBD2** dont en particulier les récepteurs à dépendance. L'identification d'autres voies de signalisation ou d'autres familles de gènes particulièrement régulés par MBD2 est actuellement en cours d'analyse. Néanmoins, confirmer l'implication de MBD2 dans la régulation des gènes impliqués dans la voie de signalisation des récepteurs à dépendance suscite un grand intérêt. En effet, les récepteurs à dépendance sont à la fois impliqués dans la transition adénome-carcinome et dans l'acquisition d'un potentiel métastatique (Bernet and Mehlen, 2007a). Dans ce cadre, comprendre les mécanismes d'inactivation par hyperméthylation de ces récepteurs dans les cancers et déterminer si MBD2 peut être une cible potentielle pour réactiver ces gènes et lutter contre le cancer semblent attractifs. Ce projet a débuté au sein de notre équipe et s'effectue en étroite collaboration avec l'équipe du Dr Mehlen, l'un des premiers à avoir découvert les récepteurs à dépendance et à avoir démontré leur rôle dans la mort cellulaire.

De nombreux gènes impliqués dans le contrôle de la prolifération, de la différenciation et de la mort cellulaire, dont en particulier les gènes suppresseurs de tumeurs, sont inactivés par hyperméthylation dans les cancers. D'après la littérature et nos résultats, cette inactivation

méthylation-dépendante serait en partie initiée par la protéine MBD2. Dès lors, ce répresseur apparaît être une cible potentielle pour combattre le cancer. Dans une perspective thérapeutique anti-cancéreuse visant à inhiber MBD2 (utilisation d'ARN interférents ou d'inhibiteurs protéiques), rechercher les cibles de la protéine MBD2 et comprendre sa capacité à contrôler l'expression génique semblent cruciaux. En effet, l'inhibition de la protéine MBD2 dans une visée thérapeutique pourrait être à ce jour envisageable. L'invalidation du gène *Mbd2* est viable chez la souris et conduit à peu d'anomalies chez l'adulte (Hendrich *et al.*, 2001; Hutchins *et al.*, 2002). Cette invalidation a également un rôle protecteur contre le risque de développer des cancers intestinaux chez les souris *Apc^{Min/+}* (Sansom *et al.*, 2003). De plus, l'équipe du Dr Szif, qui a développé une stratégie thérapeutique à l'aide d'ARN anti-sens dirigés contre les transcrits *Mbd2*, a montré que des injections de ces ARN chez la souris nude ont un fort effet anti-tumoral sur des tumeurs intestinales et pulmonaires greffées et n'ont révélé aucune toxicité vis-à-vis des cellules non tumorales murines (Campbell *et al.*, 2004). En outre, l'inhibition de la protéine MBD2 semble une alternative aux thérapies déméthylantes pour le traitement des cancers, dans la mesure où il existerait chez ce facteur une spécificité de cibles. Son inhibition aurait alors théoriquement une conséquence spécifique et non globale, relativement restreinte sur l'organisme et donc une faible toxicité.



RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Aapola U, Kawasaki K, Scott HS, Ollila J, Vihinen M, Heino M, Shintani A, Kawasaki K, Minoshima S, Krohn K, Antonarakis SE, Shimizu N, Kudoh J, and Peterson P (2000) Isolation and initial characterization of a novel zinc finger gene, DNMT3L, on 21q22.3, related to the cytosine-5-methyltransferase 3 gene family. *Genomics*, **65**, 293-298.
2. Abdel-Rahman WM, Knuutila S, Peltomaki P, Harrison DJ, and Bader SA (2008) Truncation of MBD4 predisposes to reciprocal chromosomal translocations and alters the response to therapeutic agents in colon cancer cells. *DNA Repair (Amst)*, **7**, 321-328.
3. Aerts S, Thijs G, Dabrowski M, Moreau Y, and De Moor B (2004) Comprehensive analysis of the base composition around the transcription start site in Metazoa. *BMC Genomics*, **5**, 34.
4. Akbarian S, Chen RZ, Gribnau J, Rasmussen TP, Fong H, Jaenisch R, and Jones EG (2001) Expression pattern of the Rett syndrome gene MeCP2 in primate prefrontal cortex. *Neurobiol Dis*, **8**, 784-791.
5. Allegrucci C, Thurston A, Lucas E, and Young L (2005) Epigenetics and the germline. *Reproduction*, **129**, 137-149.
6. Amir RE, Van dV, I, Wan M, Tran CQ, Francke U, and Zoghbi HY (1999) Rett syndrome is caused by mutations in X-linked MECP2, encoding methyl-CpG-binding protein 2. *Nat Genet*, **23**, 185-188.
7. Amiry N, Kong X, Muniraj N, Kannan N, Grandison PM, Lin J, Yang Y, Vouyovitch CM, Borges S, Perry JK, Mertani HC, Zhu T, Liu D, and Lobie PE (2009) Trefoil factor-1 (TFF1) enhances oncogenicity of mammary carcinoma cells. *Endocrinology*, **150**, 4473-4483.
8. Angrisano T, Lembo F, Pero R, Natale F, Fusco A, Avvedimento VE, Bruni CB, and Chiariotti L (2006) TACC3 mediates the association of MBD2 with histone acetyltransferases and relieves transcriptional repression of methylated promoters. *Nucleic Acids Res*, **34**, 364-372.
9. Antequera F and Bird A (1993) Number of CpG islands and genes in human and mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 11995-11999.
10. Antequera F, Boyes J, and Bird A (1990) High levels of de novo methylation and altered chromatin structure at CpG islands in cell lines. *Cell*, **62**, 503-514.
11. Aoki A, Suetake I, Miyagawa J, Fujio T, Chijiwa T, Sasaki H, and Tajima S (2001) Enzymatic properties of de novo-type mouse DNA (cytosine-5) methyltransferases. *Nucleic Acids Res*, **29**, 3506-3512.
12. Auriol E, Billard LM, Magdinier F, and Dante R (2005) Specific binding of the methyl binding domain protein 2 at the BRCA1-NBR2 locus. *Nucleic Acids Res*, **33**, 4243-4254.

13. Avner P and Heard E (2001) X-chromosome inactivation: counting, choice and initiation. *Nat Rev Genet*, **2**, 59-67.
14. Bachman KE, Park BH, Rhee I, Rajagopalan H, Herman JG, Baylin SB, Kinzler KW, and Vogelstein B (2003) Histone modifications and silencing prior to DNA methylation of a tumor suppressor gene. *Cancer Cell*, **3**, 89-95.
15. Bachman KE, Rountree MR, and Baylin SB (2001) Dnmt3a and Dnmt3b are transcriptional repressors that exhibit unique localization properties to heterochromatin. *J Biol Chem*, **276**, 32282-32287.
16. Bacolla A, Pradhan S, Roberts RJ, and Wells RD (1999) Recombinant human DNA (cytosine-5) methyltransferase. II. Steady-state kinetics reveal allosteric activation by methylated dna. *J Biol Chem*, **274**, 33011-33019.
17. Bader S, Walker M, Hendrich B, Bird A, Bird C, Hooper M, and Wyllie A (1999) Somatic frameshift mutations in the MBD4 gene of sporadic colon cancers with mismatch repair deficiency. *Oncogene*, **18**, 8044-8047.
18. Bader S, Walker M, McQueen HA, Sellar R, Oei E, Wopereis S, Zhu Y, Peter A, Bird AP, and Harrison DJ (2003) MBD1, MBD2 and CGBP genes at chromosome 18q21 are infrequently mutated in human colon and lung cancers. *Oncogene*, **22**, 3506-3510.
19. Bader SA, Walker M, and Harrison DJ (2007) A human cancer-associated truncation of MBD4 causes dominant negative impairment of DNA repair in colon cancer cells. *Br J Cancer*, **96**, 660-666.
20. Bakker J, Lin X, and Nelson WG (2002) Methyl-CpG binding domain protein 2 represses transcription from hypermethylated pi-class glutathione S-transferase gene promoters in hepatocellular carcinoma cells. *J Biol Chem*, **277**, 22573-22580.
21. Ballestar E, Paz MF, Valle L, Wei S, Fraga MF, Espada J, Cigudosa JC, Huang TH, and Esteller M (2003) Methyl-CpG binding proteins identify novel sites of epigenetic inactivation in human cancer. *EMBO J*, **22**, 6335-6345.
22. Balmer D, Goldstine J, Rao YM, and Lasalle JM (2003) Elevated methyl-CpG-binding protein 2 expression is acquired during postnatal human brain development and is correlated with alternative polyadenylation. *J Mol Med*, **81**, 61-68.
23. Barlow DP, Stoger R, Herrmann BG, Saito K, and Schweifer N (1991) The mouse insulin-like growth factor type-2 receptor is imprinted and closely linked to the Tme locus. *Nature*, **349**, 84-87.
24. Barr H, Hermann A, Berger J, Tsai HH, Adie K, Prokhortchouk A, Hendrich B, and Bird A (2007) Mbd2 contributes to DNA methylation-directed repression of the Xist gene. *Mol Cell Biol*, **27**, 3750-3757.
25. Barreto G, Schafer A, Marhold J, Stach D, Swaminathan SK, Handa V, Doderlein G, Maltry N, Wu W, Lyko F, and Niehrs C (2007) Gadd45a promotes epigenetic gene activation by repair-mediated DNA demethylation. *Nature*, **445**, 671-675.
26. Bartolomei MS, Webber AL, Brunkow ME, and Tilghman SM (1993) Epigenetic mechanisms underlying the imprinting of the mouse H19 gene. *Genes Dev*, **7**, 1663-1673.
27. Bartolomei MS, Zemel S, and Tilghman SM (1991) Parental imprinting of the mouse H19 gene. *Nature*, **351**, 153-155.
28. Baylin SB and Chen WY (2005) Aberrant gene silencing in tumor progression: implications for control of cancer. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, **70**, 427-433.

29. Bellacosa A (2001) Role of MED1 (MBD4) Gene in DNA repair and human cancer. *J Cell Physiol*, **187**, 137-144.
30. Bellacosa A, Cicchillitti L, Schepis F, Riccio A, Yeung AT, Matsumoto Y, Golemis EA, Genuardi M, and Neri G (1999) MED1, a novel human methyl-CpG-binding endonuclease, interacts with DNA mismatch repair protein MLH1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 3969-3974.
31. Ben Hattar J, Beard P, and Jiricny J (1989) Cytosine methylation in CTF and Sp1 recognition sites of an HSV tk promoter: effects on transcription in vivo and on factor binding in vitro. *Nucleic Acids Res*, **17**, 10179-10190.
32. Berger J, Sansom O, Clarke A, and Bird A (2007) MBD2 is required for correct spatial gene expression in the gut. *Mol Cell Biol*, **27**, 4049-4057.
33. Bernet A and Mehlen P (2007) Dependence receptors: when apoptosis controls tumor progression. *Bull Cancer*, **94**, E12-E17.
34. Bernet A, Mazelin L, Coissieux MM, Gadot N, Ackerman SL, Scoazec JY, and Mehlen P (2007) Inactivation of the UNC5C Netrin-1 receptor is associated with tumor progression in colorectal malignancies. *Gastroenterology*, **133**, 1840-1848.
35. Berube NG, Smeenk CA, and Picketts DJ (2000) Cell cycle-dependent phosphorylation of the ATRX protein correlates with changes in nuclear matrix and chromatin association. *Hum Mol Genet*, **9**, 539-547.
36. Bestor TH (1988) Cloning of a mammalian DNA methyltransferase. *Gene*, **74**, 9-12.
37. Bestor TH (1992) Activation of mammalian DNA methyltransferase by cleavage of a Zn binding regulatory domain. *EMBO J*, **11**, 2611-2617.
38. Bestor TH (2000) The DNA methyltransferases of mammals. *Hum Mol Genet*, **9**, 2395-2402.
39. Bestor TH and Ingram VM (1983) Two DNA methyltransferases from murine erythroleukemia cells: purification, sequence specificity, and mode of interaction with DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **80**, 5559-5563.
40. Bestor TH and Verdine GL (1994) DNA methyltransferases. *Curr Opin Cell Biol*, **6**, 380-389.
41. Bhattacharya SK, Ramchandani S, Cervoni N, and Szyf M (1999) A mammalian protein with specific demethylase activity for mCpG DNA. *Nature*, **397**, 579-583.
42. Billard LM, Magdinier F, Lenoir GM, Frappart L, and Dante R (2002) MeCP2 and MBD2 expression during normal and pathological growth of the human mammary gland. *Oncogene*, **21**, 2704-2712.
43. Biniszkiwicz D, Gribnau J, Ramsahoye B, Gaudet F, Eggan K, Humpherys D, Mastrangelo MA, Jun Z, Walter J, and Jaenisch R (2002) Dnmt1 overexpression causes genomic hypermethylation, loss of imprinting, and embryonic lethality. *Mol Cell Biol*, **22**, 2124-2135.
44. Bird A (2002) DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev*, **16**, 6-21.
45. Bird AP (1980) DNA methylation and the frequency of CpG in animal DNA. *Nucleic Acids Res*, **8**, 1499-1504.
46. Bird AP (1986) CpG-rich islands and the function of DNA methylation. *Nature*, **321**, 209-213.

47. Bird AP and Taggart MH (1980) Variable patterns of total DNA and rDNA methylation in animals. *Nucleic Acids Res*, **8**, 1485-1497.
48. Bird AP, Taggart MH, and Smith BA (1979) Methylated and unmethylated DNA compartments in the sea urchin genome. *Cell*, **17**, 889-901.
49. Bird AP and Wolffe AP (1999) Methylation-induced repression--belts, braces, and chromatin. *Cell*, **99**, 451-454.
50. Boeke J, Ammerpohl O, Kegel S, Moehren U, and Renkawitz R (2000) The minimal repression domain of MBD2b overlaps with the methyl-CpG-binding domain and binds directly to Sin3A. *J Biol Chem*, **275**, 34963-34967.
51. Boggs BA, Cheung P, Heard E, Spector DL, Chinault AC, and Allis CD (2002) Differentially methylated forms of histone H3 show unique association patterns with inactive human X chromosomes. *Nat Genet*, **30**, 73-76.
52. Boiani M, Eckardt S, Scholer HR, and McLaughlin KJ (2002) Oct4 distribution and level in mouse clones: consequences for pluripotency. *Genes Dev*, **16**, 1209-1219.
53. Bonfils J, Faure M, Gibrat JF, Glomot F, and Papet I (2000) Sheep cytosolic branched-chain amino acid aminotransferase: cDNA cloning, primary structure and molecular modelling and its unique expression in muscles. *Biochim Biophys Acta*, **1494**, 129-136.
54. Bortvin A, Eggan K, Skaletsky H, Akutsu H, Berry DL, Yanagimachi R, Page DC, and Jaenisch R (2003) Incomplete reactivation of Oct4-related genes in mouse embryos cloned from somatic nuclei. *Development*, **130**, 1673-1680.
55. Bostick M, Kim JK, Esteve PO, Clark A, Pradhan S, and Jacobsen SE (2007) UHRF1 plays a role in maintaining DNA methylation in mammalian cells. *Science*, **317**, 1760-1764.
56. Bourc'his D and Bestor TH (2004) Meiotic catastrophe and retrotransposon reactivation in male germ cells lacking Dnmt3L. *Nature*, **431**, 96-99.
57. Bourc'his D, Xu GL, Lin CS, Bollman B, and Bestor TH (2001) Dnmt3L and the establishment of maternal genomic imprints. *Science*, **294**, 2536-2539.
58. Boyes J and Bird A (1991) DNA methylation inhibits transcription indirectly via a methyl-CpG binding protein. *Cell*, **64**, 1123-1134.
59. Boyes J and Bird A (1992) Repression of genes by DNA methylation depends on CpG density and promoter strength: evidence for involvement of a methyl-CpG binding protein. *EMBO J*, **11**, 327-333.
60. Brackertz M, Boeke J, Zhang R, and Renkawitz R (2002) Two highly related p66 proteins comprise a new family of potent transcriptional repressors interacting with MBD2 and MBD3. *J Biol Chem*, **277**, 40958-40966.
61. Brandeis M, Ariel M, and Cedar H (1993a) Dynamics of DNA methylation during development. *Bioessays*, **15**, 709-713.
62. Brandeis M, Kafri T, Ariel M, Chaillet JR, McCarrey J, Razin A, and Cedar H (1993b) The ontogeny of allele-specific methylation associated with imprinted genes in the mouse. *EMBO J*, **12**, 3669-3677.
63. Burdon RH, Martin BT, and Lal BM (1967) Synthesis of low molecular weight ribonucleic acid in tumour cells. *J Mol Biol*, **28**, 357-371.
64. Buryanov YI and Shevchuk TV (2005) DNA methyltransferases and structural-functional specificity of eukaryotic DNA modification. *Biochemistry (Mosc)*, **70**, 730-742.

65. Campbell PM, Bovenzi V, and Szyf M (2004) Methylated DNA-binding protein 2 antisense inhibitors suppress tumorigenesis of human cancer cell lines in vitro and in vivo. *Carcinogenesis*, **25**, 499-507.
66. Carlson LL, Page AW, and Bestor TH (1992) Properties and localization of DNA methyltransferase in preimplantation mouse embryos: implications for genomic imprinting. *Genes Dev*, **6**, 2536-2541.
67. Caspary T, Cleary MA, Baker CC, Guan XJ, and Tilghman SM (1998) Multiple mechanisms regulate imprinting of the mouse distal chromosome 7 gene cluster. *Mol Cell Biol*, **18**, 3466-3474.
68. Cassel S, Revel MO, Kelche C, and Zwiller J (2004) Expression of the methyl-CpG-binding protein MeCP2 in rat brain. An ontogenetic study. *Neurobiol Dis*, **15**, 206-211.
69. Cattanach BM and Kirk M (1985) Differential activity of maternally and paternally derived chromosome regions in mice. *Nature*, **315**, 496-498.
70. Cedar H and Verdine GL (1999) Gene expression. The amazing demethylase. *Nature*, **397**, 568-569.
71. Chadwick BP and Willard HF (2003) Chromatin of the Barr body: histone and non-histone proteins associated with or excluded from the inactive X chromosome. *Hum Mol Genet*, **12**, 2167-2178.
72. Chahrour M and Zoghbi HY (2007) The story of Rett syndrome: from clinic to neurobiology. *Neuron*, **56**, 422-437.
73. Chalitchagorn K, Shuangshoti S, Hourpai N, Kongruttanachok N, Tangkijvanich P, Thongngam D, Voravud N, Sriuranpong V, and Mutirangura A (2004) Distinctive pattern of LINE-1 methylation level in normal tissues and the association with carcinogenesis. *Oncogene*, **23**, 8841-8846.
74. Chan AO, Broaddus RR, Houlihan PS, Issa JP, Hamilton SR, and Rashid A (2002) CpG island methylation in aberrant crypt foci of the colorectum. *Am J Pathol*, **160**, 1823-1830.
75. Chandler SP, Guschin D, Landsberger N, and Wolffe AP (1999) The methyl-CpG binding transcriptional repressor MeCP2 stably associates with nucleosomal DNA. *Biochemistry*, **38**, 7008-7018.
76. Chao HT and Zoghbi HY (2009) The yin and yang of MeCP2 phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **106**, 4577-4578.
77. Chapman V, Forrester L, Sanford J, Hastie N, and Rossant J (1984) Cell lineage-specific undermethylation of mouse repetitive DNA. *Nature*, **307**, 284-286.
78. Chatagnon A, Bougel S, Perriaud L, Lachuer J, Benhattar J, and Dante R (2009) Specific association between the methyl-CpG-binding domain protein 2 and the hypermethylated region of the human telomerase reverse transcriptase promoter in cancer cells. *Carcinogenesis*, **30**, 28-34.
79. Cheah MS, Wallace CD, and Hoffman RM (1984) Hypomethylation of DNA in human cancer cells: a site-specific change in the c-myc oncogene. *J Natl Cancer Inst*, **73**, 1057-1065.
80. Chedin F, Lieber MR, and Hsieh CL (2002) The DNA methyltransferase-like protein DNMT3L stimulates de novo methylation by Dnmt3a. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 16916-16921.

81. Chen RZ, Akbarian S, Tudor M, and Jaenisch R (2001) Deficiency of methyl-CpG binding protein-2 in CNS neurons results in a Rett-like phenotype in mice. *Nat Genet*, **27**, 327-331.
82. Chen T, Ueda Y, Dodge JE, Wang Z, and Li E (2003) Establishment and maintenance of genomic methylation patterns in mouse embryonic stem cells by Dnmt3a and Dnmt3b. *Mol Cell Biol*, **23**, 5594-5605.
83. Chen T, Ueda Y, Xie S, and Li E (2002) A novel Dnmt3a isoform produced from an alternative promoter localizes to euchromatin and its expression correlates with active de novo methylation. *J Biol Chem*, **277**, 38746-38754.
84. Chen WG, Chang Q, Lin Y, Meissner A, West AE, Griffith EC, Jaenisch R, and Greenberg ME (2003) Derepression of BDNF transcription involves calcium-dependent phosphorylation of MeCP2. *Science*, **302**, 885-889.
85. Chen ZX, Mann JR, Hsieh CL, Riggs AD, and Chedin F (2005) Physical and functional interactions between the human DNMT3L protein and members of the de novo methyltransferase family. *J Cell Biochem*, **95**, 902-917.
86. Cheng X and Blumenthal RM (2008) Mammalian DNA methyltransferases: a structural perspective. *Structure*, **16**, 341-350.
87. Cheng X and Roberts RJ (2001) AdoMet-dependent methylation, DNA methyltransferases and base flipping. *Nucleic Acids Res*, **29**, 3784-3795.
88. Chiang JW, Karlan BY, Cass L, and Baldwin RL (2006) BRCA1 promoter methylation predicts adverse ovarian cancer prognosis. *Gynecol Oncol*, **101**, 403-410.
89. Chim CS and Kwong YL (2006) Adverse prognostic impact of CDKN2B hypermethylation in acute promyelocytic leukemia. *Leuk Lymphoma*, **47**, 815-825.
90. Choi Y, Gehring M, Johnson L, Hannon M, Harada JJ, Goldberg RB, Jacobsen SE, and Fischer RL (2002) DEMETER, a DNA glycosylase domain protein, is required for endosperm gene imprinting and seed viability in arabidopsis. *Cell*, **110**, 33-42.
91. Christman JK, Sheikhejad G, Marasco CJ, and Sufrin JR (1995) 5-Methyl-2'-deoxycytidine in single-stranded DNA can act in cis to signal de novo DNA methylation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 7347-7351.
92. Chuang LS, Ian HI, Koh TW, Ng HH, Xu G, and Li BF (1997) Human DNA-(cytosine-5) methyltransferase-PCNA complex as a target for p21WAF1. *Science*, **277**, 1996-2000.
93. Clarke AR and Sansom OJ (2003) Analyzing tumor suppressor activities in the murine small intestine. *Oncol Res*, **13**, 333-337.
94. Coffigny H, Bourgeois C, Ricoul M, Bernardino J, Vilain A, Niveleau A, Malfoy B, and Dutrillaux B (1999) Alterations of DNA methylation patterns in germ cells and Sertoli cells from developing mouse testis. *Cytogenet Cell Genet*, **87**, 175-181.
95. Colot V and Rossignol JL (1999) Eukaryotic DNA methylation as an evolutionary device. *Bioessays*, **21**, 402-411.
96. Constanica M, Pickard B, Kelsey G, and Reik W (1998) Imprinting mechanisms. *Genome Res*, **8**, 881-900.
97. Cortazar D, Kunz C, Saito Y, Steinacher R, and Schar P (2007) The enigmatic thymine DNA glycosylase. *DNA Repair (Amst)*, **6**, 489-504.

98. Cortellino S, Turner D, Masciullo V, Schepis F, Albino D, Daniel R, Skalka AM, Meropol NJ, Alberti C, Larue L, and Bellacosa A (2003) The base excision repair enzyme MED1 mediates DNA damage response to antitumor drugs and is associated with mismatch repair system integrity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 15071-15076.
99. Costello JF, Fruhwald MC, Smiraglia DJ, Rush LJ, Robertson GP, Gao X, Wright FA, Feramisco JD, Peltomaki P, Lang JC, Schuller DE, Yu L, Bloomfield CD, Caligiuri MA, Yates A, Nishikawa R, Su HH, Petrelli NJ, Zhang X, O'Dorisio MS, Held WA, Cavenee WK, and Plass C (2000) Aberrant CpG-island methylation has non-random and tumour-type-specific patterns. *Nat Genet*, **24**, 132-138.
100. Coy JF, Sedlacek Z, Bachner D, Delius H, and Poustka A (1999) A complex pattern of evolutionary conservation and alternative polyadenylation within the long 3'-untranslated region of the methyl-CpG-binding protein 2 gene (MeCP2) suggests a regulatory role in gene expression. *Hum Mol Genet*, **8**, 1253-1262.
101. Cross SH, Meehan RR, Nan X, and Bird A (1997) A component of the transcriptional repressor MeCP1 shares a motif with DNA methyltransferase and HRX proteins. *Nat Genet*, **16**, 256-259.
102. Csankovszki G, Nagy A, and Jaenisch R (2001) Synergism of Xist RNA, DNA methylation, and histone hypoacetylation in maintaining X chromosome inactivation. *J Cell Biol*, **153**, 773-784.
103. Cui H (2007) Loss of imprinting of IGF2 as an epigenetic marker for the risk of human cancer. *Dis Markers*, **23**, 105-112.
104. Curradi M, Izzo A, Badaracco G, and Landsberger N (2002) Molecular mechanisms of gene silencing mediated by DNA methylation. *Mol Cell Biol*, **22**, 3157-3173.
105. Daniel JM (2007) Dancing in and out of the nucleus: p120(ctn) and the transcription factor Kaiso. *Biochim Biophys Acta*, **1773**, 59-68.
106. Daniel JM and Reynolds AB (1999) The catenin p120(ctn) interacts with Kaiso, a novel BTB/POZ domain zinc finger transcription factor. *Mol Cell Biol*, **19**, 3614-3623.
107. Daniel JM, Spring CM, Crawford HC, Reynolds AB, and Baig A (2002) The p120(ctn)-binding partner Kaiso is a bi-modal DNA-binding protein that recognizes both a sequence-specific consensus and methylated CpG dinucleotides. *Nucleic Acids Res*, **30**, 2911-2919.
108. Dante R, Dante-Paire J, Rigal D, and Roizes G (1992) Methylation patterns of long interspersed repeated DNA and alphoid repetitive DNA from human cell lines and tumors. *Anticancer Res*, **12**, 559-563.
109. Das PM and Singal R (2004) DNA methylation and cancer. *J Clin Oncol*, **22**, 4632-4642.
110. De Smet C, De Backer O, Faraoni I, Lurquin C, Brasseur F, and Boon T (1996) The activation of human gene MAGE-1 in tumor cells is correlated with genome-wide demethylation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 7149-7153.
111. Dean W, Santos F, Stojkovic M, Zakhartchenko V, Walter J, Wolf E, and Reik W (2001) Conservation of methylation reprogramming in mammalian development: aberrant reprogramming in cloned embryos. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 13734-13738.
112. DeChiara TM, Efstratiadis A, and Robertson EJ (1990) A growth-deficiency phenotype in heterozygous mice carrying an insulin-like growth factor II gene disrupted by targeting. *Nature*, **345**, 78-80.

113. DeChiara TM, Robertson EJ, and Efstratiadis A (1991) Parental imprinting of the mouse insulin-like growth factor II gene. *Cell*, **64**, 849-859.
114. D'Esposito M, Quaderi NA, Ciccodicola A, Bruni P, Esposito T, D'Urso M, and Brown SD (1996) Isolation, physical mapping, and northern analysis of the X-linked human gene encoding methyl CpG-binding protein, MECP2. *Mamm Genome*, **7**, 533-535.
115. Detich N, Theberge J, and Szyf M (2002) Promoter-specific activation and demethylation by MBD2/demethylase. *J Biol Chem*, **277**, 35791-35794.
116. Di CL, Buschbeck M, Gutierrez A, Joval I, Morey L, Villa R, and Minucci S (2004) Altered epigenetic signals in human disease. *Cancer Biol Ther*, **3**, 831-837.
117. Di Croce L, Raker VA, Corsaro M, Fazi F, Fanelli M, Faretta M, Fuks F, Lo CF, Kouzarides T, Nervi C, Minucci S, and Pelicci PG (2002) Methyltransferase recruitment and DNA hypermethylation of target promoters by an oncogenic transcription factor. *Science*, **295**, 1079-1082.
118. Dietrich D, Lesche R, Tetzner R, Krispin M, Dietrich J, Haedicke W, Schuster M, and Kristiansen G (2009) Analysis of DNA methylation of multiple genes in microdissected cells from formalin-fixed and paraffin-embedded tissues. *J Histochem Cytochem*, **57**, 477-489.
119. Doherty AS, Bartolomei MS, and Schultz RM (2002) Regulation of stage-specific nuclear translocation of Dnmt1o during preimplantation mouse development. *Dev Biol*, **242**, 255-266.
120. Dong A, Yoder JA, Zhang X, Zhou L, Bestor TH, and Cheng X (2001) Structure of human DNMT2, an enigmatic DNA methyltransferase homolog that displays denaturant-resistant binding to DNA. *Nucleic Acids Res*, **29**, 439-448.
121. Dragich JM, Kim YH, Arnold AP, and Schanen NC (2007) Differential distribution of the MeCP2 splice variants in the postnatal mouse brain. *J Comp Neurol*, **501**, 526-542.
122. Dunn BK (2003) Hypomethylation: one side of a larger picture. *Ann N Y Acad Sci*, **983**, 28-42.
123. Eads CA, Danenberg KD, Kawakami K, Saltz LB, Danenberg PV, and Laird PW (1999) CpG island hypermethylation in human colorectal tumors is not associated with DNA methyltransferase overexpression. *Cancer Res*, **59**, 2302-2306.
124. Eads CA, Nickel AE, and Laird PW (2002) Complete genetic suppression of polyp formation and reduction of CpG-island hypermethylation in Apc(Min/+) Dnmt1-hypomorphic Mice. *Cancer Res*, **62**, 1296-1299.
125. Eckhardt F, Lewin J, Cortese R, Rakyan VK, Attwood J, Burger M, Burton J, Cox TV, Davies R, Down TA, Haefliger C, Horton R, Howe K, Jackson DK, Kunde J, Koenig C, Liddle J, Niblett D, Otto T, Pettett R, Seemann S, Thompson C, West T, Rogers J, Olek A, Berlin K, and Beck S (2006) DNA methylation profiling of human chromosomes 6, 20 and 22. *Nat Genet*, **38**, 1378-1385.
126. Eden A, Gaudet F, Waghmare A, and Jaenisch R (2003) Chromosomal instability and tumors promoted by DNA hypomethylation. *Science*, **300**, 455.
127. Ego T, Tanaka Y, and Shimotohno K (2005) Interaction of HTLV-1 Tax and methyl-CpG-binding domain 2 positively regulates the gene expression from the hypermethylated LTR. *Oncogene*, **24**, 1914-1923.

128. Ehrlich M (2002) DNA methylation in cancer: too much, but also too little. *Oncogene*, **21**, 5400-5413.
129. Ehrlich M, Gama-Sosa MA, Huang LH, Midgett RM, Kuo KC, McCune RA, and Gehrke C (1982) Amount and distribution of 5-methylcytosine in human DNA from different types of tissues of cells. *Nucleic Acids Res*, **10**, 2709-2721.
130. Ehrlich M, Hopkins NE, Jiang G, Dome JS, Yu MC, Woods CB, Tomlinson GE, Chintagumpala M, Champagne M, Dillerg L, Parham DM, and Sawyer J (2003) Satellite DNA hypomethylation in karyotyped Wilms tumors. *Cancer Genet Cytogenet*, **141**, 97-105.
131. Ehrlich M, Woods CB, Yu MC, Dubeau L, Yang F, Campan M, Weisenberger DJ, Long T, Youn B, Fiala ES, and Laird PW (2006) Quantitative analysis of associations between DNA hypermethylation, hypomethylation, and DNMT RNA levels in ovarian tumors. *Oncogene*, **25**, 2636-2645.
132. El Kharroubi A, Piras G, and Stewart CL (2001) DNA demethylation reactivates a subset of imprinted genes in uniparental mouse embryonic fibroblasts. *J Biol Chem*, **276**, 8674-8680.
133. el-Deiry WS, Nelkin BD, Celano P, Yen RW, Falco JP, Hamilton SR, and Baylin SB (1991) High expression of the DNA methyltransferase gene characterizes human neoplastic cells and progression stages of colon cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**, 3470-3474.
134. Elenbaas B, Spirio L, Koerner F, Fleming MD, Zimonjic DB, Donaher JL, Popescu NC, Hahn WC, and Weinberg RA (2001) Human breast cancer cells generated by oncogenic transformation of primary mammary epithelial cells. *Genes Dev*, **15**, 50-65.
135. Esteller M (2002) CpG island hypermethylation and tumor suppressor genes: a booming present, a brighter future. *Oncogene*, **21**, 5427-5440.
136. Esteller M (2007) Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps. *Nat Rev Genet*, **8**, 286-298.
137. Esteller M, Corn PG, Baylin SB, and Herman JG (2001) A gene hypermethylation profile of human cancer. *Cancer Res*, **61**, 3225-3229.
138. Esteller M, Garcia-Foncillas J, Andion E, Goodman SN, Hidalgo OF, Vanaclocha V, Baylin SB, and Herman JG (2000) Inactivation of the DNA-repair gene MGMT and the clinical response of gliomas to alkylating agents. *N Engl J Med*, **343**, 1350-1354.
139. Esteller M, Sanchez-Cespedes M, Rosell R, Sidransky D, Baylin SB, and Herman JG (1999) Detection of aberrant promoter hypermethylation of tumor suppressor genes in serum DNA from non-small cell lung cancer patients. *Cancer Res*, **59**, 67-70.
140. Evertson S, Wallin A, Arbman G, Rutten S, Emterling A, Zhang H, and Sun XF (2003) Microsatellite instability and MBD4 mutation in unselected colorectal cancer. *Anticancer Res*, **23**, 3569-3574.
141. Fang JY, Cheng ZH, Chen YX, Lu R, Yang L, Zhu HY, and Lu LG (2004) Expression of Dnmt1, demethylase, MeCP2 and methylation of tumor-related genes in human gastric cancer. *World J Gastroenterol*, **10**, 3394-3398.
142. Fatemi M, Hermann A, Pradhan S, and Jeltsch A (2001) The activity of the murine DNA methyltransferase Dnmt1 is controlled by interaction of the catalytic domain with the N-terminal part of the enzyme leading to an allosteric activation of the enzyme after binding to methylated DNA. *J Mol Biol*, **309**, 1189-1199.

143. Feil R and Kelsey G (1997) Genomic imprinting: a chromatin connection. *Am J Hum Genet*, **61**, 1213-1219.
144. Feinberg AP (2004) The epigenetics of cancer etiology. *Semin Cancer Biol*, **14**, 427-432.
145. Feinberg AP and Vogelstein B (1983a) Hypomethylation of ras oncogenes in primary human cancers. *Biochem Biophys Res Commun*, **111**, 47-54.
146. Feinberg AP, Vogelstein B, Droller MJ, Baylin SB, and Nelkin BD (1983b) Mutation affecting the 12th amino acid of the c-Ha-ras oncogene product occurs infrequently in human cancer. *Science*, **220**, 1175-1177.
147. Feng Q and Zhang Y (2001) The MeCP1 complex represses transcription through preferential binding, remodeling, and deacetylating methylated nucleosomes. *Genes Dev*, **15**, 827-832.
148. Ferguson-Smith AC, Sasaki H, Cattanach BM, and Surani MA (1993) Parental-origin-specific epigenetic modification of the mouse H19 gene. *Nature*, **362**, 751-755.
149. Fillion GJ, Zhenilo S, Salozhin S, Yamada D, Prokhortchouk E, and Defossez PA (2006) A family of human zinc finger proteins that bind methylated DNA and repress transcription. *Mol Cell Biol*, **26**, 169-181.
150. Finnegan EJ, Peacock WJ, and Dennis ES (2000) DNA methylation, a key regulator of plant development and other processes. *Curr Opin Genet Dev*, **10**, 217-223.
151. Fisher RA and Hodges MD (2003) Genomic imprinting in gestational trophoblastic disease--a review. *Placenta*, **24 Suppl A**, S111-S118.
152. Fraga MF, Ballestar E, Montoya G, Taysavang P, Wade PA, and Esteller M (2003) The affinity of different MBD proteins for a specific methylated locus depends on their intrinsic binding properties. *Nucleic Acids Res*, **31**, 1765-1774.
153. Freitag M and Selker EU (2005) Controlling DNA methylation: many roads to one modification. *Curr Opin Genet Dev*, **15**, 191-199.
154. Fremont M, Siegmann M, Gaulis S, Matthies R, Hess D, and Jost JP (1997) Demethylation of DNA by purified chick embryo 5-methylcytosine-DNA glycosylase requires both protein and RNA. *Nucleic Acids Res*, **25**, 2375-2380.
155. Fujimori A, Matsuda Y, Takemoto Y, Hashimoto Y, Kubo E, Araki R, Fukumura R, Mita K, Tatsumi K, and Muto M (1998) Cloning and mapping of Np95 gene which encodes a novel nuclear protein associated with cell proliferation. *Mamm Genome*, **9**, 1032-1035.
156. Fujita H, Fujii R, Aratani S, Amano T, Fukamizu A, and Nakajima T (2003a) Antithetic effects of MBD2a on gene regulation. *Mol Cell Biol*, **23**, 2645-2657.
157. Fujita N, Takebayashi S, Okumura K, Kudo S, Chiba T, Saya H, and Nakao M (1999) Methylation-mediated transcriptional silencing in euchromatin by methyl-CpG binding protein MBD1 isoforms. *Mol Cell Biol*, **19**, 6415-6426.
158. Fujita N, Watanabe S, Ichimura T, Ohkuma Y, Chiba T, Saya H, and Nakao M (2003b) MCAF mediates MBD1-dependent transcriptional repression. *Mol Cell Biol*, **23**, 2834-2843.
159. Fujita N, Watanabe S, Ichimura T, Tsuruzoe S, Shinkai Y, Tachibana M, Chiba T, and Nakao M (2003c) Methyl-CpG binding domain 1 (MBD1) interacts with the Suv39h1-HP1 heterochromatic complex for DNA methylation-based transcriptional repression. *J Biol Chem*, **278**, 24132-24138.

160. Fuks F, Burgers WA, Godin N, Kasai M, and Kouzarides T (2001) Dnmt3a binds deacetylases and is recruited by a sequence-specific repressor to silence transcription. *EMBO J*, **20**, 2536-2544.
161. Fuks F, Hurd PJ, Deplus R, and Kouzarides T (2003) The DNA methyltransferases associate with HP1 and the SUV39H1 histone methyltransferase. *Nucleic Acids Res*, **31**, 2305-2312.
162. Fukushige S, Kondo E, Gu Z, Suzuki H, and Horii A (2006) RET finger protein enhances. *Biochem Biophys Res Commun*, **351**, 85-92.
163. Fulmer-Smentek SB and Francke U (2001) Association of acetylated histones with paternally expressed genes in the Prader--Willi deletion region. *Hum Mol Genet*, **10**, 645-652.
164. Gabory A and Dandolo L (2005) [Epigenetics and development: genomic imprinting]. *Med Sci (Paris)*, **21**, 390-395.
165. Gama-Sosa MA, Midgett RM, Slagel VA, Githens S, Kuo KC, Gehrke CW, and Ehrlich M (1983) Tissue-specific differences in DNA methylation in various mammals. *Biochim Biophys Acta*, **740**, 212-219.
166. Gaudet F, Hodgson JG, Eden A, Jackson-Grusby L, Dausman J, Gray JW, Leonhardt H, and Jaenisch R (2003) Induction of tumors in mice by genomic hypomethylation. *Science*, **300**, 489-492.
167. Georgel PT, Horowitz-Scherer RA, Adkins N, Woodcock CL, Wade PA, and Hansen JC (2003) Chromatin compaction by human MeCP2. Assembly of novel secondary chromatin structures in the absence of DNA methylation. *J Biol Chem*, **278**, 32181-32188.
168. Giamarchi C, Solanas M, Chailleux C, Augereau P, Vignon F, Rochefort H, and Richard-Foy H (1999) Chromatin structure of the regulatory regions of pS2 and cathepsin D genes in hormone-dependent and -independent breast cancer cell lines. *Oncogene*, **18**, 533-541.
169. Gill G (2005) Something about SUMO inhibits transcription. *Curr Opin Genet Dev*, **15**, 536-541.
170. GOLD M and HURWITZ J (1964) THE ENZYMATIC METHYLATION OF RIBONUCLEIC ACID AND DEOXYRIBONUCLEIC ACID. V. PURIFICATION AND PROPERTIES OF THE DEOXYRIBONUCLEIC ACID-METHYLATING ACTIVITY OF ESCHERICHIA COLI. *J Biol Chem*, **239**, 3858-3865.
171. Goll MG and Bestor TH (2005) Eukaryotic cytosine methyltransferases. *Annu Rev Biochem*, **74**, 481-514.
172. Goll MG, Kirpekar F, Maggert KA, Yoder JA, Hsieh CL, Zhang X, Golic KG, Jacobsen SE, and Bestor TH (2006) Methylation of tRNA^{Asp} by the DNA methyltransferase homolog Dnmt2. *Science*, **311**, 395-398.
173. Gowher H, Leismann O, and Jeltsch A (2000) DNA of *Drosophila melanogaster* contains 5-methylcytosine. *EMBO J*, **19**, 6918-6923.
174. Grandjean V, O'Neill L, Sado T, Turner B, and Ferguson-Smith A (2001) Relationship between DNA methylation, histone H4 acetylation and gene expression in the mouse imprinted Igf2-H19 domain. *FEBS Lett*, **488**, 165-169.
175. Grange T. and H. Thomassin (1999). « Comment déméthyle une cytosine? Enlève-t-on un peu, beaucoup, encore plus, ou pas du tout? » *Med./Sci.*, **15**, 907-908.

176. Greger V, Passarge E, Hopping W, Messmer E, and Horsthemke B (1989) Epigenetic changes may contribute to the formation and spontaneous regression of retinoblastoma. *Hum Genet*, **83**, 155-158.
177. Guenther MG, Lane WS, Fischle W, Verdin E, Lazar MA, and Shiekhatter R (2000) A core SMRT corepressor complex containing HDAC3 and TBL1, a WD40-repeat protein linked to deafness. *Genes Dev*, **14**, 1048-1057.
178. Guilleret I and Benhattar J (2004) Unusual distribution of DNA methylation within the hTERT CpG island in tissues and cell lines. *Biochem Biophys Res Commun*, **325**, 1037-1043.
179. Guo Y, Pakneshan P, Gladu J, Slack A, Szyf M, and Rabbani SA (2002) Regulation of DNA methylation in human breast cancer. Effect on the urokinase-type plasminogen activator gene production and tumor invasion. *J Biol Chem*, **277**, 41571-41579.
180. Gurdon JB and Byrne JA (2003) The first half-century of nuclear transplantation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 8048-8052.
181. Guy J, Hendrich B, Holmes M, Martin JE, and Bird A (2001) A mouse Mecp2-null mutation causes neurological symptoms that mimic Rett syndrome. *Nat Genet*, **27**, 322-326.
182. Hagberg B, Aicardi J, Dias K, and Ramos O (1983) A progressive syndrome of autism, dementia, ataxia, and loss of purposeful hand use in girls: Rett's syndrome: report of 35 cases. *Ann Neurol*, **14**, 471-479.
183. Hansen RS, Stoger R, Wijmenga C, Stanek AM, Canfield TK, Luo P, Matarazzo MR, D'Esposito M, Feil R, Gimelli G, Weemaes CM, Laird CD, and Gartler SM (2000) Escape from gene silencing in ICF syndrome: evidence for advanced replication time as a major determinant. *Hum Mol Genet*, **9**, 2575-2587.
184. Hari Krishnan KN, Chow MZ, Baker EK, Pal S, Bassal S, Brasacchio D, Wang L, Craig JM, Jones PL, Sif S, and El Osta A (2005) Brahma links the SWI/SNF chromatin-remodeling complex with MeCP2-dependent transcriptional silencing. *Nat Genet*, **37**, 254-264.
185. Hark AT and Tilghman SM (1998) Chromatin conformation of the H19 epigenetic mark. *Hum Mol Genet*, **7**, 1979-1985.
186. Hata K, Okano M, Lei H, and Li E (2002) Dnmt3L cooperates with the Dnmt3 family of de novo DNA methyltransferases to establish maternal imprints in mice. *Development*, **129**, 1983-1993.
187. Heard E (2004) Recent advances in X-chromosome inactivation. *Curr Opin Cell Biol*, **16**, 247-255.
188. Hegi ME, Diserens AC, Gorlia T, Hamou MF, de Tribolet N, Weller M, Kros JM, Hainfellner JA, Mason W, Mariani L, Bromberg JE, Hau P, Mirimanoff RO, Cairncross JG, Janzer RC, and Stupp R (2005) MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N Engl J Med*, **352**, 997-1003.
189. Heisler LE, Torti D, Boutros PC, Watson J, Chan C, Winegarden N, Takahashi M, Yau P, Huang TH, Farnham PJ, Jurisica I, Woodgett JR, Bremner R, Penn LZ, and Der SD (2005) CpG Island microarray probe sequences derived from a physical library are representative of CpG Islands annotated on the human genome. *Nucleic Acids Res*, **33**, 2952-2961.
190. Heitmann B, Maurer T, Weitzel JM, Stratling WH, Kalbitzer HR, and Brunner E (2003) Solution structure of the matrix attachment region-binding domain of chicken MeCP2. *Eur J Biochem*, **270**, 3263-3270.

191. Hendrich B and Bird A (1998) Identification and characterization of a family of mammalian methyl-CpG binding proteins. *Mol Cell Biol*, **18**, 6538-6547.
192. Hendrich B and Tweedie S (2003) The methyl-CpG binding domain and the evolving role of DNA methylation in animals. *Trends Genet*, **19**, 269-277.
193. Hendrich B, Abbott C, McQueen H, Chambers D, Cross S, and Bird A (1999a) Genomic structure and chromosomal mapping of the murine and human Mbd1, Mbd2, Mbd3, and Mbd4 genes. *Mamm Genome*, **10**, 906-912.
194. Hendrich B, Guy J, Ramsahoye B, Wilson VA, and Bird A (2001) Closely related proteins MBD2 and MBD3 play distinctive but interacting roles in mouse development. *Genes Dev*, **15**, 710-723.
195. Hendrich B, Hardeland U, Ng HH, Jiricny J, and Bird A (1999b) The thymine glycosylase MBD4 can bind to the product of deamination at methylated CpG sites. *Nature*, **401**, 301-304.
196. Herman JG, Merlo A, Mao L, Lapidus RG, Issa JP, Davidson NE, Sidransky D, and Baylin SB (1995) Inactivation of the CDKN2/p16/MTS1 gene is frequently associated with aberrant DNA methylation in all common human cancers. *Cancer Res*, **55**, 4525-4530.
197. Hermann A, Schmitt S, and Jeltsch A (2003) The human Dnmt2 has residual DNA-(cytosine-C5) methyltransferase activity. *J Biol Chem*, **278**, 31717-31721.
198. Hite KC, Adams VH, and Hansen JC (2009) Recent advances in MeCP2 structure and function. *Biochem Cell Biol*, **87**, 219-227.
199. Hong B, Reeves P, Panning B, Swanson MS, and Yang TP (2001) Identification of an autoimmune serum containing antibodies against the Barr body. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 8703-8708.
200. Horike S (2005) [How the methyl-CpG binding protein-related epigenetic disease turns on the genes that produce its symptoms]. *Tanpakushitsu Kakusan Koso*, **50**, 978-984.
201. Horike S, Cai S, Miyano M, Cheng JF, and Kohwi-Shigematsu T (2005) Loss of silent-chromatin looping and impaired imprinting of DLX5 in Rett syndrome. *Nat Genet*, **37**, 31-40.
202. HOTCHKISS RD (1948) The quantitative separation of purines, pyrimidines, and nucleosides by paper chromatography. *J Biol Chem*, **175**, 315-332.
203. Howell CY, Bestor TH, Ding F, Latham KE, Mertineit C, Trasler JM, and Chaillet JR (2001) Genomic imprinting disrupted by a maternal effect mutation in the Dnmt1 gene. *Cell*, **104**, 829-838.
204. Howlett SK (1991a) Genomic imprinting and nuclear totipotency during embryonic development. *Int Rev Cytol*, **127**, 175-192.
205. Howlett SK and Reik W (1991b) Methylation levels of maternal and paternal genomes during preimplantation development. *Development*, **113**, 119-127.
206. Hsieh CL and Lieber MR (1992) CpG methylated minichromosomes become inaccessible for V(D)J recombination after undergoing replication. *EMBO J*, **11**, 315-325.
207. Hsu DW, Lin MJ, Lee TL, Wen SC, Chen X, and Shen CK (1999) Two major forms of DNA (cytosine-5) methyltransferase in human somatic tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 9751-9756.

208. Huang EY, Zhang J, Miska EA, Guenther MG, Kouzarides T, and Lazar MA (2000) Nuclear receptor corepressors partner with class II histone deacetylases in a Sin3-independent repression pathway. *Genes Dev*, **14**, 45-54.
209. Huber R, Hansen RS, Strazzullo M, Pengue G, Mazzarella R, D'Urso M, Schlessinger D, Pilia G, Gartler SM, and D'Esposito M (1999) DNA methylation in transcriptional repression of two differentially expressed X-linked genes, GPC3 and SYBL1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 616-621.
210. Hung MS and Shen CK (2003) Eukaryotic methyl-CpG-binding domain proteins and chromatin modification. *Eukaryot Cell*, **2**, 841-846.
211. Hung MS, Karthikeyan N, Huang B, Koo HC, Kiger J, and Shen CJ (1999) Drosophila proteins related to vertebrate DNA (5-cytosine) methyltransferases. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 11940-11945.
212. Huntriss J, Hinkins M, Oliver B, Harris SE, Beazley JC, Rutherford AJ, Gosden RG, Lanzendorf SE, and Picton HM (2004) Expression of mRNAs for DNA methyltransferases and methyl-CpG-binding proteins in the human female germ line, preimplantation embryos, and embryonic stem cells. *Mol Reprod Dev*, **67**, 323-336.
213. Hutchins AS, Mullen AC, Lee HW, Sykes KJ, High FA, Hendrich BD, Bird AP, and Reiner SL (2002) Gene silencing quantitatively controls the function of a developmental trans-activator. *Mol Cell*, **10**, 81-91.
214. Ichimura T, Watanabe S, Sakamoto Y, Aoto T, Fujita N, and Nakao M (2005) Transcriptional repression and heterochromatin formation by MBD1 and MCAF/AM family proteins. *J Biol Chem*, **280**, 13928-13935.
215. Iguchi-Ariga SM and Schaffner W (1989) CpG methylation of the cAMP-responsive enhancer/promoter sequence TGACGTCA abolishes specific factor binding as well as transcriptional activation. *Genes Dev*, **3**, 612-619.
216. Ikeda Y and Kinoshita T (2009) DNA demethylation: a lesson from the garden. *Chromosoma*, **118**, 37-41.
217. Illingworth RS and Bird AP (2009) CpG islands--'a rough guide'. *FEBS Lett*, **583**, 1713-1720.
218. Ishibashi T, Thambirajah AA, and Ausio J (2008) MeCP2 preferentially binds to methylated linker DNA in the absence of the terminal tail of histone H3 and independently of histone acetylation. *FEBS Lett*, **582**, 1157-1162.
219. Issa JP (2007) DNA methylation as a therapeutic target in cancer. *Clin Cancer Res*, **13**, 1634-1637.
220. Issa JP, Baylin SB, and Herman JG (1997) DNA methylation changes in hematologic malignancies: biologic and clinical implications. *Leukemia*, **11 Suppl 1**, S7-11.
221. Ivanov MA, Lamrihi B, Szyf M, Scherman D, and Bigey P (2003) Enhanced antitumor activity of a combination of MBD2-antisense electrotransfer gene therapy and bleomycin electrochemotherapy. *J Gene Med*, **5**, 893-899.
222. Jackson M, Krassowska A, Gilbert N, Chevassut T, Forrester L, Ansell J, and Ramsahoye B (2004) Severe global DNA hypomethylation blocks differentiation and induces histone hyperacetylation in embryonic stem cells. *Mol Cell Biol*, **24**, 8862-8871.
223. Jaenisch R (1997) DNA methylation and imprinting: why bother? *Trends Genet*, **13**, 323-329.

224. Jang JS, Lee SJ, Choi JE, Cha SI, Lee EB, Park TI, Kim CH, Lee WK, Kam S, Choi JY, Kang YM, Park RW, Kim IS, Cho YL, Jung TH, Han SB, and Park JY (2005) Methyl-CpG binding domain 1 gene polymorphisms and risk of primary lung cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, **14**, 2474-2480.
225. Jeffery L and Nakielnny S (2004) Components of the DNA methylation system of chromatin control are RNA-binding proteins. *J Biol Chem*, **279**, 49479-49487.
226. Jiang CL, Jin SG, and Pfeifer GP (2004) MBD3L1 is a transcriptional repressor that interacts with methyl-CpG-binding protein 2 (MBD2) and components of the NuRD complex. *J Biol Chem*, **279**, 52456-52464.
227. Jiang CL, Jin SG, Lee DH, Lan ZJ, Xu X, O'Connor TR, Szabo PE, Mann JR, Cooney AJ, and Pfeifer GP (2002) MBD3L1 and MBD3L2, two new proteins homologous to the methyl-CpG-binding proteins MBD2 and MBD3: characterization of MBD3L1 as a testis-specific transcriptional repressor. *Genomics*, **80**, 621-629.
228. Jiang YH, Bressler J, and Beaudet AL (2004) Epigenetics and human disease. *Annu Rev Genomics Hum Genet*, **5**, 479-510.
229. Jin SG, Guo C, and Pfeifer GP (2008) GADD45A does not promote DNA demethylation. *PLoS Genet*, **4**, e1000013.
230. Jin SG, Jiang CL, Rauch T, Li H, and Pfeifer GP (2005) MBD3L2 interacts with MBD3 and components of the NuRD complex and can oppose MBD2-MeCP1-mediated methylation silencing. *J Biol Chem*, **280**, 12700-12709.
231. Johnson LM, Bostick M, Zhang X, Kraft E, Henderson I, Callis J, and Jacobsen SE (2007) The SRA methyl-cytosine-binding domain links DNA and histone methylation. *Curr Biol*, **17**, 379-384.
232. Jones PA and Baylin SB (2002) The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet*, **3**, 415-428.
233. Jones PA and Takai D (2001) The role of DNA methylation in mammalian epigenetics. *Science*, **293**, 1068-1070.
234. Jones PA and Taylor SM (1980) Cellular differentiation, cytidine analogs and DNA methylation. *Cell*, **20**, 85-93.
235. Jones PA, Taylor SM, and Wilson VL (1983) Inhibition of DNA methylation by 5-azacytidine. *Recent Results Cancer Res*, **84**, 202-211.
236. Jones PL, Veenstra GJ, Wade PA, Vermaak D, Kass SU, Landsberger N, Strouboulis J, and Wolffe AP (1998) Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription. *Nat Genet*, **19**, 187-191.
237. Jorgensen HF, Adie K, Chaubert P, and Bird AP (2006) Engineering a high-affinity methyl-CpG-binding protein. *Nucleic Acids Res*, **34**, e96.
238. Jorgensen HF, Ben Porath I, and Bird AP (2004) Mbd1 is recruited to both methylated and nonmethylated CpGs via distinct DNA binding domains. *Mol Cell Biol*, **24**, 3387-3395.
239. Jost JP (1993) Nuclear extracts of chicken embryos promote an active demethylation of DNA by excision repair of 5-methyldeoxycytidine. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 4684-4688.
240. Jost JP and Jost YC (1995a) Mechanism of active DNA demethylation during embryonic development and cellular differentiation in vertebrates. *Gene*, **157**, 265-266.

241. Jost JP, Fremont M, Siegmann M, and Hofsteenge J (1997) The RNA moiety of chick embryo 5-methylcytosine- DNA glycosylase targets DNA demethylation. *Nucleic Acids Res*, **25**, 4545-4550.
242. Jost JP, Siegmann M, Sun L, and Leung R (1995b) Mechanisms of DNA demethylation in chicken embryos. Purification and properties of a 5-methylcytosine-DNA glycosylase. *J Biol Chem*, **270**, 9734-9739.
243. Jung BP, Zhang G, Nitsch R, Trogadis J, Nag S, and Eubanks JH (2003) Differential expression of methyl CpG-binding domain containing factor MBD3 in the developing and adult rat brain. *J Neurobiol*, **55**, 220-232.
244. Kafri T, Ariel M, Brandeis M, Shemer R, Urven L, McCarrey J, Cedar H, and Razin A (1992) Developmental pattern of gene-specific DNA methylation in the mouse embryo and germ line. *Genes Dev*, **6**, 705-714.
245. Kalousek F and Morris NR (1968) Deoxyribonucleic acid methylase activity in rat spleen. *J Biol Chem*, **243**, 2440-2442.
246. Kaludov NK and Wolffe AP (2000) MeCP2 driven transcriptional repression in vitro: selectivity for methylated DNA, action at a distance and contacts with the basal transcription machinery. *Nucleic Acids Res*, **28**, 1921-1928.
247. Kanai Y, Ushijima S, Kondo Y, Nakanishi Y, and Hirohashi S (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**, 205-212.
248. Kanai Y, Ushijima S, Nakanishi Y, and Hirohashi S (1999) Reduced mRNA expression of the DNA demethylase, MBD2, in human colorectal and stomach cancers. *Biochem Biophys Res Commun*, **264**, 962-966.
249. Kanduri C, Pant V, Loukinov D, Pugacheva E, Qi CF, Wolffe A, Ohlsson R, and Lobanenkov VV (2000) Functional association of CTCF with the insulator upstream of the H19 gene is parent of origin-specific and methylation-sensitive. *Curr Biol*, **10**, 853-856.
250. Kaneda A, Wang CJ, Cheong R, Timp W, Onyango P, Wen B, Iacobuzio-Donahue CA, Ohlsson R, Andraos R, Pearson MA, Sharov AA, Longo DL, Ko MS, Levchenko A, and Feinberg AP (2007) Enhanced sensitivity to IGF-II signaling links loss of imprinting of IGF2 to increased cell proliferation and tumor risk. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **104**, 20926-20931.
251. Kaneda M, Okano M, Hata K, Sado T, Tsujimoto N, Li E, and Sasaki H (2004) Essential role for de novo DNA methyltransferase Dnmt3a in paternal and maternal imprinting. *Nature*, **429**, 900-903.
252. Kangaspeska S, Stride B, Metivier R, Polycarpou-Schwarz M, Ibberson D, Carmouche RP, Benes V, Gannon F, and Reid G (2008) Transient cyclical methylation of promoter DNA. *Nature*, **452**, 112-115.
253. Kantor B, Makedonski K, Shemer R, and Razin A (2003) Expression and localization of components of the histone deacetylases multiprotein repressory complexes in the mouse preimplantation embryo. *Gene Expr Patterns*, **3**, 697-702.
254. Kao HY, Downes M, Ordentlich P, and Evans RM (2000) Isolation of a novel histone deacetylase reveals that class I and class II deacetylases promote SMRT-mediated repression. *Genes Dev*, **14**, 55-66.
255. Kass SU, Goddard JP, and Adams RL (1993) Inactive chromatin spreads from a focus of methylation. *Mol Cell Biol*, **13**, 7372-7379.

256. Kato K and Gurdon JB (1993) Single-cell transplantation determines the time when *Xenopus* muscle precursor cells acquire a capacity for autonomous differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 1310-1314.
257. Kerr SJ and Borek E (1973) Regulation of the tRNA methyltransferases in normal and neoplastic tissues. *Adv Enzyme Regul*, **11**, 63-77.
258. Khorasanizadeh S (2004) The nucleosome: from genomic organization to genomic regulation. *Cell*, **116**, 259-272.
259. Khosla S, Aitchison A, Gregory R, Allen ND, and Feil R (1999) Parental allele-specific chromatin configuration in a boundary-imprinting-control element upstream of the mouse H19 gene. *Mol Cell Biol*, **19**, 2556-2566.
260. Kiefer H, Chatail-Hermitte F, Ravassard P, Bayard E, Brunet I, and Mallet J (2005) ZENON, a novel POZ Kruppel-like DNA binding protein associated with differentiation and/or survival of late postmitotic neurons. *Mol Cell Biol*, **25**, 1713-1729.
261. Kim GD, Ni J, Kelesoglu N, Roberts RJ, and Pradhan S (2002) Co-operation and communication between the human maintenance and de novo DNA (cytosine-5) methyltransferases. *EMBO J*, **21**, 4183-4195.
262. Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, Harley CB, West MD, Ho PL, Coviello GM, Wright WE, Weinrich SL, and Shay JW (1994) Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science*, **266**, 2011-2015.
263. Kim SH, Kang YK, Koo DB, Kang MJ, Moon SJ, Lee KK, and Han YM (2004) Differential DNA methylation reprogramming of various repetitive sequences in mouse preimplantation embryos. *Biochem Biophys Res Commun*, **324**, 58-63.
264. Kimura H and Shiota K (2003) Methyl-CpG-binding protein, MeCP2, is a target molecule for maintenance DNA methyltransferase, Dnmt1. *J Biol Chem*, **278**, 4806-4812.
265. Klose RJ and Bird AP (2004) MeCP2 behaves as an elongated monomer that does not stably associate with the Sin3a chromatin remodeling complex. *J Biol Chem*, **279**, 46490-46496.
266. Klose RJ and Bird AP (2006) Genomic DNA methylation: the mark and its mediators. *Trends Biochem Sci*, **31**, 89-97.
267. Klose RJ, Sarraf SA, Schmiedeberg L, McDermott SM, Stancheva I, and Bird AP (2005) DNA binding selectivity of MeCP2 due to a requirement for A/T sequences adjacent to methyl-CpG. *Mol Cell*, **19**, 667-678.
268. Kn H, Bassal S, Tikellis C, and El Osta A (2004) Expression analysis of the epigenetic methyltransferases and methyl-CpG binding protein families in the normal B-cell and B-cell chronic lymphocytic leukemia (CLL). *Cancer Biol Ther*, **3**, 989-994.
269. Koch C and Stratling WH (2004) DNA binding of methyl-CpG-binding protein MeCP2 in human MCF7 cells. *Biochemistry*, **43**, 5011-5021.
270. Kochanek S, Toth M, Dehmel A, Renz D, and Doerfler W (1990) Interindividual concordance of methylation profiles in human genes for tumor necrosis factors alpha and beta. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **87**, 8830-8834.
271. Koizume S, Tachibana K, Sekiya T, Hirohashi S, and Shiraishi M (2002) Heterogeneity in the modification and involvement of chromatin components of the CpG island of the silenced human CDH1 gene in cancer cells. *Nucleic Acids Res*, **30**, 4770-4780.

272. Kokura K, Kaul SC, Wadhwa R, Nomura T, Khan MM, Shinagawa T, Yasukawa T, Colmenares C, and Ishii S (2001) The Ski protein family is required for MeCP2-mediated transcriptional repression. *J Biol Chem*, **276**, 34115-34121.
273. Kondo E, Gu Z, Horii A, and Fukushige S (2005) The thymine DNA glycosylase MBD4 represses transcription and is associated with methylated p16(INK4a) and hMLH1 genes. *Mol Cell Biol*, **25**, 4388-4396.
274. Kornberg RD and Lorch Y (1999) Twenty-five years of the nucleosome, fundamental particle of the eukaryote chromosome. *Cell*, **98**, 285-294.
275. Kriaucionis S and Bird A (2004) The major form of MeCP2 has a novel N-terminus generated by alternative splicing. *Nucleic Acids Res*, **32**, 1818-1823.
276. Kudo S (1998) Methyl-CpG-binding protein MeCP2 represses Sp1-activated transcription of the human leukosialin gene when the promoter is methylated. *Mol Cell Biol*, **18**, 5492-5499.
277. Kuhnlein U, Linn S, and Arber W (1969) Host specificity of DNA produced by *Escherichia coli*. XI. In vitro modification of phage fd replicative form. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **63**, 556-562.
278. Laherty CD, Billin AN, Lavinsky RM, Yochum GS, Bush AC, Sun JM, Mullen TM, Davie JR, Rose DW, Glass CK, Rosenfeld MG, Ayer DE, and Eisenman RN (1998) SAP30, a component of the mSin3 corepressor complex involved in N-CoR-mediated repression by specific transcription factors. *Mol Cell*, **2**, 33-42.
279. Laird PW (2003) The power and the promise of DNA methylation markers. *Nat Rev Cancer*, **3**, 253-266.
280. Laird PW, Jackson-Grusby L, Fazeli A, Dickinson SL, Jung WE, Li E, Weinberg RA, and Jaenisch R (1995) Suppression of intestinal neoplasia by DNA hypomethylation. *Cell*, **81**, 197-205.
281. Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, Devon K, Dewar K, Doyle M, FitzHugh W, Funke R, Gage D, Harris K, Heaford A, Howland J, Kann L, Lehoczky J, LeVine R, McEwan P, McKernan K, Meldrim J, Mesirov JP, Miranda C, Morris W, Naylor J, Raymond C, Rosetti M, Santos R, Sheridan A, Sougnez C, Stange-Thomann N, Stojanovic N, Subramanian A, Wyman D, Rogers J, Sulston J, Ainscough R, Beck S, Bentley D, Burton J, Clee C, Carter N, Coulson A, Deadman R, Deloukas P, Dunham A, Dunham I, Durbin R, French L, Grafham D, Gregory S, Hubbard T, Humphray S, Hunt A, Jones M, Lloyd C, McMurray A, Matthews L, Mercer S, Milne S, Mullikin JC, Mungall A, Plumb R, Ross M, Shownkeen R, Sims S, Waterston RH, Wilson RK, Hillier LW, McPherson JD, Marra MA, Mardis ER, Fulton LA, Chinwalla AT, Pepin KH, Gish WR, Chissoe SL, Wendl MC, Delehaunty KD, Miner TL, Delehaunty A, Kramer JB, Cook LL, Fulton RS, Johnson DL, Minx PJ, Clifton SW, Hawkins T, Branscomb E, Predki P, Richardson P, Wenning S, Slezak T, Doggett N, Cheng JF, Olsen A, Lucas S, Elkin C, Uberbacher E, Frazier M, Gibbs RA, Muzny DM, Scherer SE, Bouck JB, Sodergren EJ, Worley KC, Rives CM, Gorrell JH, Metzker ML, Naylor SL, Kucherlapati RS, Nelson DL, Weinstock GM, Sakaki Y, Fujiyama A, Hattori M, Yada T, Toyoda A, Itoh T, Kawagoe C, Watanabe H, Totoki Y, Taylor T, Weissenbach J, Heilig R, Saurin W, Artiguenave F, Brottier P, Bruls T, Pelletier E, Robert C, Wincker P, Smith DR, Doucette-Stamm L, Rubenfield M, Weinstock K, Lee HM, Dubois J, Rosenthal A, Platzer M, Nyakatura G, Taudien S, Rump A, Yang H, Yu J, Wang J, Huang G, Gu J, Hood L, Rowen L, Madan A, Qin S, Davis RW, Federspiel NA, Abola AP, Proctor MJ, Myers RM, Schmutz J, Dickson M, Grimwood J, Cox DR, Olson MV, Kaul R, Raymond C, Shimizu N, Kawasaki K,

- Minoshima S, Evans GA, Athanasiou M, Schultz R, Roe BA, Chen F, Pan H, Ramser J, Lehrach H, Reinhardt R, McCombie WR, de la BM, Dedhia N, Blocker H, Hornischer K, Nordsiek G, Agarwala R, Aravind L, Bailey JA, Bateman A, Batzoglou S, Birney E, Bork P, Brown DG, Burge CB, Cerutti L, Chen HC, Church D, Clamp M, Copley RR, Doerks T, Eddy SR, Eichler EE, Furey TS, Galagan J, Gilbert JG, Harmon C, Hayashizaki Y, Haussler D, Hermjakob H, Hokamp K, Jang W, Johnson LS, Jones TA, Kasif S, Kasprzyk A, Kennedy S, Kent WJ, Kitts P, Koonin EV, Korf I, Kulp D, Lancet D, Lowe TM, McLysaght A, Mikkelsen T, Moran JV, Mulder N, Pollara VJ, Ponting CP, Schuler G, Schultz J, Slater G, Smit AF, Stupka E, Szustakowski J, Thierry-Mieg D, Thierry-Mieg J, Wagner L, Wallis J, Wheeler R, Williams A, Wolf YI, Wolfe KH, Yang SP, Yeh RF, Collins F, Guyer MS, Peterson J, Felsenfeld A, Wetterstrand KA, Patrinos A, Morgan MJ, de Jong P, Catanese JJ, Osoegawa K, Shizuya H, Choi S, and Chen YJ (2001) Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*, **409**, 860-921.
282. Lane N, Dean W, Erhardt S, Hajkova P, Surani A, Walter J, and Reik W (2003) Resistance of IAPs to methylation reprogramming may provide a mechanism for epigenetic inheritance in the mouse. *Genesis*, **35**, 88-93.
283. Lauster R, Trautner TA, and Noyer-Weidner M (1989) Cytosine-specific type II DNA methyltransferases. A conserved enzyme core with variable target-recognizing domains. *J Mol Biol*, **206**, 305-312.
284. Lee WH, Morton RA, Epstein JI, Brooks JD, Campbell PA, Bova GS, Hsieh WS, Isaacs WB, and Nelson WG (1994) Cytidine methylation of regulatory sequences near the pi-class glutathione S-transferase gene accompanies human prostatic carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 11733-11737.
285. Lei H, Oh SP, Okano M, Juttermann R, Goss KA, Jaenisch R, and Li E (1996) De novo DNA cytosine methyltransferase activities in mouse embryonic stem cells. *Development*, **122**, 3195-3205.
286. Lembo F, Pero R, Angrisano T, Vitiello C, Iuliano R, Bruni CB, and Chiariotti L (2003) MBDin, a novel MBD2-interacting protein, relieves MBD2 repression potential and reactivates transcription from methylated promoters. *Mol Cell Biol*, **23**, 1656-1665.
287. Leonhardt H, Page AW, Weier HU, and Bestor TH (1992) A targeting sequence directs DNA methyltransferase to sites of DNA replication in mammalian nuclei. *Cell*, **71**, 865-873.
288. Lewis A, Mitsuya K, Umlauf D, Smith P, Dean W, Walter J, Higgins M, Feil R, and Reik W (2004) Imprinting on distal chromosome 7 in the placenta involves repressive histone methylation independent of DNA methylation. *Nat Genet*, **36**, 1291-1295.
289. Lewis JD, Meehan RR, Henzel WJ, Maurer-Fogy I, Jeppesen P, Klein F, and Bird A (1992) Purification, sequence, and cellular localization of a novel chromosomal protein that binds to methylated DNA. *Cell*, **69**, 905-914.
290. Li E (2002) Chromatin modification and epigenetic reprogramming in mammalian development. *Nat Rev Genet*, **3**, 662-673.
291. Li E, Beard C, and Jaenisch R (1993) Role for DNA methylation in genomic imprinting. *Nature*, **366**, 362-365.
292. Li E, Bestor TH, and Jaenisch R (1992) Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. *Cell*, **69**, 915-926.

293. Li J, Wang J, Wang J, Nawaz Z, Liu JM, Qin J, and Wong J (2000) Both corepressor proteins SMRT and N-CoR exist in large protein complexes containing HDAC3. *EMBO J*, **19**, 4342-4350.
294. Li YQ, Zhou PZ, Zheng XD, Walsh CP, and Xu GL (2007) Association of Dnmt3a and thymine DNA glycosylase links DNA methylation with base-excision repair. *Nucleic Acids Res*, **35**, 390-400.
295. Liang G, Chan MF, Tomigahara Y, Tsai YC, Gonzales FA, Li E, Laird PW, and Jones PA (2002) Cooperativity between DNA methyltransferases in the maintenance methylation of repetitive elements. *Mol Cell Biol*, **22**, 480-491.
296. Likhite VS, Cass EI, Anderson SD, Yates JR, and Nardulli AM (2004) Interaction of estrogen receptor alpha with 3-methyladenine DNA glycosylase modulates transcription and DNA repair. *J Biol Chem*, **279**, 16875-16882.
297. Lin X and Nelson WG (2003) Methyl-CpG-binding domain protein-2 mediates transcriptional repression associated with hypermethylated GSTP1 CpG islands in MCF-7 breast cancer cells. *Cancer Res*, **63**, 498-504.
298. Liu H, Jin G, Wang H, Wu W, Liu Y, Qian J, Fan W, Ma H, Miao R, Hu Z, Sun W, Wang Y, Jin L, Wei Q, Shen H, Huang W, and Lu D (2008) Methyl-CpG binding domain 1 gene polymorphisms and lung cancer risk in a Chinese population. *Biomarkers*, **13**, 607-617.
299. Liu XF and Bagchi MK (2004) Recruitment of distinct chromatin-modifying complexes by tamoxifen-complexed estrogen receptor at natural target gene promoters in vivo. *J Biol Chem*, **279**, 15050-15058.
300. Lopes EC, Valls E, Figueroa ME, Mazur A, Meng FG, Chiosis G, Laird PW, Schreiber-Agus N, Grealley JM, Prokhortchouk E, and Melnick A (2008) Kaiso contributes to DNA methylation-dependent silencing of tumor suppressor genes in colon cancer cell lines. *Cancer Res*, **68**, 7258-7263.
301. Lopez-Serra L, Ballestar E, Fraga MF, Alaminos M, Setien F, and Esteller M (2006) A profile of methyl-CpG binding domain protein occupancy of hypermethylated promoter CpG islands of tumor suppressor genes in human cancer. *Cancer Res*, **66**, 8342-8346.
302. Lopez-Serra L, Ballestar E, Roperio S, Setien F, Billard LM, Fraga MF, Lopez-Nieva P, Alaminos M, Guerrero D, Dante R, and Esteller M (2008) Unmasking of epigenetically silenced candidate tumor suppressor genes by removal of methyl-CpG-binding domain proteins. *Oncogene*, **27**, 3556-3566.
303. Lorincz MC, Dickerson DR, Schmitt M, and Groudine M (2004) Intragenic DNA methylation alters chromatin structure and elongation efficiency in mammalian cells. *Nat Struct Mol Biol*, **11**, 1068-1075.
304. Luger K, Mader AW, Richmond RK, Sargent DF, and Richmond TJ (1997) Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature*, **389**, 251-260.
305. Lunyak VV, Burgess R, Prefontaine GG, Nelson C, Sze SH, Chenoweth J, Schwartz P, Pevzner PA, Glass C, Mandel G, and Rosenfeld MG (2002) Corepressor-dependent silencing of chromosomal regions encoding neuronal genes. *Science*, **298**, 1747-1752.
306. Luo J, Su F, Chen D, Shiloh A, and Gu W (2000) Deacetylation of p53 modulates its effect on cell growth and apoptosis. *Nature*, **408**, 377-381.
307. Lusser A, Brosch G, Lopez-Rodas G, and Loidl P (1997) Histone acetyltransferases during the cell cycle and differentiation of *Physarum polycephalum*. *Eur J Cell Biol*, **74**, 102-110.

308. Lyko F and Brown R (2005) DNA methyltransferase inhibitors and the development of epigenetic cancer therapies. *J Natl Cancer Inst*, **97**, 1498-1506.
309. Lyko F, Ramsahoye BH, and Jaenisch R (2000) DNA methylation in *Drosophila melanogaster*. *Nature*, **408**, 538-540.
310. Lyko F, Ramsahoye BH, Kashevsky H, Tudor M, Mastrangelo MA, Orr-Weaver TL, and Jaenisch R (1999) Mammalian (cytosine-5) methyltransferases cause genomic DNA methylation and lethality in *Drosophila*. *Nat Genet*, **23**, 363-366.
311. Lynch CA, Tycko B, Bestor TH, and Walsh CP (2002) Reactivation of a silenced H19 gene in human rhabdomyosarcoma by demethylation of DNA but not by histone hyperacetylation. *Mol Cancer*, **1**, 2.
312. LYON MF (1961) Gene action in the X-chromosome of the mouse (*Mus musculus* L.). *Nature*, **190**, 372-373.
313. Lyst MJ, Nan X, and Stancheva I (2006) Regulation of MBD1-mediated transcriptional repression by SUMO and PIAS proteins. *EMBO J*, **25**, 5317-5328.
314. Mack GS (2006) Epigenetic cancer therapy makes headway. *J Natl Cancer Inst*, **98**, 1443-1444.
315. Macville M, Schrock E, Padilla-Nash H, Keck C, Ghadimi BM, Zimonjic D, Popescu N, and Ried T (1999) Comprehensive and definitive molecular cytogenetic characterization of HeLa cells by spectral karyotyping. *Cancer Res*, **59**, 141-150.
316. Magdinier F and Wolffe AP (2001) Selective association of the methyl-CpG binding protein MBD2 with the silent p14/p16 locus in human neoplasia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 4990-4995.
317. Majumder S, Kutay H, Datta J, Summers D, Jacob ST, and Ghoshal K (2006) Epigenetic regulation of metallothionein-i gene expression: differential regulation of methylated and unmethylated promoters by DNA methyltransferases and methyl CpG binding proteins. *J Cell Biochem*, **97**, 1300-1316.
318. Makar KW, Perez-Melgosa M, Shnyreva M, Weaver WM, Fitzpatrick DR, and Wilson CB (2003) Active recruitment of DNA methyltransferases regulates interleukin 4 in thymocytes and T cells. *Nat Immunol*, **4**, 1183-1190.
319. Malone CS, Miner MD, Doerr JR, Jackson JP, Jacobsen SE, Wall R, and Teitell M (2001) CmC(A/T)GG DNA methylation in mature B cell lymphoma gene silencing. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 10404-10409.
320. Mandel JL and Chambon P (1979) DNA methylation: organ specific variations in the methylation pattern within and around ovalbumin and other chicken genes. *Nucleic Acids Res*, **7**, 2081-2103.
321. Mandrioli M and Volpi N (2003) The genome of the lepidopteran *Mamestra brassicae* has a vertebrate-like content of methyl-cytosine. *Genetica*, **119**, 187-191.
322. Marhold J, Kramer K, Kremmer E, and Lyko F (2004) The *Drosophila* MBD2/3 protein mediates interactions between the MI-2 chromatin complex and CpT/A-methylated DNA. *Development*, **131**, 6033-6039.
323. Martens JA and Winston F (2002) Evidence that Swi/Snf directly represses transcription in *S. cerevisiae*. *Genes Dev*, **16**, 2231-2236.

324. Martin C, I, Hansen J, Leaford D, Pollard S, and Hendrich BD (2009) The methyl-CpG binding proteins MeCP2, Mbd2 and Kaiso are dispensable for mouse embryogenesis, but play a redundant function in neural differentiation. *PLoS One*, **4**, e4315.
325. Martin V, Ribieras S, Rio MC, and Dante R (1998) The estrogen responsive element of the pS2 gene is recognized by a methylation sensitive DNA binding protein. *Biol Chem*, **379**, 409-416.
326. Martin V, Ribieras S, Song-Wang XG, Lasne Y, Frappart L, Rio MC, and Dante R (1997) Involvement of DNA methylation in the control of the expression of an estrogen-induced breast-cancer-associated protein (pS2) in human breast cancers. *J Cell Biochem*, **65**, 95-106.
327. Martinowich K, Hattori D, Wu H, Fouse S, He F, Hu Y, Fan G, and Sun YE (2003) DNA methylation-related chromatin remodeling in activity-dependent BDNF gene regulation. *Science*, **302**, 890-893.
328. Matarazzo V and Ronnett GV (2004) Temporal and regional differences in the olfactory proteome as a consequence of MeCP2 deficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 7763-7768.
329. Mayer W, Niveleau A, Walter J, Fundele R, and Haaf T (2000) Demethylation of the zygotic paternal genome. *Nature*, **403**, 501-502.
330. McGhee JD and Ginder GD (1979) Specific DNA methylation sites in the vicinity of the chicken beta-globin genes. *Nature*, **280**, 419-420.
331. McGrath J and Solter D (1984) Completion of mouse embryogenesis requires both the maternal and paternal genomes. *Cell*, **37**, 179-183.
332. Meehan RR, Lewis JD, and Bird AP (1992) Characterization of MeCP2, a vertebrate DNA binding protein with affinity for methylated DNA. *Nucleic Acids Res*, **20**, 5085-5092.
333. Meehan RR, Lewis JD, McKay S, Kleiner EL, and Bird AP (1989) Identification of a mammalian protein that binds specifically to DNA containing methylated CpGs. *Cell*, **58**, 499-507.
334. Mehlen P and Thibert C (2004) Dependence receptors: between life and death. *Cell Mol Life Sci*, **61**, 1854-1866.
335. Menoyo A, Alazzouzi H, Espin E, Armengol M, Yamamoto H, and Schwartz S Jr (2001) Somatic mutations in the DNA damage-response genes ATR and CHK1 in sporadic stomach tumors with microsatellite instability. *Cancer Res*, **61**, 7727-7730.
336. Mertineit C, Yoder JA, Taketo T, Laird DW, Trasler JM, and Bestor TH (1998) Sex-specific exons control DNA methyltransferase in mammalian germ cells. *Development*, **125**, 889-897.
337. Metivier R, Gallais R, Tiffoche C, Le Peron C, Jurkowska RZ, Carmouche RP, Ibberson D, Barath P, Demay F, Reid G, Benes V, Jeltsch A, Gannon F, and Salbert G (2008) Cyclical DNA methylation of a transcriptionally active promoter. *Nature*, **452**, 45-50.
338. Metivier R, Penot G, Carmouche RP, Hubner MR, Reid G, Denger S, Manu D, Brand H, Kos M, Benes V, and Gannon F (2004) Transcriptional complexes engaged by apo-estrogen receptor-alpha isoforms have divergent outcomes. *EMBO J*, **23**, 3653-3666.
339. Meyers M, Wagner MW, Hwang HS, Kinsella TJ, and Boothman DA (2001) Role of the hMLH1 DNA mismatch repair protein in fluoropyrimidine-mediated cell death and cell cycle responses. *Cancer Res*, **61**, 5193-5201.

340. Millar CB, Guy J, Sansom OJ, Selfridge J, MacDougall E, Hendrich B, Keightley PD, Bishop SM, Clarke AR, and Bird A (2002) Enhanced CpG mutability and tumorigenesis in MBD4-deficient mice. *Science*, **297**, 403-405.
341. Miller AP and Willard HF (1998) Chromosomal basis of X chromosome inactivation: identification of a multigene domain in Xp11.21-p11.22 that escapes X inactivation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 8709-8714.
342. Missero C, Pirro MT, Simeone S, Pischetola M, and Di Lauro R (2001) The DNA glycosylase T:G mismatch-specific thymine DNA glycosylase represses thyroid transcription factor-1-activated transcription. *J Biol Chem*, **276**, 33569-33575.
343. Mnatzakanian GN, Lohi H, Munteanu I, Alfred SE, Yamada T, MacLeod PJ, Jones JR, Scherer SW, Schanen NC, Friez MJ, Vincent JB, and Minassian BA (2004) A previously unidentified MECP2 open reading frame defines a new protein isoform relevant to Rett syndrome. *Nat Genet*, **36**, 339-341.
344. Monk M (1995) Epigenetic programming of differential gene expression in development and evolution. *Dev Genet*, **17**, 188-197.
345. Monk M, Boubelik M, and Lehnert S (1987) Temporal and regional changes in DNA methylation in the embryonic, extraembryonic and germ cell lineages during mouse embryo development. *Development*, **99**, 371-382.
346. Morel AP, Lievre M, Thomas C, Hinkal G, Ansieau S, and Puisieux A (2008) Generation of breast cancer stem cells through epithelial-mesenchymal transition. *PLoS One*, **3**, e2888.
347. Morgan HD, Santos F, Green K, Dean W, and Reik W (2005) Epigenetic reprogramming in mammals. *Hum Mol Genet*, **14 Spec No 1**, R47-R58.
348. Morgan HD, Sutherland HG, Martin DI, and Whitelaw E (1999) Epigenetic inheritance at the agouti locus in the mouse. *Nat Genet*, **23**, 314-318.
349. Mori T, Li Y, Hata H, Ono K, and Kochi H (2002) NIRF, a novel RING finger protein, is involved in cell-cycle regulation. *Biochem Biophys Res Commun*, **296**, 530-536.
350. Morris VB, Brammall J, Noble J, and Reddel R (2000) p53 localizes to the centrosomes and spindles of mitotic cells in the embryonic chick epiblast, human cell lines, and a human primary culture: An immunofluorescence study. *Exp Cell Res*, **256**, 122-130.
351. Moulton T, Crenshaw T, Hao Y, Moosikasuwon J, Lin N, Dembitzer F, Hensle T, Weiss L, McMorro L, Loew T, and . (1994) Epigenetic lesions at the H19 locus in Wilms' tumour patients. *Nat Genet*, **7**, 440-447.
352. Mulero-Navarro S and Esteller M (2008) Epigenetic biomarkers for human cancer: the time is now. *Crit Rev Oncol Hematol*, **68**, 1-11.
353. Muller HM, Fiegl H, Goebel G, Hubalek MM, Widschwendter A, Muller-Holzner E, Marth C, and Widschwendter M (2003) MeCP2 and MBD2 expression in human neoplastic and non-neoplastic breast tissue and its association with oestrogen receptor status. *Br J Cancer*, **89**, 1934-1939.
354. Muller-Tidow C, Kugler K, Diederichs S, Klumpen S, Moller M, Vogt U, Metzger R, Schneider PM, Berdel WE, and Serve H (2001) Loss of expression of HDAC-recruiting methyl-CpG-binding domain proteins in human cancer. *Br J Cancer*, **85**, 1168-1174.
355. Nan X, Campoy FJ, and Bird A (1997) MeCP2 is a transcriptional repressor with abundant binding sites in genomic chromatin. *Cell*, **88**, 471-481.

356. Nan X, Hou J, Maclean A, Nasir J, Lafuente MJ, Shu X, Kriaucionis S, and Bird A (2007) Interaction between chromatin proteins MECP2 and ATRX is disrupted by mutations that cause inherited mental retardation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **104**, 2709-2714.
357. Nan X, Meehan RR, and Bird A (1993) Dissection of the methyl-CpG binding domain from the chromosomal protein MeCP2. *Nucleic Acids Res*, **21**, 4886-4892.
358. Nan X, Ng HH, Johnson CA, Laherty CD, Turner BM, Eisenman RN, and Bird A (1998) Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. *Nature*, **393**, 386-389.
359. Nan X, Tate P, Li E, and Bird A (1996) DNA methylation specifies chromosomal localization of MeCP2. *Mol Cell Biol*, **16**, 414-421.
360. Narayan A, Ji W, Zhang XY, Marrogi A, Graff JR, Baylin SB, and Ehrlich M (1998) Hypomethylation of pericentromeric DNA in breast adenocarcinomas. *Int J Cancer*, **77**, 833-838.
361. Nephew KP and Huang TH (2003) Epigenetic gene silencing in cancer initiation and progression. *Cancer Lett*, **190**, 125-133.
362. Ng HH, Jeppesen P, and Bird A (2000) Active repression of methylated genes by the chromosomal protein MBD1. *Mol Cell Biol*, **20**, 1394-1406.
363. Ng HH, Zhang Y, Hendrich B, Johnson CA, Turner BM, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Reinberg D, and Bird A (1999) MBD2 is a transcriptional repressor belonging to the MeCP1 histone deacetylase complex. *Nat Genet*, **23**, 58-61.
364. Ng RK and Gurdon JB (2005a) Epigenetic memory of active gene transcription is inherited through somatic cell nuclear transfer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 1957-1962.
365. Ng RK and Gurdon JB (2005b) Maintenance of epigenetic memory in cloned embryos. *Cell Cycle*, **4**, 760-763.
366. Ng RK and Gurdon JB (2008) Epigenetic memory of an active gene state depends on histone H3.3 incorporation into chromatin in the absence of transcription. *Nat Cell Biol*, **10**, 102-109.
367. Nguyen CT, Gonzales FA, and Jones PA (2001) Altered chromatin structure associated with methylation-induced gene silencing in cancer cells: correlation of accessibility, methylation, MeCP2 binding and acetylation. *Nucleic Acids Res*, **29**, 4598-4606.
368. Nikitina T, Ghosh RP, Horowitz-Scherer RA, Hansen JC, Grigoryev SA, and Woodcock CL (2007a) MeCP2-chromatin interactions include the formation of chromatosome-like structures and are altered in mutations causing Rett syndrome. *J Biol Chem*, **282**, 28237-28245.
369. Nikitina T, Shi X, Ghosh RP, Horowitz-Scherer RA, Hansen JC, and Woodcock CL (2007b) Multiple modes of interaction between the methylated DNA binding protein MeCP2 and chromatin. *Mol Cell Biol*, **27**, 864-877.
370. NIRENBERG MW and MATTHAEI JH (1961) The dependence of cell-free protein synthesis in *E. coli* upon naturally occurring or synthetic polyribonucleotides. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **47**, 1588-1602.
371. Noh EJ, Lim DS, and Lee JS (2009) A novel role for methyl CpG-binding domain protein 3, a component of the histone deacetylase complex, in regulation of cell cycle progression and cell death. *Biochem Biophys Res Commun*, **378**, 332-337.

372. Ohki I, Shimotake N, Fujita N, Jee J, Ikegami T, Nakao M, and Shirakawa M (2001) Solution structure of the methyl-CpG binding domain of human MBD1 in complex with methylated DNA. *Cell*, **105**, 487-497.
373. Ohki I, Shimotake N, Fujita N, Nakao M, and Shirakawa M (1999) Solution structure of the methyl-CpG-binding domain of the methylation-dependent transcriptional repressor MBD1. *EMBO J*, **18**, 6653-6661.
374. Okamoto I, Otte AP, Allis CD, Reinberg D, and Heard E (2004) Epigenetic dynamics of imprinted X inactivation during early mouse development. *Science*, **303**, 644-649.
375. Okano M, Bell DW, Haber DA, and Li E (1999) DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell*, **99**, 247-257.
376. Okano M, Xie S, and Li E (1998a) Dnmt2 is not required for de novo and maintenance methylation of viral DNA in embryonic stem cells. *Nucleic Acids Res*, **26**, 2536-2540.
377. Okano M, Xie S, and Li E (1998b) Cloning and characterization of a family of novel mammalian DNA (cytosine-5) methyltransferases. *Nat Genet*, **19**, 219-220.
378. Oki Y and Issa JP (2007) Treatment options in advanced myelodysplastic syndrome, with emphasis on epigenetic therapy. *Int J Hematol*, **86**, 306-314.
379. Olek A and Walter J (1997) The pre-implantation ontogeny of the H19 methylation imprint. *Nat Genet*, **17**, 275-276.
380. Ooi SK and Bestor TH (2008) The colorful history of active DNA demethylation. *Cell*, **133**, 1145-1148.
381. Oswald J, Engemann S, Lane N, Mayer W, Olek A, Fundele R, Dean W, Reik W, and Walter J (2000) Active demethylation of the paternal genome in the mouse zygote. *Curr Biol*, **10**, 475-478.
382. Oue N, Kuraoka K, Kuniyasu H, Yokozaki H, Wakikawa A, Matsusaki K, and Yasui W (2001) DNA methylation status of hMLH1, p16(INK4a), and CDH1 is not associated with mRNA expression levels of DNA methyltransferase and DNA demethylase in gastric carcinomas. *Oncol Rep*, **8**, 1085-1089.
383. Palmer BR and Marinus MG (1994) The dam and dcm strains of Escherichia coli--a review. *Gene*, **143**, 1-12.
384. Pan L, Lu J, Wang X, Han L, Zhang Y, Han S, and Huang B (2007) Histone deacetylase inhibitor trichostatin a potentiates doxorubicin-induced apoptosis by up-regulating PTEN expression. *Cancer*, **109**, 1676-1688.
385. Pao MM, Tsutsumi M, Liang G, Uzvolgyi E, Gonzales FA, and Jones PA (2001) The endothelin receptor B (EDNRB) promoter displays heterogeneous, site specific methylation patterns in normal and tumor cells. *Hum Mol Genet*, **10**, 903-910.
386. Papait R, Pistore C, Negri D, Pecoraro D, Cantarini L, and Bonapace IM (2007) Np95 is implicated in pericentromeric heterochromatin replication and in major satellite silencing. *Mol Biol Cell*, **18**, 1098-1106.
387. Park JI, Kim SW, Lyons JP, Ji H, Nguyen TT, Cho K, Barton MC, Deroo T, Vleminckx K, Moon RT, and McCrea PD (2005) Kaiso/p120-catenin and TCF/beta-catenin complexes coordinately regulate canonical Wnt gene targets. *Dev Cell*, **8**, 843-854.
388. Parsons BL (2003) MED1: a central molecule for maintenance of genome integrity and response to DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 14601-14602.

389. Patra SK, Patra A, Zhao H, Carroll P, and Dahiya R (2003) Methyl-CpG-DNA binding proteins in human prostate cancer: expression of CXXC sequence containing MBD1 and repression of MBD2 and MeCP2. *Biochem Biophys Res Commun*, **302**, 759-766.
390. Paz MF, Fraga MF, Avila S, Guo M, Pollan M, Herman JG, and Esteller M (2003) A systematic profile of DNA methylation in human cancer cell lines. *Cancer Res*, **63**, 1114-1121.
391. Pelka GJ, Watson CM, Christodoulou J, and Tam PP (2005) Distinct expression profiles of Mecp2 transcripts with different lengths of 3'UTR in the brain and visceral organs during mouse development. *Genomics*, **85**, 441-452.
392. Percy AK (2002) Rett syndrome. Current status and new vistas. *Neurol Clin*, **20**, 1125-1141.
393. Perry JK, Kannan N, Grandison PM, Mitchell MD, and Lobie PE (2008) Are trefoil factors oncogenic? *Trends Endocrinol Metab*, **19**, 74-81.
394. Petronzelli F, Riccio A, Markham GD, Seeholzer SH, Genuardi M, Karbowski M, Yeung AT, Matsumoto Y, and Bellacosa A (2000) Investigation of the substrate spectrum of the human mismatch-specific DNA N-glycosylase MED1 (MBD4): fundamental role of the catalytic domain. *J Cell Physiol*, **185**, 473-480.
395. Pfeifer GP (2006) Mutagenesis at methylated CpG sequences. *Curr Top Microbiol Immunol*, **301**, 259-281.
396. Pheesse TJ, Parry L, Reed KR, Ewan KB, Dale TC, Sansom OJ, and Clarke AR (2008) Deficiency of Mbd2 attenuates Wnt signaling. *Mol Cell Biol*, **28**, 6094-6103.
397. Pinto M, Wu Y, Mensink RG, Cirnes L, Seruca R, and Hofstra RM (2008) Somatic mutations in mismatch repair genes in sporadic gastric carcinomas are not a cause but a consequence of the mutator phenotype. *Cancer Genet Cytogenet*, **180**, 110-114.
398. Plath K, Mlynarczyk-Evans S, Nusinow DA, and Panning B (2002) Xist RNA and the mechanism of X chromosome inactivation. *Annu Rev Genet*, **36**, 233-278.
399. Posfai J, Bhagwat AS, Posfai G, and Roberts RJ (1989) Predictive motifs derived from cytosine methyltransferases. *Nucleic Acids Res*, **17**, 2421-2435.
400. Pradhan S and Esteve PO (2003) Mammalian DNA (cytosine-5) methyltransferases and their expression. *Clin Immunol*, **109**, 6-16.
401. Pradhan S and Roberts RJ (2000) Hybrid mouse-prokaryotic DNA (cytosine-5) methyltransferases retain the specificity of the parental C-terminal domain. *EMBO J*, **19**, 2103-2114.
402. Pradhan S, Bacolla A, Wells RD, and Roberts RJ (1999) Recombinant human DNA (cytosine-5) methyltransferase. I. Expression, purification, and comparison of de novo and maintenance methylation. *J Biol Chem*, **274**, 33002-33010.
403. Prokhortchouk A, Hendrich B, Jorgensen H, Ruzov A, Wilm M, Georgiev G, Bird A, and Prokhortchouk E (2001) The p120 catenin partner Kaiso is a DNA methylation-dependent transcriptional repressor. *Genes Dev*, **15**, 1613-1618.
404. Qiu C, Sawada K, Zhang X, and Cheng X (2002) The PWWP domain of mammalian DNA methyltransferase Dnmt3b defines a new family of DNA-binding folds. *Nat Struct Biol*, **9**, 217-224.

405. Qu G, Dubeau L, Narayan A, Yu MC, and Ehrlich M (1999) Satellite DNA hypomethylation vs. overall genomic hypomethylation in ovarian epithelial tumors of different malignant potential. *Mutat Res*, **423**, 91-101.
406. Quaderi NA, Meehan RR, Tate PH, Cross SH, Bird AP, Chatterjee A, Herman GE, and Brown SD (1994) Genetic and physical mapping of a gene encoding a methyl CpG binding protein, Mecp2, to the mouse X chromosome. *Genomics*, **22**, 648-651.
407. Ramsahoye BH, Biniszkiwicz D, Lyko F, Clark V, Bird AP, and Jaenisch R (2000) Non-CpG methylation is prevalent in embryonic stem cells and may be mediated by DNA methyltransferase 3a. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 5237-5242.
408. Razin A and Kafri T (1994) DNA methylation from embryo to adult. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*, **48**, 53-81.
409. Razin A and Shemer R (1995) DNA methylation in early development. *Hum Mol Genet*, **4 Spec No**, 1751-1755.
410. Reese BE, Bachman KE, Baylin SB, and Rountree MR (2003) The methyl-CpG binding protein MBD1 interacts with the p150 subunit of chromatin assembly factor 1. *Mol Cell Biol*, **23**, 3226-3236.
411. Reichwald K, Thiesen J, Wiehe T, Weitzel J, Poustka WA, Rosenthal A, Platzer M, Stratling WH, and Kioschis P (2000) Comparative sequence analysis of the MECP2-locus in human and mouse reveals new transcribed regions. *Mamm Genome*, **11**, 182-190.
412. Reik W, Dean W, and Walter J (2001) Epigenetic reprogramming in mammalian development. *Science*, **293**, 1089-1093.
413. Renaud S, Loukinov D, Abdullaev Z, Guilleret I, Bosman FT, Lobanekov V, and Benhattar J (2007) Dual role of DNA methylation inside and outside of CTCF-binding regions in the transcriptional regulation of the telomerase hTERT gene. *Nucleic Acids Res*, **35**, 1245-1256.
414. Reyes JC, Muchardt C, and Yaniv M (1997) Components of the human SWI/SNF complex are enriched in active chromatin and are associated with the nuclear matrix. *J Cell Biol*, **137**, 263-274.
415. Rhee I, Bachman KE, Park BH, Jair KW, Yen RW, Schuebel KE, Cui H, Feinberg AP, Lengauer C, Kinzler KW, Baylin SB, and Vogelstein B (2002) DNMT1 and DNMT3b cooperate to silence genes in human cancer cells. *Nature*, **416**, 552-556.
416. Rhee I, Jair KW, Yen RW, Lengauer C, Herman JG, Kinzler KW, Vogelstein B, Baylin SB, and Schuebel KE (2000) CpG methylation is maintained in human cancer cells lacking DNMT1. *Nature*, **404**, 1003-1007.
417. Rhodes K, Rippe RA, Umezawa A, Nehls M, Brenner DA, and Breindl M (1994) DNA methylation represses the murine alpha 1(I) collagen promoter by an indirect mechanism. *Mol Cell Biol*, **14**, 5950-5960.
418. Riccio A, Aaltonen LA, Godwin AK, Loukola A, Percesepe A, Salovaara R, Masciullo V, Genuardi M, Paravatou-Petsotas M, Bassi DE, Ruggeri BA, Klein-Szanto AJ, Testa JR, Neri G, and Bellacosa A (1999) The DNA repair gene MBD4 (MED1) is mutated in human carcinomas with microsatellite instability. *Nat Genet*, **23**, 266-268.
419. Rideout WM, III, Coetzee GA, Olumi AF, and Jones PA (1990) 5-Methylcytosine as an endogenous mutagen in the human LDL receptor and p53 genes. *Science*, **249**, 1288-1290.
420. Robertson KD (2005) DNA methylation and human disease. *Nat Rev Genet*, **6**, 597-610.

421. Robertson KD and Wolffe AP (2000b) DNA methylation in health and disease. *Nat Rev Genet*, **1**, 11-19.
422. Robertson KD, it-Si-Ali S, Yokochi T, Wade PA, Jones PL, and Wolffe AP (2000a) DNMT1 forms a complex with Rb, E2F1 and HDAC1 and represses transcription from E2F-responsive promoters. *Nat Genet*, **25**, 338-342.
423. Robertson KD, Uzvolgyi E, Liang G, Talmadge C, Sumegi J, Gonzales FA, and Jones PA (1999) The human DNA methyltransferases (DNMTs) 1, 3a and 3b: coordinate mRNA expression in normal tissues and overexpression in tumors. *Nucleic Acids Res*, **27**, 2291-2298.
424. Rodriguez P, Bonte E, Krijgsveld J, Kolodziej KE, Guyot B, Heck AJ, Vyas P, de Boer E, Grosveld F, and Strouboulis J (2005) GATA-1 forms distinct activating and repressive complexes in erythroid cells. *EMBO J*, **24**, 2354-2366.
425. Roloff TC, Ropers HH, and Nuber UA (2003) Comparative study of methyl-CpG-binding domain proteins. *BMC Genomics*, **4**, 1.
426. Rougier N, Bourc'his D, Gomes DM, Niveleau A, Plachot M, Paldi A, and Viegas-Pequignot E (1998) Chromosome methylation patterns during mammalian preimplantation development. *Genes Dev*, **12**, 2108-2113.
427. Rountree MR, Bachman KE, and Baylin SB (2000) DNMT1 binds HDAC2 and a new co-repressor, DMAP1, to form a complex at replication foci. *Nat Genet*, **25**, 269-277.
428. Roy PH and Weissbach A (1975) DNA methylase from HeLa cell nuclei. *Nucleic Acids Res*, **2**, 1669-1684.
429. Rusconi L, Salvatoni L, Giudici L, Bertani I, Kilstrup-Nielsen C, Broccoli V, and Landsberger N (2008) CDKL5 expression is modulated during neuronal development and its subcellular distribution is tightly regulated by the C-terminal tail. *J Biol Chem*, **283**, 30101-30111.
430. Russell GJ, Walker PM, Elton RA, and Subak-Sharpe JH (1976) Doublet frequency analysis of fractionated vertebrate nuclear DNA. *J Mol Biol*, **108**, 1-23.
431. Sado T, Okano M, Li E, and Sasaki H (2004) De novo DNA methylation is dispensable for the initiation and propagation of X chromosome inactivation. *Development*, **131**, 975-982.
432. Sahar S and Sassone-Corsi P (2007) Circadian clock and breast cancer: a molecular link. *Cell Cycle*, **6**, 1329-1331.
433. Saito Y, Kanai Y, Sakamoto M, Saito H, Ishii H, and Hirohashi S (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**, 561-568.
434. Saitoh S and Wada T (2000) Parent-of-origin specific histone acetylation and reactivation of a key imprinted gene locus in Prader-Willi syndrome. *Am J Hum Genet*, **66**, 1958-1962.
435. Sakai H, Urano T, Ookata K, Kim MH, Hirai Y, Saito M, Nojima Y, and Ishikawa F (2002) MBD3 and HDAC1, two components of the NuRD complex, are localized at Aurora-A-positive centrosomes in M phase. *J Biol Chem*, **277**, 48714-48723.
436. Samaco RC, Nagarajan RP, Braunschweig D, and Lasalle JM (2004) Multiple pathways regulate MeCP2 expression in normal brain development and exhibit defects in autism-spectrum disorders. *Hum Mol Genet*, **13**, 629-639.

437. Sandelin A, Carninci P, Lenhard B, Ponjavic J, Hayashizaki Y, and Hume DA (2007) Mammalian RNA polymerase II core promoters: insights from genome-wide studies. *Nat Rev Genet*, **8**, 424-436.
438. Sanford JP, Clark HJ, Chapman VM, and Rossant J (1987) Differences in DNA methylation during oogenesis and spermatogenesis and their persistence during early embryogenesis in the mouse. *Genes Dev*, **1**, 1039-1046.
439. Sansom OJ, Berger J, Bishop SM, Hendrich B, Bird A, and Clarke AR (2003) Deficiency of Mbd2 suppresses intestinal tumorigenesis. *Nat Genet*, **34**, 145-147.
440. Sansom OJ, Bishop SM, Bird A, and Clarke AR (2004) MBD4 deficiency does not increase mutation or accelerate tumorigenesis in mice lacking MMR. *Oncogene*, **23**, 5693-5696.
441. Sansom OJ, Bishop SM, Bird A, and Clarke AR (2005) MBD2 deficiency does not accelerate p53 mediated lymphomagenesis. *Oncogene*, **24**, 2430-2432.
442. Sansom OJ, Zabkiewicz J, Bishop SM, Guy J, Bird A, and Clarke AR (2003) MBD4 deficiency reduces the apoptotic response to DNA-damaging agents in the murine small intestine. *Oncogene*, **22**, 7130-7136.
443. Santi DV, Garrett CE, and Barr PJ (1983) On the mechanism of inhibition of DNA-cytosine methyltransferases by cytosine analogs. *Cell*, **33**, 9-10.
444. Santos F, Hendrich B, Reik W, and Dean W (2002) Dynamic reprogramming of DNA methylation in the early mouse embryo. *Dev Biol*, **241**, 172-182.
445. Sarraf SA and Stancheva I (2004) Methyl-CpG binding protein MBD1 couples histone H3 methylation at lysine 9 by SETDB1 to DNA replication and chromatin assembly. *Mol Cell*, **15**, 595-605.
446. Sasaki H, Jones PA, Chaillet JR, Ferguson-Smith AC, Barton SC, Reik W, and Surani MA (1992) Parental imprinting: potentially active chromatin of the repressed maternal allele of the mouse insulin-like growth factor II (Igf2) gene. *Genes Dev*, **6**, 1843-1856.
447. Sato M, Horio Y, Sekido Y, Minna JD, Shimokata K, and Hasegawa Y (2002) The expression of DNA methyltransferases and methyl-CpG-binding proteins is not associated with the methylation status of p14(ARF), p16(INK4a) and RASSF1A in human lung cancer cell lines. *Oncogene*, **21**, 4822-4829.
448. Schlesinger Y, Straussman R, Keshet I, Farkash S, Hecht M, Zimmerman J, Eden E, Yakhini Z, Ben Shushan E, Reubinoff BE, Bergman Y, Simon I, and Cedar H (2007) Polycomb-mediated methylation on Lys27 of histone H3 pre-marks genes for de novo methylation in cancer. *Nat Genet*, **39**, 232-236.
449. Schule B, Li HH, Fisch-Kohl C, Purmann C, and Francke U (2007) DLX5 and DLX6 expression is biallelic and not modulated by MeCP2 deficiency. *Am J Hum Genet*, **81**, 492-506.
450. Schulz WA, Elo JP, Florl AR, Pennanen S, Santourlidis S, Engers R, Buchardt M, Seifert HH, and Visakorpi T (2002) Genomewide DNA hypomethylation is associated with alterations on chromosome 8 in prostate carcinoma. *Genes Chromosomes Cancer*, **35**, 58-65.
451. Schweizer J, Zynger D, and Francke U (1999) In vivo nuclease hypersensitivity studies reveal multiple sites of parental origin-dependent differential chromatin conformation in the 150 kb SNRPN transcription unit. *Hum Mol Genet*, **8**, 555-566.

452. Sreaton RA, Kiessling S, Sansom OJ, Millar CB, Maddison K, Bird A, Clarke AR, and Frisch SM (2003) Fas-associated death domain protein interacts with methyl-CpG binding domain protein 4: a potential link between genome surveillance and apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 5211-5216.
453. Sekimata M and Homma Y (2004) Sequence-specific transcriptional repression by an MBD2-interacting zinc finger protein MIZF. *Nucleic Acids Res*, **32**, 590-597.
454. Sekimata M, Takahashi A, Murakami-Sekimata A, and Homma Y (2001) Involvement of a novel zinc finger protein, MIZF, in transcriptional repression by interacting with a methyl-CpG-binding protein, MBD2. *J Biol Chem*, **276**, 42632-42638.
455. Selker EU, Tountas NA, Cross SH, Margolin BS, Murphy JG, Bird AP, and Freitag M (2003) The methylated component of the *Neurospora crassa* genome. *Nature*, **422**, 893-897.
456. Shahbazian M, Young J, Yuva-Paylor L, Spencer C, Antalffy B, Noebels J, Armstrong D, Paylor R, and Zoghbi H (2002a) Mice with truncated MeCP2 recapitulate many Rett syndrome features and display hyperacetylation of histone H3. *Neuron*, **35**, 243-254.
457. Shahbazian MD, Antalffy B, Armstrong DL, and Zoghbi HY (2002b) Insight into Rett syndrome: MeCP2 levels display tissue- and cell-specific differences and correlate with neuronal maturation. *Hum Mol Genet*, **11**, 115-124.
458. Sharif J, Muto M, Takebayashi S, Suetake I, Iwamatsu A, Endo TA, Shinga J, Mizutani-Koseki Y, Toyoda T, Okamura K, Tajima S, Mitsuya K, Okano M, and Koseki H (2007) The SRA protein Np95 mediates epigenetic inheritance by recruiting Dnmt1 to methylated DNA. *Nature*, **450**, 908-912.
459. Sheid B, Srinivasan PR, and Borek E (1968) Deoxyribonucleic acid methylase of mammalian tissues. *Biochemistry*, **7**, 280-285.
460. Shibata H, Yoshino K, Sunahara S, Gondo Y, Katsuki M, Ueda T, Kamiya M, Muramatsu M, Murakami Y, Kalcheva I, Plass C, Chapman VM, and Hayashizaki Y (1996) Inactive allele-specific methylation and chromatin structure of the imprinted gene U2af1-rs1 on mouse chromosome 11. *Genomics*, **35**, 248-252.
461. Shimono Y, Murakami H, Hasegawa Y, and Takahashi M (2000) RET finger protein is a transcriptional repressor and interacts with enhancer of polycomb that has dual transcriptional functions. *J Biol Chem*, **275**, 39411-39419.
462. Shimono Y, Murakami H, Kawai K, Wade PA, Shimokata K, and Takahashi M (2003) Mi-2 beta associates with BRG1 and RET finger protein at the distinct regions with transcriptional activating and repressing abilities. *J Biol Chem*, **278**, 51638-51645.
463. Shimosaki K, Namihira M, Nakashima K, and Taga T (2005) Stage- and site-specific DNA demethylation during neural cell development from embryonic stem cells. *J Neurochem*, **93**, 432-439.
464. Shukeir N, Pakneshan P, Chen G, Szyf M, and Rabbani SA (2006) Alteration of the methylation status of tumor-promoting genes decreases prostate cancer cell invasiveness and tumorigenesis in vitro and in vivo. *Cancer Res*, **66**, 9202-9210.
465. Sif S, Saurin AJ, Imbalzano AN, and Kingston RE (2001) Purification and characterization of mSin3A-containing Brg1 and hBrm chromatin remodeling complexes. *Genes Dev*, **15**, 603-618.
466. Slack A, Bovenzi V, Bigey P, Ivanov MA, Ramchandani S, Bhattacharya S, tenOever B, Lamrihi B, Scherman D, and Szyf M (2002) Antisense MBD2 gene therapy inhibits tumorigenesis. *J Gene Med*, **4**, 381-389.

467. Stampfer MR and Yaswen P (2003) Human epithelial cell immortalization as a step in carcinogenesis. *Cancer Lett*, **194**, 199-208.
468. Stirzaker C, Song JZ, Davidson B, and Clark SJ (2004) Transcriptional gene silencing promotes DNA hypermethylation through a sequential change in chromatin modifications in cancer cells. *Cancer Res*, **64**, 3871-3877.
469. Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJ, Belanger K, Brandes AA, Marosi C, Bogdahn U, Curschmann J, Janzer RC, Ludwin SK, Gorlia T, Allgeier A, Lacombe D, Cairncross JG, Eisenhauer E, and Mirimanoff RO (2005) Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med*, **352**, 987-996.
470. Suetake I, Shinozaki F, Miyagawa J, Takeshima H, and Tajima S (2004) DNMT3L stimulates the DNA methylation activity of Dnmt3a and Dnmt3b through a direct interaction. *J Biol Chem*, **279**, 27816-27823.
471. Surani MA (1998) Imprinting and the initiation of gene silencing in the germ line. *Cell*, **93**, 309-312.
472. Surani MA, Barton SC, and Norris ML (1984) Development of reconstituted mouse eggs suggests imprinting of the genome during gametogenesis. *Nature*, **308**, 548-550.
473. Suzuki M, Iizasa T, Nakajima T, Kubo R, Iyoda A, Hiroshima K, Nakatani Y, and Fujisawa T (2007a) Aberrant methylation of IL-12Rbeta2 gene in lung adenocarcinoma cells is associated with unfavorable prognosis. *Ann Surg Oncol*, **14**, 2636-2642.
474. Suzuki M, Shigematsu H, Nakajima T, Kubo R, Motohashi S, Sekine Y, Shibuya K, Iizasa T, Hiroshima K, Nakatani Y, Gazdar AF, and Fujisawa T (2007b) Synchronous alterations of Wnt and epidermal growth factor receptor signaling pathways through aberrant methylation and mutation in non small cell lung cancer. *Clin Cancer Res*, **13**, 6087-6092.
475. Suzuki M, Yamada T, Kihara-Negishi F, Sakurai T, and Oikawa T (2003) Direct association between PU.1 and MeCP2 that recruits mSin3A-HDAC complex for PU.1-mediated transcriptional repression. *Oncogene*, **22**, 8688-8698.
476. Swisher JF, Rand E, Cedar H, and Marie PA (1998) Analysis of putative RNase sensitivity and protease insensitivity of demethylation activity in extracts from rat myoblasts. *Nucleic Acids Res*, **26**, 5573-5580.
477. Szabo PE, Pfeifer GP, and Mann JR (1998) Characterization of novel parent-specific epigenetic modifications upstream of the imprinted mouse H19 gene. *Mol Cell Biol*, **18**, 6767-6776.
478. Takagi N and Abe K (1990) Detrimental effects of two active X chromosomes on early mouse development. *Development*, **109**, 189-201.
479. Tan CP and Nakielnny S (2006) Control of the DNA methylation system component MBD2 by protein arginine methylation. *Mol Cell Biol*, **26**, 7224-7235.
480. Tang LY, Reddy MN, Rasheva V, Lee TL, Lin MJ, Hung MS, and Shen CK (2003) The eukaryotic DNMT2 genes encode a new class of cytosine-5 DNA methyltransferases. *J Biol Chem*, **278**, 33613-33616.
481. Tao J, Hu K, Chang Q, Wu H, Sherman NE, Martinowich K, Klose RJ, Schanen C, Jaenisch R, Wang W, and Sun YE (2009) Phosphorylation of MeCP2 at Serine 80 regulates its chromatin association and neurological function. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **106**, 4882-4887.

482. Tate PH and Bird AP (1993) Effects of DNA methylation on DNA-binding proteins and gene expression. *Curr Opin Genet Dev*, **3**, 226-231.
483. Tatematsu KI, Yamazaki T, and Ishikawa F (2000) MBD2-MBD3 complex binds to hemimethylated DNA and forms a complex containing DNMT1 at the replication foci in late S phase. *Genes Cells*, **5**, 677-688.
484. Tong JK, Hassig CA, Schnitzler GR, Kingston RE, and Schreiber SL (1998) Chromatin deacetylation by an ATP-dependent nucleosome remodelling complex. *Nature*, **395**, 917-921.
485. Tryndyak V, Kovalchuk O, and Pogribny IP (2006a) Identification of differentially methylated sites within unmethylated DNA domains in normal and cancer cells. *Anal Biochem*, **356**, 202-207.
486. Tryndyak VP, Kovalchuk O, and Pogribny IP (2006b) Loss of DNA methylation and histone H4 lysine 20 trimethylation in human breast cancer cells is associated with aberrant expression of DNA methyltransferase 1, Suv4-20h2 histone methyltransferase and methyl-binding proteins. *Cancer Biol Ther*, **5**, 65-70.
487. Tsuda H, Takarabe T, Kanai Y, Fukutomi T, and Hirohashi S (2002) Correlation of DNA hypomethylation at pericentromeric heterochromatin regions of chromosomes 16 and 1 with histological features and chromosomal abnormalities of human breast carcinomas. *Am J Pathol*, **161**, 859-866.
488. Tudor M, Akbarian S, Chen RZ, and Jaenisch R (2002) Transcriptional profiling of a mouse model for Rett syndrome reveals subtle transcriptional changes in the brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 15536-15541.
489. Tweedie S, Charlton J, Clark V, and Bird A (1997) Methylation of genomes and genes at the invertebrate-vertebrate boundary. *Mol Cell Biol*, **17**, 1469-1475.
490. Tweedie S, Ng HH, Barlow AL, Turner BM, Hendrich B, and Bird A (1999) Vestiges of a DNA methylation system in *Drosophila melanogaster*? *Nat Genet*, **23**, 389-390.
491. Uchimura Y, Ichimura T, Uwada J, Tachibana T, Sugahara S, Nakao M, and Saitoh H (2006) Involvement of SUMO modification in. *J Biol Chem*, **281**, 23180-23190.
492. Um S, Harbers M, Benecke A, Pierrat B, Losson R, and Chambon P (1998) Retinoic acid receptors interact physically and functionally with the T:G mismatch-specific thymine-DNA glycosylase. *J Biol Chem*, **273**, 20728-20736.
493. Umen JG and Goodenough UW (2001) Chloroplast DNA methylation and inheritance in *Chlamydomonas*. *Genes Dev*, **15**, 2585-2597.
494. Umlauf D, Goto Y, Cao R, Cerqueira F, Wagschal A, Zhang Y, and Feil R (2004) Imprinting along the *Kcnq1* domain on mouse chromosome 7 involves repressive histone methylation and recruitment of Polycomb group complexes. *Nat Genet*, **36**, 1296-1300.
495. Unoki M, Nishidate T, and Nakamura Y (2004) ICBP90, an E2F-1 target, recruits HDAC1 and binds to methyl-CpG through its SRA domain. *Oncogene*, **23**, 7601-7610.
496. Vairapandi M and Duker NJ (1993) Enzymic removal of 5-methylcytosine from DNA by a human DNA-glycosylase. *Nucleic Acids Res*, **21**, 5323-5327.
497. van d, V, den Blaauwen JL, Sewalt RG, van DR, and Otte AP (2000) Transcriptional repression mediated by polycomb group proteins and other chromatin-associated repressors is selectively blocked by insulators. *J Biol Chem*, **275**, 697-704.

498. van der Ploeg LH and Flavell RA (1980) DNA methylation in the human gamma delta beta-globin locus in erythroid and nonerythroid tissues. *Cell*, **19**, 947-958.
499. Vendrell JA, Bieche I, Desmetz C, Badia E, Tozlu S, Nguyen C, Nicolas JC, Lidereau R, and Cohen PA (2005) Molecular changes associated with the agonist activity of hydroxy-tamoxifen and the hyper-response to estradiol in hydroxy-tamoxifen-resistant breast cancer cell lines. *Endocr Relat Cancer*, **12**, 75-92.
500. Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Sutton GG, Smith HO, Yandell M, Evans CA, Holt RA, Gocayne JD, Amanatides P, Ballew RM, Huson DH, Wortman JR, Zhang Q, Kodira CD, Zheng XH, Chen L, Skupski M, Subramanian G, Thomas PD, Zhang J, Gabor Miklos GL, Nelson C, Broder S, Clark AG, Nadeau J, McKusick VA, Zinder N, Levine AJ, Roberts RJ, Simon M, Slayman C, Hunkapiller M, Bolanos R, Delcher A, Dew I, Fasulo D, Flanigan M, Florea L, Halpern A, Hannenhalli S, Kravitz S, Levy S, Mobarry C, Reinert K, Remington K, Abu-Threideh J, Beasley E, Biddick K, Bonazzi V, Brandon R, Cargill M, Chandramouliswaran I, Charlab R, Chaturvedi K, Deng Z, Di F, V, Dunn P, Eilbeck K, Evangelista C, Gabrielian AE, Gan W, Ge W, Gong F, Gu Z, Guan P, Heiman TJ, Higgins ME, Ji RR, Ke Z, Ketchum KA, Lai Z, Lei Y, Li Z, Li J, Liang Y, Lin X, Lu F, Merkulov GV, Milshina N, Moore HM, Naik AK, Narayan VA, Neelam B, Nusskern D, Rusch DB, Salzberg S, Shao W, Shue B, Sun J, Wang Z, Wang A, Wang X, Wang J, Wei M, Wides R, Xiao C, Yan C, Yao A, Ye J, Zhan M, Zhang W, Zhang H, Zhao Q, Zheng L, Zhong F, Zhong W, Zhu S, Zhao S, Gilbert D, Baumhueter S, Spier G, Carter C, Cravchik A, Woodage T, Ali F, An H, Awe A, Baldwin D, Baden H, Barnstead M, Barrow I, Beeson K, Busam D, Carver A, Center A, Cheng ML, Curry L, Danaher S, Davenport L, Desilets R, Dietz S, Dodson K, Doup L, Ferriera S, Garg N, Gluecksmann A, Hart B, Haynes J, Haynes C, Heiner C, Hladun S, Hostin D, Houck J, Howland T, Ibegwam C, Johnson J, Kalush F, Kline L, Koduru S, Love A, Mann F, May D, McCawley S, McIntosh T, McMullen I, Moy M, Moy L, Murphy B, Nelson K, Pfannkoch C, Pratts E, Puri V, Qureshi H, Reardon M, Rodriguez R, Rogers YH, Romblad D, Ruhfel B, Scott R, Sitter C, Smallwood M, Stewart E, Strong R, Suh E, Thomas R, Tint NN, Tse S, Vech C, Wang G, Wetter J, Williams S, Williams M, Windsor S, Winn-Deen E, Wolfe K, Zaveri J, Zaveri K, Abril JF, Guigo R, Campbell MJ, Sjolander KV, Karlak B, Kejariwal A, Mi H, Lazareva B, Hatton T, Narechania A, Diemer K, Muruganujan A, Guo N, Sato S, Bafna V, Istrail S, Lippert R, Schwartz R, Walenz B, Yooseph S, Allen D, Basu A, Baxendale J, Blick L, Caminha M, Carnes-Stine J, Caulk P, Chiang YH, Coyne M, Dahlke C, Mays A, Dombroski M, Donnelly M, Ely D, Esparham S, Fosler C, Gire H, Glanowski S, Glasser K, Glodek A, Gorokhov M, Graham K, Gropman B, Harris M, Heil J, Henderson S, Hoover J, Jennings D, Jordan C, Jordan J, Kasha J, Kagan L, Kraft C, Levitsky A, Lewis M, Liu X, Lopez J, Ma D, Majoros W, McDaniel J, Murphy S, Newman M, Nguyen T, Nguyen N, and Nodell M (2001) The sequence of the human genome. *Science*, **291**, 1304-1351.
501. Verger A, Perdomo J, and Crossley M (2003) Modification with SUMO. A role in transcriptional regulation. *EMBO Rep*, **4**, 137-142.
502. Vermaak D, Ahmad K, and Henikoff S (2003) Maintenance of chromatin states: an open-and-shut case. *Curr Opin Cell Biol*, **15**, 266-274.
503. Verona RI, Mann MR, and Bartolomei MS (2003) Genomic imprinting: intricacies of epigenetic regulation in clusters. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **19**, 237-259.
504. Villa R, Morey L, Raker VA, Buschbeck M, Gutierrez A, De Santis F, Corsaro M, Varas F, Bossi D, Minucci S, Pelicci PG, and Di Croce L (2006) The methyl-CpG binding protein MBD1 is required for PML-RARalpha function. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 1400-1405.

505. Villar-Garea A, Fraga MF, Espada J, and Esteller M (2003) Procaine is a DNA-demethylating agent with growth-inhibitory effects in human cancer cells. *Cancer Res*, **63**, 4984-4989.
506. Vire E, Brenner C, Deplus R, Blanchon L, Fraga M, Didelot C, Morey L, Van Eynde A, Bernard D, Vanderwinden JM, Bollen M, Esteller M, Di Croce L, de Launoit Y, and Fuks F (2006) The Polycomb group protein EZH2 directly controls DNA methylation. *Nature*, **439**, 871-874.
507. von Kries JP, Buhrmester H, and Stratling WH (1991) A matrix/scaffold attachment region binding protein: identification, purification, and mode of binding. *Cell*, **64**, 123-135.
508. Wade PA, Geronne A, Jones PL, Ballestar E, Aubry F, and Wolffe AP (1999) Mi-2 complex couples DNA methylation to chromatin remodelling and histone deacetylation. *Nat Genet*, **23**, 62-66.
509. Wakefield RI, Smith BO, Nan X, Free A, Soteriou A, Uhrin D, Bird AP, and Barlow PN (1999) The solution structure of the domain from MeCP2 that binds to methylated DNA. *J Mol Biol*, **291**, 1055-1065.
510. Wang H, An W, Cao R, Xia L, Erdjument-Bromage H, Chatton B, Tempst P, Roeder RG, and Zhang Y (2003) mAM facilitates conversion by ESET of dimethyl to trimethyl lysine 9 of histone H3 to cause transcriptional repression. *Mol Cell*, **12**, 475-487.
511. Watanabe S, Ichimura T, Fujita N, Tsuruzoe S, Ohki I, Shirakawa M, Kawasuji M, and Nakao M (2003) Methylated DNA-binding domain 1 and methylpurine-DNA glycosylase link transcriptional repression and DNA repair in chromatin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 12859-12864.
512. WATSON JD and CRICK FH (1953) Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature*, **171**, 737-738.
513. Watt F and Molloy PL (1988) Cytosine methylation prevents binding to DNA of a HeLa cell transcription factor required for optimal expression of the adenovirus major late promoter. *Genes Dev*, **2**, 1136-1143.
514. Watt PM, Kumar R, and Kees UR (2000) Promoter demethylation accompanies reactivation of the HOX11 proto-oncogene in leukemia. *Genes Chromosomes Cancer*, **29**, 371-377.
515. Weber M, Hellmann I, Stadler MB, Ramos L, Paabo S, Rebhan M, and Schubeler D (2007) Distribution, silencing potential and evolutionary impact of promoter DNA methylation in the human genome. *Nat Genet*, **39**, 457-466.
516. Webster KE, O'Bryan MK, Fletcher S, Crewther PE, Aapola U, Craig J, Harrison DK, Aung H, Phutikanit N, Lyle R, Meachem SJ, Antonarakis SE, de Kretser DM, Hedger MP, Peterson P, Carroll BJ, and Scott HS (2005) Meiotic and epigenetic defects in Dnmt3L-knockout mouse spermatogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 4068-4073.
517. Weisenberger DJ, Campan M, Long TI, Kim M, Woods C, Fiala E, Ehrlich M, and Laird PW (2005) Analysis of repetitive element DNA methylation by MethyLight. *Nucleic Acids Res*, **33**, 6823-6836.
518. Weiss A, Keshet I, Razin A, and Cedar H (1996) DNA demethylation in vitro: involvement of RNA. *Cell*, **86**, 709-718.
519. Weitzel JM, Buhrmester H, and Stratling WH (1997) Chicken MAR-binding protein ARBP is homologous to rat methyl-CpG-binding protein MeCP2. *Mol Cell Biol*, **17**, 5656-5666.

520. Widschwendter M, Jiang G, Woods C, Muller HM, Fiegl H, Goebel G, Marth C, Muller-Holzner E, Zeimet AG, Laird PW, and Ehrlich M (2004) DNA hypomethylation and ovarian cancer biology. *Cancer Res*, **64**, 4472-4480.
521. Winqvist E, Knox J, Ayoub JP, Wood L, Wainman N, Reid GK, Pearce L, Shah A, and Eisenhauer E (2006) Phase II trial of DNA methyltransferase 1 inhibition with the antisense oligonucleotide MG98 in patients with metastatic renal carcinoma: a National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group investigational new drug study. *Invest New Drugs*, **24**, 159-167.
522. Wischnewski F, Friese O, Pantel K, and Schwarzenbach H (2007) Methyl-CpG binding domain proteins and their involvement in the regulation of the MAGE-A1, MAGE-A2, MAGE-A3, and MAGE-A12 gene promoters. *Mol Cancer Res*, **5**, 749-759.
523. White TC, McLaren NC, and Allen SL (1986) Methylation site within a facultatively persistent sequence in the macronucleus of *Tetrahymena thermophila*. *Mol Cell Biol*, **6**, 4742-4744.
524. Wolffe AP and Matzke MA (1999) Epigenetics: regulation through repression. *Science*, **286**, 481-486.
525. Wong E, Yang K, Kuraguchi M, Werling U, Avdievich E, Fan K, Fazzari M, Jin B, Brown AM, Lipkin M, and Edelmann W (2002) Mbd4 inactivation increases Cright-arrowT transition mutations and promotes gastrointestinal tumor formation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 14937-14942.
526. Wong N, Lam WC, Lai PB, Pang E, Lau WY, and Johnson PJ (2001) Hypomethylation of chromosome 1 heterochromatin DNA correlates with q-arm copy gain in human hepatocellular carcinoma. *Am J Pathol*, **159**, 465-471.
527. Woo HR, Pontes O, Pikaard CS, and Richards EJ (2007) VIM1, a methylcytosine-binding protein required for centromeric heterochromatinization. *Genes Dev*, **21**, 267-277.
528. Woodcock CL, Skoultchi AI, and Fan Y (2006) Role of linker histone in chromatin structure and function: H1 stoichiometry and nucleosome repeat length. *Chromosome Res*, **14**, 17-25.
529. Worm J and Guldborg P (2002) DNA methylation: an epigenetic pathway to cancer and a promising target for anticancer therapy. *J Oral Pathol Med*, **31**, 443-449.
530. Xie S, Wang Z, Okano M, Nogami M, Li Y, He WW, Okumura K, and Li E (1999) Cloning, expression and chromosome locations of the human DNMT3 gene family. *Gene*, **236**, 87-95.
531. Xu GL, Bestor TH, Bourc'his D, Hsieh CL, Tommerup N, Bugge M, Hulten M, Qu X, Russo JJ, and Viegas-Pequignot E (1999) Chromosome instability and immunodeficiency syndrome caused by mutations in a DNA methyltransferase gene. *Nature*, **402**, 187-191.
532. Yamada T, Koyama T, Ohwada S, Tago K, Sakamoto I, Yoshimura S, Hamada K, Takeyoshi I, and Morishita Y (2002) Frameshift mutations in the MBD4/MED1 gene in primary gastric cancer with high-frequency microsatellite instability. *Cancer Lett*, **181**, 115-120.
533. Yang X, Smith SL, Tian XC, Lewin HA, Renard JP, and Wakayama T (2007) Nuclear reprogramming of cloned embryos and its implications for therapeutic cloning. *Nat Genet*, **39**, 295-302.

534. Yasui DH, Peddada S, Bieda MC, Vallero RO, Hogart A, Nagarajan RP, Thatcher KN, Farnham PJ, and Lasalle JM (2007) Integrated epigenomic analyses of neuronal MeCP2 reveal a role for long-range interaction with active genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **104**, 19416-19421.
535. Yen RW, Vertino PM, Nelkin BD, Yu JJ, el Deiry W, Cumaraswamy A, Lennon GG, Trask BJ, Celano P, and Baylin SB (1992) Isolation and characterization of the cDNA encoding human DNA methyltransferase. *Nucleic Acids Res*, **20**, 2287-2291.
536. Yoder JA and Bestor TH (1998) A candidate mammalian DNA methyltransferase related to pmt1p of fission yeast. *Hum Mol Genet*, **7**, 279-284.
537. Yoder JA, Walsh CP, and Bestor TH (1997) Cytosine methylation and the ecology of intragenomic parasites. *Trends Genet*, **13**, 335-340.
538. Yoon HG, Chan DW, Reynolds AB, Qin J, and Wong J (2003) N-CoR mediates DNA methylation-dependent repression through a methyl CpG binding protein Kaiso. *Mol Cell*, **12**, 723-734.
539. Young JI, Hong EP, Castle JC, Crespo-Barreto J, Bowman AB, Rose MF, Kang D, Richman R, Johnson JM, Berget S, and Zoghbi HY (2005) Regulation of RNA splicing by the methylation-dependent transcriptional repressor methyl-CpG binding protein 2. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 17551-17558.
540. Yu F, Thiesen J, and Stratling WH (2000) Histone deacetylase-independent transcriptional repression by methyl-CpG-binding protein 2. *Nucleic Acids Res*, **28**, 2201-2206.
541. Zhang Y, Iratni R, Erdjument-Bromage H, Tempst P, and Reinberg D (1997) Histone deacetylases and SAP18, a novel polypeptide, are components of a human Sin3 complex. *Cell*, **89**, 357-364.
542. Zhang Y, Ng HH, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Bird A, and Reinberg D (1999) Analysis of the NuRD subunits reveals a histone deacetylase core complex and a connection with DNA methylation. *Genes Dev*, **13**, 1924-1935.
543. Zhang Y, Sun ZW, Iratni R, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Hampsey M, and Reinberg D (1998) SAP30, a novel protein conserved between human and yeast, is a component of a histone deacetylase complex. *Mol Cell*, **1**, 1021-1031.
544. Zhao X, Ueba T, Christie BR, Barkho B, McConnell MJ, Nakashima K, Lein ES, Eadie BD, Willhoite AR, Muotri AR, Summers RG, Chun J, Lee KF, and Gage FH (2003) Mice lacking methyl-CpG binding protein 1 have deficits in adult neurogenesis and hippocampal function. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 6777-6782.
545. Zhou Z, Hong EJ, Cohen S, Zhao WN, Ho HY, Schmidt L, Chen WG, Lin Y, Savner E, Griffith EC, Hu L, Steen JA, Weitz CJ, and Greenberg ME (2006) Brain-specific phosphorylation of MeCP2 regulates activity-dependent Bdnf transcription, dendritic growth, and spine maturation. *Neuron*, **52**, 255-269.
546. Zhu B, Zheng Y, Angliker H, Schwarz S, Thiry S, Siegmann M, and Jost JP (2000) 5-Methylcytosine DNA glycosylase activity is also present in the human MBD4 (G/T mismatch glycosylase) and in a related avian sequence. *Nucleic Acids Res*, **28**, 4157-4165.
547. Zhu Y, Brown HN, Zhang Y, Holford TR, and Zheng T (2005) Genotypes and haplotypes of the methyl-CpG-binding domain 2 modify breast cancer risk dependent upon menopausal status. *Breast Cancer Res*, **7**, R745-R752.
548. Zhu Y, Harrison DJ, and Bader SA (2004) Genetic and epigenetic analyses of MBD3 in colon and lung cancer. *Br J Cancer*, **90**, 1972-1975.

549. Zingg JM and Jones PA (1997) Genetic and epigenetic aspects of DNA methylation on genome expression, evolution, mutation and carcinogenesis. *Carcinogenesis*, **18**, 869-882.
550. Zinn RL, Pruitt K, Eguchi S, Baylin SB, and Herman JG (2007) hTERT is expressed in cancer cell lines despite promoter DNA methylation by preservation of unmethylated DNA and active chromatin around the transcription start site. *Cancer Res*, **67**, 194-201.



PUBLICATIONS & CONGRÈS

PUBLICATIONS

- Chatagnon A, Bougel S, Perriaud L, Lachuer J, Benhattar J, and Dante R (2009) Specific association between the methyl-CpG-binding domain protein 2 and the hypermethylated region of the human telomerase reverse transcriptase promoter in cancer cells. *Carcinogenesis*, **30 (1)**, 28-34.
- Chatagnon A, Ballestar E, Esteller M, and Dante R (2009) Cancer epigenetics: a role for the methyl-CpG-binding domain protein 2 in the modulation of the estrogen response of the *pS2/TFF1* gene. *FASEB*, **en soumission**.
- Chatagnon A, Perriaud L, Nazaret N, Benhattar J, Lachuer J, and Dante R (2009) Genome wide distribution of MBD2 binding sites, DNA methylation profiles and silencing potential. **En préparation**.

PRESENTATION ORALE :

- **MC-GARD Conferences “Interplay among genetics, epigenetics and non-coding RNA's”** - Madrid, Espagne - Mai 2008 - Masquelet A, Auriol E, Bougel S, Perriaud L, Lachuer J, Benhattar J, and Dante R. **The Methyl-CpG-Binding Domain protein 2 (MBD2), a specific interpret of methylated loci in cancer cells.** - Résumé publié dans *Cellular Oncology*, May 2008, 30 (3) : 239.

POSTERS :

- **AACR Special Conference “Cancer Epigenetics”** - Boston, MA, Etats Unis - Mai 2008 - Masquelet A, Auriol E, Bougel S, Perriaud L, Lachuer J, Benhattar J, and Dante R. **The Methyl-CpG-Binding Domain protein 2 (MBD2), a specific interpret of methylated loci in cancer cells.**
- **Colloque « Génomique et épigénomique du cancer : de nouvelles technologies pour de nouveaux défis » de l'INCA** - Paris, France - Décembre 2007 - Masquelet A, Auriol E, Bougel S, Perriaud L, Lachuer J, Benhattar J, and Dante R. **The Methyl-CpG-Binding Domain protein 2 (MBD2), a specific interpret of methylated loci in cancer cells.**
- **Gordon Research Conferences “Cancer genetics and epigenetics”** - Il Ciocco, Italie - Mai 2007 - Masquelet A, and Dante R. **The Methyl-CpG-Binding Domain protein 2 poises the transcription of estrogeno-dependant *pS2/TFF1* gene.**
- **Treizième congrès du Club Hématopoïèse et Oncogénèse (CHO)** - Presqu'île de Giens, France - Octobre 2006 - Masquelet A, Auriol E et Dante R. **Les protéines liant l'ADN méthylé (MBD) des cibles pour la réactivation transcriptionnelle des gènes oestrogéno-dépendants ?**
- **Premières journées scientifiques du CLARA** - Vulcania, Clermond-Ferrand, France - Mars 2006 - Masquelet A, Auriol E, et Dante R. **Les protéines liant l'ADN méthylé (MBD) des cibles pour la réactivation transcriptionnelle des gènes oestrogéno-dépendants ?** - Résumé publié dans *le bulletin du cancer*, Mars 2006, 93 : S107.

RÉSUMÉ

De nombreux gènes suppresseurs de tumeurs sont inactivés par hyperméthylation dans les cancers. Cette inactivation serait en partie initiée par la protéine, MBD2 (Methyl-CpG-Binding Domain protein 2). Cette protéine recrute au niveau de séquences méthylées des complexes enzymatiques capables de modifier la structure chromatinienne et crée ainsi des régions fonctionnellement inactives. Dès lors, ce répresseur apparaît être une cible potentielle pour combattre le cancer. Dans cette perspective, rechercher les cibles de MBD2 et comprendre sa capacité à contrôler l'expression génique semblent cruciales. Au cours de deux études gènes candidats, nous avons pu démontrer (i) une réelle spécificité de cible du répresseur méthylation-dépendant MBD2 pour les loci *hTERT* et *pS2/TFF1* ; et (ii) un nouveau rôle de la protéine MBD2 en tant que modulateur de l'expression génique. De plus, les actions antagonistes entre le répresseur MBD2 et le trans-activateur naturel du gène *pS2*, le récepteur aux œstrogènes α , ont été explorées. Puis, l'analyse globale des profils de distribution de MBD2, de la méthylation de l'ADN, ainsi que de l'ARN polymérase II, sur puce promoteur a montré que MBD2 possède toutes les caractéristiques d'un répresseur transcriptionnel méthylation-dépendant. En effet, 74% des promoteurs fixés par MBD2 sont méthylés et cette liaison est associée dans 65% des cas à une répression transcriptionnelle.

The Methyl-CpG-Binding Domain Protein 2 (MBD2), a specific interpret of methylated loci in cancer cells

ABSTRACT

In the past few years, several clinical trials have shown that targeting DNA methylation machinery might be of interest in cancer therapy to restore tumor suppressor genes expression and inhibit tumor growth. The Methyl-CpG-Binding Domain protein 2 (MBD2) is an important constituent of the DNA methylation machinery since this protein is directly involved in the mediation of the epigenetic signal. Moreover, MBD2 seems to show some gene specificity, its inhibition reactivate a limited number of genes. Taken together these data suggest that MBD2 represents potential new target in cancer therapy and, therefore, new insights on MBD2 specificities are, in this context, of importance. To this end, we have developed two different approaches: a candidate genes analysis and a genome-wide analysis, using ChIP-on-chip method, in order to map MBD2 binding sites. The candidate gene approaches are strongly in favour of the "one gene - one MBD" hypothesis, at least for the genes analyzed. Indeed, our results indicate that MBD2 is specifically and directly involved in the transcriptional repression of *hTERT* and *pS2/TFF1* genes. Furthermore, a new role of MBD2 in the fine-scale modulation of these genes was demonstrated, and the antagonist actions between MBD2 and the natural trans-activator of *pS2* gene, the estrogen receptor α , were explored. Genome wide distribution of MBD2 binding sites, DNA Methylation profiles, and silencing potential, showed that the MBD2 is a real methylation-dependant transcriptional repressor: 74% of the MBD2 binding promoters are methylated and 65% silenced.

DISCIPLINE : Epigénétique et cancer

MOTS-CLÉS : Méthylation de l'ADN, MBD2, répression transcriptionnelle, cancer, ChIP-on-chip

INTITULÉ ET ADRESSE DU LABORATOIRE :

Laboratoire d'Oncogenèse et Progression Tumorale - Unité Mixte INSERM 590
Centre Léon Bérard - 28 rue Laennec - 69373 Lyon Cedex 08 FRANCE