N°d'ordre NNT : 2017LYSE1163

THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON

opérée au sein de

L'Université Claude Bernard Lyon 1

Ecole Doctorale ED 340
Biologie Moléculaire Intégrative et Cellulaire

Spécialité de doctorat : Epigénétique et cancérologie

Soutenue publiquement le 14 septembre 2017 par :

Pauline Mathot

Mécanismes épigénétiques et réponse des cellules cancéreuses au microenvironnement.

Implication de la méthylation de l'ADN et de l'un de ses interprètes, MBD2.

Devant le jury composé de :

Madame ROUSSEAUX Sophie	Directrice de Recherche - UJF Grenoble	Rapporteuse
Madame TOMASETTO Catherine-Laure	Directrice de Recherche – IGBMC Strasbourg	Rapporteuse
Monsieur DEFOSSEZ Pierre-Antoine	Directeur de Recherche - Université Paris 7	Examinateur
Monsieur VALCOURT Ulrich	Maître de Conférences - UCBL Lyon I	Examinateur
Monsieur DANTE Robert	Directeur de Recherche - CRCL Lyon I	Directeur de thèse

N°d'ordre NNT : 2017LYSE1163

THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON

opérée au sein de

L'Université Claude Bernard Lyon 1

Ecole Doctorale ED 340
Biologie Moléculaire Intégrative et Cellulaire

Spécialité de doctorat : Epigénétique et cancérologie

Soutenue publiquement le 14 septembre 2017 par :

Pauline Mathot

Mécanismes épigénétiques et réponse des cellules cancéreuses au microenvironnement.

Implication de la méthylation de l'ADN et de l'un de ses interprètes, MBD2.

Devant le jury composé de :

Madame ROUSSEAUX Sophie	Directrice de Recherche - UJF Grenoble	Rapporteuse
Madame TOMASETTO Catherine-Laure	Directrice de Recherche – IGBMC Strasbourg	Rapporteuse
Monsieur DEFOSSEZ Pierre-Antoine	Directeur de Recherche - Université Paris 7	Examinateur
Monsieur VALCOURT Ulrich	Maître de Conférences - UCBL Lyon I	Examinateur
Monsieur DANTE Robert	Directeur de Recherche - CRCL Lyon I	Directeur de thèse

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

Président de l'Université	**M. le Professeur Frédéric FLEURY**
Président du Conseil Académique	M. le Professeur Hamda BEN HADID
Vice-président du Conseil d'Administration	M. le Professeur Didier REVEL
Vice-président du Conseil Formation et Vie Universitaire	M. le Professeur Philippe CHEVALIER
Vice-président de la Commission Recherche	M. Fabrice VALLÉE
Directrice Générale des Services	Mme Dominique MARCHAND

COMPOSANTES SANTE

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard	Directeur : M. le Professeur G.RODE
Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles Mérieux	Directeur : Mme la Professeure C. BURILLON
Faculté d'Odontologie	Directeur : M. le Professeur D. BOURGEOIS
Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques	Directeur : Mme la Professeure C. VINCIGUERRA
Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation	Directeur : M. X. PERROT
Département de formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine	Directeur : Mme la Professeure A-M. SCHOTT

COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE

Faculté des Sciences et Technologies	Directeur : M. F. DE MARCHI
Département Biologie	Directeur : M. le Professeur F. THEVENARD
Département Chimie Biochimie	Directeur : Mme C. FELIX
Département GEP	Directeur : M. Hassan HAMMOURI
Département Informatique	Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE
Département Mathématiques	Directeur : M. le Professeur G. TOMANOV
Département Mécanique	Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID
Département Physique	Directeur : M. le Professeur J-C PLENET
UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives	Directeur : M. Y.VANPOULLE
Observatoire des Sciences de l'Univers de Lyon	Directeur : M. B. GUIDERDONI
Polytech Lyon	Directeur : M. le Professeur E.PERRIN
Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique	Directeur : M. G. PIGNAULT
Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1	Directeur : M. le Professeur C. VITON
Ecole Supérieure du Professorat et de l'Education	Directeur : M. le Professeur A. MOUGNIOTTE
Institut de Science Financière et d'Assurances	Directeur : M. N. LEBOISNE

Résumé - Abstract

Mécanismes épigénétiques et réponse des cellules cancéreuses au microenvironnement. Implication de la méthylation de l'ADN et de l'un de ses interprètes, MBD2.

Les cancers du sein ont la particularité de développer un microenvironnement tumoral important où les fibroblastes associés au cancer (CAF) jouent un rôle crucial dans la tumorigénèse *via* la sécrétion de différents facteurs de croissance, cytokines, protéases et composants de la matrice extracellulaire. Ces différents facteurs secrétés par les CAFs sont impliqués dans de nombreuses voies de signalisation suggérant que la reprogrammation des cellules cancéreuses par les CAFs peut affecter de nombreux gènes.

Le séquençage des ARN messagers (RNAseq) de lignées cellulaires de cancer du sein cultivées en présence de milieux conditionnés de CAF, nous a permis d'identifier 372 gènes surexprimés *in vitro* par les facteurs sécrétés par les CAF et *in vivo* selon la teneur en cellules stromales des tumeurs mammaires. De façon inattendue, nous avons pu constater que les facteurs sécrétés par les CAF ainsi que le contenu en cellules stromales des tumeurs n'induisent pas de changements significatifs de méthylation de l'ADN mais activent de manière spécifique des gènes caractérisés par une signature méthylation. Différentes approches expérimentales, telles que l'inhibition de la méthylation de l'ADN, l'inhibition de l'expression de la protéine MBD2 (protéines de liaison à l'ADN méthylé) et des expériences d'immuno-précipitation de la chromatine (ChIP) ont permis de montrer l'implication de ces marques de méthylation et des protéines de liaison à l'ADN méthylé dans la réponse des cellules cancéreuses aux facteurs sécrétés par les CAFs. Ces résultats ont permis l'identification d'événements moléculaires impliqués dans la réponse des cellules tumorales aux signaux sécrétés par les cellules stromales dans les tumeurs mammaires mettant en lumière l'importance des marques épigénétiques dans la reprogrammation des cellules cancéreuses induites par les cellules stromales.

Mots clefs : *Epigénétique, Méthylation de l'ADN, Fibroblastes associés au cancer, Protéines de liaison à l'ADN méthylés.*

Epigenetic and response of cancer cells to the microenvironment. Involvement of DNA methylation and one of its interpreters, MBD2.

Breast cancers develop in complex tissue environments where cancer associated fibroblasts (CAF) play a crucial role in tumorigenesis by secreting various growth factors, cytokines, proteases and extracellular matrix components. Soluble factors secreted by CAFs are involved in many pathways including inflammation, metabolism, proliferation, and epigenetic modulation suggesting that CAF-dependent reprograming of cancer cells affects a large set of genes.

From RNAseq data obtained from breast cancer cell lines grown in presence of CAF-secreted factors, we identified 372 upregulated genes exhibiting an expression level positively correlated with the stromal content of breast cancer specimens. Furthermore, we observed that gene expression changes were not mediated through significant DNA methylation changes. Nevertheless CAF-secreted factors but also stromal content of the tumors remarkably activated specific genes characterized by a DNA methylation signature: hypermethylation at transcription start site (TSS) and shore regions. Experimental approaches (inhibition of DNA methylation, knockdown of MBD2, and ChIP assays) demonstrated the implication of DNA methylation and methyl DNA binding protein in the response of cancers cells to CAF-secreted factors. These data put in light the importance of epigenetics marks in the cancer cell reprogramming induced by stromal cell and indicate that the interpreters of the DNA methylation signal play a major role in the response of the cancer cells to the microenvironment.

Keywords: *Epigenetic, DNA methylation, Cancer associated fibroblasts, Methyl DNA Binding Proteines.*

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier les membres du jury. Le *Docteur Sophie Rousseaux* ainsi que le *Docteur Catherine-Laure Tomassetto* pour avoir accepté d'être les rapporteurs de ma thèse. Le *Docteur Pierre-Antoine Defossez* pour avoir accepté de faire partie de mon jury ainsi que pour ses nombreux conseils scientifiques. Je tiens également à remercier le *Professeur Ulrich Valcourt* pour avoir accepté de présider cette thèse, mais également pour son soutien toute au long de ma thèse ainsi que pour ses formidables cours de biologie cellulaire.

Je voudrais également remercier le *Docteur Fabrice Lavial* et le *Docteur Philippe Juin* pour leurs précieux conseils au cours de mes différents comités de suivi de thèse.

Un grand merci au *Docteur Patrick Mehlen* de m'avoir accueilli dans son laboratoire. Un grand merci au *Centre Léon Berard* et à la *Ligue contre le cancer* pour m'avoir permis de réaliser ma thèse dans de très bonnes conditions.

Je souhaite adresser un grand merci au *Docteur Robert Dante* pour avoir assuré la direction de ma thèse durant ces trois années. Je vous remercie pour m'avoir fait profiter de votre grande expérience tout en me laissant petit à petit construire la mienne. Votre rigueur, votre curiosité scientifique et votre esprit critique ont été pour moi quelque chose d'exceptionnel. Je vous remercie pour nos traditionnelles pauses-café au relais H et nos longues discussions sur les sciences comme sur la vie. Ce n'est que partie remise avec les cappuccinos. Je tiens également à vous remercier plus particulièrement pour votre soutien, votre compréhension et votre aide concernant ma future orientation vers la médecine. Il y a beaucoup de choses pour lesquelles j'aimerais vous remercier et j'espère que notre amitié continuera encore de longues années.

Je tiens également à remercier mes anciens collègues et amis, les *Docteurs Guillaume Devailly* et *Mélodie Grandin* pour m'avoir transmis avec patience toutes leurs connaissances et leurs « petites manies du laboratoire » comme disait Guillaume. Je vous souhaite plein de bonnes choses pour vos futures carrières.
Je tiens également à remercier tous mes collègues de l'équipe Mehlen, Paulette, Crevette,

Nini, Bouboule, Blabla, Ficus, Clémentine, Jordan, Justine, Clélia, Jéromine, Riad, Solène, Jojo, Shuseng, Ana, Benj, Jean-Guy, Mélissa, Olivier, Duygu, Andrea, Hong et tous les autres … Merci de m'avoir accueillie dans votre équipe et merci pour votre convivialité qui m'a entouré durant ces années passées à vos côtés. J'ai également une pensée pour Paulette et Shuseng, les suivantes sur la liste à passer leur thèse, je suis sûre que vous serez parfaite. Je souhaite également une très bonne thèse à tous les nouveaux doctorants de notre équipe.

Je tiens également à remercier tous les membres du 5 ème étage, Victoire, Cassandre, Alexandre, Adrien, Karam, Elodie, Marine, Alexandra, Saïdi, Nicolas, Laurent, Stéphanie, Violaine pour votre aide et pour tous les bons moments passés avec vous. Merci à Marine et Alexandra pour votre soutien sans faille dans la réalisation (difficile) de la figure 1 !

Je tiens également à remercier Yoyo et Marie pour leur coaching sportif et morale aussi quand il le fallait !

Merci à mes amies pour leurs encouragements durant ces années Marion B, Marlène, Manon, Mathilde, Sophie, Charlène. Merci à Noémie pour sa relecture de mon manuscrit ainsi que pour ses nombreux conseils de bio-info, bonne fin de thèse à toi !

Un immense merci à mon compagnon pour ces années de bonheur passées à tes côtés, merci pour ton soutien, merci pour ta compréhension, merci pour avoir si souvent écourté nos week-ends pour «juste passer au labo » ! Un grand merci pour avoir corrigé mon manuscrit et ce n'était pas une mince affaire ! Un grand merci pour m'avoir encouragé à poursuivre mes études vers la médecine.

Enfin un immense merci à ma famille à qui je dois beaucoup, merci à mes parents pour leur aide et leur soutien, merci de m'avoir permis de réaliser ces longues études toujours pas finies ... promis maman après j'arrête !! Merci à mon frère et à mes sœurs pour leur soutien.

Sommaire

Liste des figures et tableaux 4
Liste des abréviations 6

Introduction 8

Partie I : Epigénétique et régulation transcriptionnelle 8
1. Organisation et régulation du génome humain 8
A. Organisation du génome humain 8
B. Régulation de l'expression génique chez l'homme 10
a. Protéines capables de moduler l'activité de la transcription 11
b. Conformation de la chromatine 12
c. Rôle des ARN non codants dans la régulation de la transcription 14
2. L'information épigénétique 16
A. Méthylation de l'ADN 16
a. Mécanismes de méthylation et de déméthylation 18
b. Fonctions de la méthylation de l'ADN 21
B. Code histone 25

Partie II : Méthylation de l'ADN et cancer 27
1. Changement des profils de méthylation dans les cancers 28
A. Baisse du taux global de méthylation 28
B. Hyperméthylation locale 29
2. Protéines de liaison à l'ADN méthylé 33
A. Les acteurs principaux 33
a. La famille MBD 33
b. La famille SRA 40
c. Les protéines à doigts de zinc 40
B. Protéines de liaison à l'ADN méthylé et cancer 41
3. Thérapies épigénétiques 44
A. Inhibiteurs de la méthylation de l'ADN 44
B. Inhibiteurs des histones désacétylases 45
C. Inhibiteurs des modifications d'histones 46
D. Inhibiteurs des protéines de liaison à l'ADN méthylé 46

Partie III : Microenvironnement tumoral 47
1. La cellule cancéreuse et son microenvironnement de véritables complices ... 47
A. Les cellules endothéliales 47
B. Les cellules du système immunitaire 48
C. Les cellules fibroblastiques 49
D. Dialogue entre les différentes cellules du microenvironnement tumoral 50
E. Evolution du microenvironnement au cours de la progression tumorale 51
2. Les fibroblastes associés au cancer : Un mal plus complexe qu'il n'y paraît 53
A. Caractéristiques des fibroblastes associés au cancer 53
a. Les différents types cellulaires à l'origine des CAFs 53
b. Les marqueurs des fibroblastes associés au cancer 55
B. Conséquences des interactions entre les CAFs et les cellules tumorales 56
a. Impact des CAFs dans la tumorigenèse 56
b. Impact des CAFs dans le métabolisme cellulaire 58
c. Impact des CAFs dans l'immunité tumorale 60
d. Impact des CAFs dans la réponse aux agents anti-cancéreux 62

Objectifs généraux 65

Résultats 66

Partie I : DNA methylation signal plays a major role in the response of cancer cells to the microenvironment, in human breast tumors. 66
1. Préambule 66
2. Abstract 67
3. Introduction 68
4. Results 69
5. Discussion 82
6. Materials and methods 86
7. Acknowledgements 89
8. Supplementary material 90
9. Travaux complémentaires non publiés 96

Partie II : Inhibition of DNA methylation promotes breast tumor sensitivity to netrin-1 interference 99
1. Préambule 99
2. Article 101

Partie III : Dynamics of MBD2 deposition across methylated DNA regions during malignant transformation of human mammary epithelial cells 102

1. Préambule 102

2. Article 103

Discussion générale 104

Représentation schématique des principaux résultats 110

Collaborations 112

Partie I : The SCN9A channel and plasma membrane depolarization promote cellular senescence through Rb pathway 112

1. Préambule 112

2. Abstract 113

Partie II : Interfering with SHH interaction to its receptor Patched triggers tumor growth inhibition through Patched-induced apoptosis 114

1. Préambule 114

2. Abstract 116

Partie III : Participation aux congrès 117

Bibliographie 118

Liste des figures et tableaux

Figure 1: Exemple du promoteur du gène de la β-globuline 9

Figure 2: Schéma des différentes régions d'un gène.....10

Figure 3: Schéma représentant l'effet des enhancers et des insulateurs sur la chromatine.....12

Figure 4: Schéma de l'euchromatine et de l'hétérochromatine.....14

Figure 5: Structure chimique des bases azotées cytosine et 5-méthylcytosine.....16

Figure 6: Désamination de la 5-méthylcytosine en thymine.....17

Figure 7: Appariement de la 5-méthylcytosine.....18

Figure 8: La déméthylation de l'ADN.....21

Figure 9: Les dinucléotides CpG et îlots CpG dans les cellules somatiques normales.....23

Figure 10: Méthylation des gènes soumis à l'empreinte.....24

Figure 11: Importance des éléments répétés dans le génome.....29

Figure 12: Altération des profils de méthylation dans les cellules cancéreuses.....30

Figure 13: Pourcentage d'hyperméthylation des îlots CpG dans les cancers selon le type de tumeur.....31

Figure 14: Pourcentage d'hyperméthylation des îlots CpG dans les cancers selon le gène suppresseur de tumeur.....32

Figure 15: Les protéines capables de lier l'ADN méthylé se répartissent en trois familles structurelles.....33

Figure 16: Alignement des protéines MBD de l'homme, de la souris et du xénope.....34

Figure 17: Activité répressive de la protéine MeCP2.....35

Figure 18: Activité répressive de la protéine MBD1.....36

Figure 19 : Rôle de MBD2c dans le maintien à l'état pluripotent des ESCs.....37

Figure 20 : Activité répressive de la protéine MBD2.....38

Figure 21: Structure de la 5-Azacytidine et de la 5-Aza-2'deoxycytidine.....44

Figure 22: Les cellules du microenvironnement tumoral.....47

Figure 23: Illustration de quelques interactions de signalisation au sein du microenvironnement.....51

Figure 24: Activation des fibroblastes résidents.....54

Figure 25: Reprogrammation métabolique du microenvironnement tumoral.....59

Figure 26: Modèle de classification des CAFs selon leurs fonctions.....61

Figure 27: Exemples de stratégies visant à cibler les CAFs.....64

Figure 28: Taux de changement des gènes identifiés *in vitro* uprégulés par les milieux conditionnés de CAFs dans les cellules SKBR3 et AU565 traitées par ces milieux conditionnés ou par le milieu conditionné de prépuces.....96

Figure 29: Taux de méthylation sur les TSS des gènes identifiés in vitro up régulés par les milieux conditionnés de CAFs dans les tissus tumoraux et dans les tissus normaux issus des mêmes patientes.....97

Figure 30: Schéma du concept des récepteurs à dépendance.....99

Figure 31: Représentation schématique des principaux résultats.....110

Figure 32: Schéma représentant l'activité du récepteur Patched en présence et en absence de son ligand SHH.....115

Tableau 1: Principales modifications des histones et des variants d'histones.....25

Tableau 2: Principaux marqueurs des CAFs.....56

Liste des abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique
ANG-1 : *Angiopoïetine-1*
ARN : Acide ribonucléique
ARNm : ARN messager
ARNpi : ARN interagissant avec les protéines Piwi
ARNr : ARN ribosomique
ARNsi : petit ARN interférents endogènes
ARNsn : petit ARN nucléaires
ARNsno : petits ARN nucléolaires
ARNt : ARN de transfert
BER : Base Excision Repair
BRE : B Responsive Element
CAF : Cancer associated fibroblasts
CC : Domaine Coiled-coil
CCL2 : *C-C motif chemokine ligand 2*
CCL5 : *C-C motif chemokine ligand 5*
CpG : Dinucléotides 5'-Cytosine-Guanine-3'
CSF : *Colony-Stimulating Factor*
CTL : Lymphocytes T Cytotoxique
CXCL9 : *C-X-C motif chemokine ligand 9*
CXCL10 : *C-X-C motif chemokine ligand 10*
DNMT : ADN méthyltransférases
EndMT : Transition Endothéliale mésenchymateuse
FAP : Fibroblast activation protein
FGF : *Fibroblast Growth Factor*
FGF2 : *Fibroblast growth factor 2*
FSP1 : Fibroblast specific protein-1
HDAC : Enzymes histone désacétylases
HGF : *Hepatocyte growth Factor*
ICF : *Immunodeficiency, Centromeric region instability, Facial anomalies*
IGF1R : *Insulin-like growth factor 1 receptor*
IGF-II : *Insulin-like growth factor II*
Inr : Initiator Element
miARN : microARN
MAFs : Metastasis Associated Fibroblasts
MBP : Methyl-DNA-binding proteins
MEC : Matrice extracellulaire
NG2 : *Neuron glial antigen-2*
NK : Natural Killer
NSC : Cellule souche neuronale
PDGF : *Platelet-derived growth factor*
PDGR α et β : *Platelet derived growth factor receptor α et β*
PGE2 *: Prostaglandin E2*
SAM : S-adénosylméthionine
STC1 : Glycoprotéine stanniocalcin-1
TBP : Tata binding protein

TEM : Transition Epithélio Mésenchymateuse
TET : *Ten Eleven Translocation methylcytosine dioxygenase*
TGF-β : *Transforming Growth Factors Beta*
TNF-α : *Tumour necrosis factor*
TRD : Transcription Repression Domain
TSS : Transcription start site
VEGF : *Vascular Endothélial Growth Factors*
VIM : *Vimentin*
3'UTR : 3' untranslated region
5caC : 5-carboxycytosine
5fC : 5-formylcytosine
5hmC : 5-hydroxymethylcytosine
5mC : 5-méthylcytosines
5'UTR : 5' untranslated region
α-SMA : *Alpha Smooth Muscle Actin*

Introduction

Partie I : Epigénétique et régulation transcriptionnelle

1. Organisation et régulation du génome humain

A. Organisation du génome humain

La grande majorité de l'information génétique est stockée sous forme de molécules d'acides désoxyribonucléiques (ADN) qui se trouvent principalement dans le noyau des cellules et en petite quantité dans les mitochondries. Ces molécules d'ADN, porteuses d'informations, sont répliquées et partagées également entre les deux cellules filles lors de la mitose. L'information génétique est exprimée en différents gènes qui assurent le bon fonctionnement de la cellule. On compte entre 20 000 et 35 0000 gènes répertoriés selon les définitions et disponibles dans diverses bases de données tels que ENSEMBL (Cunningham *et al*, 2015).

Chez les eucaryotes les unités de transcription sont monocistroniques c'est à dire qu'elles correspondent à un gène. Les gènes peuvent être départagés en 3 classes. Les gènes de classe 1 ont comme produits des ARN ribosomiques et sont transcrits par l'ARN polymérase I. Les gènes de classe 2 ont comme produits des protéines et des ARN fonctionnels et sont transcrits par l'ARN polymérase II. Enfin les gènes de classe 3 ont comme produits des ARN de transfert, des ARN ribosomiques 5S et des petits ARN, et sont transcrits par l'ARN polymérase III.

Ces différents types de gènes sont donc régulés par des facteurs spécifiques en fonction de leurs polymérases. On parle de **facteurs *cis* et *trans*** ; les facteurs *cis* correspondent aux séquences de nucléotides impliquées dans la régulation de ces gènes, également appelées, **régions promotrices**. Ces régions promotrices sont reconnues par les facteurs *trans* capables eux de lier l'ADN et de réguler l'expression de ces gènes.

Nous nous focaliserons sur les gènes transcrits par l'ARN polymérase II.

Ils sont composés aux niveaux de leur extrémité 5' d'une région promotrice bien souvent définie entre -2Kb à +0,5Kb par rapport au site d'initiation de la transcription (TSS). Il est important de noter ici que nous utiliserons cette définition dans la suite de notre étude.

Cette région promotrice peut contenir différents élément tels que :

- Une boite TATA (Yang *et al*, 2007)
- Une boite CCAAT
- Un élément Inr (Initiator Element)
- Un élément BRE (B Responsive Element)
- Un îlot CpG[1] (Deaton & Bird, 2011).

Ainsi que de nombreux autres sites de fixations de facteurs de transcriptions. L'exemple du promoteur du gène de la β-globuline est représenté en Figure 1.

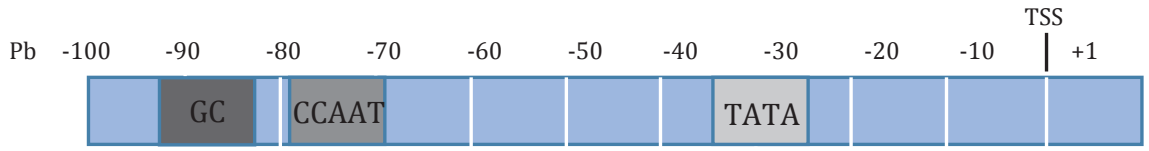


Figure 1: Exemple du promoteur du gène de la β-globuline : Ce promoteur comprend une boite TATA, une boite CCAAT, et un îlot CpG, pb (paire de bases).

Les promoteurs reconnus par l'ARN polymérase II sont très hétérogènes. Il a notamment été montré que seul 32% des gènes possèdent une boite TATA, généralement observé sur des gènes dont l'expression est spécifique d'un tissu. Les gènes présentant des profils d'expression complexe présentent plutôt des îlots CpG aux niveaux de leurs promoteurs.

Ces éléments ainsi que de nombreux autres sites de fixation de facteurs de transcription permettent le recrutement de protéines TBP (TATA binding proteins). Ces protéines entraînent la formation d'un complexe d'activation permettant le recrutement de l'ARN polymérase II.

[1] Notion définie page 17

Nous pouvons également retrouver sur ces gènes une région située entre le site d'initiation de la transcription et le codon d'initiation de la traduction appelée 5' UTR pour 5' *untranslated region* (région transcrite non traduite) ainsi qu'une région située entre le codon stop de la traduction et le site de terminaison de la transcription appelée 3' UTR (Figure 2).

Par ailleurs, les gènes de classe 2 sont constitués de différents segments, en effet ils sont composés d'**exons** correspondant aux régions codantes et d'**introns** correspondant aux régions non codantes. Les introns sont des régions systématiquement exclus de l'ARN messager (ARNm) alors que les exons peuvent être inclus ou exclus dans l'ARNm en fonction de l'épissage alternatif.

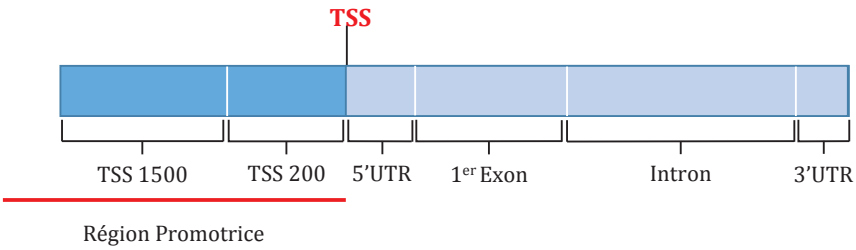


Figure 2: Schéma des différentes régions d'un gène.

B. Régulation de l'expression génique chez l'homme

Toutes les cellules de notre corps contiennent le même ensemble de gènes qu'il s'agisse d'un neurone, d'une cellule musculaire ou d'une cellule de la peau (sauf les lymphocytes B et les gamètes) cependant ces cellules n'ont ni la même forme, ni la même fonction et ne réagissent pas aux mêmes signaux environnementaux. Les différences présentes d'un point de vue anatomique, comportemental et physiologique entre les cellules sont dues à des différences entre leur profil d'expression génique. L'expression des gènes permet ainsi à la cellule de répondre correctement à son environnement afin d'assurer les besoins de l'organisme entier.

L'expression des gènes dépend de la transcription de ceux-ci. La transcription est donc un processus très contrôlé, en effet le choix de la zone du génome à transcrire mais également du niveau de transcription est crucial pour la cellule. Ce processus est contrôlé par un ensemble de facteur régulateur agissant en plusieurs étapes.

a. Protéines capables de moduler l'activité de la transcription

La transcription est fortement influencée par différentes protéines capables de réguler les promoteurs.

On retrouve d'une part **les facteurs de transcription** qui sont des protéines capables de se lier à l'ADN sur des séquences spécifiques situées sur ou près du promoteur. Ils sont caractérisés par la présence d'un domaine de liaison à l'ADN qui leur confère leur spécificité.

D'autre part **les co-activateurs et les co-répresseurs** sont des protéines capables de s'associer au complexe d'initiation de la transcription par l'intermédiaire d'interactions protéines-protéines.

Par ailleurs certaines protéines ont également la capacité de se lier à des séquences spécifiques, activatrices (nommée **enhancers**) ou inhibitrices (nommée **silencers**) situées à une certaine distance du promoteur. Ces protéines, par l'intermédiaire d'une boucle d'ADN les rapprochant du promoteur, sont capables de contrôler l'activité du promoteur (Figure 3a).

L'activité de ces enhancers et silencers peut être contrôlée/limitée par d'autre éléments appeler **insulateurs.** Ces insulateurs ne modifient pas l 'activité des enhancers et des silencers mais empêchent leurs communications avec les promoteurs en segmentant les chromosomes en domaines fonctionnellement indépendants (Vogelmann *et al*, 2011). Il s'agit d'un élément de régulation supplémentaire, permettant ou non le rapprochement des enhancers ou silencers avec les promoteurs (Figure 3b). Ces éléments insulateurs semblent notamment important lorsque deux gènes sont proches l'un de l'autre empêchant que l'effet des enhancers/silencers ne se répercute sur le gène suivant. Par ailleurs ces éléments semblent également importants dans les phénomènes d'empreinte parentale[2].

[2] Notion définie page 24

Ces divers éléments régulateurs permettent un contrôle très précis de la transcription des gènes permettant de coordonner les multiples réponses cellulaires face aux signaux extérieurs.

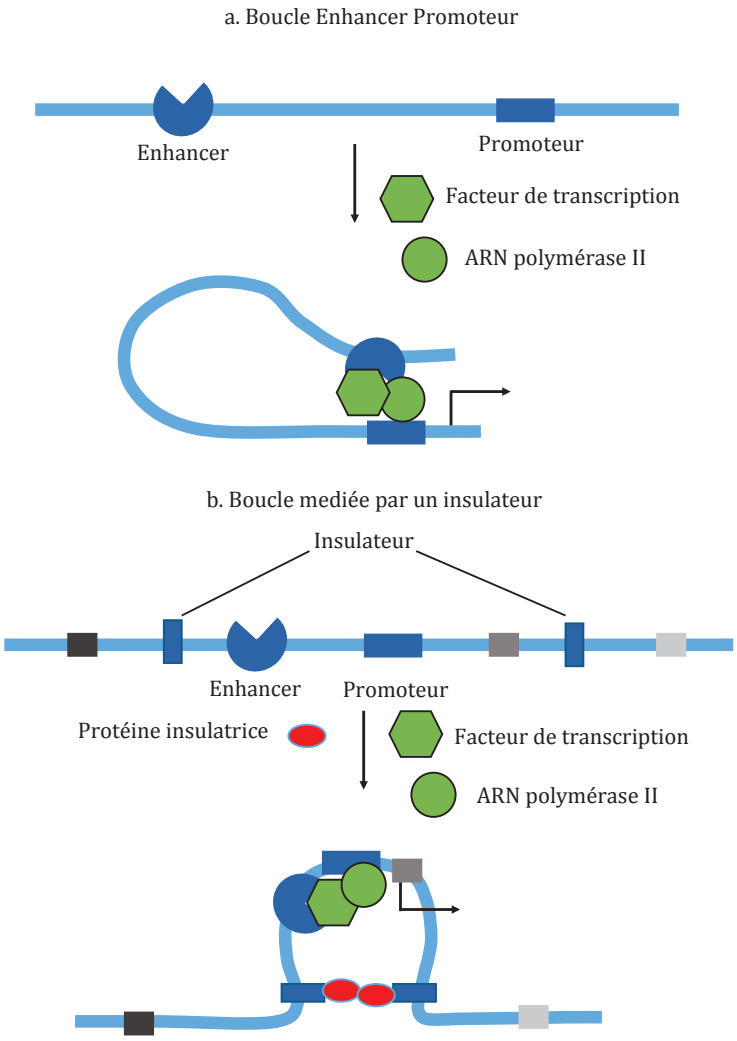


Figure 3: Schéma représentant l'effet des enhancers et des insulateurs sur la chromatine. a. Boucle enhancer promoteur médiée par un facteur de transcription spécifique permettant l'activation de la transcription. b. Boucle médiée par un insulateur permettant de séparer la partie codante du gène et sa région régulatrice du génome environnant contenant d'autres éléments régulateurs (Cavalli & Misteli, 2013).

b. Conformation de la chromatine

La molécule d'ADN forme des complexes avec différentes protéines et subit différents niveaux de compaction pour former la chromatine. L'état de la chromatine joue un rôle important dans le contrôle de la transcription des gènes. Le niveau de base de

compaction est le nucléosome, il s'agit d'un complexe de huit molécules d'histones centrales (deux de chaque histones H2A, H2B, H3, H4) autour duquel s'enroule 147 paires de base d'ADN. Les différents nucléosomes sont séparés par un fragment d'ADN libre, l'ensemble étant stabilisé par une molécule d'histone de liaison H1 et formant ce que l'on appelle une structure en *collier de perle.* Ce premier niveau d'empaquetage permet une activité transcriptionnelle.

Les queues N-terminales des histones présentes en dehors du nucléosome peuvent subir différentes modifications (acétylation, phosphorylation, et méthylation) pouvant affecter la condensation ainsi que le niveau de transcription de la chromatine.

Il existe deux types de chromatine, la chromatine dite ouverte ou **euchromatine** et la chromatine dite fermée ou **hétérochromatine**, dû à la présence de la protéine HP1 empaquetant les nucléosomes entre eux. L'euchromatine étant associée à des régions plus fortement transcrites (promoteur, exons et introns de gènes exprimés) alors que l'hétérochromatine est-elle associée à des régions faiblement transcrites (régions inter-géniques, régions d'ADN répétées). L'hétérochromatine peut être constitutive c'est-à-dire qu'elle conserve cette caractéristique fermée à travers les divisions cellulaires ou facultative c'est-à-dire qu'elle se forme de façon réversible en fonction de différents stimuli extérieurs et fait partie intégrantes du contrôle de l'expression génique (Grewal & Jia, 2007).

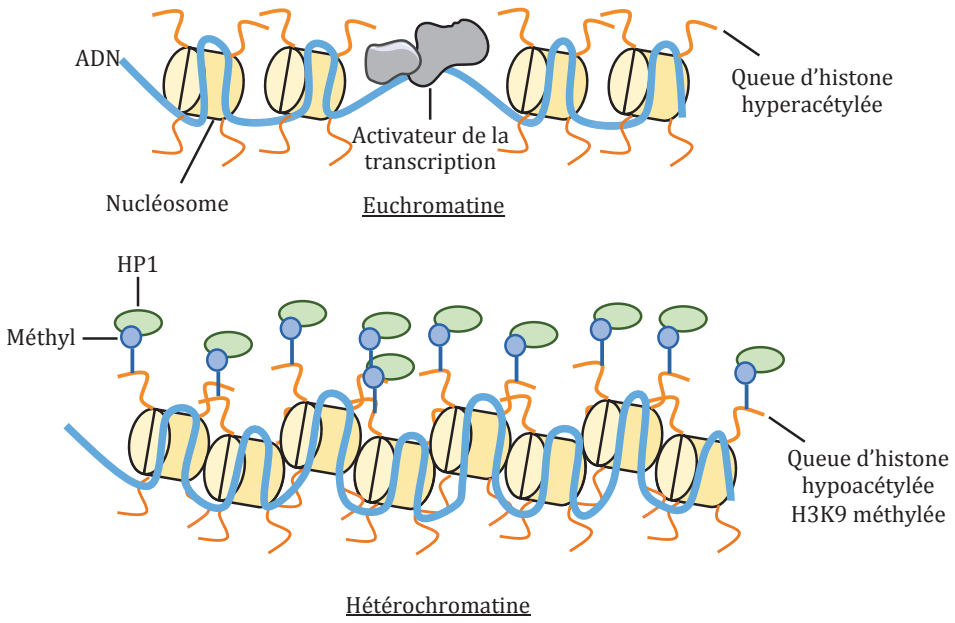


Figure 4: Schéma de l'euchromatine et de l'hétérochromatine. L'euchromatine est moins compactée, laissant des régions libres pouvant être fixée par la machinerie de transcription. L'hétérochromatine plus compactée est associée à la protéine HP1. Les deux états sont associés à des modifications d'histones différentes.

c. Rôle des ARN non codants dans la régulation de la transcription

Le nombre de gènes codant pour des protéines a régulièrement été revu à la baisse alors que le nombre de gènes codant pour des ARN fonctionnels non codant a été quant à lui constamment revu à la hausse. Ces ARN non codants assurent diverses fonctions.

Les ARN ribosomiques (ARNr) et les ARN de transfert (ARNt) sont essentiels à la traduction des ARNm.

D'autres ARN non codants interviennent également pour assurer la maturation des ARNm, ARNt et ARNr. C'est le cas notamment des petit ARN nucléaires (ARNsn) impliqués dans l'épissage et les petits ARN nucléolaires (ARNsno) impliqués dans des modifications de certains nucléotides de l'ARNr.

Les microARN (miARN) jouent un rôle dans la régulation de l'expression de gènes cibles particuliers en s'appariant avec leurs transcrits inhibant ainsi leurs traductions (Du & Zamore, 2005).

Les ARN interagissant avec les protéines Piwi (ARNpi) sont exprimés dans les cellules de la lignée germinale où ils limitent l'activité des éléments transposables (Girard & Hannon, 2007).

Les petits ARN interférents endogènes (ARNsi) favorisent la dégradation d'ARN cible *via* le complexe RISC (RNA- Induced Silencing Complex) (Sasidharan & Gerstein, 2008).

Enfin il existe également plusieurs milliers de longs ARN non codants impliqués dans la régulation de la transcription des gènes en s'associant aux complexes de modification de la chromatine. Par exemple le gène *XIST* code pour un long ARN non codant Tsix qui contrôle l'inactivation du chromosome X chez la femelle (Pollex & Heard, 2012). L'ARN H19 est quant à lui impliqué dans la répression de la transcription de l'allèle maternel ou paternel de régions soumises à l'empreinte (Issa & Baylin, 1996).

En conclusion de nombreux ARN transcrits par la cellule jouent un rôle majeur dans la régulation de la transcription des gènes.

2. L'information épigénétique

L'information épigénétique peut se définir comme étant une information non génétique inhérente à la cellule et transmise aux cellules filles lors de la mitose. Ces informations définissent l'épigénome d'une cellule et se caractérisent par de multiples formes influençant l'expression des gènes. Nous pouvons notamment observer des modifications chimiques de l'ADN, des modifications post-traductionnelles des protéines histones, différents variants d'histones, des ARN non codants (miRNA, piRNA, lncRNA) et certains facteurs de transcriptions. Contrairement aux informations génétiques les informations épigénétiques ont la particularité d'être potentiellement réversibles. On distingue les marques épigénétiques associées à une activation et les marques associées à une répression du niveau de transcription (Bird, 2007).

A. Méthylation de l'ADN

La méthylation de l'ADN implique la méthylation d'une partie des résidus cytosines sur leur carbone 5 pour donner des 5-méthylcytosines (5mC).

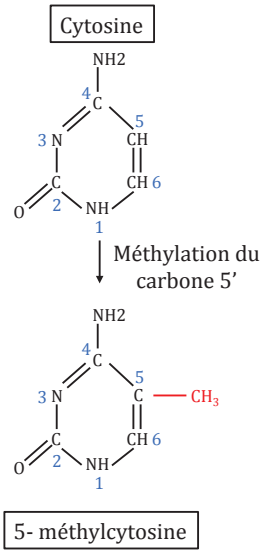


Figure 5: Structure chimique des bases azotées cytosine et 5-méthylcytosine.

Dans la plupart des cas seules les cytosines dont la base voisine en aval est une guanine, c'est à dire les dinucléotides 5'-Cytosine-Guanine-3' (CpG) peuvent être méthylées de façon symétrique sur les deux brins d'ADN (Gruenbaum *et al*, 1981; Sinsheimer, 1955).

Dans le génome les sites CpG sont relativement rares, leur fréquence globale observée est bien plus faible que leur fréquence théorique que l'on peut estimer par la fréquence de C et la fréquence de G. Ainsi dans la plupart des régions du génome, le taux de CpG observés / CpG théoriques est faible, de l'ordre de 0,2. Nous pouvons, du moins partiellement, expliquer ce phénomène par le fait que la 5-méthylcytosine est chimiquement instable et a tendance à se désaminer en thymine une base naturelle de l'ADN qui n'est donc pas efficacement reconnue par la machinerie de réparation de l'ADN (Bird, 1980). Au cours de l'évolution le nombre de CpG a ainsi progressivement diminué en raison de la conversion des CpG en TpG.

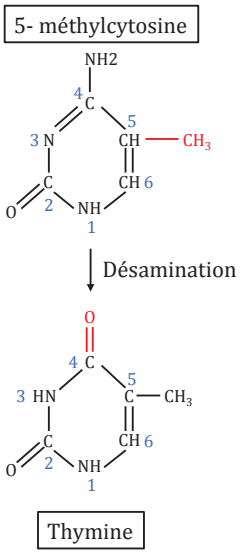


Figure 6: Désamination de la 5-méthylcytosine en thymine.

Cependant il existe dans le génome des séquences particulières appelées **îlots de CpG** qui présentent un taux de CpG observés / CpG théoriques plus élevé. Ces séquences ont été premièrement définies comme étant des zones de plus de 200 paires de bases, riches en G+C, supérieure à 50%, dont le taux de CpG observés / CpG théoriques est supérieur à 0,6 (Gardiner-Garden & Frommer, 1987). D'autres définitions plus stringentes ont également vu le jour définissant les îlots de CpG par des zones de plus de 500 paires de

bases présentant un contenu en G+C, supérieure à 55%, dont le taux de CpG observés / CpG théoriques est supérieur à 0,65 (Takai & Jones, 2002).

Le groupement méthyle se place dans le grand sillon sur la face extérieure de la double hélice d'ADN, ce qui n'empêche pas l'appariement de la cytosine avec la guanine et ne modifie pas la conformation en double hélice B de l'ADN. Cette méthylation de l'ADN est synthétisée par des enzymes spécifiques appelées ADN méthyltransférases (DNMT) et des cofacteurs fortement régulés.

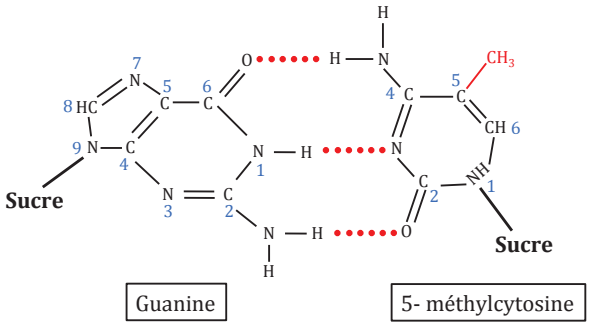


Figure 7: Appariement de la 5-méthylcytosine. La 5-méthylcytosine s'apparie avec la guanine de la même manière que la cytosine.

a. Mécanismes de méthylation et de déméthylation

- ADN méthyltransférases, les auteurs de la méthylation de l'ADN

Chez l'homme, il existe trois DNMT fonctionnelles (DNMT1, DNMT3A et DNMT3B). Ces enzymes sont capables de méthyler l'ADN avec une forte affinité pour les cytosines présentes au sein des sites CpG. Cette réaction de méthylation, nécessite un cofacteur la S-adénosylméthionine (SAM) qui transfère son groupement méthyle et devient une S-adénosyl-L-homocystéine (SAH).

L'enzyme DNMT1 présente trois isoformes DNMT1a et DNMT1b, du a un épissage alternatif, et DNMT1o spécifique de l'ovaire. L'enzyme DNMT1 assure la maintenance des sites CpG méthylés lors de réplication. En effet DNMT1 est plus active sur les sites CpG hémi-méthylés que sur les sites CpG non méthylé, ce qui permet d'assurer la persistance de la méthylation des sites CpG au cours des divisions cellulaires (Reik *et al*,

2001). De plus l'enzyme DNMT1 peut interagir avec de nombreuses autres protéines dans divers complexes (Wang & James Shen, 2004; Chin *et al*, 2016).

Les enzymes DNMT3A et DNMT3B joueraient un rôle préférentiel dans l'ajout de nouvelle marque de méthylation appelé méthylation *de novo* de l'ADN (Okano *et al*, 1998), cependant certaines études montrent également leur implication dans la maintenance de la méthylation (Jones & Liang, 2009). Il existe différents isoformes de DNMT3A et DNMT3B provenant d'épissage alternatif pouvant avoir différentes fonctions, par exemple le variant DNMT3B3 ne semble pas présenter d'activité méthyltransférase contrairement à l'isoforme DNMT3B1 (Aoki *et al*, 2001). La mutation du gène DNMT3B est responsable du syndrome ICF (*Immunodeficiency, Centromeric region instability, Facial anomalies*) induisant une hypométhylation limitée de l'ADN.
Une quatrième protéine DNMT3L a été identifiée. Inactive catalytiquement, elle jouerait un rôle dans l'activation des protéines DNMT3A et DNMT3B (Chedin *et al*, 2002) et serait notamment importante dans le phénomène d'empreinte parentale (Bourc'his *et al*, 2001). Une cinquième protéine, DNMT2, a également été identifiée et s'est révélée être une enzyme de méthylation de l'ARN (Goll *et al*, 2006).

- Effacement des marques de méthylation de l'ADN

La méthylation de l'ADN est un phénomène dynamique qui varie en fonction des contextes. L'élimination des marques de méthylation fait donc partie intégrante de la régulation épigénétique. Ces marques peuvent être éliminées par plusieurs mécanismes (Wu & Zhang, 2014).

Au cours de la réplication de l'ADN, en absence d'activité de maintenance de la méthylation, on observe une déméthylation passive de l'ADN. En effet au cours de la réplication, les sites CpG méthylés symétriquement se retrouvent hémi-méthylés, l'enzyme DNMT1 copie alors la méthylation du brin mère sur le brin nouvellement synthétisé. Par conséquent en absence de cette activité de maintenance de la méthylation, les CpG méthylés sont progressivement dilués lors de la réplication. Ainsi dans les tissus en prolifération, un arrêt ou une baisse de la méthylation de maintenance

entraîne une déméthylation de l'ADN. Par exemple, cette déméthylation passive jouerait un rôle important dans la baisse du taux global de méthylation lors des premières divisions cellulaires des zygotes (Smith *et al*, 2012).

D'autres mécanismes participent à l'élimination active de la méthylation, sur des sites spécifiques ou de manière globale, *via* notamment la réparation de l'ADN et l'oxydation.
Lors de certains processus de réparation de l'ADN, on observe l'excision d'un fragment d'ADN suivie d'une resynthèse à partir du brin complémentaire. Les cytosines intégrées sont alors non méthylées, par conséquent une réparation de l'ADN à proximité d'un site CpG méthylé peut entraîner sa déméthylation.
Par ailleurs les cytosines méthylées peuvent subir des désaminations induites par des désaminases (AID, APOBEC1). Cette désamination conduit à l'apparition d'une thymine et donc à un mésappariement T-G. Ce mésappariement est alors ensuite réparé par excision de base (BER-*Base Excision Repair*) (Hajkova *et al*, 2010) la cytosine intégrée est alors non méthylée.
La 5-méthylcytosine peut également être hydroxylée en 5-hydroxyméthylcytosine (5hmC) *via* des enzymes de la famille TET (Ten Eleven Translocation methylcytosine dioxygenase). Ces enzymes sont également capables de modifier la 5hmC en 5-formylcytosine (5fC) et en 5-carboxycytosine (5caC) (Kriaucionis & Heintz, 2009; Tahiliani *et al*, 2009; Ito *et al*, 2011). Ces produits oxydés peuvent être activement supprimés, par réparation de l'ADN ou passivement supprimés, par division cellulaire (He *et al*, 2011; Hashimoto *et al*, 2012). La 5hmC serait ainsi un intermédiaire réactionnel à la déméthylation.

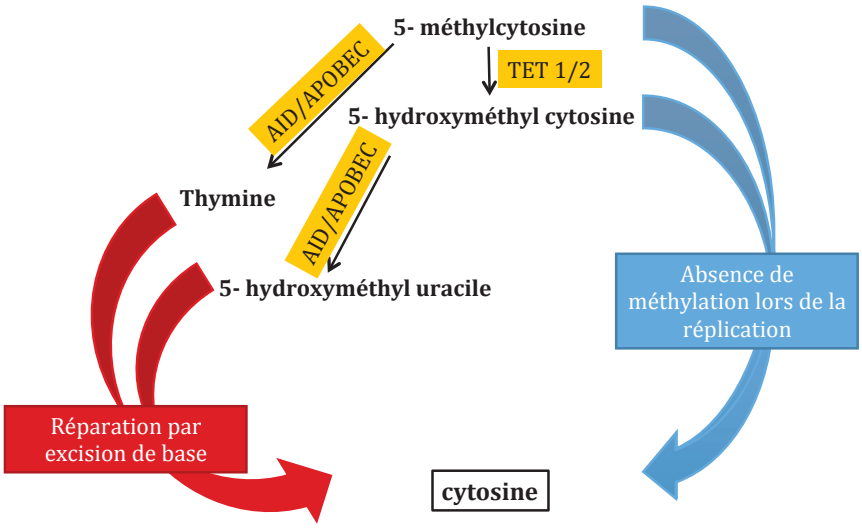


Figure 8: La déméthylation de l'ADN.

b. Fonctions de la méthylation de l'ADN

- Méthylation de maintenance et état de la chromatine

Comme nous l'avons vu précédemment, il existe deux types de chromatine, la chromatine dite ouverte (euchromatine) et la chromatine dite fermée (hétérochromatine). Il est important que cette caractéristique soit maintenue au cours des divisions cellulaires. Lors de la réplication de l'ADN génomique, la protéine DNMT1, afin d'assurer la maintenance de la méthylation, est recrutée sur les sites CpG hémi-méthylé. DNMT1 ainsi que d'autres protéines capables de se lier à l'ADN méthylé sont alors capables de recruter des enzymes histones méthyl-transférases (SUV39H1 ou SETDB1) et histones désacétylases. Ces enzymes vont alors modifier les queues d'histones des nucléosomes et aboutir à la compaction de la chromatine. La méthylation de l'ADN est ainsi impliquée dans le maintien de la compaction de la chromatine après réplication (Li, 2002).

- Méthylation du promoteur et répression des gènes

Dans plus de la moitié des gènes et dans presque la totalité des gènes ubiquitaires on observe la présence d'îlots CpG à proximité des sites d'initiation de la transcription.

De manière très courante, la méthylation des régions promotrice d'un gène a été associée à sa répression transcriptionnelle (Bird & Wolffe, 1999). Des expériences de transfection de plasmide méthylé et de mesure du taux de transcription du gène rapporteur ont montré que les gènes contenus dans les plasmides méthylés présentaient une expression beaucoup plus faible (Cedar, 1988).

La méthylation de l'ADN n'entraîne pas directement une baisse de l'activité de l'ARN polymérase II (Jove *et al*, 1984). Cette répression transcriptionnelle passerait donc par des mécanismes indirects, nécessitant d'autres facteurs capables d'interpréter ces marques de méthylation. Deux mécanismes principaux expliquent cette répression transcriptionnelle. Premièrement de nombreux facteurs de transcription ne reconnaissent plus leur séquence cible si cette dernière est méthylée (Zhu *et al*, 2016). Deuxièmement des protéines sont capables de se fixer spécifiquement sur l'ADN méthylé et d'entraîner une répression transcriptionnelle *via* le recrutement de complexes répresseurs. Comme nous l'avions signalé auparavant la présence de 5mC n'a que très peu d'influence sur la structure de la double hélice d'ADN. Elle modifie cependant la forme et la surface électrostatique du grand sillon de l'ADN interférant ainsi avec la fixation de facteurs de transcription et le recrutement d'autres protéines spécifiques.

La majorité des îlots CpG sont dans la plupart des cas non méthylés, les mécanismes protégeant les îlots CpG de la méthylation font l'objet d'études. Une hypothèse montre notamment que la fixation de facteurs de transcription et de protéines spécifiques des îlots CpG non-méthylés pourrait réduire l'accessibilité des DNA méthyltransférases sur ces sites (Thomson *et al*, 2010). Cependant une petite fraction des promoteurs, contrôlant notamment des gènes spécifiques de certains tissus ou des gamètes ainsi que des gènes soumis à l'empreinte parentale sont eux méthylés.

- Méthylation en dehors des îlots CpG

Les doublets CpG présents hors des contextes îlots CpG sont quant à eux fortement méthylés de l'ordre de 60-80%. Cette méthylation, majoritairement présente dans les séquences extra-géniques, touche en particulier les éléments répétés. Elle permettrait

ainsi une répression de la transcription des éléments transposables (Slotkin & Martienssen, 2007).

La méthylation joue également un rôle dans la structure du génome, par exemple dans la formation des chromocentres des chromosomes interphasiques (Gilbert *et al*, 2007).

Au niveau des régions intra-géniques, les exons inclus dans les transcrits présenteraient des taux de méthylation plus important par rapport aux exons non inclus ou aux introns. Ceci indiquerait un rôle de la méthylation dans le guidage de la machinerie de transcription et d'épissage (Shukla *et al*, 2011).

Par ailleurs la méthylation intra-génique pourrait également avoir un rôle dans l'inhibition d'éventuels promoteurs alternatifs (Maunakea *et al*, 2010).

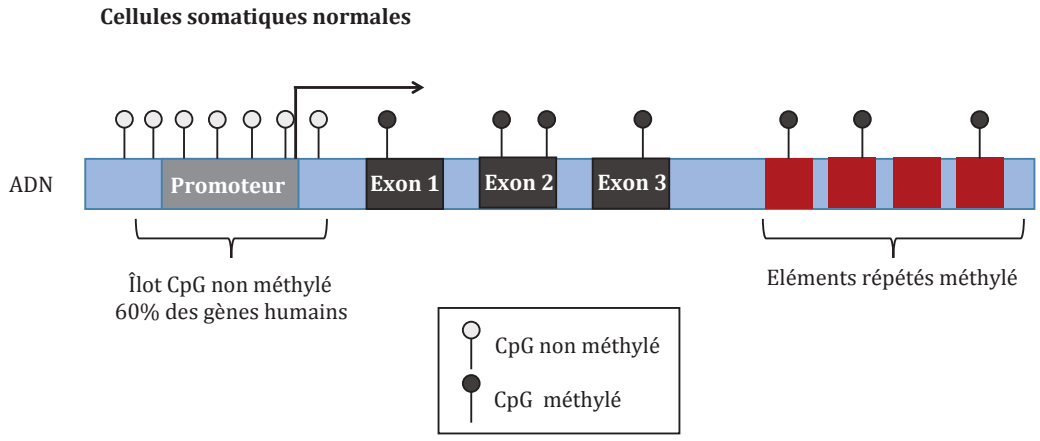


Figure 9: Les dinucléotides CpG et îlots CpG dans les cellules somatiques normales.

- Méthylation de l'ADN et inactivation du chromosome X

Précédemment, nous avons vu que le gène *XIST* qui code pour un long ARN non codant Tsix permet de contrôler l'inactivation du chromosome X chez la femelle. Or l'expression du gène *XIST* cesse rapidement sur le chromosome inactivé n'alimentant plus la production d'ARN Tsix. Cette inactivation du chromosome X est alors maintenue dans un second temps par des modifications épigénétiques, telle que l'hyperméthylation de l'ADN. La méthylation de l'ADN participe ainsi au maintien de l'inactivation du chromosome X (Heard *et al*, 1997; Pollex & Heard, 2012).

- Méthylation de l'ADN et empreinte parentale

Certains gènes (une centaine identifiée à ce jour) présentent une expression mono-allélique. En effet selon l'origine parentale seul l'allèle transmis par le père ou la mère, sera exprimé dans les tissus somatiques. On observe très fréquemment une méthylation spécifique de l'allèle qui n'est pas exprimée.

Lors de la gamétogénèse les cellules germinales primordiales subissent une déméthylation importante suivie d'une re-méthylation. Le pronucléus femelle serait déméthylé de manière passive alors que le pronucléus mâle serait déméthylé de manière active (6 à 8 heures après fécondation).

Au cours de l'étape de re-méthylation les gènes soumis à l'empreinte établissent leurs marques de méthylation.

Après fécondation au cours du développement embryonnaire on observe une baisse du taux de méthylation des pronucléi mâle et femelle, cependant les marques présentent sur les gènes soumis à l'empreinte sont elles conservées.

Après implantation de l'embryon dans la paroi utérine, on observe alors une méthylation *de novo* du génome permettant l'établissement de l'identité cellulaire des différents tissus (Reik *et al*, 2001).

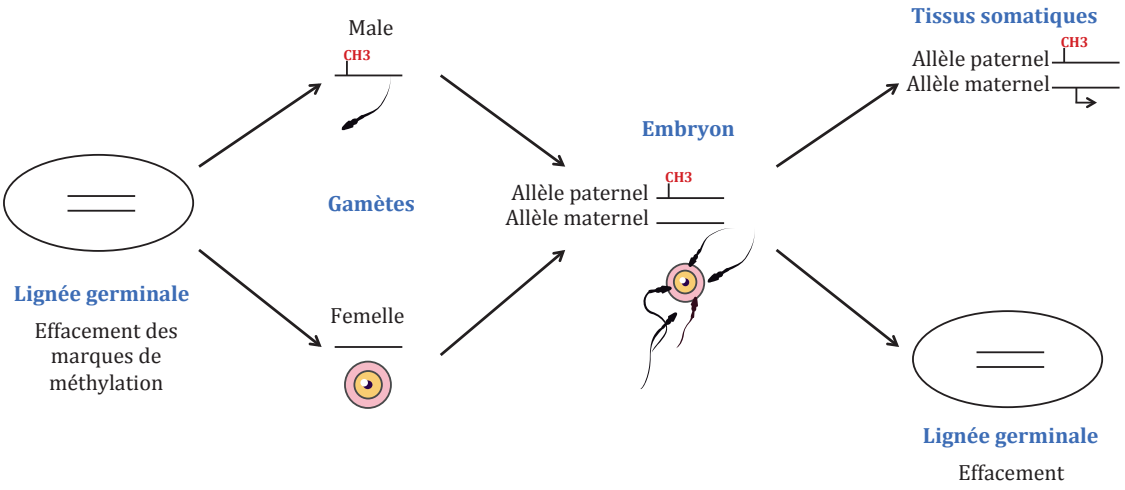


Figure 10: Méthylation des gènes soumis à l'empreinte.

B. Code histone

Les bases moléculaires de l'information épigénétique incluent également les modifications post-traductionnelles des queues d'histone ainsi que les variant d'histones pouvant être intégrés à la chromatine. Ces informations sont généralement nommées sous le terme « code histone » et synthétisées ci-dessous (Izzo & Schneider, 2010; Jenuwein & Allis, 2001; Yun *et al*, 2011; Sarma & Reinberg, 2005).

Marque histone	Fonctions
Méthylation des histones	
H3K4me1/me2/me3	Activation transcriptionnelle
H3K9me1/me2	Inhibition transcriptionnelle
H3K9me3	Inhibition transcriptionnelle et hétérochromatisation
H3K27me1/me2/me3	Inhibition transcriptionnelle
H3K36me	Régulation transcriptionnelle
H3K79me1/me2/me3	Activation transcriptionnelle
H3R2me2	Inhibition transcriptionnelle
H4K20me1/me2/me3	Inhibition transcriptionnelle et réparation de l'ADN
Acétylations des histones	
H2AK5ac	Activation transcriptionnelle et réparation de l'ADN
H3K14ac	Activation transcriptionnelle, réparation de l'ADN et réplication de l'ADN
H4K5ac	Activation transcriptionnelle, réparation de l'ADN et réplication de l'ADN
H4K8ac	Activation transcriptionnelle, réparation de l'ADN et réplication de l'ADN
H4K16ac	Activation transcriptionnelle et réparation de l'ADN
Phosphorylation des histones	
H3S10P	Activation transcriptionnelle
H2AXP	Réparation de l'ADN
Ubiquitination des histones	
H2AK119Ub	Activation transcriptionnelle et réparation de l'ADN
H2BK120Ub	Activation transcriptionnelle et réparation de l'ADN
Variants d'histones	
H2AX	Réparation des cassures double brins
H2AZ	Activation transcriptionnelle
CENP-A	Structure des centromères
H3.3	Activation transcriptionnelle et maintien des télomères

Tableau 1: Principales modifications des histones et des variants d'histones.

Différentes modifications des histones ainsi que l'intégration de variants d'histones agissent de manières coordonnées pour réguler différents processus cellulaires tels que la transcription des gènes, la réplication et la réparation de l'ADN.

Ces modifications d'histones ainsi que d'autres mécanismes épigénétiques agissent en synergie afin de réguler une large gamme de processus cellulaires.

Partie II : Méthylation de l'ADN et cancer

Le terme cancer désigne une maladie provoquée par une masse de cellules capables de proliférer de manières anormalement excessives, formant ainsi une tumeur et pouvant envahir d'autres tissus c'est à dire développer des métastases. On distingue les cancers issus de cellules épithéliales appelés carcinomes, les cancers issus de cellules d'un tissu conjonctif appelés sarcomes et les cancers hématopoïétiques. Cette pathologie résulte de l'accumulation d'altérations menant à des caractéristiques communes (Hanahan & Weinberg, 2011);

- Signal de prolifération soutenu.
- Echappement aux signaux limitant la prolifération.
- Capacité d'envahir d'autres tissus et de développer des métastases.
- Capacité réplicative infinie.
- Induction de l'angiogenèse.
- Résistance à la mort cellulaire.

Ces altérations sont de natures multiples et de causes multifactorielles. Elles peuvent être d'origine génétique, dues à des mutations somatiques acquises lors de la vie de l'individu par mutations spontanées ou par exposition à des éléments mutagènes (tabac, alcool, rayonnement UV, virus). Elle peuvent également être dues à des mutations germinales transmises par les gamètes à la descendance, c'est le cas des cancers familiaux, par exemple des mutations du gène *BRCA1* sont associées au développement de cancers du sein.
Ces altérations peuvent également avoir une origine épigénétique induisant des modifications de l'état de la chromatine.

Ces altérations peuvent s'associer de manière additive et conduire à l'activation de gènes oncogènes et à la répression de gènes suppresseurs de tumeurs.
Dans la suite de notre étude nous nous focaliserons sur les altérations de la méthylation de l'ADN dans les cancers.

1. Changement des profils de méthylation dans les cancers

A. Baisse du taux global de méthylation

On observe une baisse du taux global de méthylation de l'ADN dans les tissus cancéreux, de l'ordre de 10 à 30%, comparées à une grande variété de tissus normaux (Gama-Sosa *et al*, 1983). Cette altération a été observée dans divers cancers (Bedford & van Helden, 1987; de Capoa *et al*, 2003; Ehrlich, 2002), de façon plus ou moins marquée en fonction du type de cancer et du taux de méthylation des cellules d'origines. L'hypométhylation de l'ADN peut être observée durant les premiers stades de la tumorigénèse, par exemple dans des tissus hyperplasiques (augmentation anormale du nombre de cellules normales d'un tissu) (Goelz *et al*, 1985) et serait corrélée avec la progression tumorale (Ehrlich *et al*, 2006).

La baisse du taux global de méthylation de l'ADN dans les cellules cancéreuses serait majoritairement due à l'hypométhylation des séquences d'ADN répétées (Figure 12).
Cette hypométhylation des séquences répétées a pour conséquence d'augmenter l'instabilité génétique en limitant la répression de certains éléments transposables. Il a notamment été montré qu'une perte de 10% de la fonction de l'enzyme DNMT1 chez la souris peut entraîner l'apparition de lymphomes T due à une instabilité chromosomique ayant entraîné une altération du chromosome 15 (Gaudet *et al*, 2003).

Le taux de méthylation de ces séquences répétées (par exemple LINE-1, SAT2 et ALU), représentant environ la moitié du génome, (Figure 11) peut être utilisé comme un marqueur du taux global de méthylation et pourrait avoir une valeur indicatrice de l'état d'avancement de la pathologie (Weisenberger *et al*, 2005); Hoffmann & Schulz, 2005).

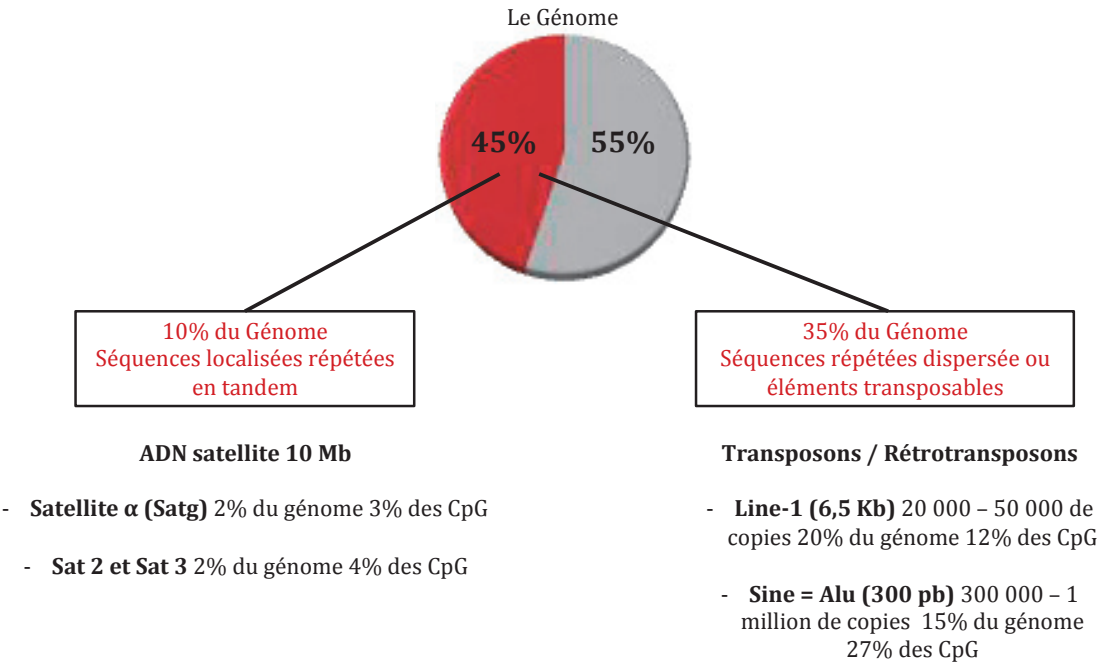


Figure 11: Importance des éléments répétés dans le génome.

L'hypométhylation de régions géniques dans le cancer semble être beaucoup moins fréquente néanmoins certaines hypométhylations touchent des régions géniques ainsi que des régions régulatrices et sont associées à une activation transcriptionnelle de ces gènes (Ortmann *et al*, 2008; Goelz *et al*, 1985). Par exemple le gène *PLAU* codant pour une urokinase uPA est hypométhylé dans les cancers du sein et du pancréas induisant une surexpression de cette protéine (Pakneshan *et al*, 2004; Pulukuri *et al*, 2007).

La baisse du taux de méthylation observée peut être due à différents mécanismes. Il a été suggéré que la phosphorylation de DNMT1 perturbant son interaction avec les protéines PCNA et UHRF1 pourrait être impliquée (Hervouet *et al*, 2010). D'autre part, une dérégulation des enzymes de la famille TET, impliquées dans la déméthylation active, pourrait également être impliquée dans la baisse du taux de méthylation (Scourzic *et al*, 2015).

B. Hyperméthylation locale

En parallèle de cette baisse de méthylation, on observe également des hyperméthylations locales de certains îlots CpG (Figure 12), particulièrement observées

dans les régions promotrices de gènes suppresseurs de tumeurs. Ces hyperméthylations jouent un rôle dans la répression transcriptionnelle de ces gènes et participent ainsi à l'échappement tumoral. En effet elles permettent aux cellules cancéreuses d'abolir les systèmes de contrôles de la prolifération cellulaire, d'apoptose ou encore de la sénescence.

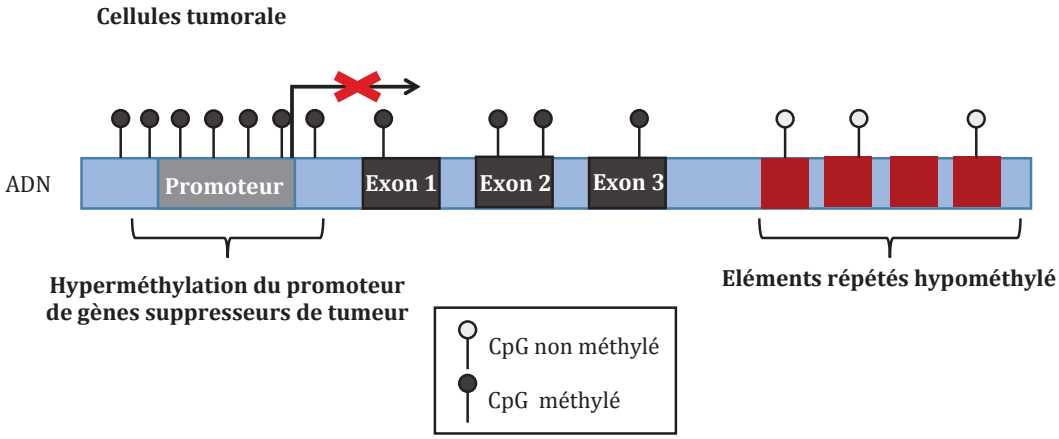


Figure 12: Altération des profils de méthylation dans les cellules cancéreuses.

Certains types de tumeurs présentent plus d'hyperméthylation d'îlots CpG que d'autres, par exemple les tumeurs provenant du tractus gastro-intestinale (œsophage, estomac, côlon) présentent d'importantes hyperméthylations (Figure 13). Les raisons de ces différences entre les types de tumeurs sont mal connues mais une hypothèse résiderait dans le fait que les types de tumeurs les plus hyperméthylés seraient celles les plus exposés aux agents cancérigènes externes comme par exemple les tumeurs du tractus gastro-intestinale.

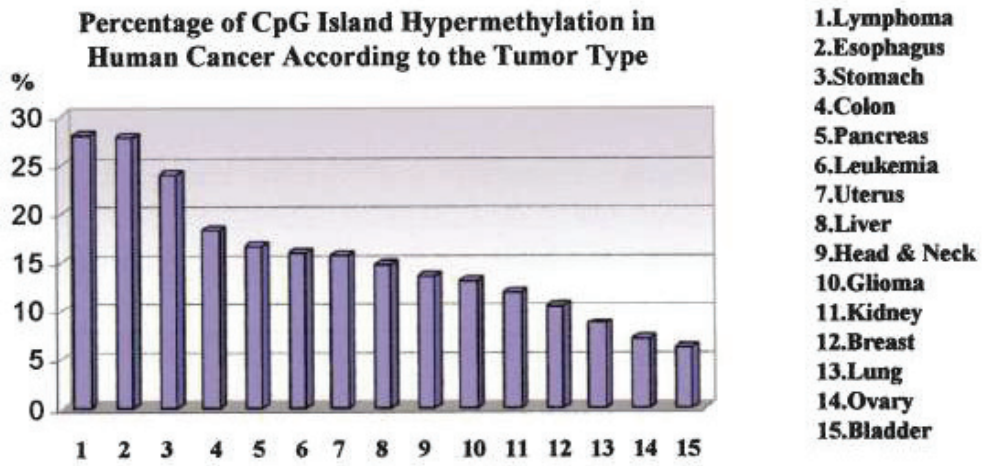


Figure 13: Pourcentage d'hyperméthylation des îlots CpG dans les cancers selon le type de tumeur d'après (Esteller, 2002).

Concernant les gènes affectés par ces hyperméthylation on retrouve des gènes impliqués dans différents mécanismes anti-tumoraux comme le contrôle du cycle cellulaire, la réparation de l'ADN, l'adhérence cellulaire, l'apoptose et le métabolisme (Figure 14).

Ces hyperméthylations de régions promotrices ont également été associées à la répression transcriptionnelle de multiple miRNA pouvant conduire à une régulation positive de leurs cibles oncogéniques (Saito *et al*, 2006).

Bien que la plupart des gènes affectés par l'hyperméthylation le soit de manière individuelle (Easwaran *et al*, 2010), certains domaines sous-chromosomiques montrent de multiples hyperméthylations sur certains loci (Coolen *et al*, 2010).

Par ailleurs nous pouvons signaler ici que certains gènes touchés par l'hyperméthylation dans les cancers présentent également ce type d'altération avec le vieillissement (Issa, 2000).

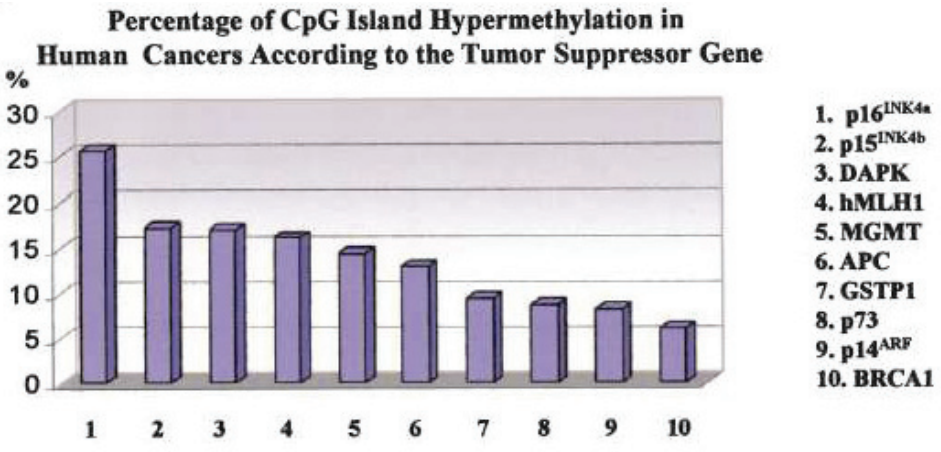


Figure 14: Pourcentage d'hyperméthylation des îlots CpG dans les cancers selon le gène suppresseur de tumeur (Esteller, 2002).

Ces hyperméthylations pourraient également avoir des conséquences génétiques. En effet la désamination de cytosine méthylé entraînant des transitions C vers T peut augmenter l'apparition de mutations ponctuelles des gènes suppresseurs de tumeurs.

Le rôle de l'hyperméthylation dans le développement tumorale est complexe, deux hypothèses coexistent actuellement. Une première montre un rôle précoce de la méthylation dans la tumorigénèse basée sur des études montrant que l'immortalisation d'une lignée cellulaire entraîne plus de changement de méthylation que sa transformation oncogénique (Gordon *et al*, 2014). Une seconde hypothèse serait plutôt en faveur d'un rôle secondaire de la méthylation, l'hyperméthylation pourrait avoir lieu dans un second temps une fois la répression acquise par d'autres mécanismes répresseurs et agir comme verrou pour fixer la répression.

Les origines de ces hyperméthylations locales sont multiples et restent un domaine de recherche, il semble néanmoins que la coexistence de phénomènes d'hyperméthylations et d'hypométhylations dans les cancers ne soit pas en faveur d'une augmentation de l'activité enzymatique des DNMTs, mais plutôt en faveur d'une dérégulation de cette activité notamment au niveau du ciblage de la méthylation.

2. Protéines de liaison à l'ADN méthylé

A. Les acteurs principaux

La répression transcriptionnelle induite par la méthylation passe principalement par des mécanismes indirects nécessitant des facteurs capables d'interpréter ces marques de méthylation. Ces facteurs sont appelés les *Methyl-DNA-binding proteins* (MBP), ils sont capables de se fixer spécifiquement sur l'ADN méthylé et d'entraîner une répression transcriptionnelle *via* le recrutement de complexes répresseurs.

Trois domaines structuraux sont actuellement connus pour leur capacité à se lier à l'ADN méthylé formant trois familles de protéines : la famille MBD, la famille SRA et les protéines à doigts de zinc (Figure 15) (Defossez & Stancheva, 2011a) .

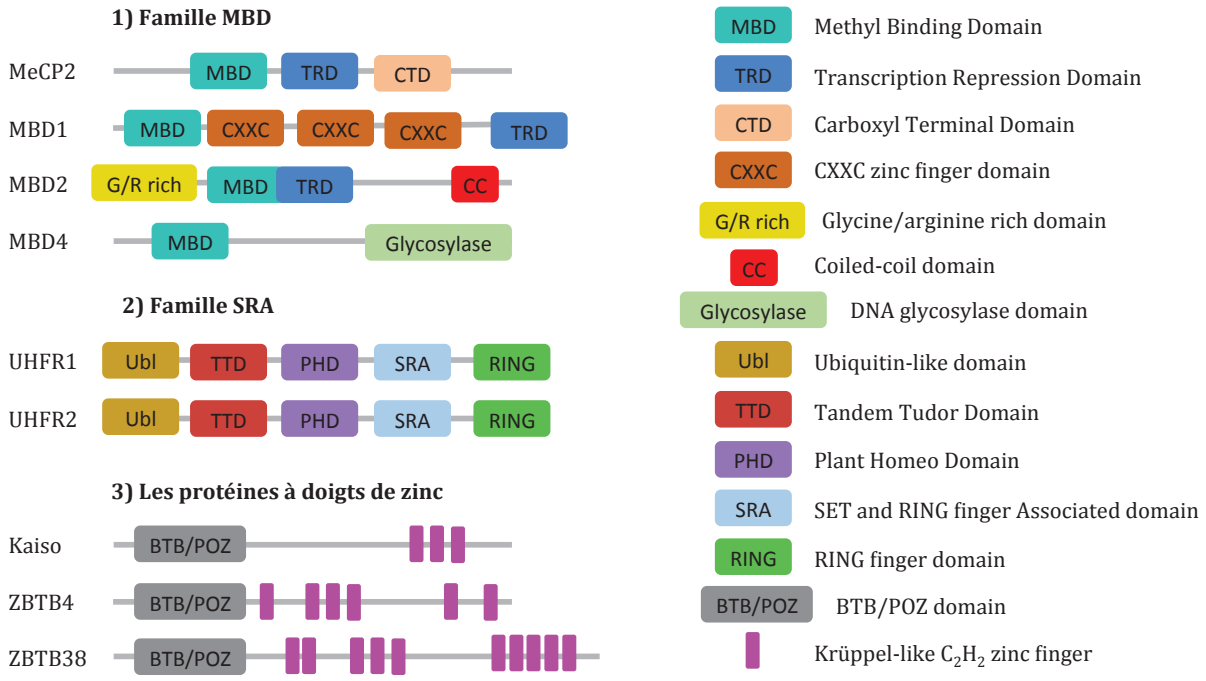


Figure 15: Les protéines capables de lier l'ADN méthylé se répartissent en trois familles structurelles.

a. La famille MBD

La famille MBD comprend les protéines MeCP2, MBD1, MBD2, MBD3 et MBD4 possédant toutes un domaine MBD. Ces protéines sont capables de se fixer au CpG méthylé, à

l'exception de la protéine MBD3 qui n'est pas capable de lier l'ADN méthylé chez les mammifères (Hendrich & Bird, 1998).

MeCP2 est la première protéine à avoir été isolée, la caractérisation de son domaine MBD a ensuite permis l'identification des autres protéines de cette famille. Ces protéines présentent des séquences protéiques similaires avec la présence de 4 feuillets β, d'une hélice α ainsi que d'une boucle « en épingle à cheveu » (Figure 16). Comme nous pouvons le voir sur la figure 16 le domaine MBD correspond à un domaine protéique amino-terminal d'une centaine d'acides aminés bien caractérisés et très conservés au cours de l'évolution. Notons ici que chez l'homme et la souris, certains acides aminés dans le domaine MBD de la protéine MBD3 ne sont pas conservés ce qui pourrait expliquer le défaut de fixation de la protéine MBD3 aux CpG méthylés chez les mammifères.

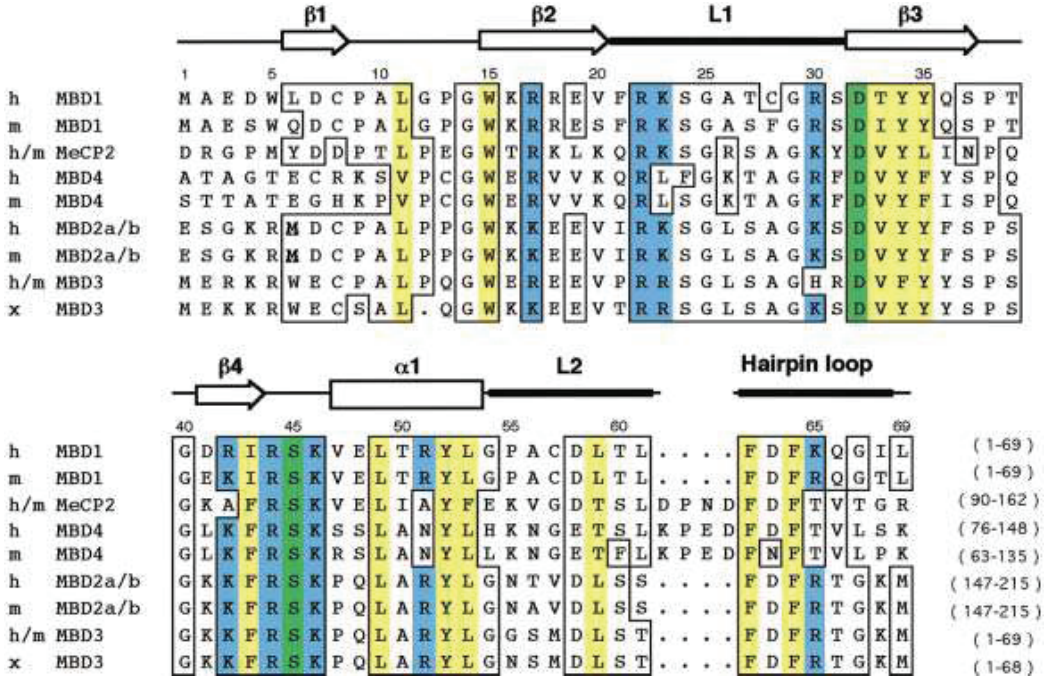


Figure 16: Alignement des protéines MBD de l'homme (h), de la souris (m) et du xénope (x). Les résidus importants sont surlignés : en bleu pour les résidus basiques, en jaune pour les résidus hydrophobiques et en vert pour les résidus acides. D'après (Ohki *et al*, 1999).

Le domaine MBD confère à ces protéines la capacité de se fixer aux CpG méthylés, le rôle de répresseur transcriptionnelle est quant à lui joué par un autre domaine : le domaine TRD pour « *Transcription Repression Domain ».* Ce domaine TRD a pu être identifié sur les protéines MeCP2, MBD1 et MBD2 mais contrairement au domaine MBD, il présente

des séquences protéiques différentes en fonction de la protéine et permet le recrutement de complexes répresseurs différents. Aucun domaine TRD n'a pu être identifié dans la protéine MBD4 qui ne possède pas d'activité répressive (Figure 15).

- La protéine MeCP2

La protéine MeCP2 présente un domaine TRD capable de recruter le répresseur SIN3A lui-même capable de recruter des protéines histones désacétylases (HDAC1) et histones méthyltransférases (Suv39H1) (Nan *et al*, 1998; McDonel *et al*, 2012). Ce complexe permet la désacétylation et la méthylation des queues d'histones induisant une répression transcriptionnelle par compaction de la chromatine (Figure 17). Le gène codant pour la protéine MeCP2 est localisé chez l'homme sur le chromosome X. Cette protéine est particulièrement importante pour le fonctionnement des cellules nerveuses où elle est présente à un niveau d'expression élevé. Elle a notamment été impliquée dans plusieurs pathologies neurologiques. La mutation du gène MeCP2 est responsable d'un syndrome de retard mental féminin appelé syndrome de Rett. Des duplications du gène MeCP2 sont également associées à des troubles sévères du développement neurologique affectant principalement les garçons. La duplication du gène MeCP2 n'étant pas une maladie neurodégénérative inéluctable, une équipe de recherche a réussi à supprimer les effets produits par la duplication du gène MeCP2 sur des souris génétiquement modifiées. La thérapie génique ouvre ainsi de nouvelles perceptives de traitement de cette pathologie (Sztainberg *et al*, 2015).

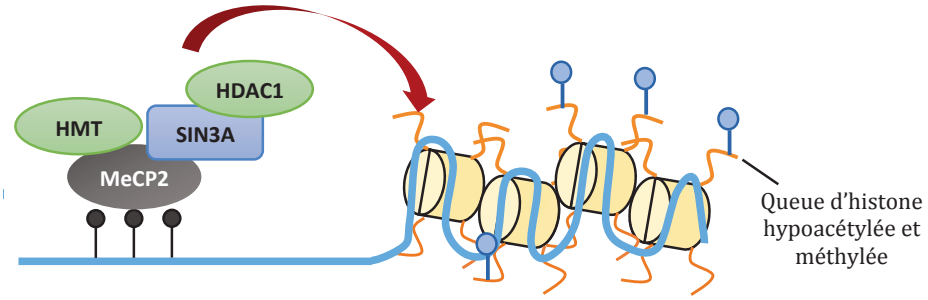


Figure 17: Activité répressive de la protéine MeCP2

- La protéine MBD1

La protéine MBD1 présente un domaine TRD capable de recruter les protéines histones méthyltransférase Suv39H1 et SETDB1 ainsi que des protéines histones désacétylases (Sarraf & Stancheva, 2004; Fujita *et al*, 2003) induisant une répression transcriptionnelle. MBD1 présente également plusieurs domaines à doigts de zinc CXXC (Figure 15) qui lui permet de se lier également à l'ADN non méthylé. Elle pourrait ainsi *via* ce domaine à doigts de zinc induire une répression transcriptionnelle de régions non méthylées (Jorgensen *et al*, 2004) (Figure 18). Il a été montré que des dysfonctionnements de cette protéine affectent la différenciation des cellules souches neuronales (NSC). En effet MBD1 permettrait la répression du microARN miR-184 dans les NSC permettant de contrôler l'équilibre entre la prolifération et la différenciation des NSC (Liu *et al*, 2010).

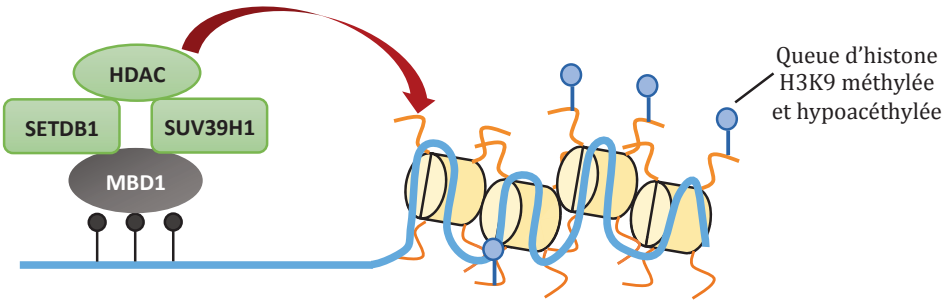


Figure 18: Activité répressive de la protéine MBD1.

- La protéine MBD2

La protéine MBD2 présente un domaine TRD capable de recruter les complexes protéiques Mi-2/NuRD et SIN3A induisant une répression transcriptionnelle par désacétylation des queues d'histones (Du *et al*, 2015; Wood & Zhou, 2016) (Figure 20). Alors que les autres protéines MBD présentent des domaines MBD et TRD bien distincts, ces domaines se chevauchent dans la protéine MBD2, ce qui suggère un lien étroit entre liaison à l'ADN méthylé et répression transcriptionnelle. La protéine MBD2 possède également un domaine *Coiled-coil* (CC) impliqué dans les interactions protéine-protéine suggérant également que la répression transcriptionnelle *via* le recrutement de complexes protéiques est une fonction importante de la protéine MBD2.

La protéine MBD2 possède dans sa région N terminale une région riche en glycine-arginine (G/R rich) sujette aux modifications post-traductionnelles (Figure 16).

La protéine MBD2 présente différents isoformes (Hendrich & Bird, 1998) :

- MBD2a correspond à la forme longue de la protéine.
- MBD2b correspond à une forme plus courte de la protéine due à un site d'initiation de la traduction alternatif à l'extrémité N-terminale du domaine MBD.
- MBD2c correspond également à une forme plus courte due à un épissage alternatif incluant l'exon 3 conduisant à l'apparition d'un codon stop précoce. Cette isoforme perd ainsi les domaines C-terminaux TRD et CC. Chez l'adulte, il serait majoritairement présent dans les testicules. Dans les cellules souches embryonnaires (ESC), MBD2c agirait comme compétiteur de MBD2a empêchant la répression de gènes requis pour la pluripotence. Il permettrait ainsi le maintien à l'état pluripotent des ESCs (Lu *et al*, 2014) (Figure 19).

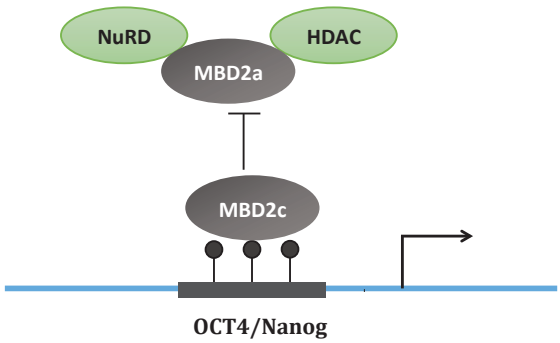


Figure 19 : Rôle de MBD2c dans le maintien à l'état pluripotent des ESCs.

De par sa structure protéique le rôle canonique de MBD2 est d'agir en tant que répresseur transcriptomique. La protéine MBD2 est principalement exprimée dans les tissus somatiques et est très faiblement exprimée à l'état embryonnaire (Roloff *et al*, 2003). Ceci explique que les souris KO pour le gène *MBD2* ne présentent pas de létalité embryonnaire mais présentent cependant quelques défauts neurologiques tels que des anomalies du comportement maternel nourricier (Hendrich *et al*, 2001) ainsi que des expressions aberrantes de gènes, notamment dans les lignées lymphocytaires (Berger & Bird, 2005).

Plus précisément des expériences d'immnoprécipitation de la chromatine (ChIP-on-chip et ChIP-seq) ont montré que MBD2 se lie principalement aux promoteurs de gènes

inactifs contenant un îlot CpG fortement méthylés (Chatagnon *et al*, 2011). La présence de la protéine MBD2 dans ces régions génomiques semble également être influencée par l'occupation de la protéine MBD3 sur ces mêmes sites, ce qui suggère une coordination possible entre ces deux protéines (Baubec *et al*, 2013). Par ailleurs la protéine MBD2 pourrait également se fixer sur des gènes actifs en particulier sur des exons ou corps des gènes méthylés et pourrait moduler l'ARN polymérase II notamment en induisant son ralentissement (Hajkova *et al*, 2010).

La protéine MBD2 a pour fonction principale d'induire une répression transcriptionnelle par une désacétylation des queues d'histones *via* son domaine TRD. Mais MBD2 est également impliquée dans la méthylation des histones plus précisément sur les arginines des queues d'histones H3, H4 et H2A (Tan & Nakielny, 2006). Cette modification est catalysée par des arginines méthyltransférases (PRMT1 et PRMT5) qui interagissent avec MBD2 *via* son domaine G/R rich (Zhao *et al*, 2009; Di Lorenzo & Bedford, 2011). De plus MBD2 elle-même peut également être méthylée par PRMT1 et PRMT5 sur son domaine G/R rich (Le Guezennec *et al*, 2006). Ces interactions peuvent conduire à l'activation ou à l'inhibition du gène en fonction de l'enzyme PRMT recrutée. En effet PRMT1 induit une diméthylation (H4R3me2a) associé à une activation transcriptionnelle (Wang *et al*, 2001) alors que PRMT5 induit une diméthylation symétrique (H4R3me2s) associée à une répression transcriptionnelle (Pal *et al*, 2004). De plus la méthylation de la protéine MBD2 par PRMT1/5 inhibe son interaction avec les histones désacétylases ainsi que sa capacité de fixation à l'ADN méthylé ce qui entraîne une activation transcriptionnelle (Figure 20).

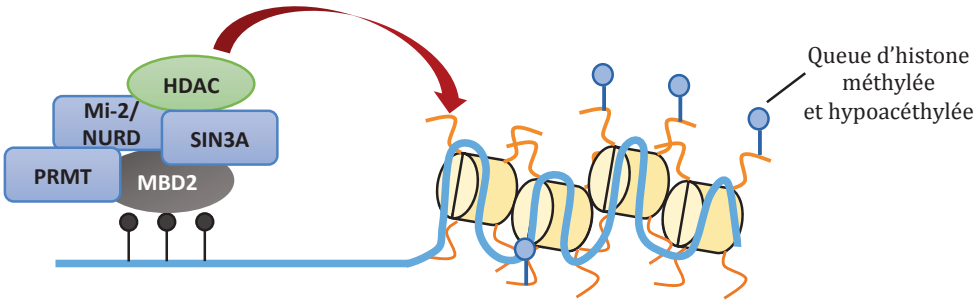


Figure 20 : Activité répressive de la protéine MBD2.

- La protéine MBD3

La protéine MBD3 malgré plus de 70% de séquences identiques avec la protéine MBD2 n'est pas capable de lier l'ADN méthylé chez les mammifères, ceci serait partiellement due aux mutations K30H/Y34F dans son domaine MBD (Saito & Ishikawa, 2002). La protéine MBD3 fait cependant partie du complexe répresseur NuRD, ce qui induit sa localisation préférentiellement sur des promoteurs et enhancers riches en CpG de gènes actifs (Shimbo *et al*, 2013). Le KO du gène *MBD3* chez la souris entraîne une mort embryonnaire précoce (Hendrich *et al*, 2001) indiquant un rôle complexe de la protéine MBD3 dans le développement embryonnaire. Récemment une étude s'est intéressée à la fixation de MBD3 dans les différentes étapes du cycle cellulaire. Cette étude a notamment révélée qu'une partie des protéines MBD2 et MBD3 colocalisent avec l'enzyme DNMT1 lors de la maintenance de l'ADN méthylé. Elle fournirait un mécanisme de correction et de protection contre une possible méthylation excessive induite par DNMT1 (Cui & Irudayaraj, 2015).

- La protéine MBD4

La protéine MBD4 a longtemps été décrite comme une enzyme de réparation de l'ADN.
En effet, MBD4 possède une activité enzymatique Thymine-DNA glycosylase impliquée dans la réparation des mésappariements induits par la déamination des cytosines méthylées (mésappariements T - G). Cette activité de réparation pourrait être particulièrement importante pour le maintient des CpG méthylés (Hendrich *et al*, 1999).
De plus MBD4 est capable de se lier au CpG méthylé et de réprimer la transcription de certains gènes grâce à son domaine MBD. La répression transcriptionnelle induite par MBD4 dépend des enzymes histones désacétylases (HDAC) recrutées grâce à son interaction directe avec Sin3A et HDAC. MBD4 se fixerait en outre sur les promoteurs hyperméthylés des gènes *p16* et *hMLH1* (Kondo *et al*, 2005).
Par conséquent la protéine MBD4 joue un rôle dans la répression transcriptionnelle ainsi que dans le maintien des promoteurs hyperméthylés *via* son activité de réparation.

b. La famille SRA

La protéine UHRF1 (également connue sous le nom de Np95 et ICBP90) se lie aux CpG méthylés grâce à son domaine SRA pour «Set and Ring finger associated domain » (Unoki *et al*, 2004). Au cours de la réplication cellulaire, la protéine UHRF1 se localise préférentiellement sur les CpG hémi-méthylés, où elle permet le recrutement de l'enzyme DNMT1 assurant la maintenance de la méthylation.
Les souris KO pour UHRF1 présentent une létalité embryonnaire, cependant les cellules souches de ces embryons montrent des taux de méthylation fortement diminué, par rapport aux souris sauvages, ainsi que des expressions anormales d'éléments répétés (Sharif *et al*, 2007).

La protéine UHRF2 est quant à elle capable de se lier à l'ADN méthylé grâce a son domaine TTD pour « Tandem Tudor Domain ». Cette fixation est dépendante de la marque H3K9me3.
L'expression ectopique d'*UHRF2* dans des cellules souches embryonnaires KO pour *UHFR1* ne permet pas de restaurer un phénotype sauvage indiquant que la protéine UHRF2 semble avoir des fonctions différentes de la protéine UHRF1.
En effet contrairement à la protéine UHRF1, l'expression de la protéine UHRF2 augmente au cours de la différentiation cellulaire où elle permettrait le contrôle de certains gènes (Pichler *et al*, 2011; Zhang *et al*, 2011). De plus le domaine SRA de la protéine UHRF2 aurait une affinité plus importante pour les cytosines hydroxyméthylées par rapport au domaine SRA de la protéine UHRF1.
UHFR2 possède également une activité enzymatique d'ubiquitine ligase de type E3, capable d'ubiquitiner notamment les cyclines D1 et E1 induisant un arrêt du cycle cellulaire en G1.
De par ces différentes fonctions UHRF2 pourrait ainsi jouer un rôle central dans la coordination du cycle cellulaire.

c. Les protéines à doigts de zinc

Cette famille de protéines comporte les protéines KAISO (également appelé ZBTB33), ZBTB4 et ZBTB38 (Filion *et al*, 2006). Tout comme les protéines de la famille des MBD,

ces protéines se lient à l'ADN méthylé et sont capables d'entraîner une répression transcriptionnelle dépendante de la méthylation. Au sein de cette famille protéique, ses différents membres semblent avoir des fonctions spécifiques.

La protéine KAISO est capable de se fixer à l'ADN sur deux types de séquences : une séquence consensus non méthylée CTGCNA (Daniel *et al*, 2002), ainsi que sur des séquences méthylée présentant au moins deux dinucléoides CpG méthylés de manière symétrique (Prokhortchouk *et al*, 2001). KAISO est capable d'induire une répression transcriptionnelle *via* le recrutement du complexe N-CoR impliqué dans la désacétylation et la méthylation de la lysine 9 (K9) de histones H3 (Yoon *et al*, 2003).
La protéine ZBTB4 tout comme KAISO est capable de se fixer sur l'ADN sur deux types de séquences : une séquence consensus non méthylée ainsi que sur une séquence consensus méthylée (Sasai *et al*, 2010). ZBTB4 est capable de réprimer la transcription de certains gènes *via* le recrutement du complexe SIN3A. ZBTB4 a notamment été impliquée dans la répression de *p21* important dans la réponse des cellules à l'apoptose (Weber *et al*, 2008). D'une manière générale ZBTB4 présente une expression importante dans le cerveau où il régule l'expression de gènes spécifiques dans les différents types de neurones (Filion *et al*, 2006).
La protéine ZBTB38 est quant à elle capable de fixer l'ADN uniquement sur des séquences méthylées et de recruter le complexe répresseur CtBP/HDAC (Sasai *et al*, 2005).

La plupart de ces protéines capables de lier l'ADN méthylé permettent d'induire une répression transcriptionnelle et d'interpréter ainsi les marques de méthylation. Ces différentes protéines présentent chacune leur propre spécificité aussi bien au niveau de leurs sites de fixations, du complexe répresseur recruté ainsi qu'au niveau de leur pattern d'expression.

B. Protéines de liaison à l'ADN méthylé et cancer

Dans les cancers les profils de méthylation sont fortement altérés, on observe notamment des hyperméthylations sur les promoteurs de gènes suppresseurs de tumeurs. Ces hyperméthylations sont alors interprétées par les protéines de liaison à

l'ADN méthylé capables d'induire la répression transcriptionnelle de ces gènes (Lopez-Serra *et al*, 2006). Cette caractéristique confère ainsi aux protéines de liaison à l'ADN méthylé des propriétés pro-oncogéniques.

La fixation de MeCp2 a ainsi été associée à la répression transcriptionnelle des gènes *p14* et *p16* dans différentes lignées cellulaires (Nguyen *et al*, 2001).

Le rôle pro-oncogénique de la protéine MBD2 a notamment pu être démontré chez la souris où la perte de *MBD2* diminue la formation de tumeurs dans un modèle de souris prédisposé à former des tumeurs du colon (*APC* $^{Min/+}$) (Sansom *et al*, 2003).
Il a également été montré que l'invalidation de *MBD2* par shRNA dans des lignées cellulaires mammaires permet la réexpression de gènes suppresseurs de tumeurs dans ces lignées et diminue ainsi leur capacité tumorigénique (Mian *et al*, 2011). La fixation d'MBD2 sur des gènes spécifiques sous exprimés lors de la transformation *in vitro* de lignées cellulaires mammaires immortalisées a également été mise en évidence dans notre laboratoire (Devailly *et al*, 2015).
Ces expériences confirment l'implication de la protéine MBD2 dans la progression tumorale *via* sa fonction de répresseur transcriptionnelle.
Par ailleurs, il a également été montré que MBD2 participe à l'hyperméthylation des gènes suppresseurs de tumeurs dans les cancers en s'associant aux protéines DNMT1 et DNMT3A capables de méthyler l'ADN (Stirzaker *et al*, 2016).

MBD3, sous unitée centrale du complexe répresseur NuRD, a été quant à elle impliquée dans la conversion de cellule cancéreuse en cellule possédant des caractères souches dans un modèle de cancer du foie (Li *et al*, 2017).

UHRF1 a également été impliquée dans la répression de différents gènes suppresseurs de tumeurs dans plusieurs types de cancer. Elle est par exemple capable de réprimer le gène *p16ink4a* dans les cancers colorectaux (Wang *et al*, 2012; Daskalos *et al*, 2011; Babbio *et al*, 2012).

La famille des protéines à doigt de zinc joue également un rôle important dans les cancers (Lopes *et al*, 2008). En effet au même titre que MBD2, la perte de *KAISO* dans le

modèle de souris prédisposées à former des tumeurs (*APC* $^{Min/+}$) supprime également la formation de tumeurs chez ces souris (Prokhortchouk *et al*, 2006).

Contrairement aux autres MBD, un rôle anti-oncogénique de la protéine ZBTB4 a été mis en évidence dans un modèle de cancer du sein (Kim *et al*, 2012), puis confirmée grâce au développement de souris KO pour *ZBTB4.* Ces souris présentent une susceptibilité accrue aux carcinogènes provoquant la formation de cancer de la peau. Les cellules primaires isolées de ces souris présentent des défauts du cycle cellulaire ainsi qu'une importante instabilité génomique confirmant le rôle suppresseur de tumeur de ZBTB4 (Roussel-Gervais *et al*, 2017).

Les MBD jouent un rôle important dans l'oncogenèse à travers l'interprétation des marques épigénétiques des cellules cancéreuses. De par leurs propriétés pro-oncogéniques ou anti-oncogéniques, les MBD peuvent également subir des altérations dans les cancers. On peut notamment observer des dérégulations au niveau des patterns d'expression de MBD2, MBD1 et MeCP2 dans différents types de cancers (Billard *et al*, 2002; Kanai *et al*, 1999; Patra *et al*, 2003). Des mutations de MBD2 et de MBD1 ont également été rapportées dans les cancers du côlon (Bader *et al*, 2003). Une perte d'expression du gène suppresseur de tumeur ZBTB4 a également été observée dans des lignées de cancer du sein, dû à l'activation d'un microARN spécifique de ZBTB4.

3. Thérapies épigénétiques

Au vu de l'importance des marques épigénétiques dans les cancers et de leurs caractères réversibles beaucoup d'études se sont portées sur le développement de drogues capables de cibler ces altérations épigénétiques (Yoo & Jones, 2006).

A. Inhibiteurs de la méthylation de l'ADN

Certaines thérapies visent à inhiber la méthylation de l'ADN, il en existe deux types : les analogues de nucléosides et les analogues non nucléosidiques.

Les analogues de nucléosides sont généralement des analogues de la cytosine présentant un cycle modifié relié à un sucre (ribose ou désoxyribose). Ces molécules ont la particularité de devoir être métabolisées par des enzymes kinases afin d'être converties en nucléotides et incorporées dans l'ADN ou l'ARN. C'est le cas de la 5-Azacytidine et de la 5-Aza-2'deoxycytidine disposant d'une autorisation de mise sur le marché et actuellement utilisés en clinique (Figure 21).

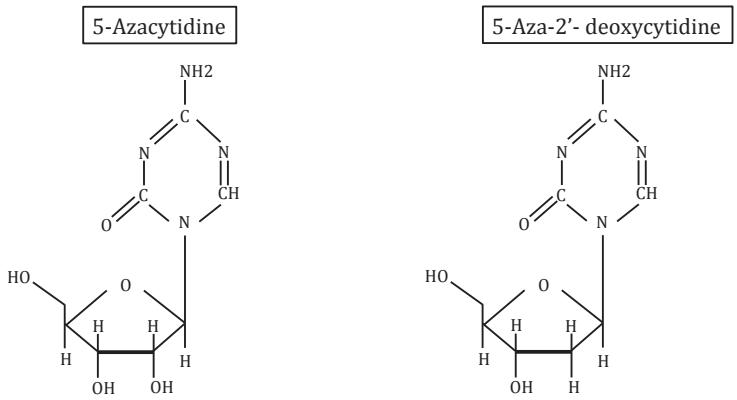


Figure 21: Structure de la 5-Azacytidine et de la 5-Aza-2'deoxycytidine.

Ces drogues correspondent à des cytosines modifiées où le carbone 5, cible de la méthylation, est remplacé par un azote. Le mécanisme d'action de ces drogues est complexe : une fois intégrées à l'ADN elles remplacent les cytosines par des cytosines ne pouvant pas être méthylées. De plus, ces drogues ont également la capacité de piéger l'enzyme DNMT1 induisant une hypométhylation de l'ADN nouvellement synthétisé.

Dans les cellules cancéreuses elles permettent d'inhiber l'hyperméthylation des gènes suppresseurs de tumeurs induisant ainsi des phénomènes de sénescence, apoptose et de différentiation cellulaire. Ces molécules présentent cependant des demi-vies courtes dans l'organisme. A l'heure actuelle de nombreux autres analogues de nucléosides sont activement recherchés et de nombreux essais cliniques sont actuellement en cours testant ces analogues de nucléosides seuls ou en combinaison avec d'autres drogues. Par exemple, au laboratoire, nous avons étudié la combinaison de la 5-Aza-2'deoxycytidine avec un anticorps activant la voie pro-apoptotique des récepteurs à dépendance[3] (Grandin *et al*, 2016c, 2016a).

Il existe également des analogues non nucléosidiques capables d'inhiber la méthylation de l'ADN, peu d'entre eux sont arrivés au stade de l'essai clinique mais cela reste un domaine de recherche très actif. Ces inhibiteurs pourraient représenter une stratégie efficace en clinique grâce à l'inhibition de la méthylation par liaison directe avec l'enzyme DNMT1 sans incorporation dans l'ADN. Par exemple une petite molécule nommée RG108 à récemment été développé, elle aurait la capacité de bloquer le site catalytique de DNMT1 et de le rendre ainsi inactif (Brueckner *et al*, 2005).

B. Inhibiteurs des histones désacétylases

Les modifications des histones jouent un rôle important dans l'interprétation des marques de méthylation, en effet plusieurs complexes répresseurs recrutés par les MBD contiennent des enzymes histones désacétylases (HDAC) capables d'induire une répression transcriptionnelle par acétylation des queues d'histones. Ceci a donc mené au développement d'inhibiteur d'HDAC.
Les inhibiteurs d'HDAC sont divisés en quatre groupes possédant chacun leur propre fonctionnalité : les acides gras à chaînes courtes, les acides hydroxamiques, les peptides cycliques et les dérivés de benzamide.
D'une manière générale les inhibiteurs des HDAC induisent une hyper-acétylation des histones qui peut amener à l'activation de gènes suppresseurs de tumeurs et à la répression d'oncogène (Yoo & Jones, 2006).

[3] Notion définie page 99

De nombreux inhibiteurs d'HDAC sont en phase d'essai clinique et certains d'entre eux sont actuellement utilisés en clinique.

C. Inhibiteurs des modifications d'histones

Comme nous l'avons vu précédemment les bases moléculaires de l'information épigénétique incluent également des modifications post-traductionnelles des queues d'histones comme leur méthylation, acétylation, phosphorylation et ubiquitination. Ces modifications sont également altérées dans les cancers et représentent de nouvelles pistes thérapeutiques (Fraga *et al*, 2005). Par exemple, les protéines BET à bromodomaines reconnaissent les histones acétylés sur leurs lysines et régulent l'expression de ses gènes cibles. Récemment une petite molécule capable de se lier de manière compétitive aux motifs de reconnaissance des lysines acétylés ou aux bromodomains appelés JQ1 a été développée. Cette molécule est alors capable d'inhiber l'interaction des protéines BET avec leurs cibles entraînant ainsi un effet antiprolifératif des cellules cancéreuses offrant de nouvelles stratégies thérapeutiques (Filippakopoulos *et al*, 2010).

D. Inhibiteurs des protéines de liaison à l'ADN méthylé

De par leur propriété pro-oncogénique, les MBD représentent des cibles thérapeutiques potentielles (Sansom *et al*, 2007). L'inhibition de leur domaine MBD ou TRD pourrait être une piste intéressante, cependant à l'heure actuelle aucune petite molécule capable d'inhiber les MBD n'a été décrite.

En définitive l'épigénétique joue un rôle majeur dans les cellules cancéreuses et peut mener au développement de nouvelles thérapies épigénétiques. Mais les cellules cancéreuses ne représentent pas l'intégralité d'une tumeur. En effet les cellules cancéreuses sont entourées d'un microenvironnement tumoral composé de cellules stromales jouant un rôle important dans la cancérogénèse et dans lesquelles l'épigénétique a également son importance.

Partie III : Microenvironnement tumoral

1. La cellule cancéreuse et son microenvironnement de véritables complices

Historiquement, une tumeur était vue comme un ensemble de cellules cancéreuses relativement homogène dont le fonctionnement pouvait alors être élucidée en étudiant les propriétés des cellules cancéreuses qui la composent. Au cours des dernières années, les tumeurs ont davantage été défini comme des organes à parts entières, présentant des interactions complexes à l'image des tissus sains. Considérant cette perceptive, le fonctionnement des tumeurs ne peut être élucidé qu'en étudiant à la fois les propriétés des cellules cancéreuses et le propriétés du microenvironnement qu'elles développent (Figure 22) (Hanahan & Weinberg, 2011).

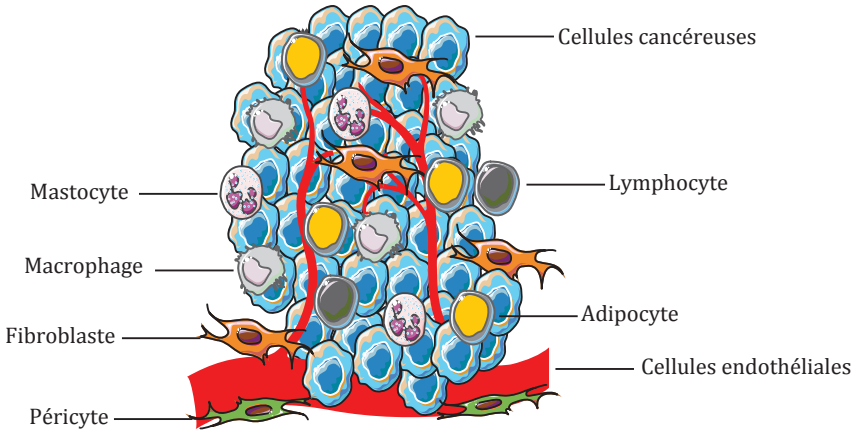


Figure 22: Les cellules du microenvironnement tumoral.

A. Les cellules endothéliales

Parmi les cellules du microenvironnement on retrouve les cellules endothéliales formant un système vasculaire associé à la tumeur. Ce système vasculaire est formé à partir de vaisseaux préexistant *via* un phénomène appelé angiogenèse. L'angiogenèse est activé *via* différents facteurs pro-angiogénique, les plus connus sont le VEGF (Vascular Endothélial Growth Factors), le FGF (Fibroblast Growth Factor) et ANG-1

(Angiopoietin-1). Au cours des dernières années se sont ajoutés à ceux-ci de multiple ligands reconnus par différents récepteurs présents sur les cellules endothéliales comme par exemple Notch, Neuropilin et Robo, formant un réseau de plus en plus complexe de voies de signalisation interconnectées entres elles. Sous l'effet des cellules tumorales, les cellules endothéliales présentent des profils d'expressions différents et expriment à la surface des marqueurs spécifiques, on les nomme alors cellules endothéliales associées à la tumeur (Ruoslahti, 2002). La formation de ce système vasculaire complexe permet l'apport de cellules immunitaires, de nutriments et d'oxygène aux cellules cancéreuses. Il favorise également leur dissémination dans la circulation sanguine (Pasquale, 2010; Ahmed & Bicknell, 2009).

Parallèlement à la formation de vaisseau sanguin on observe la formation de vaisseaux lymphatiques, ils sont souvent observés en périphérie de la tumeur ainsi que dans les tissus normaux adjacents. Ces vaisseaux permettraient de faciliter la formation de métastases dans les ganglions grâce à la dissémination des cellules cancéreuses par la lymphe (Tammela & Alitalo, 2010).

Ces vaisseaux sont entourés de cellules mésenchymateuses appelées péricytes qui participent à la formation des vaisseaux sanguins notamment au niveau de la membrane vasculaire et assurent la survie des cellules endothéliales *via* la sécrétion de signaux paracrines (Bergers & Song, 2005). Des expériences visant à inhiber les facteurs sécrétés par les péricytes associés aux tumeurs ont montré leur importance dans l'endothélium tumorale. Par exemple l'inhibition du PDGF déstabilise de manière intéressante l'intégrité des vaisseaux présents dans la tumeur (Raza *et al*, 2010).

B. Les cellules du système immunitaire

Les cellules du système immunitaire font partie intégrante des cellules constituant le microenvironnement tumorale. Ces cellules immunitaires fonctionnent de manière conflictuelles certaines ayant des fonctions antitumorales et d'autres protumorales. Bien que l'on retrouve communément des Lymphocytes T Cytotoxique (CTL) et des cellules NK (« Natural Killer ») capables de tuer les cellules cancéreuses dans les tumeurs, de

nombreuses études ont également montré l'implication des cellules immunitaires dans la progression tumorale (de Visser *et al*, 2006).

Plus précisément différentes études ont montré que certains sous types de macrophages, mastocytes, neutrophiles et lymphocytes T et B peuvent avoir des effets positifs sur le maintient des tumeurs, *via* la sécrétion de différentes molécules de signalisation (DeNardo *et al*, 2010; Johansson *et al*, 2008; Murdoch *et al*, 2008; De Palma *et al*, 2007). Ces molécules de signalisation comprennent des facteurs favorisant la croissance tumorale comme l'EGF, des facteurs favorisant l'angiogenèse comme le VEGF et le FGF2 ainsi que des facteurs favorisant l'inflammation comme des cytokines et des chimiokines. Bien entendu, la totalité des cellules immunitaires ne sont pas concernées, en effet d'autres sous classes de cellules de l'immunité innée et de lymphocytes sont également capables d'induire une réponse immunitaire anti-tumorale.

Cet équilibre entre deux réponses inflammatoires en contradiction s'avère déterminant dans l'évolution de la pathologie et du pronostic. Actuellement de nouvelles pistes thérapeutiques visant à réorienter les cellules immunitaires vers une réponse anti tumorale, voient le jour (Restifo *et al*, 2012).

C. Les cellules fibroblastiques

Des cellules de type fibroblastiques sont retrouvées dans la plus part des carcinomes, où elles représentent une part importante des cellules stromales.
Les fibroblastes présents dans ce microenvironnement sont modifiés par les cellules cancéreuses, ce qui leurs confèrent des caractéristiques particulières. Ils sont alors appelés « Cancer associated fibroblasts » (CAF) pour fibroblastes associés au cancer. Ils présentent certaines caractéristiques de myofibroblastes et expriment des marqueurs spécifiques, le plus connue étant l'expression de « l'alpha smooth muscle actin » (α-SMA) (Baubec *et al*, 2016; Shiga *et al*, 2015).

Dans les cancers, les myofibroblastes recrutés ont été caractérisés comme étant capables de promouvoir la croissance tumorale notamment en augmentant la prolifération des cellules cancéreuses, l'angiogenèse et leur capacité à former des

métastases (Madar *et al*, 2013; Hanahan & Coussens, 2012; Quail & Joyce, 2013; Klemm & Joyce, 2015).

Comme nous avons pu le voir à travers ces différents exemples, les cellules tumorales sont capables de modifier les cellules du stroma qui à leur tour acquièrent des caractéristiques spécifiques capables de promouvoir la croissance tumorale. On assiste alors à un véritable dialogue entre les cellules stromales et les cellules tumorales.

D. Dialogue entre les différentes cellules du microenvironnement tumoral

En parallèle du dialogue entre les cellules tumorales et les cellules stromales, les différents types cellulaires au sein du stroma agissent en synergie et de manière inter connecté *via* de véritables interactions entre leurs voies de signalisations au sein du microenvironnement.

Par exemple, les cellules cancéreuses sont capables de sécréter un facteur nommé « Colony-Stimulating Factor » (CSF) qui va activer les cellules immunitaires présent dans le microenvironnement tumoral. Ces cellules immunitaires activées vont alors sécréter du VEGF, permettant l'activation des cellules endothéliales et ainsi favoriser l'angiogénese. Les cellules immunitaires sécrètent également des protéases qui vont alors dégrader les protéines de la matrice extracellulaire (MEC) et libérer les facteurs présents dans cette matrice comme le « Transforming Growth Factors Beta » (TGF-β). Le TGF-β active alors les fibroblastes qui à leur tour sécrètent différents facteurs comme le facteur de croissance HGF favorisant la prolifération des cellules tumorales (Figure 23).

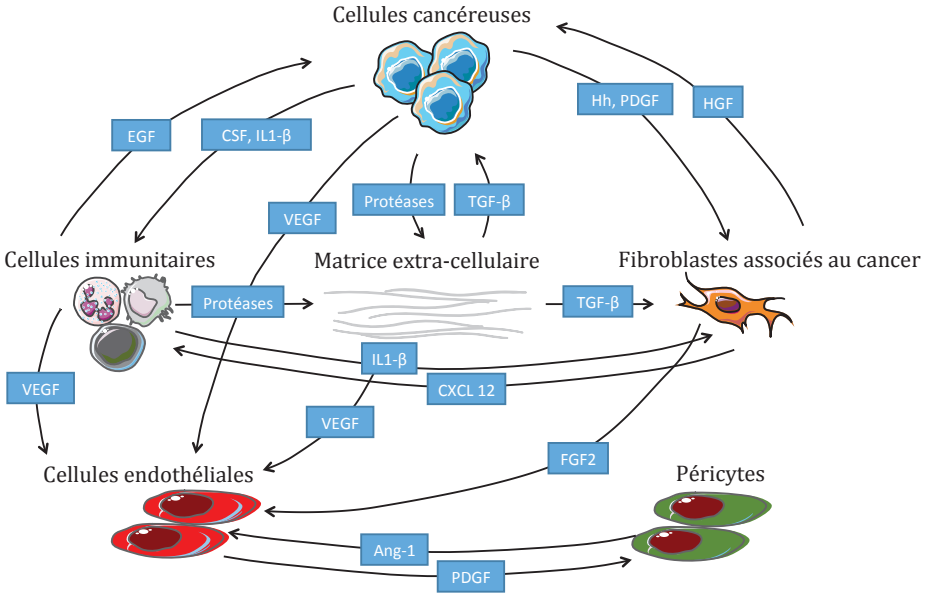


Figure 23: Illustration de quelques interactions de signalisation au sein du microenvironnement d'après (Hanahan & Weinberg, 2011) .

Cet exemple de signalisation illustre à la fois la complexité et l'intensité des échanges entre les cellules cancéreuses et les cellules stromales ainsi qu'entre les différents types de cellules stromales présentes au sein d'une tumeur.

E. Evolution du microenvironnement au cours de la progression tumorale

Il est important de spécifier ici l'existence d'une autre dimension plus complexe, en effet il ne s'agit pas simplement de cellules tumorales et de cellules stromales présentant des caractéristiques spécifiques et stables. En effet, ces cellules vont être modifiées de façon progressive et simultanée en coordination avec la formation de la tumeur.

Ainsi dans les stades précoces du développement tumoral, les cellules cancéreuses commencent à proliférer dans un stroma dit non permissif cherchant à limiter la prolifération des cellules cancéreuses. Par la suite, petit à petit, les cellules cancéreuses interagissent avec quelques cellules stromales et les modifient formant ainsi un stroma plus permissif au développement tumoral. Ce stroma réagit alors à son tour en améliorant les capacités prolifératives des cellules cancéreuses.

Par conséquent en fonction de l'état d'avancement de la pathologie on peut observer des cellules stromales présentant des caractéristiques et des fonctions différentes. Par exemple *in vitro* des CAFs extrait à partir de tumeurs peuvent présenter une forte hétérogénéité en fonction de l'état d'avancement des tumeurs d'où ils ont été extraits.

2. Les fibroblastes associés au cancer : Un mal plus complexe qu'il n'y paraît

A. Caractéristiques des fibroblastes associés au cancer

a. Les différents types cellulaires à l'origine des CAFs

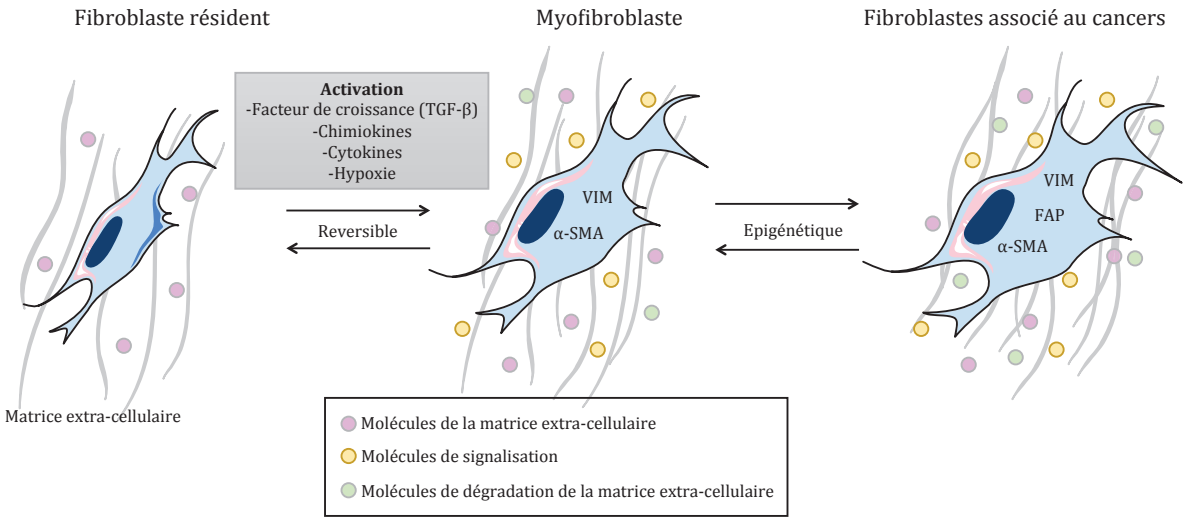
- Les fibroblastes résidents à l'origine des CAFs

Les fibroblastes sont des cellules différenciées provenant des cellules-souches mésenchymateuses, il s'agit de cellules de types fusiformes possédant de longs prolongements cytoplasmiques. Ils sont présents dans de nombreux tissus conjonctifs où ils assurent un rôle de soutien en participant à la formation de la matrice extra-cellulaire et en sécrétant de nombreuses autres molécules comme des cytokines et des facteurs de croissance.

Dans les tissus normaux les fibroblastes sont généralement considérés inactifs dans un état de repos. Ils peuvent cependant dans certaines conditions comme lors d'une plaie, d'une inflammation mais également du développement d'une tumeur être activés, on les nomme alors myofibroblastes.
Les myofibroblastes sont caractérisés notamment par l'expression d'une protéine du cytosquelette particulière : l'actine du muscle lisse (« Alpha Smooth Muscle Actin » α-SMA). L'expression de cette protéine leur assure des propriétés contractiles et migratoires plus importantes, essentielles à leurs fonctions dans la réparation tissulaire (Figure 24). Ces fibroblastes activés présentent également des taux de prolifération plus important ainsi qu'une augmentation de leur capacité sécrétoire, on peut également parler ici d'acquisition d'un phénotype sécrétoire (Darby *et al*, 2014).

Dans le cas du développement d'une tumeur les fibroblastes activés par l'inflammation sous-jacente subissent des modifications supplémentaires induites par les cellules cancéreuses afin d'acquérir les caractéristiques des fibroblastes associés au cancer (CAF) (Figure 24). Les cellules cancéreuses agiraient majoritairement *via* la sécrétion de

facteurs de croissance, dont les mieux décrits sont le TGF-β, le « *Platelet-derived growth factor* » (PDGF) et le « fibroblast growth factor 2 » (FGF2) (Elenbaas & Weinberg, 2001).
Ces modifications supplémentaires induites par les cellules cancéreuses seraient majoritairement épigénétiques induisant une modification stable des myofibroblastes en CAF. (Tampe & Zeisberg, 2014; Zeisberg & Zeisberg, 2013; Li *et al*, 2015; Mrazek *et al*, 2014).
Nous pouvons détailler ici quelques études : Il a par exemple été montré qu'une dérégulation épigénétique des cellules stromales serait suffisante pour augmenter l'initiation tumorale dans un modèle murin de cancer de la prostate (Zong *et al*, 2012).
Il a également été montré que l'exposition de fibroblastes aux cytokines pro-inflammatoires LIF induit des modifications épigénétiques dans ces cellules caractérisées par l'activation de le voie JACK1/STAT3 entraînant une activité pro-invasive de ces fibroblastes (Albrengues *et al*, 2015).
Une expérience intéressante montre également que des CAF traités à la Décitabine, un agent déméthylant montrent une diminution de leur taux de prolifération, de leur capacité sécrétoire ainsi que de leur taux d'expression de l'α-SMA (Bechtel *et al*, 2010).
Ces modifications épigénétiques étant relativement stables dans le temps, cela permet la mise en culture de cellules primaires fibroblastiques isolées à partir de tumeurs.



Prolifération	-	+	+++
Contractibilité	-	+++	+
Phénotype sécrétoire	-	++	+++
Capacité migratoire	-	++	++

Figure 24: Activation des fibroblastes résidents d'après (Kalluri, 2016).

- Les autres types cellulaires à l'origine des CAFs

De nombreuses études ont également rapporté que les CAFs pouvaient provenir de différents types cellulaires créant une véritable hétérogénéité dans leur origine. Les CAFs seraient notamment issus de cellules souches mésenchymateuses (20% des CAFs) (Direkze *et al*, 2004; Quante *et al*, 2011) et hématopoïétiques dérivées de la moelle osseuse (McDonald & LaRue, 2012; Ogawa *et al*, 2006). Des cellules épithéliales pourraient également être à l'origine de certains CAFs *via* un phénomène de transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) (Petersen *et al*, 2003; Iwano *et al*, 2002). De même, *via* un phénomène de transition endothélio-mésenchymateuse (TEndM), les CAFs pourraient provenir de cellules endothéliales (Zeisberg *et al*, 2007).

De nombreux types cellulaires différents peuvent donc être à l'origine des CAFs. Par conséquent en fonction du type cellulaire d'origine mais également comme nous l'avons vu précédemment de l'état d'avancement des tumeurs, les CAFs peuvent présenter des caractéristiques différentes.

b. Les marqueurs des fibroblastes associés au cancer

De nombreuses études ont cherché à identifier des marqueurs spécifiques de CAFs, mais à ce jour du fait de la grande hétérogénéité et instabilité de cette population cellulaires aucun marqueur spécifique des CAFs n'a pu être identifié. Cependant une combinaison de différents marqueurs permettant de différencier les fibroblastes résidents des myofibroblastes (fibroblastes activés) ont été admis comme étant des marqueurs des CAFs. La grande majorité de ceux-ci sont listés dans le tableau 2 (Madar *et al*, 2013; Ohlund *et al*, 2014).

Marqueurs Positifs	Marqueurs Négatifs
α-SMA	Cytokeratin
Fibroblast activation protein (FAP)	CD31
Fibroblast specific protein-1 (FSP1)	
Periostin	
Neuron glial antigen-2 (NG2)	
Vimentin (VIM)	
Desmin	
Platelet derived growth factor receptor α et β (PDGR α et β)	
Tenascin-C	

Tableau 2: Principaux marqueurs des CAFs d'après (Shiga *et al*, 2015).

B. Conséquences des interactions entre les CAFs et les cellules tumorales

a. Impact des CAFs dans la tumorigenèse

Initialement, les premières expériences cherchant à définir le rôle des CAFs dans la tumorigenèse ont montré que la co-injection chez des souris de CAFs et de cellules cancéreuses favorise la formation de tumeurs (Olumi *et al*, 1999a). A la suite de ces expériences de nombreuses études principalement réalisées en co-cultivant des CAFs et des cellules cancéreuses ont vu le jour.

Elles ont notamment démontré que la capacité des CAFs à promouvoir la croissance tumorales était, du moins pour une partie, dû à leur rôle dans l'activation de l'angiogenèse *via* la sécrétion de différents facteurs dont CXCL12 impliqué dans le recrutement des cellules endothéliales (Orimo *et al*, 2005).

Les CAFs auraient également la capacité de promouvoir la motilité et l'invasion des cellules cancéreuses par la sécrétion de différentes protéines capables de remodeler la matrice extra-cellulaire. Par exemple les protéines MMP1 et MMP3, sécrétées par les CAFs, impliquées dans la dégradation de la matrice extra-cellulaire seraient impliquées dans la TEM et l'invasion des cellules cancéreuses (Lochter *et al*, 1997; Sternlicht *et al*,

1999; Boire *et al*, 2005). Par ailleurs les modifications des fibres de collagène induites par les CAFs modulent également l'accessibilité des cellules cancéreuses aux différents facteurs de croissance modulant ainsi la croissance tumorale (Levental *et al*, 2009).

Les CAFs auraient également la capacité de sécréter des exosomes, petites vésicules contenant différentes molécules de signalisations, impliqués également dans la progression tumorale et le développement de métastases (Kahlert & Kalluri, 2013). Par exemple dans un modèle de lignées cellulaires mammaires, il a été montré que les exosomes sécrétés par les CAFs étaient impliqués dans l'activation de la voie Wnt des cellules cancéreuses (Luga & Wrana, 2013). Par ailleurs, les exosomes sécrétés par les CAFs joueraient également un rôle dans la résistance des cellules cancéreuses aux chimiothérapies. Cette action passerait par des phénomènes indirects, où les exosomes auraient notamment la capacité de favoriser la prolifération des « cellules souches cancéreuses » (Hu *et al*, 2015).

Les « cellules souches cancéreuses » sont définies conceptuellement comme étant une population de cellules cancéreuses capable d'initier la formation d'une tumeur une fois injectées chez la souris. Elles seraient notamment impliquées dans la résistance de certaines tumeurs aux chimiothérapies actuelles, mais également, dans le développement de métastases (Clevers, 2011). Les CAFs joueraient un rôle important dans le maintient et la dissémination de cette population de « cellules souches cancéreuses » *via* par exemple la sécrétion de Periostin, favorisant ainsi le développement de métastases (Malanchi *et al*, 2011). De plus, dans les cellules souches cancéreuses de côlon, l'activation de la voie Wnt, importantes à leur maintien, serait en partie dû au facteur HGF pour « Hepatocyte growth Factor » secrété par les CAFs (Vermeulen *et al*, 2010).

Dans un modèle de cancer du poumon, il a également été montré que l'activation du récepteur « *Insulin-like growth factor 1 receptor* » (IGF1R) par le facteur « Insulin-like growth factor II » (IGF-II) sécrété par les CAFs induit l'expression de Nanog caractéristique des cellules souches cancéreuses (Chen *et al*, 2014a).

Les CAFs ne jouent pas seulement un rôle dans le développement de métastases à travers les cellules souches cancéreuses. Ils sont également capables de guider par leurs sécrétions le développement des métastases (Gaggioli *et al*, 2007; O'Connell *et al*, 2011). Par exemple, dans les cancers colorectaux, il a été montré que l'IL-11 et qu'une glycoprotéine stanniocalcin-1 (STC1) sécrétés par les CAFs seraient impliqués dans la survie des cellules cancéreuses ainsi que dans le développement de métastases (Pena *et al*, 2013; Calon *et al*, 2012). D'une manière plus générale la perte du gène *Fsp1*, marqueurs des CAFs induit une perte de mobilité des fibroblastes et est associée à une réduction des métastases chez ces souris (Grum-Schwensen *et al*, 2005). Par ailleurs au sein des sites métastatiques, on retrouve également des CAFs appelés MAFs pour « *Metastasis Associated Fibroblasts* » jouant un rôle important dans l'initiation et le développement des métastases. Ces MAFs présentent tout comme les CAFs des origines multiples. Ils peuvent provenir de fibroblastes résidant au sein du site métastatique, être issus de cellules souches de la moelle osseuse ou provenir de CAFs issus du site initial recrutés au sein du site métastatique.

b. Impact des CAFs dans le métabolisme cellulaire

Le métabolisme cellulaire des CAFs a dû s'adapter à un environnement intra tumoral fortement hypoxique. Cette adaptation métabolique des CAFs a également un effet sur les cellules tumorales en favorisant la redistribution de différents nutriments nécessaires aux cellules cancéreuses.

En effet les CAFs sont capables de créer un microenvironnement riche en nutriments comme du lactate, des corps cétoniques, des acides gras et des acides aminés, afin de soutenir d'un point de vue métabolique la croissance tumorale (Martinez-Outschoorn *et al*, 2014).

Une expérience utilisant un modèle de CAFs *in vitro* (Fibroblaste déficient en *caveolin-1*) a notamment montré grâce à des analyses protéomiques et transcriptomiques que le stroma tumoral alimenterait directement les cellules cancéreuses *via* un effet nommé « Reverse Warburg Effect » (Pavlides *et al*, 2009). Selon ce modèle, les cellules cancéreuses auraient la capacité de transformer les cellules du stroma en cellules activées fournissant à la tumeur l'énergie nécessaire à sa croissance et à l'angiogenèse

augmentant ainsi l'émergence de résistances thérapeutiques mais également de métastases.

Cette symbiose métabolique joue un rôle majeur dans le développement tumoral. En effet, une expérience a montré que la perte du gène *EGLN1*, impliqué dans la réponse au facteur HIF1 jouant un rôle clé dans l'hypoxie, dans un modèle de souris prédisposé à former des cancers de la glande mammaire induit une diminution des métastases. Cette effet serait majoritairement dû à une diminution de la reprogrammation des fibroblastes en CAFs (Kuchnio *et al*, 2015). Par conséquent cette symbiose métabolique est importante à la fois dans la reprogrammation des CAFs par les cellules cancéreuses mais également dans le soutien des CAFs aux cellules tumorales, établissant un véritable dialogue au sein du métabolisme cellulaire.

Par ailleurs les CAFs peuvent également agir sur la disponibilité des différents métabolites pour les autres types cellulaires du microenvironnement dont les cellules immunitaires. Par exemple la diminution des acides aminés tryptophanes et arginine dans le microenvironnement tumoral induit une diminution des lymphocytes T (Chang *et al*, 2015). Par conséquent les CAFs présentent également des fonctions immunomodulatrices *via* le contrôle de la disponibilité des nutriments.

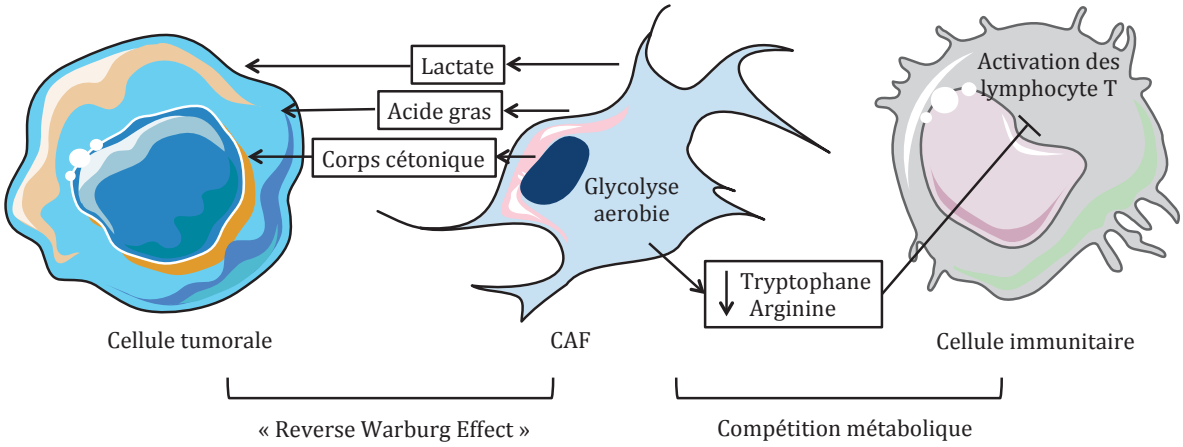


Figure 25: Reprogrammation métabolique du microenvironnement tumoral d'après (Kalluri, 2016).

c. Impact des CAFs dans l'immunité tumorale

L'impact des CAFs sur l'immunité tumorale est un phénomène complexe qui dépend à la fois du contexte tumoral c'est à dire du stade d'avancement de la tumeur mais également des différentes cellules du microenvironnement. En effet, les CAFs sécrètent différentes cytokines et chemokines pouvant avoir un effet direct ou indirect sur l'immunité tumorale dont voici quelques exemples : IL-6, IL-4, IL-8, IL-10, TNF, TGF-β, CCL2, CCL5, CKCL9, CXCL10, SDF1, PGE2, HGF.

D'une manière générale les CAFs sont considérés comme étant immunosuppresseurs, favorisant la croissance tumorale. Nous pouvons ici citer quelques expériences clés :
Une étude a notamment développé un modèle de souris transgéniques présentant une ablation des fibroblastes FAP+. L'induction d'un carcinome pulmonaire chez ces souris déplétées en cellules FAP+ a provoqué une nécrose hypoxique rapide des tumeurs grâce à une réponse immunitaire *via* l'interféron-γ et le facteur TNF-α. De plus l'induction d'un adénocarcinome canalaire pancréatique chez ces souris a également permis de mettre en évidence une réponse immunitaire anti-tumorale plus importante chez ces souris comparée aux souris non déplétées en fibroblastes.
Par conséquent, cette étude a permis de mettre en évidence la fonction immunosuppressive des CAFs (Kraman *et al*, 2010).
Plus précisément différentes études, réalisées principalement *in vitro,* ont montré l'implication de différents facteurs sécrétés par les CAFs dans la modulation des cellules immunitaires. Par exemple l'IL-6 sécrétée par les CAFs a été impliquée dans l'inhibition des cellules dendritiques induisant une anergie des lymphocytes T (Park *et al*, 2004). Le TGF-β à quant à lui été impliqué dans de nombreuses réactions immunosupressives (Wan & Flavell, 2007).

Cependant d'autres études ont également montré un effet pro-tumorigénique des CAFs *via* notamment une activation du système immunitaire. Par exemple une étude a créé un modèle de souris transgéniques ayant la capacité de supprimer les myofibroblastes (α-SMA +) dans un modèle de cancer du pancréas. Dans ce modèle, la déplétion des myofibroblastes conduit à des tumeurs plus invasives présentant plus d'hypoxie, plus de TEM et plus de cellules souches cancéreuses. Cette déplétion est de plus associée à une

diminution de la survie des animaux. Cette conséquence de la délétion des myofibroblastes serait due à une suppression de la surveillance immunitaire. De manière intéressante cette étude montre également une corrélation entre les chances de survie des patients atteints d'un cancer du pancréas et la présence de myofibroblastes au sein de leurs tumeurs (Ozdemir *et al*, 2014). En effet, moins le stroma contient de myofibroblastes, plus les chances de survie des patients sont moindres.

Ces différents exemples contradictoires illustrent la complexité des échanges entre les CAFs et les cellules du système immunitaire. Ces expériences mettent également en lumière les différents effets des CAFs en fonction de l'état d'avancement des cancers. Une classification des différents sous types de fibroblastes a récemment été proposé par (Kalluri, 2016) représenté dans la figure 26.

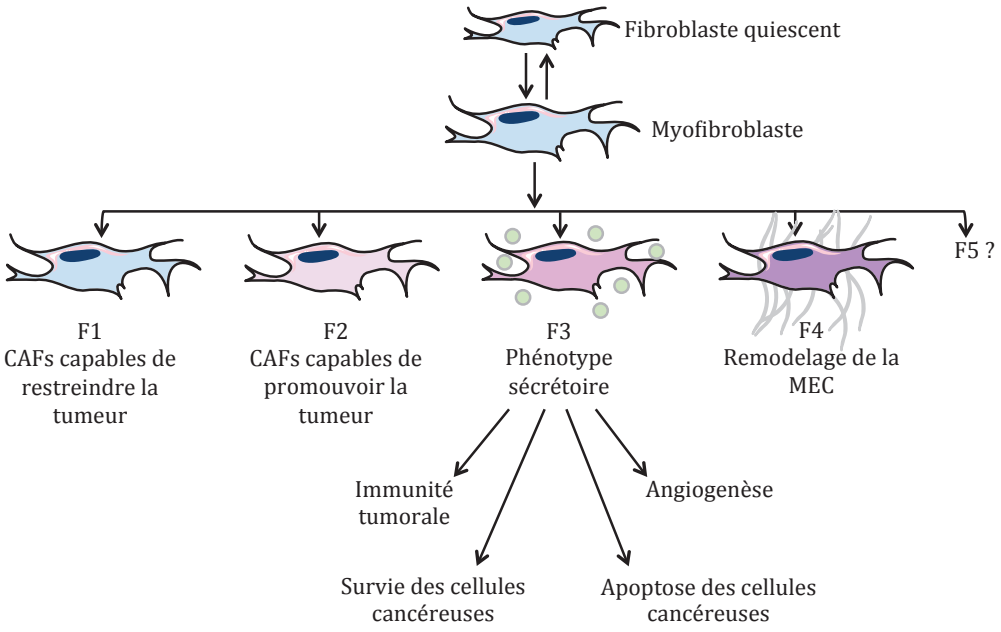


Figure 26: Modèle de classification des CAFs selon leurs fonctions d'après (Kalluri, 2016). Après l'activation des fibroblastes quiescent en myofibroblastes, ils peuvent sous l'effet des cellules cancéreuses se différencier d'avantage en différents sous-types fonctionnels. Le sous-type F1 aurait un rôle plutôt anti-tumoral alors que le sous-type F2 aurait lui un rôle plutôt pro-tumoral. Le sous-type F3 serait constitué de CAFs présentant un phénotype sécrétoire important. Le sous-type F4 serait constitué de CAFs jouant un rôle important dans le remodelage de la matrice extracellulaire. D'autres sous-types (F5 ?) pourraient également à l'avenir être défini.

d. Impact des CAFs dans la réponse aux agents anti-cancéreux

Différentes études ont mis en évidence l'implication des CAFs dans la résistance des cellules cancéreuses à différentes thérapies. Une étude réalisée sur les cancers du sein a notamment associé l'expression de gènes spécifiques dans les cellules stromale et la résistance des patientes aux chimiothérapies (5-fluorouracile, epirubicine, cyclophosphamide) (Farmer *et al*, 2009). Cette étude a ainsi permis l'identification d'une signature transcriptomique des cellules du stroma associée à la résistance aux traitements des patientes.

D'une manière mécanistique, comme nous l'avons mentionné précédemment, les CAFs influence la réponse des cellules cancéreuses aux chimiothérapies de par leurs actions dans la modulation du système immunitaire, dans la prolifération cellulaire ainsi que dans le métabolisme cellulaire (Correia & Bissell, 2012).

Par ailleurs les CAFs participent également *via* la sécrétion de protéines de la matrice extracellulaire à une augmentation de la pression hydrostatique interstitielle. Cette augmentation de la pression diminue le transport des différentes molécules à travers les capillaires réduisant l'accès des molécules de chimiothérapies aux cellules cancéreuses, participant ainsi aux mécanismes de résistances des tumeurs (Heldin *et al*, 2004).
De par leurs actions sur la matrice extracellulaire les CAFs jouent également un rôle dans l'augmentation des interactions entre les cellules tumorales et la matrice extracellulaire favorisant également des phénomènes de résistance.
Par exemple dans un modèle de mélanome murin induit par une mutation du gène *BRAF*, il été montré que les CAFs participent à la résistance des cellules cancéreuses aux inhibiteurs de BRAF *via* la formation d'une matrice extracellulaire riche en fibronectine. En effet la matrice extracellulaire riche en fibronectine induit une activation des kinases FAK (Focal adhesion kinase) et ERK (Extracellular signal-regulated kinases) capables d'augmenter la prolifération cellulaire et de compenser l'effet des inhibiteurs de BRAF (Hirata *et al*, 2015).

Les CAFs peuvent également induire des phénomènes de résistance *via* la sécrétion de différents facteurs solubles comme par exemple le TGF-β, IL-6 et le HGF. En effet le TGF-

β est impliqué dans la résistance des cellules cancéreuses *via* notamment l'induction d'une transition épithélio-mésenchymateuse (Zheng *et al*, 2015). L'IL-6 sécrété par les CAFs a également été impliqué dans des phénomènes de résistance aux chimiothérapies en facilitant la réparation de l'ADN et l'induction de signaux antioxydant, anti-apoptotique et pro-tumorale, protégeant les cellules cancéreuses des dommages à l'ADN, du stress oxydatif, et de l'apoptose induit par les thérapies anti cancéreuses (Kumari *et al*, 2016). L'HGF sécrété par les CAFs est également un facteur clé dans la résistance des cellules tumorale, il a notamment été impliqué *in vitro* dans la résistance des cellules de mélanome au Vemurafenib (Wilson *et al*, 2012), ainsi qu'aux inhibiteurs de RAF (Straussman *et al*, 2012).

Par ailleurs une étude a également montré l'importance du contact entre les cellules tumorale et les CAFs dans l'induction de résistance au Lapatinib dans un modèle de cancer du sein (Marusyk *et al*, 2016). Par conséquent de nombreuses études ont montrées l'implication des CAFs *via* différents mécanismes dans la résistance des cellules cancéreuses aux chimiothérapies.

De nouvelles stratégies thérapeutiques ont alors vu le jour basées sur le ciblage à la fois des cellules cancéreuses et des cellules du microenvironnements (Figure 27) (McMillin *et al*, 2013). Une étude a par exemple montré, dans un modèle de souris présentant un adénocarcinome pancréatique, que la dégradation enzymatique de l'acide hyaluronique secrété de façon abondante par les CAFs permettait une meilleure réponse des souris à la Gemcitabine (Provenzano *et al*, 2012). Ainsi le développement de thérapies visant à inhiber l'effet des CAFs pourraient permettre un meilleur accès des molécules de chimiothérapies aux cellules cancéreuses. Cependant ceci est valable uniquement si l'on considère que les CAFs possèdent uniquement un rôle pro tumoral or comme nous avons pu le constater à travers diverse expériences cette hypothèse est soumis à controverse. Si bien qu'un essai clinique visant à inhiber l'effet pro tumoral des CAFs, en utilisant un inhibiteur de SHH combiné avec une chimiothérapie classique, dans le traitement d'adénocarcinomes pancréatiques métastatiques a récemment échoué en phase II [4].

[4] http://phx.corporate-ir.net/phoenix.zhtml?c=121941&p=irol-newsArticle&ID=1653550

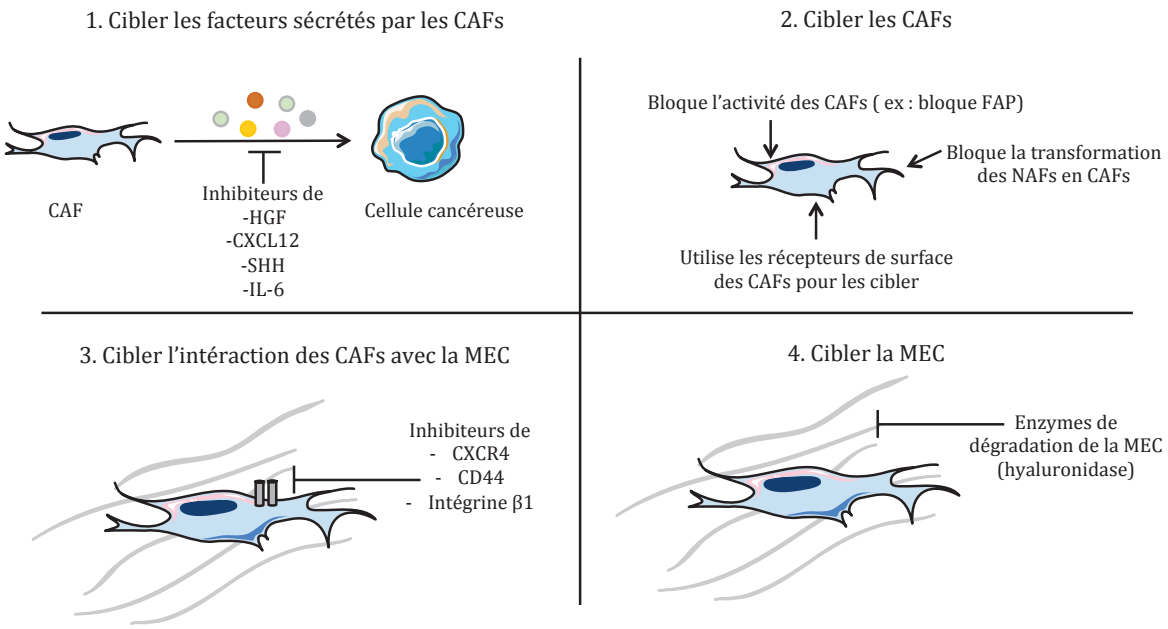


Figure 27: Exemples de stratégies visant à cibler les CAFs d'après (Ohlund *et al*, 2014).

Par conséquent, les CAFs jouent un rôle complexe et encore mal caractérisé au sein du microenvironnement tumoral. Il est alors nécessaire de mieux étudier à la fois les différents facteurs sécrétés par les CAFs ainsi que leurs conséquences sur les cellules cancéreuses afin d'approfondir la validité de future thérapie visant à cibler les fibroblastes associés au cancer.

Objectifs généraux

Comme nous l'avons vu au cours de l'introduction, la présence de cellules cancéreuses dans un tissu conduit à l'apparition de fibroblastes modifiés (CAF) présentant des propriétés prolifératives et sécrétoires importantes. En retour ces fibroblastes ont également la capacité de modifier les cellules tumorales favorisant leur prolifération, le développement de métastases, et leur résistance aux drogues anticancéreuses. Ce dialogue se caractérise notamment par la sécrétion de différents facteurs de croissances (tels que TGF-β, FGF, HGF), cytokines (tels que IL-6, Slit2, IL-8, IL-10), protéases (MMP) et composants de la matrice extracellulaire impliqués dans l'initiation et la progression tumorale.

Ces facteurs solubles sécrétés par les CAF sont impliqués dans de nombreuses voies de signalisation comme l'inflammation, le métabolisme cellulaire et la prolifération cellulaire, suggérant ainsi que la reprogrammation des cellules tumorales par les CAF affecte de nombreux gènes. En effet, en réponse à ces facteurs les cellules tumorales vont activer ou au contraire réprimer certains gènes cibles modulant ainsi de manière épigénétique leur profil d'expression. Par conséquent cette signalisation paracrine semble jouer un rôle important dans le dialogue entre les cellules tumorales et les CAFs, une meilleure compréhension des mécanismes de régulation impliqués dans ce dialogue pourrait ainsi conduire à des découvertes pertinentes permettant d'améliorer les connaissances sur la progression tumorale et la résistance des cellules tumorales.

Notre étude a ainsi pour objectifs de mieux définir les conséquences fonctionnelles des interactions entre les cellules cancéreuses et les CAFs, ainsi que d'étudier l'éventuelle implication de mécanismes épigénétiques dans cette modulation.

Grâce à un modèle cellulaire simplifié composé de lignées cellulaires tumorales cultivées en présence de facteurs sécrétés par des CAFs, nous avons pu analyser à l'échelle du génome les régulations transcriptomiques et épigénétiques associées au dialogue entre les cellules tumorales et les fibroblastes associés au cancer.

Résultats

Partie I : DNA methylation signal plays a major role in the response of cancer cells to the microenvironment, in human breast tumors.

Pauline Mathot[1], Mélodie Grandin[1], Guillaume Devailly[2], Frédérique Souaze[3], Vincent Cahais[4], Sebastian Moran[5], Mario Campone[3], Zdenko Herceg[4], Manel Esteller[5,6,7], Philippe Juin[3], Patrick Mehlen[1], Robert Dante[1*]

1. Préambule

Au cours de cette étude, nous avons cherché à caractériser les effets des CAFs sur l'expression génique des cellules cancéreuses. Nous nous sommes intéressés plus particulièrement au cancer du sein pour plusieurs raisons.

Tout d'abord, les cancers du sein se développent dans un environnement tissulaire complexe riche, capable d'influencer la croissance tumorale. Ce microenvironnement est composé de différents types cellulaires, dont les fibroblastes qui représentent la population la plus abondante (Bussard *et al*, 2016).

De part cette caractéristique les fibroblastes associés au cancer ont fait l'objet de nombreuses études dans les cancers du sein, offrant ainsi une large bibliographie. Nous pouvons citer ici quelques études clés ; Il a été montré que la mise en culture de cellules MCF10A et MCF10AT1-III8 avec des fibroblastes associés au cancer induit des changements de morphologie et augmente la croissance de ces cellules, alors que leur mise en culture avec des fibroblastes normaux inhibe leur croissance (Shekhar *et al*, 2001).

Il a également été montré que les CAFs étaient capables de sécréter différents facteurs comme SDF-1, CXCL12, TGF-β et leptine favorisant la croissance tumorale, l'invasion et le développement de métastases dans les tumeurs mammaires (Orimo *et al*, 2005; Kojima *et al*, 2010; Yu *et al*, 2014a; Barone *et al*, 2012).
De plus, la base de données « The Cancer Genome Atlas » (TCGA) dispose de quantités importantes de données de séquençage haut débit de tumeurs mammaires (RNAseq, Puce méthylation). Cette base de données offre ainsi un large panel d'études et permet de caractériser plus précisément les interactions entres les cellules tumorales et les cellules stromales chez l'homme.
Les cancers du sein représentent ainsi un modèle de choix pour l'étude des interactions entre les cellules cancéreuses et les CAFs.

Au cours de notre étude nous avons cherché plus précisément à caractériser les altérations des cellules cancéreuses induites par les CAFs au niveau de leur transcriptome et de leur épigénome. Ce manuscrit a été soumis à la revue *Oncogenesis* pour évaluation.

2. Abstract

Breast cancer associated fibroblasts play a crucial role in tumor initiation, metastasis and therapeutic resistance by secreting various growth factors, cytokines, protease and extracellular matrix components. Soluble factors secreted by CAFs are involved in many pathways including inflammation, metabolism, proliferation, and epigenetic modulation suggesting that CAF-dependent reprograming of cancer cells affects a large set of genes.
This paracrine signaling play an important role in tumor progression, thus deciphering some of these processes could lead to relevant discoveries with subsequent clinical implications.

Here, we investigated the mechanisms underlying the changes in gene expression patterns associated with the crosstalk between breast cancer cells and the stroma. From RNAseq data obtained from breast cancer cell lines grown in presence of CAF-secreted factors, we identified 372 upregulated genes exhibiting an expression level positively correlated with the stromal content of breast cancer specimens. Furthermore, we

observed that gene expression changes were not mediated through significant DNA methylation changes. Nevertheless CAF-secreted factors but also stromal content of the tumors remarkably activated specific genes characterized by a DNA methylation signature: hypermethylation at transcription start site (TSS) and shore regions. Experimental approaches (inhibition of DNA methylation, knockdown of MBD2, and ChIP assays) indicated that this set of genes was epigenetically controlled.

These data put in light the importance of epigenetics marks in the cancer cell reprogramming induced by stromal cell and indicated that the interpreters of the DNA methylation signal play a major role in the response of the cancer cells to the microenvironment.

3. Introduction

The tumor microenvironment is composed of a heterogeneous population of non-neoplastic cells including immune cells, vascular endothelial cells and fibroblasts. The presence of cancer cells leads to the appearance of phenotypically modified fibroblasts, which in turn reprogram tumor cells. The crosstalk between these components and cancer cells promotes tumor growth, metastasis (Dvorak, 1986), and impacts the response of tumors to anti-cancer therapies (Hanahan & Coussens, 2012; Hanahan & Weinberg, 2011; Quail & Joyce, 2013; Klemm & Joyce, 2015; Bussard *et al*, 2016; Marusyk *et al*, 2016; Junttila & de Sauvage, 2013).

In breast tumors activated fibroblasts (cancer-associated fibroblasts, CAFs) are the predominant stromal cell type (Sappino *et al*, 1988). CAFs present some characteristics of myofibroblasts and express specific markers including α-smooth muscle actin(α-SMA), vimentin(VIM), neuron glial antigen-2 and fibroblast specific protein-1 (Shiga *et al*, 2015). CAFs secrete various growth factors (including, FGFs, HGF, TGF-β, and SDF-1/CXCL12), cytokines (including, IL-6, Slit2, IL-8, IL-10, TNF-α, monocyte chemoattractantprotein-1, leptin, and IFN-β), proteases (MMPs), and extracellular matrix (ECM) components involved in tumor initiation, progression and invasion of breast cancer (Kalluri & Zeisberg, 2006; Buchsbaum & Oh, 2016; Qiao *et al*, 2016; Madar *et al*, 2013; Luo *et al*, 2015; Straussman *et al*, 2012; Orimo *et al*, 2005; Barone *et al*,

2012). *In vitro* cocultures have underlined the importance of heterotypic interactions among different cell types (Casbas-Hernandez *et al*, 2011). For instance, the contribution of CAFs to lapatinib resistance can be mediated by cell contact (Marusyk *et al*, 2016), while CAF culture supernatants are able to induce resistance to RAF inhibitors in breast cancer cells (Yu *et al*, 2014a; Straussman *et al*, 2012). Soluble factors secreted by CAFs and cancer cells are involved in many pathways including inflammation, metabolism, proliferation, and epigenetic modulation (Gascard & Tlsty, 2016), suggesting that CAF-dependent reprograming of cancer cells affects a large set of genes.

Thus, paracrine signaling seems to play an important role in the crosstalk between cancer cells and CAFs, and deciphering some of these processes could lead to relevant discoveries with subsequent clinical implications. In the present study, we have investigated the mechanisms underlying the changes in gene expression patterns associated with the crosstalk between cancer cells and the stroma. Unexpectedly we found that gene expression changes induced by CAF-secreted factors were not mediated through significant DNA methylation changes. Nevertheless CAF-secreted factors remarkably activate genes characterized by a high level of methylated CpGs on their regulatory region, defining a DNA methylation signature of genes modulated by stromal cell contents in human breast tumors. Our data put in light the importance of epigenetics marks in the cancer cell reprogramming induce by stromal cell.

4. Results

Identification of stromal-dependent genes in human breast tumors.

To assess the mechanisms underlying the changes in gene expression patterns associated with the crosstalk between cancer cells and the stroma, primary cultures of stromal fibroblasts were established from 3 primary infiltrating ductal carcinoma (CAF-8, CAF-11, and CAF-15) and from one primary infiltrating lobular carcinoma (CAF-12); the anatomopathological characteristics of the breast tumors are shown in Table S1 (Supplementary Table S1). Western blot analysis of the cultured fibroblasts (CAF-8, CAF-11, CAF-12, and CAF-15) indicated that they strongly expressed the CAF markers, alpha smooth muscle actin (α-SMA) and vimentin (VIM) (Shiga *et al*, 2015), at a similar

level at different passages, while, as expected, the negative marker E-cadherin remained undetected (Supplementary Figure S1). CAF cultures were also characterized by their impact on cancer cell morphology. When cultured for 48 hours in CAF culture supernatant (CAF-CM), the SKBR3 and the AU565 breast cancer cell lines underwent morphological changes, adopting a spindle-like shape with actin reorganization and an increase in size (Figure 1a), consistently with other breast cancer cell lines cultured in CAF culture supernatants (Yu *et al*, 2014b) or treated with TGF-β (Lamouille & Derynck, 2007).

To identify the gene expression changes induced by CAF-secreted factors, the impact of CAF-CM on the transcriptome of SKBR3 and AU565 breast cancer cell lines was investigated by high-throughput sequencing of polyadenylated RNA (RNAseq). Heat maps depicting gene expression fold changes induced by CAF-CMs indicated that the 4 different CAF media have similar effects on gene expression in both cell lines (Figure 1b). Combining data obtained using CAF-8, CAF-11, CAF-12, and CAF-15, we identified 558 and 732 genes upregulated (fold change (FC) ≥ 2, q-value < 0.05) respectively in SKBR3 and AU565 cells exposed to CAF-CMs (Supplementary Figure S2). Furthermore, the fold changes induced by CAF-CMs were highly correlated between each other (Pearson correlation coefficient, r, ranging from 0.902 to 1, Supplementary Table S2).

Similarities between CAF inductions were also observed between cell lines, since 67% of genes upregulated upon exposure to CAF-CMs in SKBR3 cells were also upregulated in AU565 (Supplementary Figure. S3A). Leading to the identification of a set of 372 genes upregulated by CAF-secreted factors in both cell lines ("upregulated genes"; Supplementary Table S5). Concomitantly we identified a set of 3479 genes unaffected by CAF-secreted factors in SKBR3 and AU565 cell lines ("unaffected genes"; Supplementary Table S5). "Upregulated genes" were investigated for their representation in KEGG pathways by WebGestalt (Wang *et al*, 2013). KEGG pathways enriched in this set of genes included several pathways known to be involved in the crosstalk between CAFs and cancer cells, metabolic pathways, cytokine-cytokine receptor interaction, pathways implicated in cancer, the Jak-STAT signaling pathway, and the MAPK signaling pathway (Supplementary Figure S3B).

These *in vitro* results identified groups of genes modulated by CAF secreted factors in breast cancer cell lines. In order to investigate the potential physiological significance of

this finding, we examined their expression according to the level of stromal cells present in tumors from samples available through The Cancer Genome Atlas (TCGA). The stromal cell contents of the tumors were evaluated using the stromal ESTIMATE score (Yoshihara *et al*, 2013) available at the ESTIMATE web site. Among the 372 "upregulated genes", only 6 also belonged to the gene list of stromal signature (Yoshihara *et al*, 2013). Tumors were subdivided in two groups, "high stromal score" (positive score values, n = 750) and "low stromal score" (negative score values, n = 350). Heat map depicting the expression level of the set of "upregulated genes" in the two groups of tumors (high/low stromal score) indicated that the set of "upregulated genes" was expressed at a higher level in the group of tumors with high stromal cell content than in the group with low stromal cell content (Figure 1c). Conversely, the set of "unaffected genes" did not exhibit an expression dependent on stromal cell content of the tumors (Figure 1c).

For the set of "upregulated genes", the difference between means observed between the two groups of tumors was statistically significant (two-tailed unpaired Student's t-test, $P < 0.0001$, difference between means in RSEM (diff-mean-RSEM) = 218.2). In contrast, very small differences were observed between the two groups of tumors for the "unaffected genes" (diff-mean-RSEM = -57.50) and for the "all-genes group" (genes not included in the two later categories, diff-mean-RSEM = 17.65) (Figure 1d). Furthermore, the expression level of the "upregulated genes" was positively correlated with the stromal score (Pearson's $r = 0.36$, $P = 1.3 \times 10^{-33}$) (Figure 1e), while this positive correlation was not observed for the "unaffected genes" (Pearson's $r = -0.40$, $P < 1 \times 10^{-100}$) (Figure 1f). When the human breast tumors were subdivided according to the main tumor types found in the TCGA databank, this correlation seemed to be stronger (Pearson's r = 0.49) in invasive lobular carcinoma than in invasive ductal carcinoma (Pearson's r = 0.33) (Supplementary Figure S4). Although we cannot exclude some biases due to sample sizes (n = 182 and n = 752) these data suggested that the response to stromal cell content might be also dependent on the tumor type.

Taken together, these results identified groups of genes which are modulated by CAF secreted factors *in vitro* and presenting an expression level dependent on the presence of stromal cells in human breast tumors. To get further into the mechanisms underlying

transcriptomic modifications induced by stromal cells, DNA methylation analyses at key genomic regions were performed.

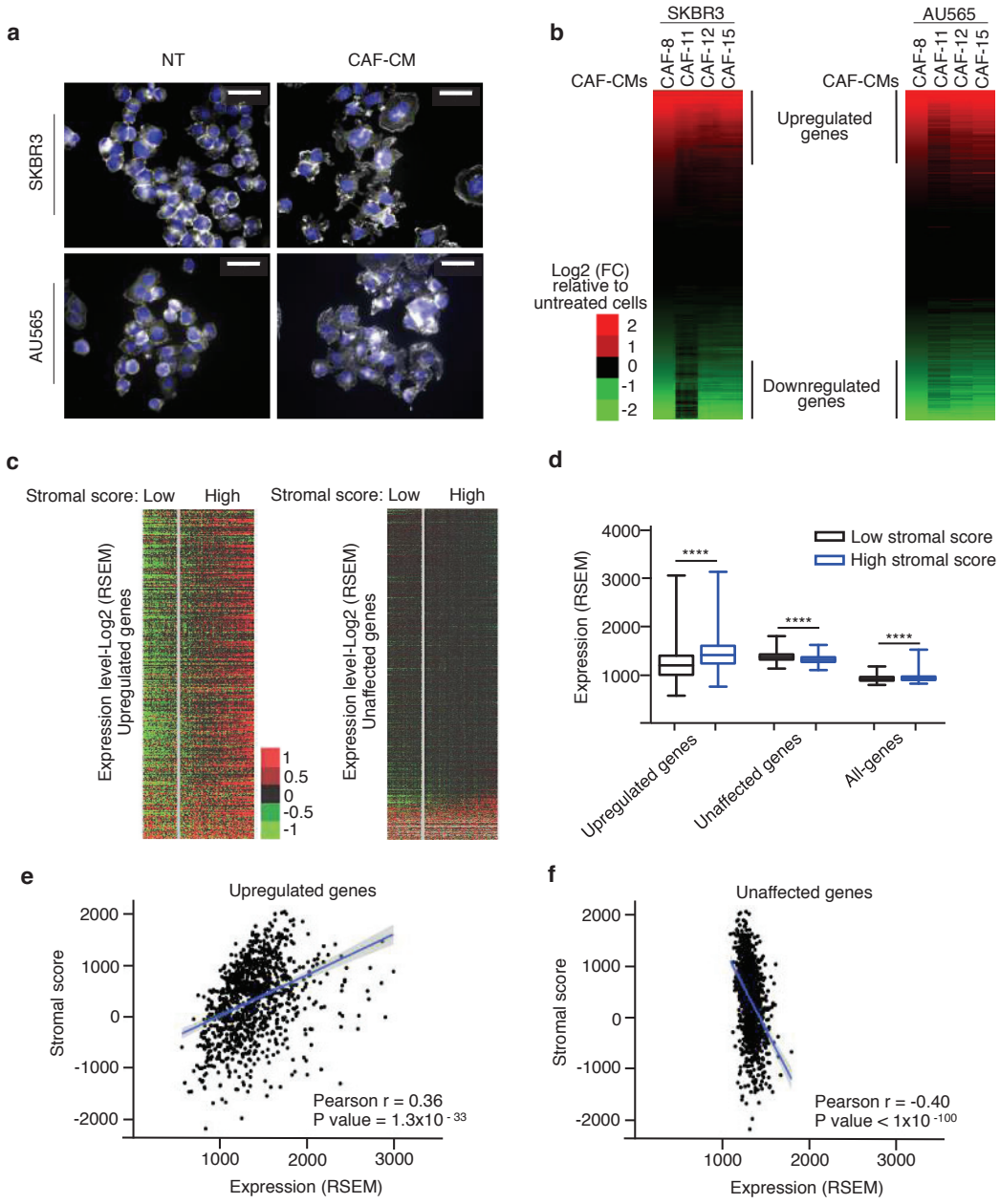


Figure 1. Identification of stromal-dependent genes in human breast tumors.
(**a**) Breast cancer cell lines SKBR3 and AU565 treated with CAF-11 CM or control medium for 48 h were stained for F-actin. Nuclei were visualized using DAPI staining in blue. Representative images, scale bars, 50 µm. (**b**) Heat maps from RNAseq data of SKBR3 and AU565 cell lines. Genes were classified according to their expression levels in cells treated with CAF-CMs normalized by their expression in control cells. (**c**) Heat map depicting expression level of genes modulated by CAF-secreted factors identified *in vitro* in function of human breast tumors stromal score; left panel: genes upregulated by CAF secreted factors (median centering, n = 1042); right panel: genes unaffected by CAF

secreted factors (median centering, n = 1042). (**d**) Mean expression level of genes modulated by CAF-secreted factors identified *in vitro,* in human breast tumors as a function of the tumor stromal score. (**** $P < 0.0001$, two-tailed unpaired Student's t-test. Error bars = s.e.m). (**e**) Linear regression curve presenting the relationship between the mean expression levels of genes upregulated by CAF-secreted factors identified *in vitro* and the tumor stromal score. (**f**) Linear regression curve presenting the relationship between genes unaffected by CAF-secreted factors identified *in vitro* and the tumor stromal score.

Gene upregulation upon CAF-secreted factors occurs in the absence of DNA methylation changes.

Epigenetic modifications seem to play a crucial role in the crosstalk between cancer cells and the stroma (Hu *et al*, 2005; Liu *et al*, 2017). To investigate the existence of DNA methylation changes associated with genes modulation induced by CAF-secreted factors, SKBR3 and AU565, DNA methylation levels, at key genomic regions were determined using the MethylationEPIC (EPIC) BeadChip technology, which covers over 850,000 CpG sites.

We observed first that SKBR3 and AU565 cells exhibited different levels of methylation on theirs regulatory regions (Supplementary Figure S5). CpGs were annotated according to the manifest provided with the Infinium MethylationEPIC and classified into 3 different groups: "TSS regions" (TSS1500, 0-1500 bases upstream of transcription start site (TSS)), "shore regions" (shore, 0-2 kb from CpG island), and "shelf regions" (shelf, 2-4 kb from CpG island). Differential methylation was not observed on the TSS regions of the "upregulated genes" in SKBR3 and AU565 cells grown in two different CAF-CMs (Figure 2a). Data obtained for *ETV7*, *STAT5A*, *SOX9*, *KSR1*, *PDK4*, and *PARP14* illustrate this analysis (Figure. 2b). Furthermore, using ChAMP software, we did not detect significant change at the 850,000 CpGs analyzed, in cell lines grown in CAF-CMs compared to control cells. Concomitantly, in human breast tumor we did not detect differential methylation of "upregulated genes" in tumor presenting high stromal score compare with tumor presenting low stromal score (Figure 2c).

Although we (Grandin *et al*, 2016b, 2016a; Portela & Esteller, 2010), as many other colleagues, have observed that methylation changes may have a major role in carcinogenesis, our data showed that genes induced by stromal was unexpectedly not mediated through DNA methylation changes.

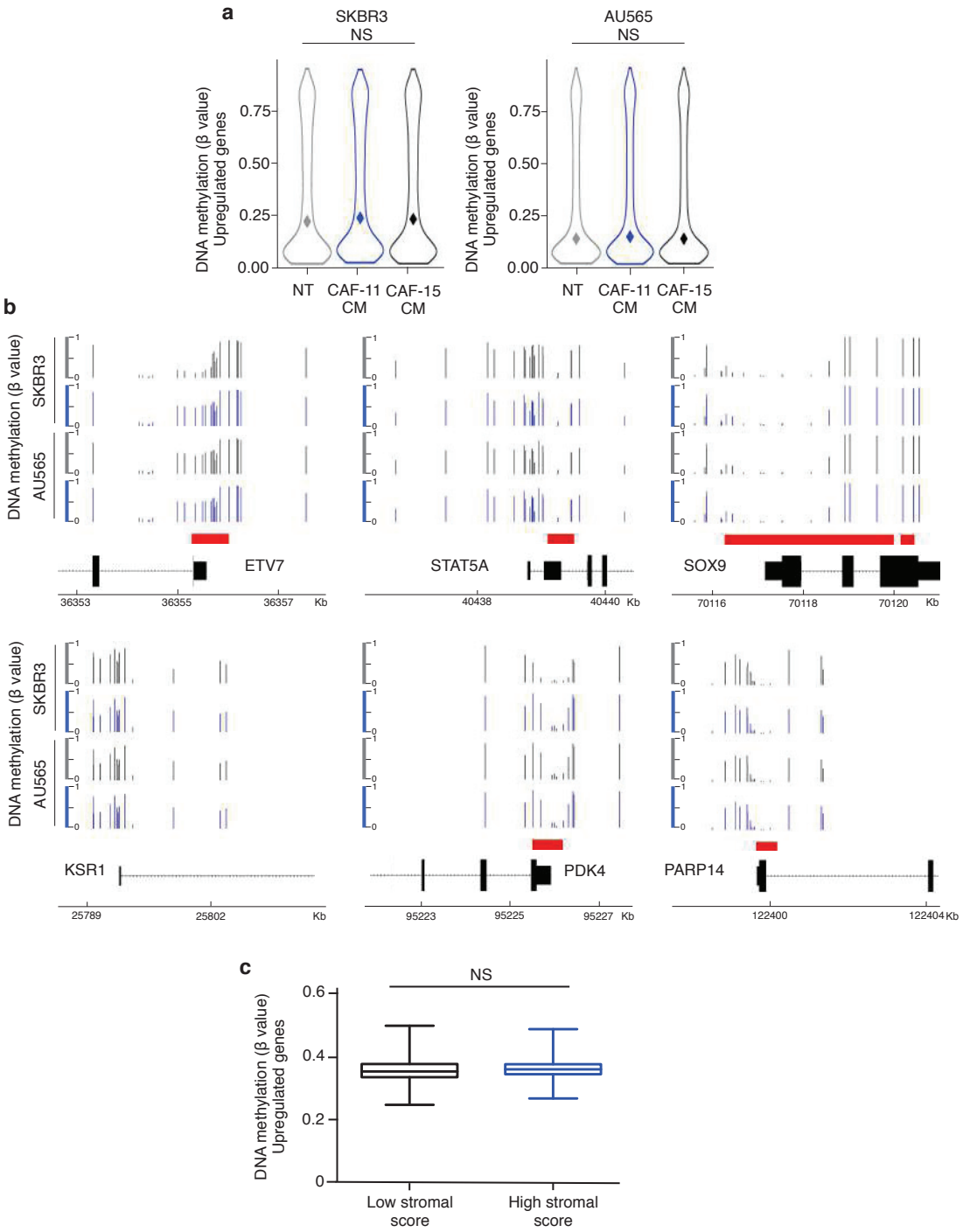


Figure 2. Gene upregulation upon CAF-secreted factors occurs in the absence of DNA methylation changes.

(**a**) Level of DNA methylation (β value) at TSS1500 regions of "upregulated genes". The level of DNA methylation of these genes was analyzed in SKBR3 and AU565 cells treated with CAF-11 CM, CAF-15 CM or control medium (NT) for 48 h. (**b**) Genome coverage of DNA methylation in NT cells (grey) or in cells treated with CAF-11 CM (blue) at six genomic locations. Scales (β values); Genes in black and CpG islands in red. (**c**) Mean DNA methylation level (β values) at TSS1500 regions of "upregulated genes" in breast tumors in function of their tumor stromal score. (*NS* $P \geq 0.05$, two-tailed unpaired Student's t-test).

DNA methylation signature of genes modulated by CAF-secreted factors.

We observed that the TSS regions of "upregulated genes" were significantly more methylated ($P < 0.0001$, two-tailed unpaired Student's t-test) than the TSS regions of "unaffected genes", in SKBR3 and AU565 cells (Figure 3a). Significant hypermethylation of "upregulated genes" ($P < 0.0001$, two-tailed unpaired Student's t-test) was also observed for shore regions (Figure 3a), while shelf regions that are more distant from regulatory regions did not exhibited this characteristic (Figure 3a). This hypermethylation was symmetrically distributed around the TSS for both cell lines (Figure 3b). Furthermore, in breast tumor, as observed in cell lines, the set of "upregulated genes" exhibited hypermethylations on their TSS regions when compared with the TSS region of "unaffected genes" or the TSS region of the "all-genes groups" (two-tailed unpaired Student's t-test, $P < 0.0001$) (Figure 3c). Heatmap depicting the TSS methylation level of "upregulated genes" on human breast tumors revealed a relative homogeneity among the 839 patients analyzed (Figure 3d). Moreover heatmap depicting the TSS methylation level of these "upregulated genes" in tumor tissue and normal tissue in paired normal/tumoral samples (n=75) showed similar DNA methylation levels of these genes in tumor when compared with their normal counterpart, indicating that this DNA methylation signature was not induced by the tumor but characterized these genes (Figure 3e).

The relationship between DNA methylation level and the gene response to stroma was further evaluated by subdividing the TGCA breast cancer cohort in genes harboring a positive expression level positively correlated (Pearson $r \geq 0.3$), or no correlated (Pearson $r < 0.3$), with the stromal cell content of the tumors. We observed that their DNA methylation levels at TSS regions were higher (% of methylation, median value:

0.35, N=1066) in the group of upregulated genes than in the group of genes not affected (median value: 0.21, N=14904). To avoid potential biases du to different expression levels between the two groups, we also limited our analysis to genes with similar expression levels (2 x median ≤ RSEM values ≥ 0.5 x median). Differential methylation levels between the 2 groups were still observed (median value: 0.30, N=736 versus median value : 0.10, N=8647 in the group genes positively correlated or not correlated, respectively) (Figure 3f), while their mean expression level was not significatively different (two-tailed unpaired Student's t-test, P = 0.75), (Figure 3g).

This result indicate that CAF-secreted factors but also stromal content of the tumor remarkably activate genes characterized by a high level of methylated CpGs on their regulatory region, defining a DNA methylation signature of genes modulated by stromal cell contents in human breast tumors. Thus, this DNA methylation signature of genes upregulated by CAF-secreted factors suggests that DNA methylation was involved in their transcriptomic regulation.

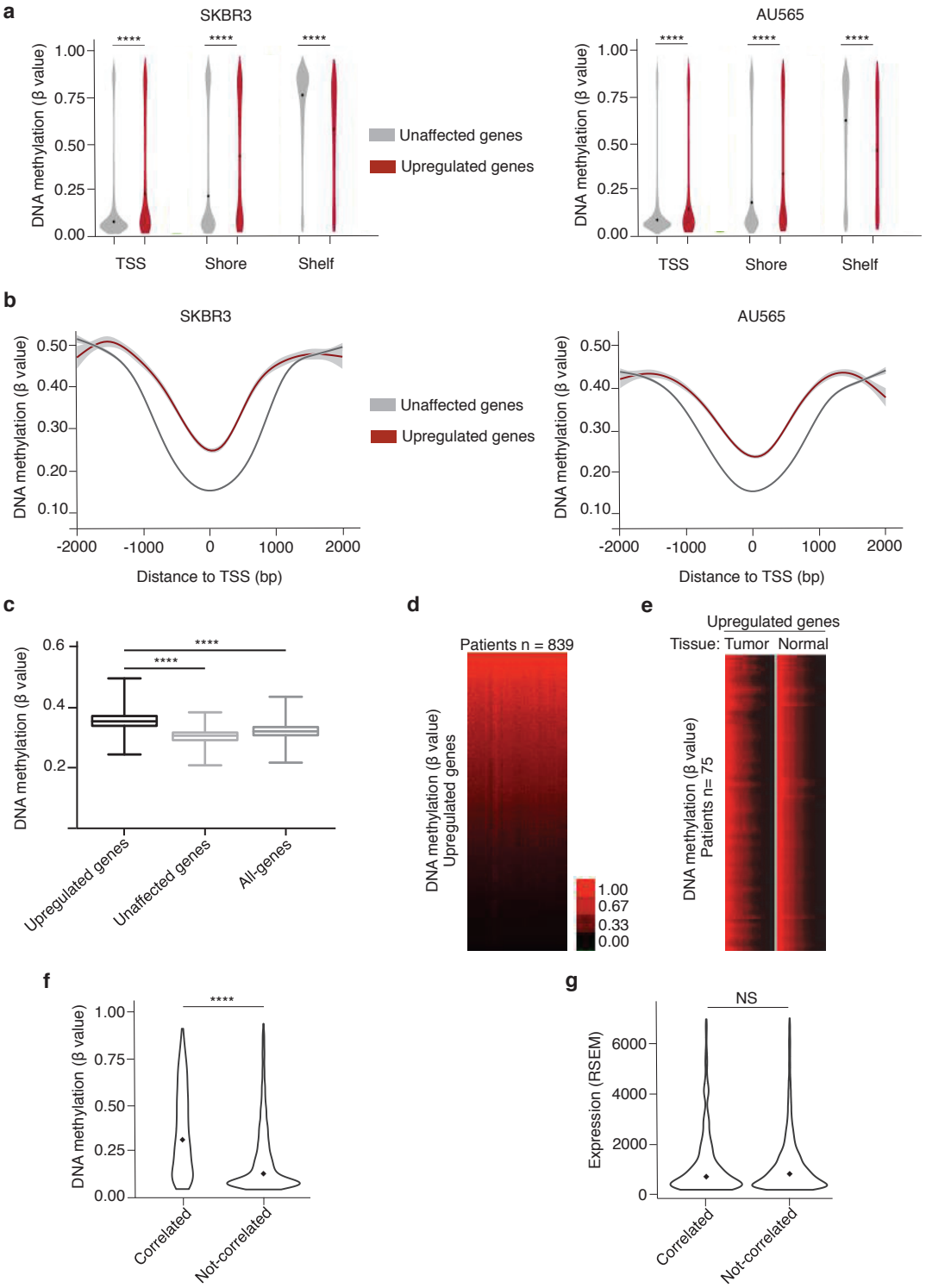


Figure 3. DNA methylation signature of genes modulated by CAF-secreted factors. (**a**) Violin plots depicting the level of DNA methylation (β values) of "upregulated genes" or "unaffected genes" in SKBR3 and AU565 cell lines; diamond, median value; DNA methylation level at TSS1500, Shore and Self-regions. (**** $P < 0.0001$, two-tailed unpaired Student's t-test). (**b**) DNA methylation level (β values) of "upregulated genes" or "unaffected genes according to their distance to TSS, in SKBR3 and AU565 cell lines. (**c**) Mean DNA methylation levels at the TSS1500 region of genes modulated by CAF-secreted factors identified *in vitro*, in human breast tumors. (**** $P < 0.0001$, two-tailed unpaired Student's t-test). (**d**) Heat map depicting the methylation level at TSS1500

regions of “upregulated genes”, in human breast tumors (n=839 patients). (**e**) Heat map depicting the methylation level at TSS1500 regions of “upregulated genes” in paired normal/tumoral sample, in the 75 patients analyzed. (**f**) Violin plots depicting the level of DNA methylation (β values) of genes with an expression positively correlated (Correlated, Pearson r ≥ 0.3, n = 736) or not correlated (Not-correlated, Pearson r < 0.3, n = 8647) with the stromal cell content of the tumors; diamond, median value; DNA methylation level at TSS1500 (**** $P < 0.0001$, two-tailed unpaired Student’s t-test). (**g**) Violin plots depicting the expression level of genes correlated or not correlated with the stromal cell content of the tumors, diamond, median value; Expression level (NS = not significant, P = 0.75, two-tailed unpaired Student’s t-test).

Involvement of DNA methylation in the response to CAF-secreted factors.

To gain further insight into the association between this DNA methylation signature and gene expression, SKBR3 and AU565 cells were treated with decitabine (DAC), an inhibitor of DNA methylation. Analysis of CpG methylation using the EPIC BeadChip approach indicated that DAC treatment resulted in an efficient demethylation of TSS regions ($P < 0.0001$, two-tailed unpaired Student’s t-test) since mean hypomethylation levels were estimated at 18% and 27% for SKBR3 and AU565 cells, respectively (Supplementary Figure S6). Furthermore, RNAseq experiments, indicated that a large proportion (70% and 49%, in SKBR3 and AU565 cells, respectively) of genes upregulated by CAF-CMs were also upregulated upon DNA methylation inhibition by DAC (FC ≥ 2, adjusted $P < 0.05$), while DAC treatments downregulated a very small fraction (0.4% and 2.5%, in SKBR3 and AU565 cells, respectively) of this set of genes (Figure 4a). Moreover, a very low proportion (0.9% and 1.3%, in SKBR3 and AU565 cells, respectively) of genes unaffected by CAF-CMs were upregulated upon DNA treatment (Supplementary Figure S7), suggesting that DNA methylation was involved in the regulation of a large part of “upregulated genes”.

The potential involvement of the DNA methylation signature in the response to CAF-secreted factors was investigated for specific genes in both cell lines. For *ITGB6*, *STAT5A*, *MUC20*, *SERPINA3*, *SAA1*, and *FHL2*, DAC treatment reduced their response to CAF-CM (Figure 4b). This result indicates that CAF-mediated gene upregulation and

demethylation-dependent upregulation (induced by DAC) did not produce a cumulative effect.

This result suggests that presence of methylated CpGs seems to play an important role on the upregulation induced by CAF-secreted factors. Since the upregulation of these hypermethylated genes was not mediated through a demethylation induced by CAF-secreted factors, it might be dependent on the modulation of proteins involved in the interpretation of their DNA methylation.

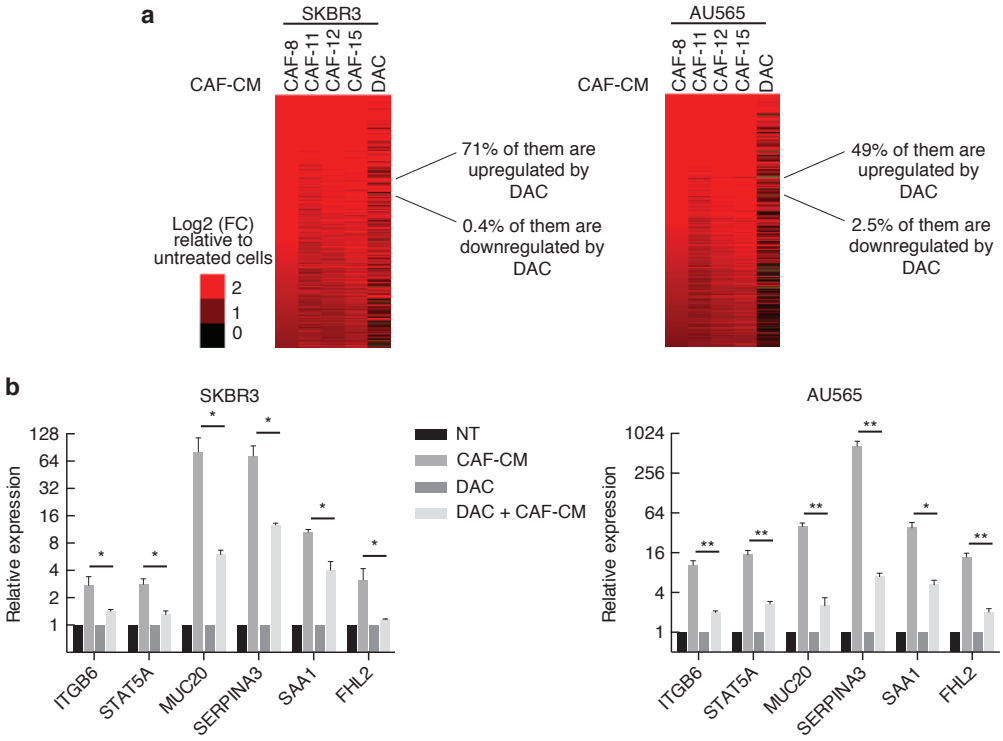


Figure 4. Involvement of DNA methylation in the response to CAF-secreted factors. (**a**) Heat maps depicting the set of "upregulated genes" upon exposure to CAF-CMs or DAC. (**b**) Relative expression of six genes in SKBR3 and AU565 cells treated with CAF11-CM (CAF-CM), decitabine (DAC) or both (DAC + CAF-CM) (** P<0.05*; *** P<0.01*, two-tailed unpaired Student's t-test. Error bars = s.e.m). NT = not treated.

Methyl DNA binding protein MBD2 deposition at genes modulated by CAF-secreted factors.

Among the proteins involved in the repression of methylated genes, many studies have shown that the methyl-CpG binding domain proteins (MBD) play a major role in

translating DNA methylation into gene repression (Bird, 2002; Defossez & Stancheva, 2011b; Wood & Zhou, 2016). These proteins recognize methylated CpG sites independently of their surrounding sequences and recruit repressor complexes at their binding sites. The methyl-CpG binding domain protein 2 (MBD2), a member of the MBD protein family, regulates multiple aspects of cell differentiation and function, including immune iPS reprogramming (Lee *et al*, 2013), immune response (Cook *et al*, 2015), and cancer (Mian *et al*, 2011; Sansom *et al*, 2003; Stirzaker *et al*, 2016). We thus investigated the impact of MBD2 depletion on the set of "upregulated genes". *MBD2* knockdown by transient transfection with a siRNA targeting *MBD2* (Devailly *et al*, 2015) led to a 86% and 87% reduction of *MBD2* mRNA in SKBR3 and AU565 cells, respectively, while the other members of the MBD family (*MeCP2*, *MBD1*, and *MBD4*) were not affected (Supplementary Table S3). This inhibition was also observed at the protein level (Figure 5a).

We identified by RNAseq 292 and 459 genes specifically upregulated in SKBR3 and AU565 cells, respectively, following siMBD2 treatments compared with scrambled control siRNA (siCtrl). A substantial part of these genes were also upregulated by CAF-secreted factors, 16% and 27% in SKBR3 and AU565, respectively (Figure. 5b). Furthermore, the fold changes in gene expression observed upon MBD2 depletion were positively correlated with the fold changes induced by CAF-CMs (Figure 5c and 5d) (Pearson's r = 0.27 and r = 0.42, P = 0.000017 and P = 1.4×10^{-12} for SKBR3 and AU565 cells, respectively), indicating that a fraction of genes upregulated by CAF-secreted factors are regulated by MBD2 through their DNA methylation signature. Moreover, MBD2 deposition at 17 genes, upregulated upon MBD2 depletion and treatment with CAF-CMs, was validated by chromatin immunoprecipitation assays (Figure 5e and 5f) from both cell lines grown in control medium. These data indicated, that the methyl-dependent repressor MBD2 targets a part of genes upregulated by CAF-secreted factors. Furthermore, ChIP assays indicated MBD2 enrichments were reduced at several upregulated genes, in cell SKBR3 and AU565 cells grown in presence of CAF-secreted factors (Figure 5g and 5h).

Taken together these data suggest that dynamic MBD2 deposition across methylated DNA regions was associated with the modulation of gene expression by the CAF.

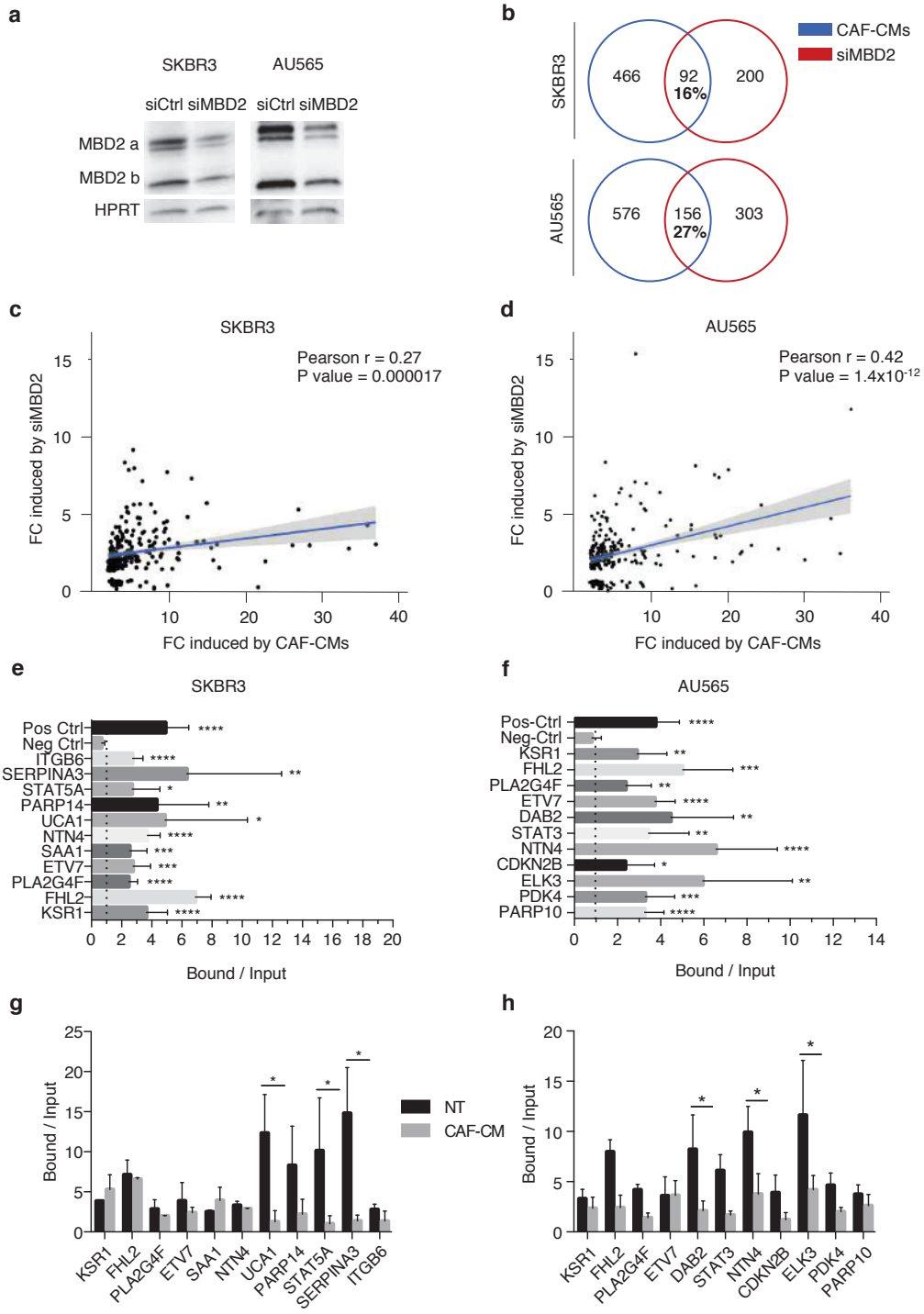


Figure 5. Methyl DNA binding protein MBD2 deposition at genes modulated by CAF-secreted factors.

(**a**) Western blot analysis of MBD2 proteins in SKBR3 and AU565 cells treated with siRNA targeting MBD2. (**b**) Venn diagram of genes upregulated by CAF-CMs compared to genes upregulated by MBD2 siRNA. (**c**) Linear regression curve presenting the relationship between the fold change in gene expression induced by CAF-CMs and siRNA targeting MBD2 in SKBR3, and (**d**) in AU565. (**e**) Chromatin immunoprecipitation

mapping MBD2 biding sites at the 5' end regions of genes upregulated by CAF-secreted factors in SKBR3, and (**f**) in AU565. (* *P < 0.05*; ** *P < 0.01*; ****P* < 0.0001, two-tailed unpaired Student's t-test. Error bars = s.e.m). (**g**) Chromatin immunoprecipitation assays of MBD2 enrichment at the 5' end regions of genes upregulated by CAF-secreted factors in SKBR3 treated with CAF8-CM (CAF-CM), NT (not treated); and (**h**) in AU565. (* *P < 0.05*; ** *P < 0.01*; ****P* < 0.0001, two-tailed unpaired Student's t-test. Error bars = s.e.m).

5. Discussion

It is well-recognized that some genes are specifically expressed in the tumor microenvironment in the presence of tumor cells (Basset *et al*, 1990; Chiquet-Ehrismann *et al*, 1986; Yee *et al*, 1991; Olumi *et al*, 1999b; Orimo *et al*, 2001). Concomitantly, the importance of stromal cells for tumor progression has also been established (Olumi *et al*, 1999b; Orimo *et al*, 2005), although the stroma has been reported to limit cancer progression mainly during the first steps of the oncogenic process (Bissell & Hines, 2011). Dozens of factors secreted by CAFs have now been identified and their role in cancer cell plasticity is widely acknowledged (Taddei *et al*, 2013; Gascard & Tlsty, 2016). The mechanisms underlying the changes in gene expression patterns associated with the crosstalk between cancer cells and the stroma remain an ongoing field of research.

Genetic modifications do not seem to play an important role in the phenotypic modifications observed in fibroblasts upon activation by cancer cells (Qiu *et al*, 2008; Du & Che, 2017; Pidsley *et al*, 2016), however, these phenotypic modifications are conserved over several passages during *in vitro* cultivation of CAFs. Epigenetic modifications should, therefore, play a major role in the cancer-stroma crosstalk (Du & Che, 2017). Epigenetic modifications do not occur only in CAFs but also in cancer cells since many CAF-secreted factors are involved in epigenetic pathways. For example, the CAF-secreted factor TGF-β (Ao *et al*, 2007; Kojima *et al*, 2010; Yu *et al*, 2014b), mediates epigenetic switches through SOX4 activation, which in turn modulates EZH2, a histone methyltransferase, in cancer cells (Tiwari *et al*, 2013). Furthermore, TGF-β treatments may induce genome-wide changes in DNA methylation, in liver cancer cell lines (Martin *et al*, 2014). Epigenetic players, such as miRNAs (Rokavec *et al*, 2016), also contribute to the maintenance of an invasive, cancer initiating cell phenotype. For instance, loss of Let7 is also expected to induce HMGA2, a regulator of the chromatin remodeling of stemness traits in transformed cells (Dangi-Garimella *et al*, 2009).

Taken together these data indicate that epigenetic markers could play a central role in the tumor-stroma crosstalk. Consistently, inhibition of DNA methylation by exposure to DAC upregulated a large proportion (about 60%) of genes upregulated by CAF-secreted factors, identified in a model based on two human breast cancer cell lines.

The analysis of DNA methylation using the Infinium MethylationEPIC beadChip technology, which interrogates 850,000 CpGs, also highlighted the importance of epigenetic marks. The potential regulatory regions (TSS and shore regions) of genes modulated by CAF-secreted factors were hypermethylated when compared with genes unresponsive to these stimuli. We did not detect significant differentially methylated CpG between cells grown in CAF conditioned medium and cells grown in control medium indicating that gene upregulation driven by CAF-secreted factors was not mediated through changes in DNA methylation. Our results provide evidence that CAF secreted factors induced phenotypic changes in cancer cell lines without substantial DNA methylation changes. In line with these data, it has been reported that transdifferentiation of B cell to macrophage can occur without DNA methylation changes (Rodriguez-Ubreva *et al*, 2012). These findings suggest that CAF secreted factors can induce changes in the interpretation of this epigenetic mark to activate or repress the expression of key genes.

The model used allowed us to isolate the effects of CAF-secreted factors from those occurring during heterotypic interactions which occur in human tumors. However, we cannot exclude that changes in DNA methylation in cancer cells could be induced by contact with stromal cells in human breast tumors. Alternatively, our model did not allow the identification of the genes undergoing CAF-dependent changes in methylation since cells were grown in CAF culture supernatant for a relatively short time. Nevertheless, when clinical breast cancer specimens were classified according to their stromal cell contents (TCGA databank) the methylation patterns of the genes upregulated by CAF-secreted factors did not differ in tumors exhibiting a high stromal cell content from those with a low stromal cell content.

Since gene upregulation mediated by a chemically induced hypomethylation (treatment with DAC) and the upregulation mediated by CAF-CMs did not result in a cumulative effect, the signal provided by DNA methylation was important in the response of human breast cancer cell lines to CAF-CMs. This epigenetic mark is linked to transcriptional control by various mechanisms. DNA methylation may impair the direct binding of transcription factors to their targets and, in turn, may lead to transcriptional downregulation (Ehrlich & Lacey, 2013; Iguchi-Ariga & Schaffner, 1989; Kim, 2003; Campanero *et al*, 2000; Watt & Molloy, 1988). More recently, it has been shown that some transcriptions factors bind to methylated sequences, and for some of them the methylation status of specific CpGs participates in defining their binding sites (Zhu *et al*, 2016). Pioneering studies, from *in vitro* transcription assays, have established that DNA methylation does not inhibit transcription *per se* and suggest that proteins associating DNA sequences play an important role in the repression of methylated templates (Jove *et al*, 1984). Several families of proteins that recognize methylated DNA with no or weak sequence specificity have been identified (Hendrich & Bird, 1998; Bird, 2002). Their methyl-DNA binding domain has been used to define three major families of proteins (Baubec & Schubeler, 2014; Defossez & Stancheva, 2011b) among them the methyl-CpG binding domain proteins (MBD) exhibit weak or no specificities for sequences surrounding methylated CpGs (Klose *et al*, 2005; Scarsdale *et al*, 2011; Baubec & Schubeler, 2014). Nevertheless, these proteins are involved in many cellular processes. For example MBD2 is a crucial player in differentiation, carcinogenesis, and immunology, and has an important role in the repression of methylated genes, while this protein may also act as a transcriptional activator for some genes (Baubec *et al*, 2013; Angrisano *et al*, 2006). Specific MBD2 deposition occurs at genes downregulated during the *in vitro* transformation of immortalized human mammary cells and for about 10% of them this specific deposition is not driven by changes in DNA methylation but by the redistribution of MBD2 across methylated regions (Devailly *et al*, 2015).

In the model used in the present study, MBD2 depletion upregulated approximately 20% of the genes upregulated by CAF-CMs and ChIP experiments have validated the presence of MBD2 at the 5' end of the 17 genes analyzed. Although these assays were not quantitative enough to monitor potential changes in MBD2 deposition by ChIPseq, ChIP assays indicated that CAF-CMs can reduce MBD2 deposition at several upregulated

genes, in SKBR3 and AU565 breast cancer cell lines. A DNA methylation signature was associated with the genes modulated by CAF-secreted factors, while these transcriptomic changes were not associated with direct changes in DNA methylation. These data suggest that MBD2, and other proteins recognizing methylated sequences, may be involved not only in the control of these genes but also in the transcriptomic changes observed upon CAF-secreted factors treatments.

Combining the data obtained from the different cell lines and CAF media used, we identified 372 genes upregulated by CAF-CMs. Many of these genes belong to pathways associated with carcinogenesis and include transcription factors (STAT5A, ETV7, ETV6, SOX4, and SOX9, for example) playing an important role in oncogenesis. In clinical breast tumor specimens, the group of genes identified from cell line models harbored an expression positively correlated with the stromal cell content of the tumors (TCGA databank, n = 1100), suggesting that these genes were also modulated by the microenvironment in human breast tumors. Furthermore, the stromal cell contents of the tumors did not influence the expression level of genes unaffected ($0.8 \leq FC \geq 1.2$) by CAF-secreted factors. Taken together, these data suggested that the *in vitro* model, used in this study, mimicked some characteristics of the crosstalk between tumor cells and stroma, and that the genes identified were involved in the physiopathology of human breast tumors. A DNA methylation signature similar to that observed in cell lines, defined the group of stroma-dependent genes, since they were hypermethylated at their TSS regions compared to the unaffected genes or to the all-genes group. Taken together these data suggest that the epigenetic signature may impact their CAF-dependent expression in human breast tumors.

In summary, our study demonstrates that CAF-secreted factors but also stromal content of the tumor remarkably activated specific genes characterized by a DNA methylation signature. These data provide new insights for the identification of molecular events defining the responsiveness of genes to stromal cell contents of human tumors. These findings might have clinical implications; the targeting of methylation-dependent mechanisms controlling gene expression may represent a new strategy for impacting the effects of stroma on cancer cell plasticity.

6. Materials and methods

Tissue specimens and cultures

Human breast cancer cell lines AU565 and SKBR3 obtained from the American Type Culture Collection (ATCC) were cultured in RPMI-1640 medium (Life Technologies) and McCoy's 5a medium (Life Technologies) supplemented with 10% FBS (Lonza) and 1% penicillin/streptomycin (InVitrogen). Immortalized human mammary epithelial cells (HMECs) were kindly provided by Dr. Anne-Pierre Morel (CRCL, Lyon, France) and cultured as previously described (Morel *et al*, 2008). Primary cultures of breast cancer-associated fibroblasts were kindly provided by Dr. Fréderique SOUAZE (CRCNA, Nantes, France) and cultured in DMEM-F12 (Life Technologies) supplemented with 10% FBS and 1% penicillin/streptomycin. Fresh human mammary samples were obtained from chemotherapy naive patients with invasive carcinoma after surgical resection at the Institut de Cancérologie de l'Ouest, René Gauducheau, Nantes, France. All procedures involving patient specimens were approved by the local institutional review boards and all research was carried out in accordance with the Helsinki declaration. CAF samples were obtained with informed consent and human ethics approval from Institut de Cancérologie de l'Ouest (Nantes, France). Cancer associated fibroblasts were used in the experiments at less than 8 passages, and theirs characteristics are presented in Table S1 (Supplementary Table S1). Regular tests for mycoplasma contamination were performed. To prepare conditioned medium of cultured CAFs (CAF-CM), CAFs were cultured for 48 h in DMEM-F12 supplemented with 1% FBS, collected and then centrifuged for 10 min at 1,000 r.p.m to remove cell debris.

Treatments

For the CAF-CM treatment, cells were seeded at 1.10^5 per well in 6-well plates. The following day, cells were cultured in CAF-CM for 48 h. For MBD2 siRNA experiments, cells were seeded at 3.10^5 per well in 6-well plates. The day after, cells were transfected with 100 pmol of MBD2 targeting siRNA (siMBD2; sens: 5-GGAGGAAGUGAUCCGAAAdTdT-3)(Devailly *et al*, 2015) or control siRNA (siCtrl; Sigma-Aldrich, MISSION siRNA Universal Negative Controls #1) using RNAiMAX (Sigma-Aldrich) as specified by the manufacturer's instructions. Cells were collected 72 h after

treatment initiation. For the decitabine (DAC) treatment, cells were seeded at 1.10^5 per well in 6-well plates. The following day, cells were treated daily with 10 µM of DAC (Sigma-Aldrich) for three days and were then collected.

Immunofluorescence staining

Cells were seeded onto a Nunc Lab-Tek Chamber Slide system (Sigma-Aldrich), and cultured for 48 h prior to their fixation in 3.7% paraformaldehyde for 20 min. Cells were permeabilized in PBS 1X 0.1% Triton X-100 for 20 min and incubated with the filamentous actin (F-actin) dye (Phalloidin, Fluorescein Isothiocyanate Labeled, Sigma-Aldrich) for 1 h. The cell nuclei were counterstained with 4',6-Diamidino-2-Phenylindole, Dihydrochloride (DAPI).

Expression analysis

Total RNA was extracted using the NucleoSpin RNA kit (Macherey-Nagel) following the manufacturer's instructions. RNA purity, integrity and quantification were assessed using agarose gel-electrophoresis and analyzed on a NanoDrop 1000 (Thermo Scientific). For RNAseq experiments, pools of three independent experiments were sent for high-throughput sequencing to IntegraGen and each experiment was conducted in duplicate. For quantitative real-time PCR (qPCR), each experiment was carried out in triplicate, 1 µg of RNA was reverse-transcribed, using the iScript cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad). Quantitative-PCR was performed using a Mini opticon (Bio-Rad) and the IQ SYBR Green supermix (Bio-Rad). Gene expression profiles were validated using 2 standard housekeeping genes, *PBGD* and *GAPDH.* Primer sequences are listed in Table S4 (Supplementary Table S4).

Immunoblotting

Cells were lysed in RIPA Buffer, lysates were sonicated and heated at 95°C for 5 min. After electrophoresis and transfer, membranes were incubated either with anti-alpha smooth muscle actin (Abcam, ab7817), anti-vimentin (Abcam, ab92547), anti-E-cadherin (BD Biosciences, 610181), anti-MBD2a,b (Sigma-Aldrich, RA-18) or anti-HPRT (Abcam, ab10479) antibodies.

MBD2 chromatin immunoprecipitation (ChIP)

MBD2 ChIP was performed as previously described (Auriol *et al*, 2005). Sheared chromatin (with a mean fragment length between 300 and 500 bp) was obtained by sonication of formaldehyde crosslinked nuclei. ChIP was then performed with an antibody against MBD2a,b (Sigma-Aldrich, RA-18) using the ChIP Assay Kit (Merck Millipore) as specified by the manufacturer's instructions. Precipitated DNA was purified using the NucleoSpin Gel and PCR Clean-up kit, (Macherey-Nagel) according to the manufacturer's protocol 'DNA clean-up of samples containing SDS'. Input and bound fractions of DNA were assayed by fluorometry (Qubit 2.0, Life Technologies). Enrichment in the bound fraction, compared to the input, was measured by qPCR for several genes including one positive (pos-Ctrl) and one negative control (neg-Ctrl), using iQ SYBR Green supermix (BioRad). The pos-Ctrl was located at the *BRCA1-NBR2* locus, since this region was methylated in all samples analyzed so far and associated with MBD2 (Auriol *et al*, 2005; Magdinier *et al*, 2000), whereas the neg-Ctrl was a CpG-free region located on chromosome 16 q23.3. Primer sequences are listed in Table S4 (Supplementary Table S4).

Infinium MethylationEPIC beadChip

Genomic DNA was extracted from cell lines using the QIAmp DNA Mini Kit (Qiagen). DNA methylation analysis was subsequently performed for duplicate experiments using the Infinium MethylationEPIC Kit (Illumina) according to the manufacturer's instructions (Moran *et al*, 2016).

Statistical and database analyses

For RNAseq analysis, reads were aligned using TopHat2 (Kim *et al*, 2013) on the UCSC *Homo sapiens* hg19 genome. Differential expression was assessed using Cuffdif (Trapnell *et al*, 2010).

KEGG Analyses were performed using the WEB-based Gene SeT AnaLysis Toolkit (WebGestalt) (Wang *et al*, 2013). For the Infinium MethylationEPIC beadChip analysis, the raw data obtained from the 850 K arrays were processed from the IDAT files with the ChAMP pipeline (Morris *et al*, 2014). For The Cancer Genome Atlas (TCGA) analysis, data were downloaded, assembled and processed using TCGA-Assembler (Zhu *et al*, 2014) (data download on December 2014). The list of analyzed genes is shown in

Supplementary Table S5. Subsequent analyses were performed with the R statistical software v 3.3.1 and GraphPad Prism software.

Data access

The dataset supporting the conclusions of this article is available in the gene expression omnibus (GEO) repository GSE95462. Private link for the reviewer until acceptance of the manuscript: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?token=mvidsgiillsdfux&acc=GSE95462.

Conflict of interest

The authors declare that they have no competing financial interests and no conflict of interest in relation to the work described

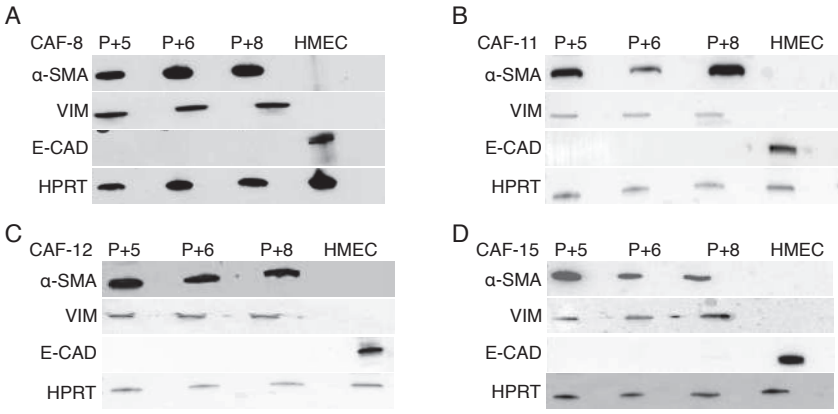
7. Acknowledgements

We thanks Dr. Frédérique Souaze for primary culture of breast cancer associated fibroblast and helpful discussions. We are grateful to Dr. B. Manship for editing of this manuscript and helpful discussions. We acknowledge Integragen for library preparations and highthrouput sequencing experiments.

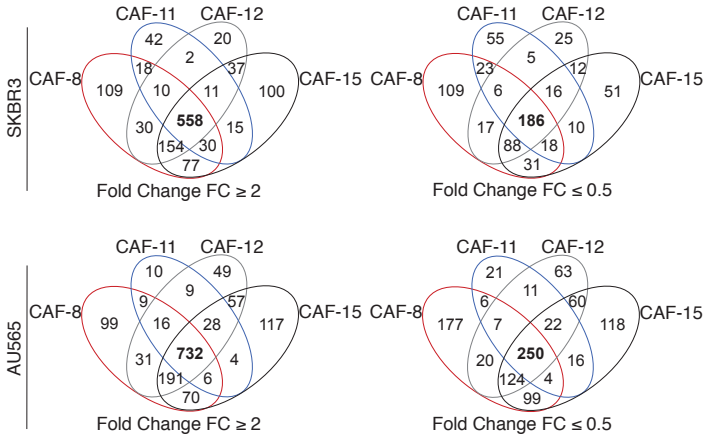
Authors' contributions: PM contributed to the experimental design and performed the work, with the help of MG, GD. FS and PJ has provided some primary culture of breast cancer associated fibroblasts. ZH, VC, ME and SM provided some scientific insight and technical support on MethylationEPIC BeadChip experiments and their analysis. PM participated in the writing of the manuscript. RD proposed the project, experimental design, and wrote the manuscript.

8. Supplementary material

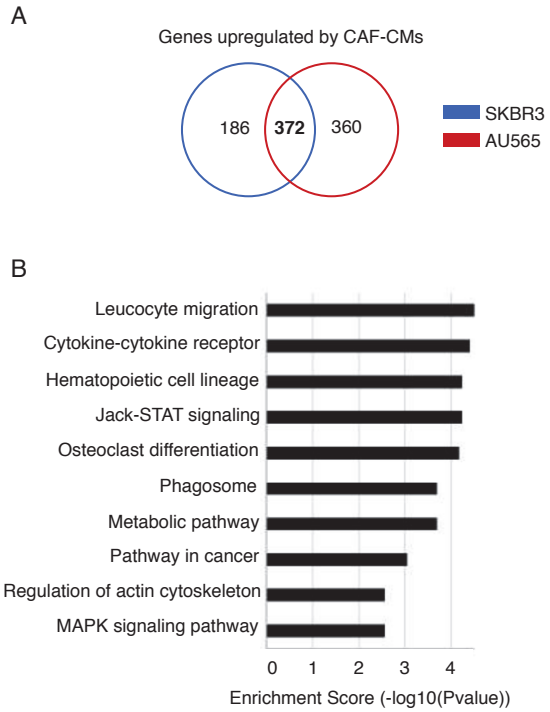
a) Supplementary figures



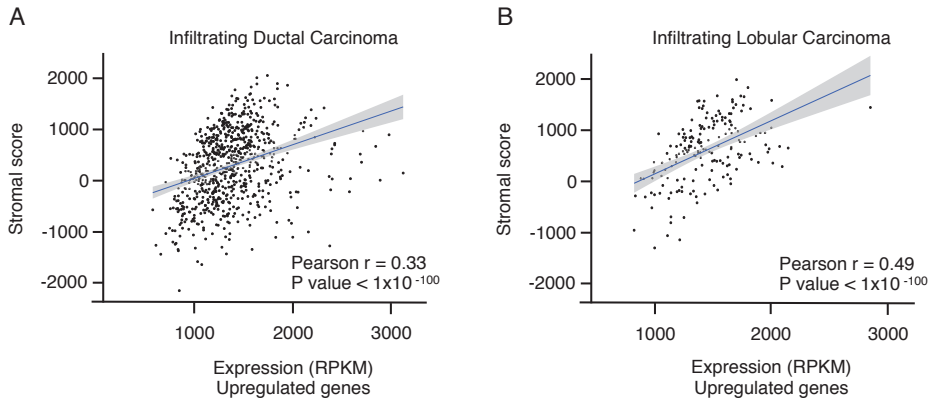
Supplementary Figure S1. CAFs characterisation. Western blot analysis of α-smooth muscle actin (α-SMA), vimentin (VIM), e-cadherin (E-CAD) and hypoxanthine-guanine ribosyltransferase (HPRT) proteins. A In CAF-8 at different passages (P+5, P+6, P+8) and in Human Mammary Epithelial Cells (HMEC) cell, B In CAF-11 at different passages and in HMEC, C In CAF-12 at different passages and in HMEC, D In CAF-15 at different passages and in HMEC.



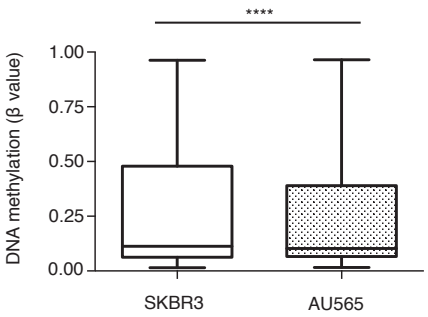
Supplementary Figure S2. Genes modulated by CAF-secreted factors in SKBR3 and AU565 breast cancer cell lines. Venn diagram of up-and downregulated genes identified by RNAseq in SKBR3 and AU565 cells treated with CAF-CMs.



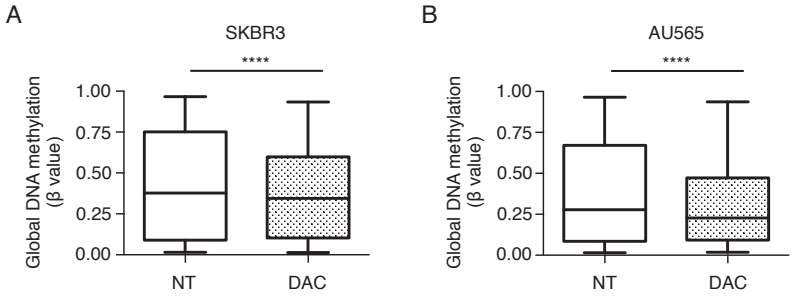
Supplementary Figure S3. Characterization of genes upregulated by CAF-CMs in SKBR3 and AU565 breast cancer cell lines. A Venn diagram of upregulated genes identified in the SKBR3 cell line compared to the AU565 cell line. B TOP 10 KEGG pathways contributions by WebGestalt of genes upregulated by CAF-CMs in both AU565 and SKBR3 cell lines (gene number in each pathway > 5).



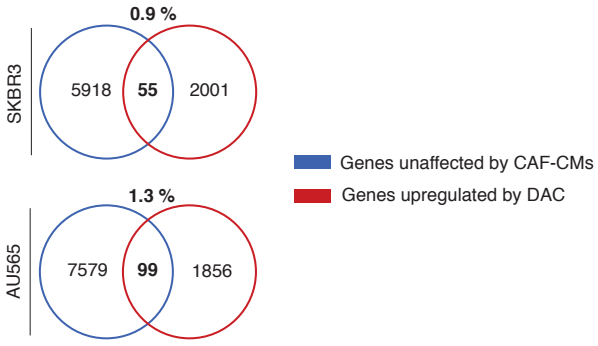
Supplementary Figure S4. Correlation between the expression level of genes upregulated by CAF secreted factors identified *in vitro* and tumors stromal score in human breast infiltrating ductal or lobular carcinoma. A Linear regression curve between the mean expression level of genes upregulated by CAF secreted factors and tumors stromal score in human breast infiltrating ductal carcinoma (n = 752). B Linear regression curve between the mean expression level of genes upregulated by CAF secreted factors and tumor stromal score in human breast infiltrating lobular carcinoma (n = 182).



Supplementary Figure S5. SKBR3 and AU565 cells exhibited different methylation levels. DNA methylation level (β value) on TSS1500 regions of SKBR3 and AU565 cell lines. (*****P* < 0.0001, two-tailed unpaired Student's t-test).



Supplementary Figure S6. SKBR3 and AU565 cells treated with Decitabine exhibited lower DNA methylation levels. Global DNA methylation level (β value) of A SKBR3 and B AU565 cell lines treated or not with Decitabine (DAC). (*****P* < 0.0001, two-tailed unpaired Student's t-test).



Supplementary Figure S7. Inhibition of DNA methylation have no effect on genes unaffected by CAF-CMs. Venn diagram of genes unaffected by CAF-CMs (0.8 ≤ FC ≥ 1.2) and genes upregulated by DAC treatment (FC ≥ 2) in SKBR3 and AU565 cell lines.

b) Supplementary tables

CAF	Date	Histological_Type	Grade	Detail_Grade	ER Status	PR Status	HER2 Status
8	01/10/13	Infiltrating Ductal Carcinoma	III	3-3-2	ER +	PR +	HER2 -
11	19/02/14	Infiltrating Ductal Carcinoma	II	3-3-1	ER +	PR +	HER2 -
12	01/11/14	Infiltrating Lobular Carcinoma	II	3-2-1	ER +	PR +	HER2 +
15	20/05/14	Infiltrating Ductal Carcinoma	I	2-2-1	ER +	PR +	HER2 -

Supplementary Table S1. Breast tumors anatomopathological characteristics. Anatomopathological characteristics of the breast tumors where primary cultures of cancer associated fibroblasts (CAF) were established. Oestrogen receptor (ER), Progesterone receptor (PR) and Human Epidermal Growth Factor Receptor-2 (HER2) status were established by Immunohistochemistry.

A

SKBR3			
Pearson r	CAF-11	CAF-12	CAF-15
CAF-8	0.929	0.978	0.970
CAF-11		0.977	0.960
CAF-12			0.992

B

AU565			
Pearson r	CAF-11	CAF-12	CAF-15
CAF-8	0.942	1	0.990
CAF-11		0.942	0.902
CAF-12			0.989

Supplementary Table S2. Correlation between the fold changes induced by the different CAFs . A Person correlation coefficient, r, between the fold changes induced by the different CAF-CMs, in SKBR3. B Person correlation coefficient, r, between the fold changes induced by the different CAF-CMs, in AU565.

A

SKBR3

Gene	Value in cells treated with siScramble	Value in cells treated with siMBD2	Fold change	q-value	Significant
MBD2	12.2	1.6	0.1	0.0021	yes
MECP2	11.9	10.3	0.9	0.7721	no
MBD1	14.4	13.8	1.0	0.9361	no
MBD3	21.9	22.1	1.0	0.9895	no
MBD4	14.7	13.6	0.9	0.8812	no

B

AU565

Gene	Value in cells treated with siScramble	Value in cells treated with siMBD2	Fold change	q-value	Significant
MBD2	14.0	1.8	0.1	0.0013	Yes
MECP2	13.4	11.8	0.9	0.7832	no
MBD1	14.8	14.8	1.0	0.9990	no
MBD3	9.4	11.8	1.3	0.1893	no
MBD4	15.3	14.7	1.0	0.9453	no

Supplementary Table S3. Members of the MBD gene family were not affected by the knock down of MBD2 protein. Value in RPKM of *MBD2*, *MECP2*, *MBD1*, *MBD3*, *MBD4* gene, Fold change induced by the siRNA targeting MBD2 protein and q-value from duplicate experiment, analysed with Cuffdif, A in SKBR3 cells and, B in AU565 cells treated with siScramble or siRNA targeting MBD2 protein.

qPCR Primers	Forward primer (5' to 3')	Reverse primer (5' to 3')
ITGB6	ATC-GGT-CTG-CAC-AGC-AAG-AA	CAG-GCA-CAC-TGA-GGT-CCA-AT
FHL2	CTC-ATC-CAA-GTG-CCA-GGA-AT	GTG-GCA-GAT-GAA-GCA-GGT-CT
STAT5A	CCC-CCA-GGC-TCC-CTA-TAA-CA	AGA-GGT-GAA-AAG-ACC-GGC-AG
MUC20	AAG-ACC-TCA-CTG-ACC-CCA-GA	ACC-TCT-CAG-CAC-AGT-AAC-GC
SERPINA3	CTT-CTC-CAG-CTG-GGC-ATT-GA	GGC-CTG-TTG-AAA-CGC-ACA-AT
SAA1	ATG-ATG-CTG-CCA-AAA-GGG-GA	CCA-CTC-CTG-CCC-CAT-TCA-TT
MBD2	TCA-GAA-GCA-AGC-CTC-AGT-TG	CAG-AGC-TTG-TGT-GCA-AAG-CA
GAPDH	CGG-AGT-CAA-CGG-ATT-TGG-TCG-TAT	AGC-CTT-CTC-CAT-GGT-GGT-GAA-GAC
PBGD	GAG-TGA-TTC-GCG-TGG-GTA-CC	GGC-TCC-GAT-GGT-GAA-GCC
ChIP qPCR Primers		
ITGβ6	GAG-TTA-GCA-AGC-TCC-TGG-CA	CTC-CCG-GCT-TTC-CAA-AGA-GA
SERPINA3	GGA-GGA-GGG-ACA-ACC-ACT-TG	CAC-CTA-GAG-AGG-GGT-GTG-GA
STAT5A	CTG-AAG-GGA-ACT-GCT-GGA-GG	AAT-GGA-TTT-GGC-AGG-GGA-GG
PARP14	GAG-CAC-CTA-TTG-CCC-ACT-GT	TCA-CAA-ACT-GTG-GCC-CCT-TT
UCA1	TCA-CTG-TGT-GAG-GGT-TTC-GG	TCA-GGA-CTT-GGC-AAC-ACC-AA
NTN4	CTC-GGC-TAA-ACA-ATC-GCT-GC	TTA-GCT-GCG-TGT-GGT-TGC-TA
SAA1	GGT-GGT-AAC-TCC-TGC-CTT-CC	CCC-GTG-AGA-AGC-TTC-ATG-GT
ETV7	ACC-TAG-AAA-ACC-GGC-GAG-TG	CAC-TCA-CTT-CCC-CTT-CCA-CC
PLA2G4F	GCC-TTA-GGC-TGC-AGA-TGG-AT	TAG-GCC-TTG-GGA-AGA-GTG-GA
FHL2	GGA-AGG-TCC-TAT-CCC-CAC-CT	CTC-AAC-CTG-TGC-TCT-CCC-TG
KSR1	GCA-CCA-ACT-CAG-CAA-ACA-GG	TTA-CCA-CGG-TGA-AGG-CTG-AC
DAB2	TCG-GGG-AGA-AGT-CAA-AAG-CC	AGG-AAC-CGT-TGT-CCC-TTG-TC
STAT3	TCT-TAC-CAC-GCG-GGA-ATC-AG	ATG-TTT-CCG-GGT-GTG-TGT-GT
CDKN2B	TCG-CGA-AGC-AAG-TTG-ACT-GA	GGG-AGA-AAA-GGG-GCT-TTG-GA
ELK3	ACC-GAA-AAC-CCA-GAC-AGG-AA	GCT-GGG-ATG-GAA-GAG-TTG-GG
PDK4	GGG-GCT-GCC-CAG-ATA-CAT-TT	GAC-CTT-TTG-CAG-CAG-ACA-GC
PARP10	CCC-CTC-ACT-CAG-GAT-CTC-CA	CAG-GAC-AGA-AAG-CTG-CAG-GA
Pos-Ctrl	AAG-GGC-TCC-TCC-AGC-ACG-GC	TTC-TGA-GGG-ACC-GAG-TGG-GC
Neg-Ctrl	GAA-GGC-TGC-ATG-GAA-ATG-AT	GGA-TCT-GGA-TCG-GAA-GGA-AC

Supplementary Table S4. List of primers

9. Travaux complémentaires non publiés

A. Spécificité des CAFs

Comme nous l'avons vu au cours de l'introduction, les CAFs constituent une population très hétérogène de cellules qui en fonction de l'état d'avancement de la tumeur dont ils sont issus mais également de son origine cellulaire peuvent avoir des caractéristiques et des effets différents. Étonnamment au cours de cette étude, les quatre CAFs issus de tumeurs différentes au niveau de leur grade ainsi que de leur type histologique présentent des effets sur les cellules cancéreuses très similaires. Néanmoins une question se pose ici : quelle est la spécificité de ces CAFs par rapport à des myofibroblastes normaux, c'est à dire des fibroblastes activés mais non modifiés par des cellules cancéreuses ? Afin de répondre à cette question nous avons utilisé du milieu conditionné réalisé à partir de cultures de myofibroblastes issus de prépuces. Ces résultats n'ont pas été intégrés au papier mais sont représentés ci-dessous.

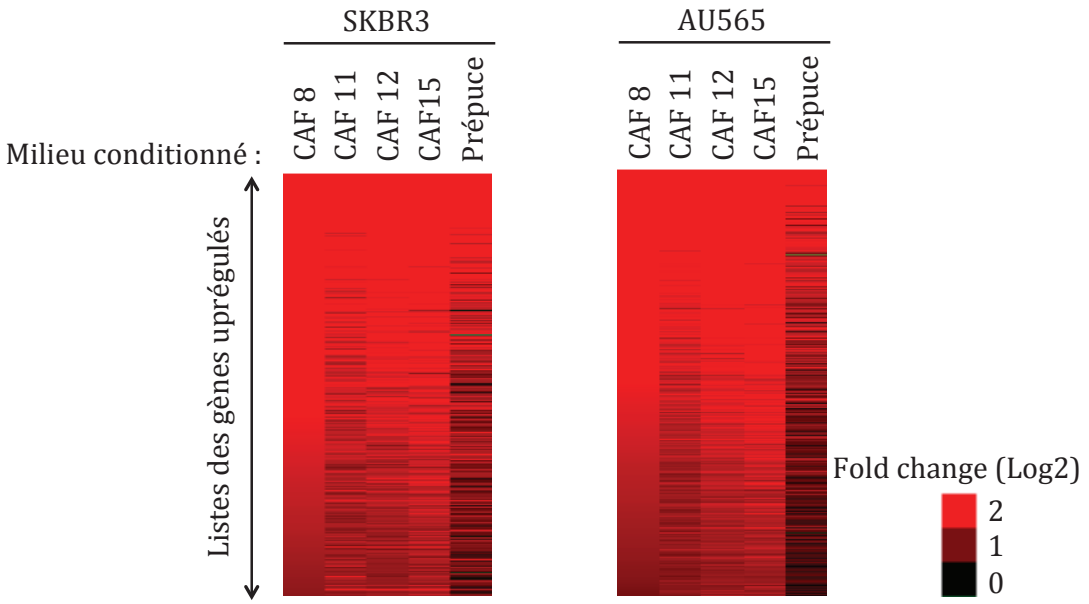


Figure 28: Visualisation des changements d'expression induit par les milieux conditionnés de CAFs ou de prépuces dans les cellules SKBR3 et AU565 par rapport aux cellules non traitées à partir des 372 gènes identifiés préalablement comme étant uprégulés par les CAFs

Nous pouvons alors observer que le milieu conditionné réalisé à partir de myofibroblastes de prépuces induit moins de changements que les milieux conditionnés

issus de CAFs. Ceci nous permet de conclure qu'au sein de notre liste de gènes identifiés comme étant uprégulés par les CAFs une majorité semble être spécifiquement uprégulés par les CAFs et non par les myofibroblastes normaux.

B. Méthylation des gènes uprégulés par les CAFs dans les cellules normales

Après avoir identifié une liste de gènes uprégulés de manière spécifique par les CAFs. Nos résultats nous ont permis de montrer que ces gènes présentent des taux de méthylation au niveau de leur TSS plus important par rapport aux gènes non affectés par les milieux conditionnés.

Nous pouvons également nous demander ici si il s'agit d'une caractéristique présente de manière globale ou si il s'agit d'une caractéristique présente uniquement dans les tissus tumoraux. Pour répondre à cette question nous avons comparé les taux de méthylation au niveau des TSS des gènes uprégulés par les CAFs dans les tissus tumoraux par rapport aux tissus normaux issus des mêmes patientes, disponibles dans la base de donnée TCGA.

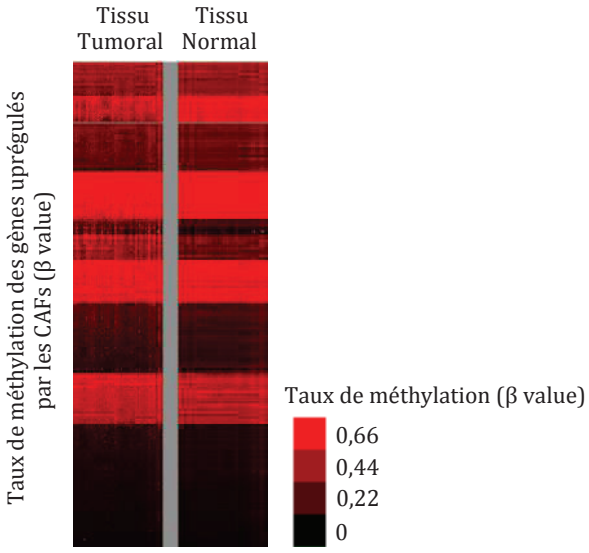


Figure 29: Taux de méthylation sur les TSS des gènes identifiés *in vitro* up régulés par les milieux conditionnés de CAFs dans les tissus tumoraux et dans les tissus normaux issus des mêmes patientes. Les gènes ont été clustérisés selon leur taux de méthylation.

On observe alors très peu de différence au niveau des taux de méthylation de ces gènes entre les tissus tumoraux et les tissus normaux. Il semblerait alors que cette

caractéristique ne soit pas induite dans les cellules tumorales mais qu'il s'agirait d'une caractéristique propre au tissu.

Toutefois l'examen attentif de cette *heatmap* montre également que la méthylation de certains gènes est modifiée dans les cellules tumorales. Les conséquences fonctionnelles de ces modifications de la méthylation dans les cancers ont été étudiées, pour une voie particulière, dans la seconde étude présentée ci-dessous.

Partie II : Inhibition of DNA methylation promotes breast tumor sensitivity to netrin-1 interference

1. Préambule

L'équipe du laboratoire est spécialisée dans le concept des **récepteurs à dépendance**. Il s'agit d'une famille fonctionnelle de récepteurs transmembranaires présentant des effets antagonistes selon la présence de son ligand. En présence de leurs ligands, ces récepteurs sont capables d'induire une signalisation positive de prolifération, différentiation et migration. Alors qu'en absence de leurs ligands ils sont capables d'induire la mort cellulaire programmée des cellules par apoptose (Mehlen *et al*, 1998; Mehlen & Thibert, 2004). La survie des cellules exprimant ce type de récepteur à leur surface est donc dépendante de la présence de ligands dans le milieu extracellulaire.

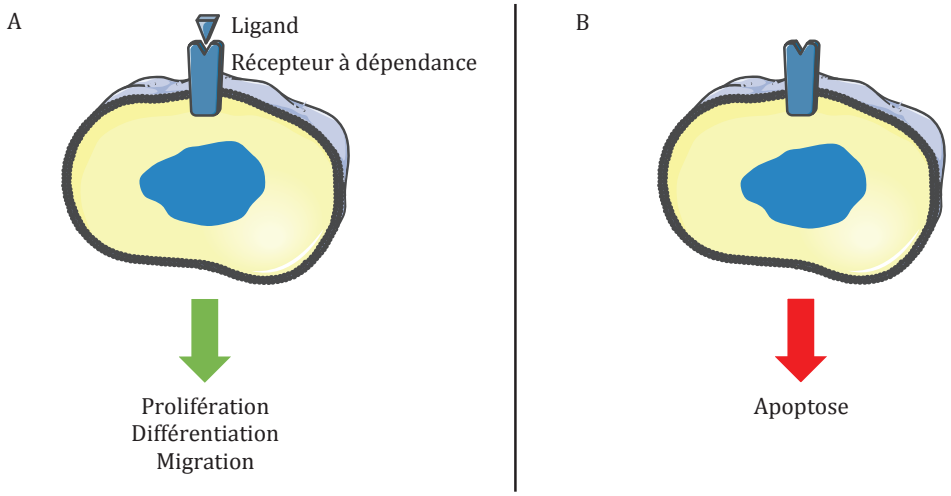


Figure 30: Schéma du concept des récepteurs à dépendance. **A.** En présence de son ligand, le récepteur induit un signal positif de prolifération, différentiation et migration. **B.** En absence de son ligand, le récepteur induit la mort cellulaire programmée des cellules par apoptose.

De manière physiologique les récepteurs à dépendance jouent un rôle important au cours du développement embryonnaire (Furne *et al*, 2008; Mehlen & Bredesen, 2004).
Ces récepteurs ont également été, pour un grand nombre, impliqués dans divers cancers. En effet en présence de leurs ligands ils induisent un signal de prolifération cellulaire et ont donc un effet pro-oncogénique. Par exemple en présence du ligand SHH, le récepteur

Patched, identifié comme étant un récepteur à dépendance (Thibert *et al*, 2003), active les facteurs de transcription GLI (Ingham & McMahon, 2001). En revanche en absence ou en quantité limitée de ligand, ces récepteurs limitent la prolifération cellulaire en induisant l'apoptose des cellules, ils jouent alors un rôle suppresseur de tumeurs conditionné à l'absence de ligand (Goldschneider & Mehlen, 2010).

Cette étude se concentre sur les récepteurs à dépendance Uncoordinated-5-Homologs (UNC5H1-4/A–D) et Deleted in Colorectal Carcinoma (DCC) (Llambi *et al*, 2001). Ces récepteurs, dont le ligand est la netrine-1 (NTN1), seraient capables en son absence d'induire l'apoptose des cellules *via* l'activation d'une protéine régulatrice de l'apoptose DAPK1. Au regard de leurs fonctions gènes suppresseurs de tumeurs, les récepteurs à dépendance sont fréquemment altérés dans les cancers (Chen *et al*, 2014b).

Au cours de cette étude notre équipe a pu démontrer que les gènes codant pour le ligand NTN1 et l'effecteur pro-apoptotique DAPK1 sont fréquemment perdus par hyperméthylation dans les cancers du sein, empêchant ainsi l'activation de cette voie pro-apoptotique. Les lignées cellulaires mammaires présentant ce type d'altérations sont alors résistantes à la mort induite par un anticorps bloquant l'interaction de la NTN1 avec ses récepteurs.
Nous avons pu montrer par la suite qu'un traitement à la 5-Aza-2'deoxycytidine, capable d'inhiber la méthylation de l'ADN, induit une réexpression de ces gènes ainsi qu'une réactivation de cette voie pro-apoptotique. *In vitro* on observe alors une re-sensibilisation des lignées cellulaires à l'anticorps bloquant le ligand NTN1.
De plus des expériences de xénogreffes de lignées cellulaires mammaires chez la souris immunodéprimée ont confirmé ces résultats. La combinaison d'un traitement à la 5-Aza-2'deoxycytidine associé avec un anticorps bloquant la NTN1 induit un ralentissement de la croissance tumorale comparé au traitement seul 5-Aza-2'deoxycytidine ou anticorps bloquant la NTN1.

Par conséquent cette étude est la preuve d'un concept intéressant montrant la réactivation de cibles thérapeutiques grâce à des inhibiteurs de la méthylation de l'ADN.

Ces travaux ont été réalisés par Mélodie Grandin, j'ai quant à moi participé aux expériences de xénogreffes chez la souris nude.

2. Article

Research Article

TRANSPARENT PROCESS OPEN ACCESS

EMBO Molecular Medicine

Inhibition of DNA methylation promotes breast tumor sensitivity to netrin-1 interference

Mélodie Grandin[1], Pauline Mathot[1], Guillaume Devailly[1], Yannick Bidet[2], Akram Ghantous[3], Clementine Favrot[1], Benjamin Gibert[1], Nicolas Gadot[4], Isabelle Puisieux[5], Zdenko Herceg[3], Jean-Guy Delcros[1], Agnès Bernet[1], Patrick Mehlen[1,*,†] & Robert Dante[1,**,†]

Abstract

In a number of human cancers, NTN1 upregulation inhibits apoptosis induced by its so-called dependence receptors DCC and UNC5H, thus promoting tumor progression. In other cancers however, the selective inhibition of this dependence receptor death pathway relies on the silencing of pro-apoptotic effector proteins. We show here that a substantial fraction of human breast tumors exhibits simultaneous DNA methylation-dependent loss of expression of NTN1 and of DAPK1, a serine threonine kinase known to transduce the netrin-1 dependence receptor pro-apoptotic pathway. The inhibition of DNA methylation by drugs such as decitabine restores the expression of both NTN1 and DAPK1 in netrin-1-low cancer cells. Furthermore, a combination of decitabine with NTN1 silencing strategies or with an anti-netrin-1 neutralizing antibody potentiates tumor cell death and efficiently blocks tumor growth in different animal models. Thus, combining DNA methylation inhibitors with netrin-1 neutralizing agents may be a valuable strategy for combating cancer.

Keywords apoptosis; breast cancer; decitabine; dependence receptor; DNA methylation

Subject Categories Cancer; Chromatin, Epigenetics, Genomics & Functional Genomics

DOI 10.15252/emmm.201505945 | Received 14 October 2015 | Revised 30 May 2016 | Accepted 3 June 2016 | Published online 4 July 2016

EMBO Mol Med (2016) 8: 863–877

Introduction

Recent research focusing on a specific functional family of receptors, namely the dependence receptors (DRs) (Mehlen *et al*, 1998; Llambi *et al*, 2001), has highlighted their implication in inhibiting tumor progression. Indeed, in contrast to most cellular receptors, a dual role characterizes these transmembrane receptors: in the presence of their respective ligands, they provide a typical positive signal (promoting cell survival, migration, proliferation, etc.), while the absence of ligand triggers a cascade of signaling events leading to apoptotic cell death. The DR protein family currently contains approximately twenty known members, and one of their most exhaustively studied ligands is Netrin-1. This DR ligand was the first secreted attractive axon guidance cue to be described in the early nineties, since then, the role of netrin-1 in many biological functions has been established (Cirulli & Yebra, 2007; Mehlen & Guenebeaud, 2010; Ramkhelawon *et al*, 2014). Netrin-1 receptors, namely, are the Deleted in Colorectal Carcinoma (DCC), the Uncoordinated-5-Homologs (UNC5H1-4/A–D). The ability of these receptors to trigger apoptosis in settings under ligand-limited conditions was shown to be a constrain for impede tumor progression. Indeed, the inactivation of *UNC5C,* and *DCC*, or the mutation of the *DCC*-inducing apoptosis domain is associated with tumor development and progression in mouse models (Bernet *et al*, 2007; Castets *et al*, 2012; Krimpenfort *et al*, 2012). Furthermore, in line with these observations, *DCC* and *UNC5H* are silenced in many cancers, either by loss of heterozygosity or epigenetic mechanisms (Hedrick *et al*, 1994; Bernet *et al*, 2007; Shin *et al*, 2007). Alternatively, in some types of cancers, an upregulation of *NTN1* provides a similar tumor growth selective advantage by abolishing their dependency on netrin-1 availability in the micro-environment (Fitamant *et al*, 2008). This upregulation is particularly marked in some cases of aggressive breast cancer and in breast metastasis (Fitamant *et al*, 2008; Harter *et al*, 2014). The reliance on netrin-1 for tumor growth was rapidly perceived as an opportunity for therapeutic intervention, since it was speculated that the disruption of the binding of netrin-1 to its receptors should induce apoptotic cell death *in vitro* and tumor growth inhibition *in vivo*. Consistently, the silencing of netrin-1 or the development of biological agents interfering with netrin-1/DRs interactions has been

1 Dependence Receptors, Cancer and Development Laboratory - Equipe labellisée 'La Ligue', LabEx DEVweCAN, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon (CRCL), INSERM U1052-CNRS UMR5286, Université de Lyon, Centre Léon Bérard, Lyon, France
2 Laboratoire d'Oncologie Moléculaire, Centre Jean Perrin, Clermont-Ferrand, France
3 Epigenetics Group, IARC, Lyon, France
4 Endocrine Differentiation Laboratory, CRCL, Université de Lyon, Hospices Civils de Lyon, Hôpital Edouard Herriot, Anatomie Pathologique, Lyon, France
5 Targeting of the tumor and its immune environment Laboratory CRCL, INSERM U1052, CNRS UMR5286, UCBL, CLB, Lyon, France
*Corresponding author. Tel: +33 4 7878 2870; E-mail: patrick.mehlen@lyon.unicancer.fr
**Corresponding author. Tel: +33 7 7878 5922; E-mail: robert.dante@lyon.unicancer.fr
†These authors contributed equally to this work

© 2016 The Authors. Published under the terms of the CC BY 4.0 license

shown to efficiently reduce tumor growth and metastasis in different animal models (Fitamant *et al*, 2008; Delloye-Bourgeois *et al*, 2009a,b; Paradisi *et al*, 2013; Grandin *et al*, 2016). Moreover, an anti-netrin-1 antibody is under preclinical evaluation and should be assessed in early clinical trials in 2016.

Nevertheless, a substantial fraction of human tumors appears to conserve the expression of netrin-1 receptors without upregulating *NTN1* expression, suggesting that the downstream DR pathways may be impaired (Shin *et al*, 2007; Mian *et al*, 2011; Krimpenfort *et al*, 2012). In cancers, epigenetic modifications are frequently associated with an increase in the expression of anti-apoptotic proteins and with the inactivation of factors inducing apoptosis (Baylin & Ohm, 2006). In this context, previous studies have reported that DAPK1, a serine threonine kinase responsible for UNC5H-induced apoptosis, is downregulated in various cancers (Llambi *et al*, 2005; Guenebeaud *et al*, 2010). Furthermore, mechanistic analyses have demonstrated a direct relationship between the hypermethylation of the CpG island (CGi) located within the *DAPK1* promoter region and its downregulation (Raval *et al*, 2007; Pulling *et al*, 2009; Mian *et al*, 2011; Kilinc *et al*, 2012). Finally, it was shown that treatment with decitabine (5-aza-2′-deoxycytidine, DAC) inhibits the DNA methylation of the *DAPK1* promoter and restores DAPK1 expression in lung cancer cell lines (Tang *et al*, 2004).

Inhibition of DNA methylation may prove to be a promising approach for combating cancer (Yang *et al*, 2010; Rodriguez-Paredes & Esteller, 2011a; Dawson & Kouzarides, 2012; Tsai *et al*, 2012). Concordantly, DAC showed anti-leukemic effects in several clinical trials and has been approved by FDA for the treatment of myelodysplastic syndromes and recent studies indicated that DAC shows some effects in preclinical models (Tsai *et al*, 2012). Here, we report that treatment with DAC restores the pro-apoptotic machinery linked to the netrin-1/DR-mediated cell death signaling pathway in breast cancer cell lines and patient-derived xenografts and sensitize cancer cells to netrin-1 neutralizing agents. We thus provide evidence that combining DNA methylation inhibitors with a netrin-1 neutralizing antibody empowers tumor cell death *in vitro* and tumor growth inhibition in mice.

Results

Epigenetic downregulation of netrin-1 is associated with the epigenetic downregulation of *DAPK1*, in human breast cancers

In order to study the mechanisms underlying inhibition of netrin-1/DRs-mediated apoptosis, which in a fraction of tumors is neither dependent on netrin-1 upregulation nor DR silencing, we investigated *DAPK1* expression and DNA methylation in breast tumors.

We thus examined differentially methylated regions (DMRs) associated with malignant transformation in breast cancer samples ($n = 92$) available from The Cancer Genome Atlas (TCGA) by comparing paired normal/tumoral data obtained from the HumanMethylation450K Array (HM450, Illumina) and by high-throughput sequencing of polyadenylated RNA (RNAseq). This comparison focused on the level of DNA methylation within the 5′-end of *NTN1* (position −765 to + 1,300 relative to the transcription start site, TSS) and *DAPK1* (+ 365 and + 838 relative to the TSS) and revealed that these regions were hypermethylated (threshold = 2) in about 30% of tumoral samples compared with their normal counterparts (Fig 1A and B). Furthermore, *NTN1* was downregulated (Fig 1C, fold change (FC) ≤ 0.5) in 43% of cases and the "NTN1-low" samples were hypermethylated (Fig 1G; $P = 3 \times 10^{-2}$, two-sided Mann–Whitney test) when compared with samples exhibiting no *NTN1* downregulation (FC ≥ 1.3). Using the same approach for *DAPK1*, we observed that samples exhibiting *DAPK1* downregulation (29% of the samples, Fig 1D) were also hypermethylated ($P = 3 \times 10^{-4}$) when compared with the other samples (Fig 1H). These epigenetic modifications did not seem to be independent events since in *NTN1*-hypermethylated samples ($n = 23$, FC ≥ 2), *DAPK1* was also hypermethylated (mean FC = 2.22), while in *NTN1*-hypomethylated samples ($n = 13$, FC < 0.7), *DAPK1* was not hypermethylated (mean FC = 0.93). The relationship between *DAPK1*/*NTN1* downregulation and DNA hypermethylation was also observed in a larger number of breast cancer samples ($n = 807$) available on TCGA data portal. Indeed, the mean percentage of CpG methylation (Fig 1E and F) of *DAPK1* and *NTN1* were inversely correlated with their levels of expression (Pearson's $r = -0.32$, $P < 10^{-18}$ and Pearson's $r = -0.14$, $P = 6.7 \times 10^{-5}$, respectively), suggesting that DNA methylation represses *DAPK1* and *NTN1* transcription in human breast tumors.

Although we cannot excluded a bias due to stromal contamination, it should be noted that, in paired samples, while hypermethylation was observed in tumoral tissues, very low levels of DNA methylation were measured in their normal counterparts (Fig 1A and B). For both genes, a region (not represented on HM450) located at the 3′-end of the CGis (Fig 2A, light gray boxes) was selected for the quantitative analysis of DNA methylation of breast cancer biopsies (tumor bank—Centre Léon Bérard) by bisulfite pyrosequencing. The analysis indicated that the mean percentage of CpG methylation of the *DAPK1* and *NTN1* pyrosequenced regions were inversely correlated (Pearson's $r = -0.66$, $P = 0.003$, and Pearson's $r = -0.55$, $P = 0.008$, respectively) with their levels of expression (Fig EV1A and B). Altogether, these data suggested that DNA methylation is involved in the downregulation of *NTN*1 and *DAPK1* in human breast cancers.

To determine whether this concomitant change in *DAPK1* and *NTN1* expression was also observed at the protein levels, DAPK1, UNC5B, and netrin-1 were measured by immunohistochemistry (IHC) using tissue microarrays (70 sections) from human breast ductal carcinoma (Super Bio Chips). This analysis revealed, that, netrin-1-low samples also exhibited low levels of DAPK1 (χ^2 test, $P = 0.04$). In contrast, UNC5B levels were the same, irrespective of netrin-1 levels (Fig EV1C and D). This result was validated in the TCGA cohort of breast tumors samples ($n = 807$), where a correlation between *DAPK1* and *NTN1* expression was observed (odd ratio = 4.71, $P = 0.03$, Fig EV1E).

In order to establish an *in vitro* experimental model mimicking the DNA methylation alterations observed in breast cancer tissues, DNA methylation patterns of two cancer cell lines were determined by parallel sequencing. Pull-down assays were conducted using the MDA-MB-231 cell line derived from human breast cancer, and the HMLER cell line generated through the *in vitro* transformation of human mammary cells (Elenbaas *et al*, 2001; Morel *et al*, 2008). Methylated DNA fragments were selected using a recombinant protein containing the Methyl-CpG-binding domain of MBD2 of MBD2 (Methyl-Cap-seq), from MDA-MB-231 cell line derived from

 © 2016 The Authors

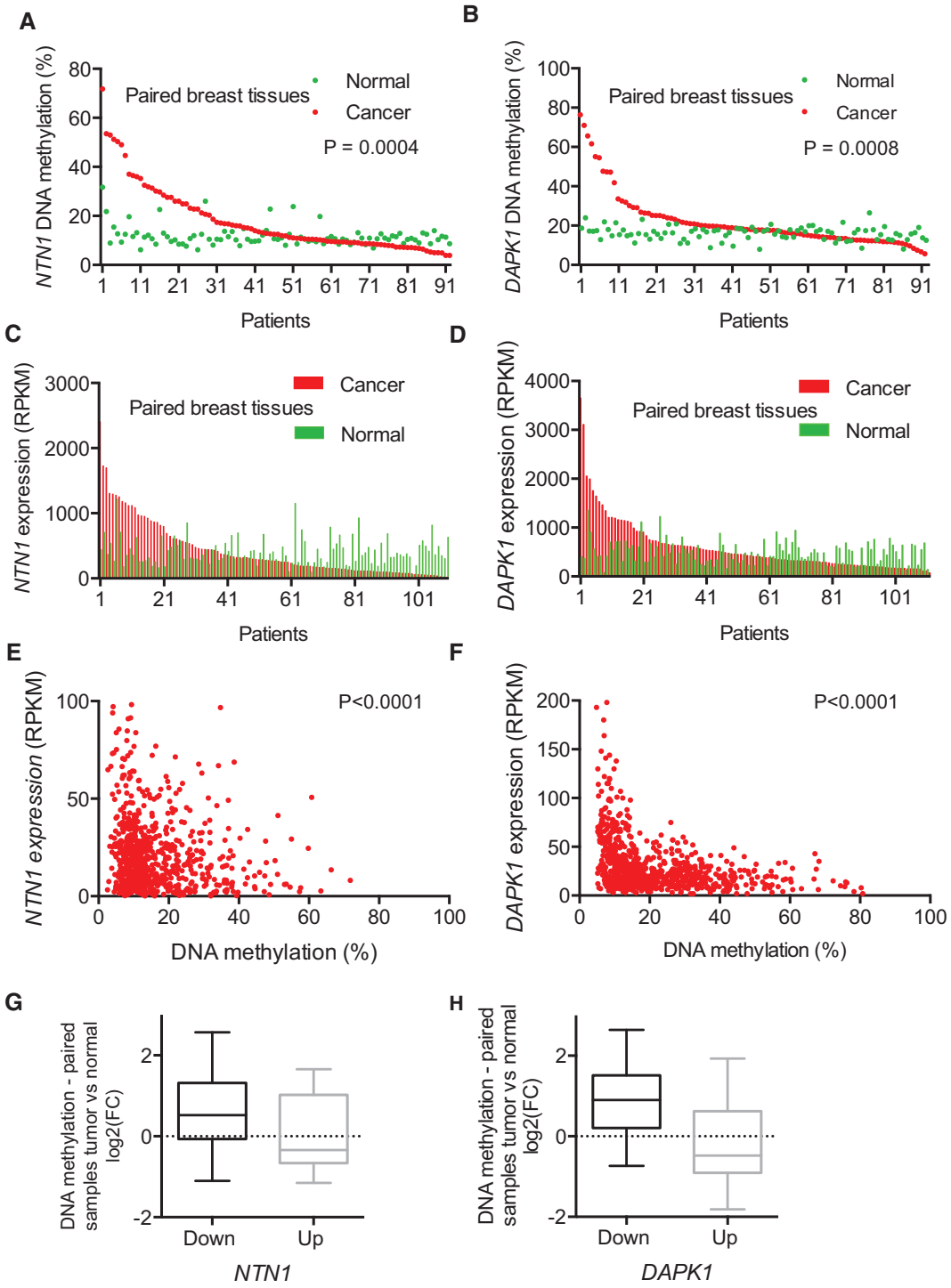


Figure 1. *NTN1* and *DAPK1* are hypermethylated and downregulated in human breast cancers.

A, B DNA methylation level of *NTN1* (A) and *DAPK1* (B) 5′ regions (Illumina's HumanMethylation450K Array (HM450) from The Cancer Genome Atlas breast cohort) in paired breast tissues (normal: green circles, tumor: red circles), $n = 92$, Wilcoxon matched-pairs signed rank test, $P = 0.004$ and $P = 0.0008$.

C, D *NTN1* (D) and *DAPK1* (G) gene expression in paired breast tissues (normal: green bars, tumor: red bars), RNAseq from TCGA breast cohort, $n = 112$ and 114, respectively.

E, F Correlation between *NTN1* (E) and *DAPK1* (F) gene expression and DNA methylation in the breast cancer cohort (TCGA, $n = 807$). Pearson correlation, $P = 6.7.10^{-5}$, $r = -0.14$ for *NTN1* (A) and $P < 10^{-16}$, $r = -0.32$ for *DAPK1* (B), respectively.

G, H Tumor/normal DNA methylation ratio of *NTN1* (G) and *DAPK1* (H) in human breast tumors (data extracted from TCGA cohort, paired samples) according to gene expression (downregulated FC ≤ 0.5, down, $n = 33$, or upregulated FC ≥ 1.3, up, $n = 16$). $P = 3 \times 10^{-2}$ and $P = 3 \times 10^{-4}$ two-sided Mann–Whitney test, for *NTN1* and *DAPK1*, respectively.

© 2016 The Authors

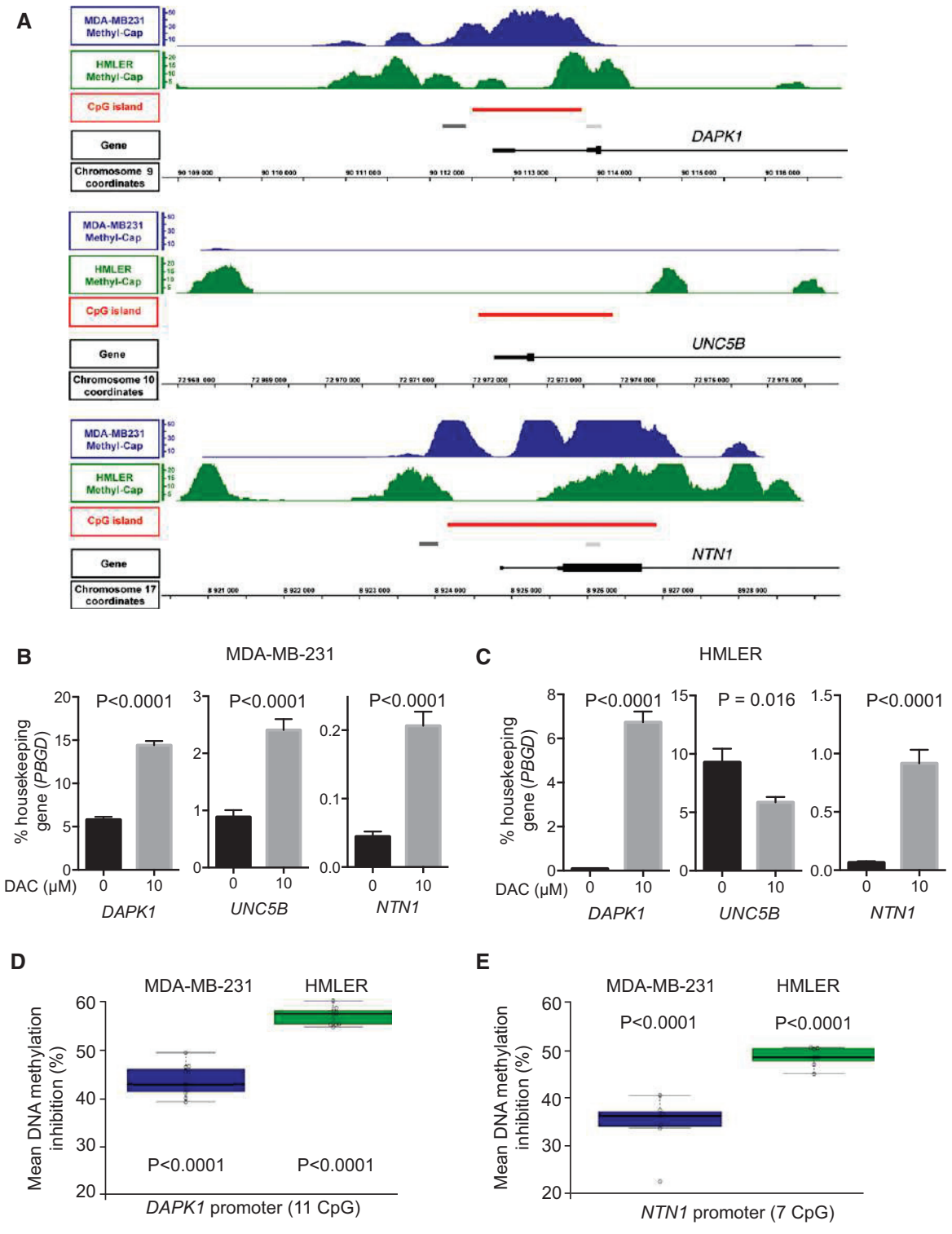


Figure 2. DNA methylation and demethylation in mammary cell lines.

A Methyl-Cap-seq read density profiles of the 5′ end of *DAPK1*, *UNC5B*, and *NTN1* in MDA-MB-231 (blue) and HMLER (green) cells. Red boxes represent the CpG islands (CGis); light gray boxes the regions analyzed by bisulfite PCR sequencing; dark gray boxes represent the regions analyzed by parallel sequencing of amplicons from bisulfite modified DNA; and black boxes represent the exons and UTR. Chromosome coordinates of each gene are given (black lines).

B, C Gene expression was measured by qRT–PCR after 72 h for MDA-MB-231 (B) and HMLER cells (C) treated daily with DAC (10 μM). *PBGD* expression level was used as an internal control. Data are expressed as mean ± s.e.m. of at least 3 independent experiments. ****$P < 0.0001$, two-tailed unpaired Student's *t*-test.

D, E Measurement of DNA hypomethylation of the *DAPK1* (D) and *NTN1* (E) promoters after decitabine treatment of MDA-MB-231 and HMLER cells. Over 1960 sequences were analyzed per group in 2 independent experiments. ****$P < 0.0001$, two-way ANOVA and *post hoc* Tukey test.

 © 2016 The Authors

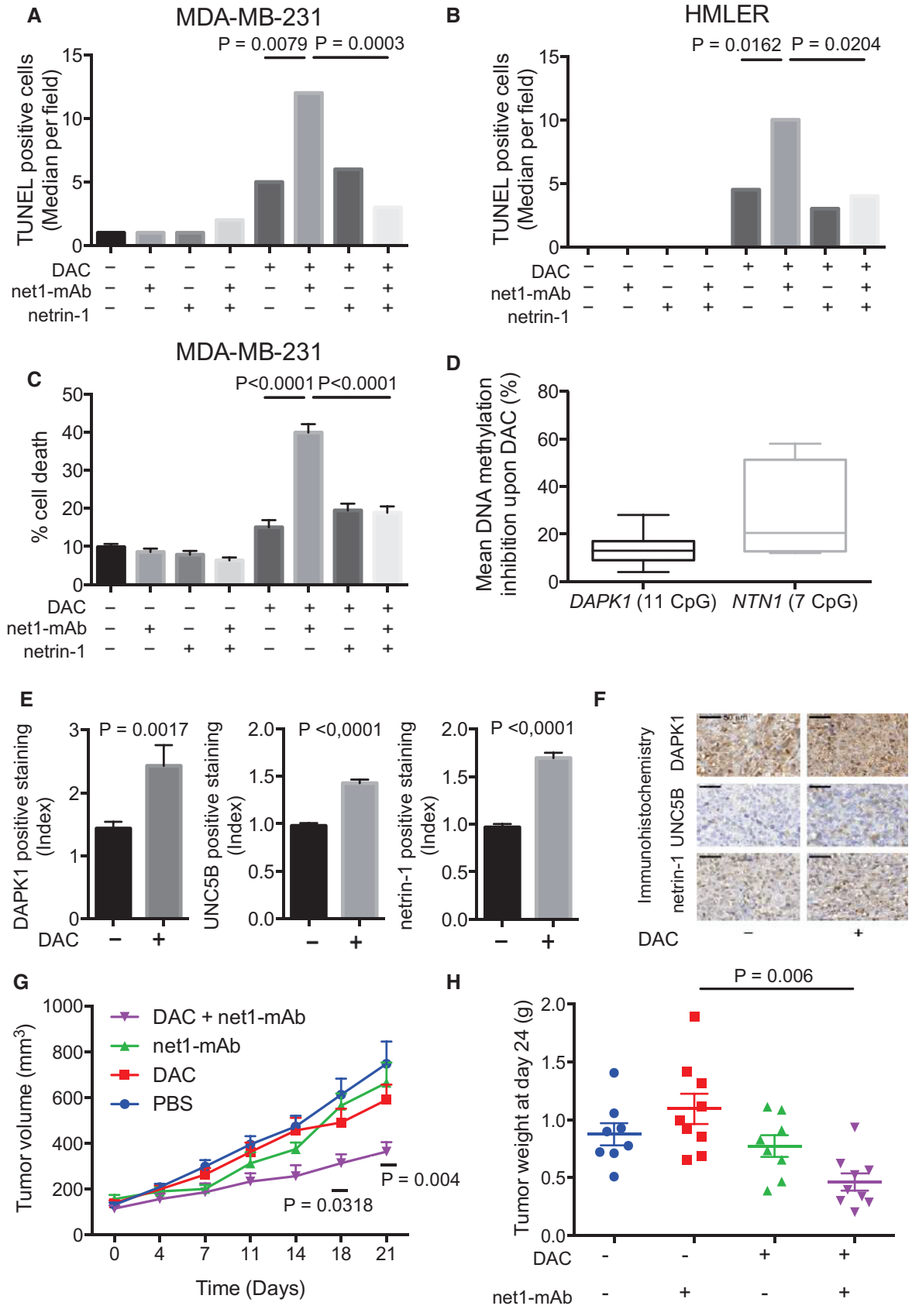

A
MDA-MB-231
P = 0.0079 P = 0.0003
TUNEL positive cells (Median per field)
DAC
net1-mAb
netrin-1
B
HMLER
P = 0.0162 P = 0.0204
C
MDA-MB-231
P<0.0001 P<0.0001
% cell death
D
Mean DNA methylation inhibition upon DAC (%)
DAPK1 (11 CpG)
NTN1 (7 CpG)
E
DAPK1 positive staining (Index)
P = 0.0017
UNC5B positive staining (Index)
P <0,0001
netrin-1 positive staining (Index)
P <0,0001
F
Immunohistochemistry
DAPK1
UNC5B
netrin-1
G
Tumor volume (mm3)
DAC + net1-mAb
net1-mAb
DAC
PBS
P = 0.004
P = 0.0318
Time (Days)
H
P = 0.006
Tumor weight at day 24 (g)

Figure 3.

Figure 3. Netrin-1 neutralizing antibody net1-mAb triggers apoptosis in hypomethylated MDA-MB-231 and HMLER breast cancer cell lines.

A, B Cells were treated with DAC (10 μM, 72 h), and/or net1-mAb (10 μg/ml, 48 h) and/or recombinant netrin-1 (5 μg/ml, 48 h). TUNEL assays from 3 independent experiments. ***$P < 0.0001$ one-way ANOVA.

C Cellular mortality was assessed using the toxilight assay. Data represent mean ± s.e.m. from 3 independent experiments. ****$P < 0.0001$, one-way ANOVA.

D–H MDA-MB-231 cells were implanted into the mammary gland fat pad of immuno-compromised mice. When tumors reached 100 mm^3, mice were injected subcutaneously with decitabine (0.4 mg/kg) or PBS and/or intraperitoneally with net1-mAb (10 mg/kg). (D) Loss of DNA methylation of the *NTN1* and *DAPK1* promoters in decitabine treated tumors, compared with PBS treated tumors, after one week of treatment. > 1,700 sequences were analyzed per group in 2 independent experiments. ****$P < 0.0001$, two-way ANOVA and *post hoc* Tukey-test. (E, F) After one week of treatment, tumors from xenografted mice were fixed in formalin, embedded in paraffin, and sliced into 4 μm sections. (E) Levels of DAPK1, UNC5B, and netrin-1 were measured in 4 independent tumors per treatment group by immunohistochemistry staining, and expressed as a percentage of total tumor surface normalized against the control PBS-group. Data represented as means ± s.e.m. ****$P < 0.0001$, two-way ANOVA and *post hoc* Tukey-test. (F) Representative tumor sections corresponding to MDA-MB-231 xenografts, scale bars = 50 μm. (G) Tumor volumes were measured twice a week. The statistical significance of the differences obtained between the control PBS-group and treated (DAC + net1-mAb) group was determined by two-way ANOVA and *post hoc* Tukey-test. ***$P < 0.0001$. Error bars = s.e.m. $n = 9$ mice per group. (H) Tumor weights were measured 3 days after the end of the experiment. The statistical significance of the differences obtained between the groups was determined by one-way ANOVA, ***$P < 0.0001$. Error bars = s.e.m. $n = 9$ mice per group.

human breast cancer, and the HMLER cell line constructed from *in vitro* transformation of human mammary cells (Elenbaas *et al*, 2001; Morel *et al*, 2008). Data obtained indicated that the 5′-end CpGis of *DAPK1* and *NTN1* were methylated in the two cancer cell lines (Fig 2A). Furthermore, the treatment of MDA-MB-231 and HMLER cells with decitabine (DAC) resulted in a significant upregulation of *DAPK1* and *NTN1* mRNA (Fig 2B and C) and in the inhibition of DNA methylation within the *DAPK1* and *NTN1* promoter regions (Figs 2D and E, and EV1F and G).

Parallel sequencing of DMRs (Fig 2A, dark gray boxes) validated their methylation status obtained from Methyl-Cap-seq experiments and indicated that DAC treatments reduced their level of methylation by half, *in vitro* (Fig 2D and E). Of note, DAC treatment of MDA-MB-231 cells resulted in the upregulation of *UNC5B*, although its promoter was not methylated in any of the cell lines tested (Fig 2B and C), suggesting an indirect regulatory mechanism. However, this upregulation was not observed for the other netrin-1-specific receptors, *UNC5A*, *UNC5C,* and *DCC* (Fig EV2A and B). Altogether, these data strongly suggest that DNA hypermethylation is involved in the transcriptional silencing of *DAPK1* and *NTN1* in human breast cancer cells.

Decitabine resensitizes cancer cells to netrin-1 interference *in vitro*

We thus hypothesized that the pharmacological targeting of the DNA methylation machinery may restore functional netrin-1/DR pathways and resensitize netrin-1-low cells to netrin-1 interference. We investigated whether the forced expression of *DAPK1* in the *DAPK1*-negative HMLER cells re-established pro-apoptotic pathways (Fig EV2C and D). As expected, an increase in caspase-3 activity was observed in *DAPK1* transfected cells. Furthermore, this pro-apoptotic effect was partially reversed by adding recombinant netrin-1 (Fig EV2D). We next analyzed cell death by conducting viability assays and caspase-3 activity assays in HMLER cells transfected with *NTN1* siRNA and treated with DAC. While transfections had a mild effect on HMLER cells *per se*, treatment with DAC strongly potentiated the netrin-1 deprivation-induced cell death (Fig EV2F–H).

Keeping in mind the therapeutic perspective of our study, we assessed the effect of combining DAC with a human anti-netrin-1 antibody, net1-mAb (Grandin *et al*, 2016). MDA-MB-231 and HMLER cells were treated with DAC or net1-mAb, or a combination of both drugs. As anticipated, the cell lines were resistant to net1-mAb alone, while, as previously observed (Lund *et al*, 2011) (Rodriguez-Paredes & Esteller, 2011b), DAC induced cell death in most of the cells tested, as evidenced by DNA fragmentation (Figs 3A and B, and EV2I and J) and viability assays (Fig 3C). The addition of net1-mAb to DAC-treated cells significantly enhanced apoptosis (Fig 3A–C). Moreover, this effect was blocked by the concomitant addition of recombinant netrin-1 (Fig 3A–C), indicating that net1-mAb-induced cell death was specifically linked to netrin-1 neutralization. To confirm that the pro-apoptotic activity observed upon the combined net1-mAb and DAC treatment was not linked to an intrinsic property of DAC, MDA-MB-231 and HMLER cell lines were treated with the 5-azacytidine (Aza), a DNA methylation inhibitor. This treatment resulted in similar gene expression modifications and cell death effects as DAC, when combined with the net1-mAb (Appendix Fig S1). The functional consequences of this combination treatment were also evaluated in additional human breast cancer cell lines. The highest upregulation of both *NTN1* and *DAPK1* was observed when treating cells with 10 μM of DAC (Fig EV3A–E), we thus used this concentration in the combined DAC and net1-mAb treatment to investigate the induction of apoptosis (Fig EV3F). A similar potentiation of cell death by combining DAC and net1-mAb was observed in cell lines (AU565, SKBR3, and MDA-MB-157) exhibiting an upregulation of at least one of 3 genes, *NTN1*, *UNC5B,* or *DAPK1* (Fig EV3C–E).

The combination of the netrin-1 neutralizing antibody with decitabine inhibits tumor growth and metastasis in animal models

We next investigated whether the inhibition of DNA methylation could also re-establish the netrin-1/DRs-mediated pro-apoptotic pathways *in vivo*. Nude mice were engrafted with MDA-MB-231 cells in the mammary fat pad as an orthotopic site for breast cancer. When tumors were palpable (≈100 mm^3), DAC was subcutaneously injected at a therapeutic dose (0.5 mg/kg). Parallel sequencing of amplicons derived from *DAPK1* and *NTN1* CGis indicated that these genes were also hypomethylated (ranging from 5 to 27% depending of the CpG analyzed) in tumors from DAC-treated mice (Fig 3D). Furthermore, we observed that DAC treatments were associated with the re-expression of DAPK1, netrin-1, and UNC5B by the IHC staining of tumor sections (Fig 3E and F).

To evaluate the effect on tumor growth, MDA-MB-231 orthotopic xenografts were performed, and mice were treated by

 © 2016 The Authors

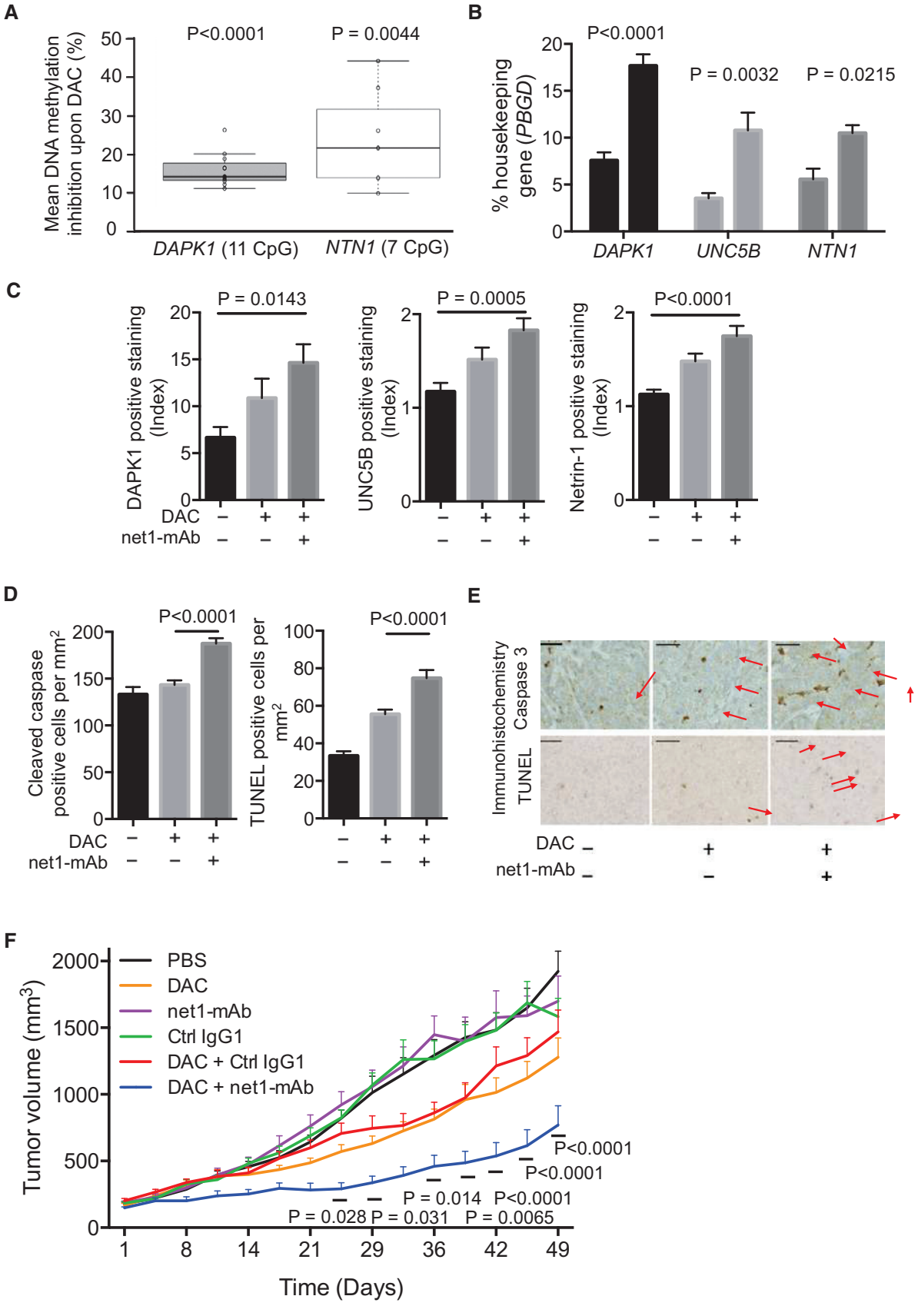


Figure 4.

© 2016 The Authors

Figure 4. DAC treatment triggers upregulation of genes in the netrin-1/dependence receptor signaling pathway, and, when combined with net1-mAb, induces apoptosis and tumor growth inhibition in a mouse model bearing a patient-derived breast tumor.

A Loss of DNA methylation of the *NTN1* and *DAPK1* promoters in decitabine-treated PDX tumors, compared with the control PBS group. The percentage of mean DNA methylation of the 11 *DAPK1*-CpGs was 94% (550 amplicons analyzed), while that of the 7 *NTN1*-CpGs was 64% (213 amplicons analyzed). Two-way ANOVA and *post hoc* Tukey test.

B Expression of *DAPK1*, *UNC5B*, and *NTN1* was measured by qRT–PCR in PDX tumors after 7 days of *in vivo* DAC treatment (0.4 mg/kg). The level of *PBGD* expression was used as an internal control. Data are expressed as mean ± s.e.m. for at least 3 grafts per group. ****$P < 0.0001$, two-way ANOVA and *post hoc* Tukey test.

C Levels of DAPK1, UNC5B, and netrin-1 were measured in at least 3 independent paraffin embedded xenografts per treatment group by immunohistochemistry. Data are expressed as the percentage of the total tumor surface normalized against the median tumor surface of the PBS group. ****$P < 0.0001$, one-way ANOVA. Error bars = s.e.m.

D Cleaved caspase-3 and DNA fragmentation (TUNEL) median number of cells per mm^2 were measured in treated xenografts. Data represent mean ± s.e.m. from at least 3 tumors per group. ****$P < 0.0001$, one-way ANOVA.

E Representative sections of the xenograft PDX analyzed in (D). Scale bars = 50 μm. Arrows indicate positive staining.

F The combination of net1-mAb and DAC reduces human breast tumor growth in immuno-compromised mice. After anesthesia, mice were engrafted in the interscapular area with a ≈ 60 mm^3 patient-derived tumor. When the tumors reached 120–150 mm^3, mice were injected subcutaneously with decitabine (0.4 mg/kg) or PBS and/or intraperitoneally with net1-mAb (10 mg/kg) or with a human IgG1 control isotype antibody (Ctrl IgG1, 10 mg/kg) from day 1 to day 21. Tumor volumes were measured twice a week; $n = 7$ mice per group. The statistical significance of the differences obtained between the DAC + Ctrl IgG1 group and the DAC + net1-mAb group was determined by two-way ANOVA2 and *post hoc* Tukey test, ****$P < 0.0001$. Error bars = s.e.m.

intraperitoneal injections of net1-mAb, or subcutaneous injections of DAC, or a combination of both treatments for a period of 21 days (Fig 3G and H). While no significant difference was observed between the control groups and mice treated either with net1-mAb or DAC alone, the combination of both drugs strongly inhibited tumor growth (Fig 3G) and led to a reduction in tumor weight (Fig 3H). Furthermore, similar results were obtained using the NET1-mAb antibody, which is scheduled for human trials in 2016 (Grandin *et al*, 2016) (Appendix Fig S2A). Interestingly, the inhibitory effect of the combined treatment on tumor growth was associated with a marked increase in tumor cell death (Appendix Fig S2B and C).

To gain further insights into the mechanisms underlying the tumor suppressive activity of netrin-1 neutralization following DAC treatment, cancer cell proliferation and tumor angiogenesis were analyzed in treated tumors. A small reduction in the proliferative rate (Ki67 staining) was determined in MDA-MB-231 xenografts from mice treated with DAC; however, the differences between treated samples and controls were not statistically significant (Appendix Fig S3A and B). Staining of sections from MDA-MB-231 xenografts with an antibody directed against CD31 (also known as platelet endothelial cell adhesion molecule) revealed that the anti-netrin-1 antibody treatment led to a reduction in angiogenesis. This finding strengthens a previous report, which suggested the implication of netrin-1 during angiogenesis (Bongo & Peng, 2014). However, no statistically significant differences were observed between mice treated with the anti-netrin-1 antibody alone, where no inhibition in tumor growth was detected, and the mice treated with a combination of DAC and net1-mAb, where tumor growth was profoundly affected (Appendix Fig S3A). Hence, the inhibitory effect of the combination of DAC and net1-mAb on tumor growth is likely related to their pro-apoptotic effects, rather than to a change in proliferation or in angiogenesis.

Finally, the effect of this combination treatment on metastasis formation was evaluated in a model previously used for monitoring tumor dissemination (Walker *et al*, 2004; Delloye-Bourgeois *et al*, 2009b). MDA-MB-231 cells previously treated with control IgG1, DAC, and net1-mAb alone or in combination, were seeded onto the chorioallantoic membrane (CAM) of 10 days old chicken embryos. Data obtained indicated that CAMs grafted with cells previously treated with DAC and the net1-mAb exhibited a reduction in the formation of lung metastasis (Appendix Fig S4).

To move toward a model closer to the human pathology, we analyzed the effect of combining DAC and the netrin-1 antibody in mice model bearing a patient-derived tumor (PDX model). Consistently with the data obtained from mice engrafted with cell lines, DAC treatments induced the hypomethylation of *DAPK1* and *NTN1* in our PDX (Fig 4A) and increased the levels of DAPK1, UNC5B, and netrin-1 (Fig 4B and C). Furthermore, IHC staining on tumor sections indicated that the combination treatment increased the apoptotic rate (Fig 4D and E), while it was not correlated with tumor cell proliferation or angiogenesis (Appendix Fig S3C and D). Similarly to the data obtained in MDA-MB-231 engrafted cells, the combined treatment reduced the growth of the PDX tumor when compared to the effects of monotherapies (Fig 4F).

Tumor growth inhibition induced by combining decitabine with netrin-1 interference is directly mediated by UNC5B and DAPK1

The potential reversibility of epigenetic DNA modifications raised the possibility that inhibition of DNA methylation might induce the re-expression of these genes, and thus, resensitize cells to several pathways resulting in apoptosis. Therefore, we studied gene re-expression following DAC treatment in MDA-MB-231 and HMLER cell lines, by RNAseq. Indeed, the 626 upregulated genes upon DAC treatments (FC untreated/treated cells > 2) both in MDA-MB-231 and HMLER cells were investigated for their Gene Ontology term and their KEGG pathway contributions using the WEB-based GEne SeT AnaLysis Toolkit (Wang *et al*, 2013). Enriched Gene Ontology terms were of various nature and included response to molecules of bacterial origin, response to lipopolysaccharide, biological regulation, cell proliferation, and cytokine activity. Enriched KEGG pathways included KEGG osteoclast differentiation, KEGG MAPK signaling pathway, KEGG rheumatoid arthritis, KEGG cytokine–cytokine receptor interaction, pathways in cancer, and NOD-like receptor signaling pathway (Appendix Fig S5). Genes upregulated upon DAC treatment were associated with many biological functions; however, the profiles of transcriptomic changes suggested that no other pro-apoptotic pathway participated in the synergistic effect of net1-mAb and DAC on cell death observed herein.

 © 2016 The Authors

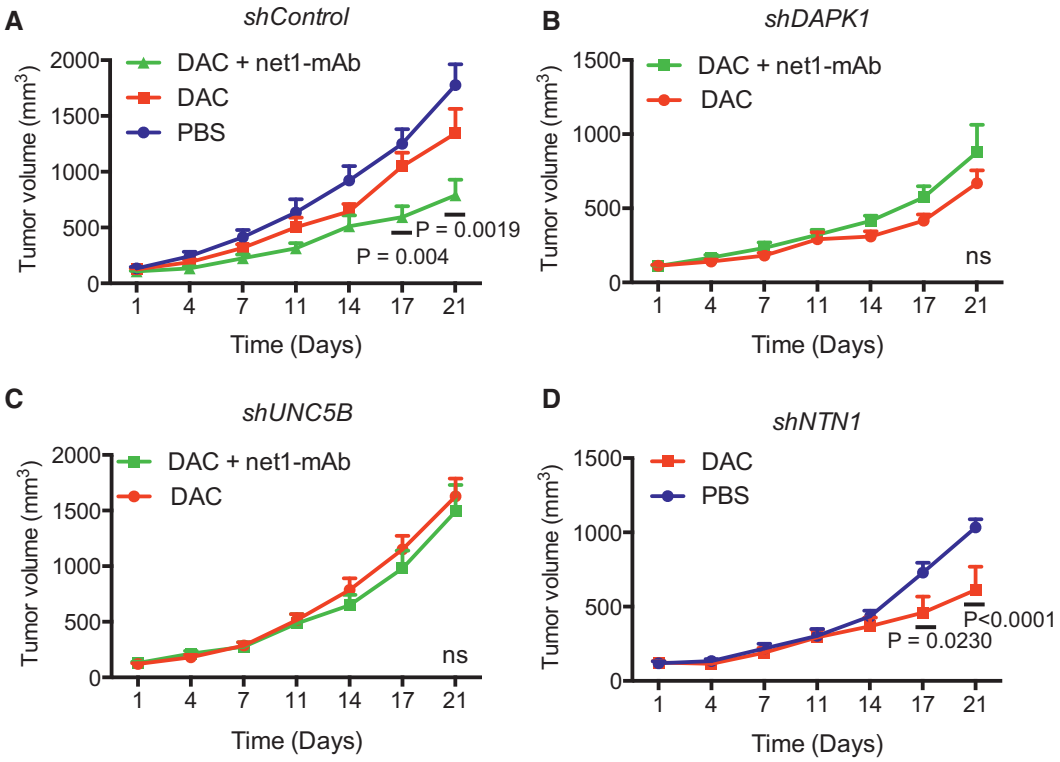


Figure 5. Sensitivity of MDA-MB-231 cell lines stably transfected with shRNA targeting *DAPK1*, *UNC5B*, and *NTN1* to treatments combining DAC and net1-mAb.

A–D Stably transfected MDA-MB-231 cells bearing a control (A), *DAPK1* (B), *UNC5B* (C), or *NTN1* shRNA (D) were injected into the mammary fat pad of immunocompromised mice. When tumors reached 100–120 mm^3, mice were injected subcutaneously with DAC (0.4 mg/kg) or PBS and/or intraperitoneally with net1-mAb (10 mg/kg). Tumor volumes were measured twice a week, $n = 8$ mice per group. The statistical significance of the differences obtained between DAC group and DAC + net1-mAb group for sh*Control*, DAC group and DAC + net1-mAb group for sh*DAPK1* and sh*UNC5B*, and PBS group and DAC group for sh*NTN1*, respectively, was determined by two-way ANOVA and *post hoc* Tukey test. ****$P < 0.0001$, ns = not significant. Error bars = s.e.m.

It has been reported (Qi *et al*, 2015) that the addition of netrin-1 to the culture medium of human liver cancer, glioblastoma, and embryonic kidney cell lines induces the expression of the Yes-associated protein (YAP), of TAZ, a transcriptional coactivator with a PDZ-binding motif (WWTR1), and of the connective tissue growth factor (CTGF), the transcription of which is initiated by YAP/TAZ. The induction of YAP/TAZ following the addition netrin-1 was correlated with an increase in cell proliferation and following the addition of netrin-1 neutralization by specific antibodies, with a decrease in the proliferation and migration of the cell lines analyzed (Qi *et al*, 2015). Therefore, we verified whether, in DAC-treated cells, netrin-1 neutralization leads to the downregulation of the YAP/TAZ signaling pathway, which, in turn, could participate in the anti-tumoral effects associated with the combined treatment. The effect of the net1-mAb on the expression of *YAP, TAZ, and CTGF*, in MDA-MB-231 and HMLER cells treated with DAC, was thus investigated. In MDA-MB-231 cells, DAC treatment increased the level of *TAZ* and *CTGF* expression, while net1-mAb treatment only induced a slight increase in *TAZ* expression. In contrast, in HMLER cells, the addition of net1-mAb only induced the expression of *CTGF* in DAC-treated cells, while the expression of *YAP* and *TAZ* was not significantly modified (Appendix Fig S6A and B). Collectively, these observations did not seem to be in favor of major role of the YAP/TAZ-mediated signals in the response of cancer cells to the combined DAC/+net1-mAB treatment. In a similar context, *p53* alterations were reported to cooperate with YAP signaling pathways during cancer cell proliferation (Di Agostino *et al*, 2016), raising the question of the implication of TP53 in the apoptotic effect observed. In the panel of cells analyzed, T47D cells exhibited no alteration in *p53* and did not respond to the combined treatment (Fig EV3F), while other cell lines, mutated (MDA-MB-231), blocked (HMLER), or wild type (H460) responded to the combined DAC/+net1-mAb treatment (Grandin *et al*, 2016). Taken together, these data suggested that TP53 does not play a determinant role in the tumor growth inhibitory effect conferred by the combination treatment.

Similarly to the data reported by Roulois *et al* (2015) in colorectal cancer cells, DAC treatment of MDA-MB-231 and HMLER cells induced the interferon regulatory factor 7 (IRF7), a key player in the type I interferon (IFN)-dependent immune responses (Appendix Fig S6C and D). We thus investigated the effect of this transcriptional regulator on the expression of *DAPK1*, *NTN1*, or *UNC5B* upon DAC treatment in MDA-MB-231 and HMLER cells. The transient transfection of these two cell lines with a siRNA targeting *IRF7* strongly reduced *IRF7* expression and prevented its upregulation upon DAC treatment (Appendix Fig S6C and D). However, *IRF7* mRNA depletion failed to abrogate DAC induction of *DAPK1*, *NTN1*, and *UNC5B* upregulation, suggesting that IRF7 and more generally the interferon

© 2016 The Authors

(IFN)-like response is not implicated in regulating the expression of these genes following DAC treatment.

Our final working hypothesis was, therefore, that the tumor growth inhibitory effects conferred by the combination treatment were mediated through the pro-apoptotic DR pathway. To validate this hypothesis, we generated MDA-MB-231 cells stably expressing shRNAs targeting *DAPK1*, *NTN1*, or *UNC5B* transcripts. qRT–PCR analyses indicated that the DAC-induced expression of *DAPK1*, *NTN1*, and *UNC5B* was efficiently counteracted by gene silencing in the corresponding MDA-MB-231-shDAPK1, MDA-MB-231-shNTN1, and MDA-MB-231-shUNC5B cells (Fig EV4A). We then investigated the responses of the MDA-MB-231-shRNA cells, when engrafted in mammary fat pad and treated or not with the combination treatment (DAC and the net1-mAb). After validating the levels of DAPK1, UNC5B, and netrin-1 by IHC (Fig EV4B–D), anti-active caspase-3 IHC staining was performed on tumor sections and revealed that the silencing of *DAPK1* or *UNC5B* fully prevents the activation of caspase-3 mediated by the combination treatment, while DAC monotherapy resulted in a marked increase in caspase-3 activity when *NTN1* was silenced. Furthermore, the silencing of *DAPK1* or *UNC5B* mRNA prevented the inhibition of tumor growth induced by the combination treatment, further confirming our working hypothesis (Fig 5A–C). Moreover, *NTN1* silencing was sufficient to induce tumor growth inhibition following DAC monotherapy (Fig 5D). Taken together, these data demonstrate that DAPK1 and UNC5B are the key players involved in the response to the combined DAC and the anti-netrin-1 antibody treatment.

Discussion

The results presented herein provide a proof of concept that inhibition of DNA methylation can sensitize solid tumors to antibodies mediating tumor cell apoptosis. We previously proposed that in netrin-1-low tumors, inhibition of the netrin-1 dependence receptor (DR) pathway may occur either through the downregulation of the receptors or of key signaling pathway partners in colorectal cancer and neuroblastoma (Bernet *et al*, 2007; Zhu *et al*, 2013). Interestingly, in the panel of breast cancers analyzed in the current study, low levels of *NTN1* expression are associated with the hypermethylation of the CpG island located in the 5′-end of this gene. Furthermore, this correlation between hypermethylation and gene silencing was also found for *DAPK1*, an essential partner in the apoptotic netrin-1/DR pathway. These features were confirmed in breast cancer cell lines, since *NTN1* was downregulated and methylated in HMLER and MDA-MB-231 cells, and *DAPK1* was methylated and downregulated in HMLER cells.

In addition we showed, both *in vitro* and in xenograft models, that combining inhibition of DNA methylation with an anti-netrin-1 antibody resulted in the re-expression of netrin-1 and DAPK1 and led to tumor cell death and tumor growth inhibition. The correlation between *NTN1* and *DAPK1* silencing and DNA hypermethylation does not exclude that their upregulation in DAC-treated cells might be dependent on additional factors. For example, *UNC5B*, while unmethylated, was upregulated in DAC-treated MDA-MB-231 cells, and it was previously shown that in breast cancer cells, the downregulation of some methylated genes is dependent on the deposition of the methyl-CpG binding domain protein 2 (MBD2) within their promoter sequence (Devailly *et al*, 2015).

It is intriguing that, in the PDX model, the administration of DAC as a monotherapy only resulted in a slight tumor growth inhibitory effect. It is unlikely that the resistance to DAC treatment, used as a monotherapeutic agent, may have resulted from an over- or under-dosage, since several reports have shown that similar DAC doses are efficient in reducing tumor formation in some mouse models, including Apc^{Min}-induced intestinal neoplasia (Tsai *et al*, 2012), HRAS-G12V-transformed human epithelial kidney, leukemic cells, breast cancer cell lines, and engrafted patient-derived tumors (Mian *et al*, 2011; Kilinc *et al*, 2012). Furthermore, DNA hypomethylation was observed following DAC treatment in MDA-MB-231 xenograft tumors and PDX, indicating that DNA methylation was efficiently inhibited by DAC, *in vivo*. Alternatively, these data would suggest that tumor-growing conditions can overcome, at least partially, the anti-tumor effect of DAC. Experimental approaches (Rodriguez-Paredes & Esteller, 2011b; Yang *et al*, 2012; Azad *et al*, 2013) and clinical trials (ClinicalTrials.gov http://www.clinicaltrials.gov) using combinations of DAC with other epigenetic modifiers and/or cytotoxic agents provide interesting strategies for tumor growth reduction. However, these approaches have overlooked an important aspect of DAC, which is the re-expression of potentially masked targets and pathways. The data reported here provide not only evidence for the importance of ligand/DRs pairs in the regulation of tumor development but also advocate a new strategy based on the specific targeting of genes re-expressed following a DNA hypomethylating treatment. Finally, inhibitors of DNA methylation could "prime" tumors to netrin-1 addiction, and the subsequent treatment with a combination of inhibitors of DNA methylation and an anti-netrin-1 antibody could result in a powerful therapeutic strategy.

Materials and Methods

Tumor samples

Human breast cancer samples were provided by the tumor bank of the Centre Léon Bérard (Lyon, France). Fresh tissue samples were obtained during breast surgery, prior to any systemic therapy, snap-frozen in liquid nitrogen, and stored for scientific research in a biological resources repository, according to the French National Ethical Guidelines. Tissue microarrays of paraffin embedded breast tumor sections were obtained from Super Bio Chips (Cliniscience, Nanterre, France).

Cell lines and treatments

The HMLER, MDA-MB-157, MDA-MB-231, and MDA-MB-231-Luc breast cancer cell lines (Cell Biolabs, San Diego, CA, USA) were maintained in Dulbecco's Minimum Essential Medium F12 Glutamax (DMEM-F12 Glutamax) (Life Technologies). In addition, human EGF 10 ng/ml (Promocell, Heidelberg, Germany), hydrocortisone 0.5 μg/ml, puromycin 0.5 μg/ml (InVitrogen), and insulin 10 μg/ml (InVitrogen) were added to the medium of HMLER cells. AU565 and T47D cell lines were maintained in RPMI medium (Life Technologies), supplemented with insulin 0.2 U/ml (InVitrogen) for T47D

 © 2016 The Authors

cells. SKBR3 cells were maintained in McCoy's medium (Life Technologies). All of these cell lines were supplemented with 10% FBS (Lonza, Basel, Switzerland) and 1% penicillin/streptomycin (InVitrogen, Carlsbad, CA, USA). Twenty-four hours after plating, cells were grown for 3 days in fresh medium containing various concentrations of decitabine (5-aza-2′-deoxycytidine, DAC) (Sigma-Aldrich) or 2 μM 5-azacytidine (Sigma-Aldrich), renewed every day. The cells were then cultured, under serum deprived conditions for 48 h, in the presence of the net1-mAb anti-netrin-1 antibody (10 μg/ml) (Netris Pharma, Lyon, France), as well as in the presence or not of the recombinant Flag-tagged netrin-1 (5 μg/ml) (Adipogen).

Enforced gene expression and siRNA experiment

The pcDNA3.1 vector coding for *DAPK1 (Llambi et al, 2005)* was used to enforce the expression of *DAPK1* in HMLER cells. Empty plasmids or plasmids containing a HA-tagged DAPK construct were transfected into HMLER cells using Lipofectamine 2000 (Invitrogen). *NTN1* siRNA has been previously described (Delloye-Bourgeois *et al*, 2009a) and was transfected using Lipofectamine 2000 into HMLER cells, which were previously treated or not with decitabine for 72 h. *IRF7* siRNA was transfected using Lipofectamine 2000, and transfected cells were treated for 72 h with DAC. Scramble siRNA (Sigma) was used as a control.

Stable shRNA transfection of cell lines

Control, *DAPK1*, *UNC5B,* and *NTN1* shRNA plasmids (Sigma Mission shRNA) were transfected into subconfluent cells using Lipofectamine 2000, according to the manufacturer's protocol. After transfection, puromycin (2 μg/ml) was added to the fresh medium as a selection factor. The selection of transfected cells occurred over a 5-day time-course. Cells were then trypsinized and diluted to obtain 0–2 clones per well in 96-well plates. Cell selection using puromycin (2 μg/ml) was conducted throughout the shRNA transfection, selection, and all of the subsequent experiments, in order to conserve gene downregulation. Following their amplifications, cells were treated or not with DAC, and tested for their level of *DAPK1/UNC5B/NTN1* expression before and after DAC treatment. Clones that exhibited a "normal" proliferation rate and a low level of expression of the gene of interest were selected.

Caspase-3 activity and viability assays

Caspase-3 activity was measured as previously described (Llambi *et al*, 2005), (Delloye-Bourgeois *et al*, 2009a) using the Ac-DEVD-AFC substrate assay (Gentaur Biovision, Brussel, Belgium). Alternatively, the percentage of cell death was measured by acridine orange and DAPI staining, using the NucleoCounter NC-3000 system (ChemoMetec A/S, Allerød, Denmark).

Fluorescent caspase-3 activity

The apoptotic index was measured using the CellPlayer 96-Well Kinetic Caspase 3/7 Apoptosis Kit, according to the manufacturer's protocol (Essen bioscience, Hertfordshire, UK). Three thousands cells were plated in 96-well plates, treated with DAC (10 μM final) or vehicle (PBS) for 48 h. The cells were then incubated in serum free medium enriched with a kinetic apoptosis reagent (1/5,000e), with net1-mAb (10 μg/ml) and/or with recombinant netrin-1 (5 μg/ml), and with DAC or PBS. Cells were placed in an IncuCyte FLR or ZOOM with a 10 × objective in a standard cell culture incubator at 37°C and 5% CO_2 for 48 h. As a marker of proliferation, and to correct for differential proliferation of cells, the total number of DNA-containing objects was counted at the end of the experimental time-course, using Vybrant Green. This number was used to calculate the "apoptotic index", defined as the ratio of the number of caspase-3/7 positive objects to the total number of DNA-containing objects, as recommended by the manufacturer's protocol.

TUNEL assays

For the detection of DNA fragmentation, cells were cultured on coverslips, and, after treatments, fixed in 4% paraformaldehyde for 20 min. TUNEL assays (terminal deoxynucleodityl-transferase-mediated dUTP-biotin nick end labeling) were then performed using 300 U/ml TUNEL enzyme and 6 μM biotinylated dUTP, according to the manufacturer's guidelines (Roche Diagnostics, Meylan, France).

Mouse model of xenografts

Five-week-old female athymic $Swiss^{nu/nu}$ mice were obtained from Charles River (Ecully, France) and were housed in a specific pathogen-free animal facility. MDA-MB-231 or MDA-MB-231-Luc shRNA cells (2×10^6) were resuspended in 200 μl PBS and implanted into the mammary gland fat pad. When tumors reached an approximate volume of 100 mm^3, 10 mg/kg of net1-mAb (Netris Pharma, France) or an equal volume of PBS (Life Technologies) was injected intraperitoneally, twice a week for 3 weeks. DAC was then injected subcutaneously into the left flank 3 times a week for 3 weeks (dosage: 0.5 mg/kg; vehicle: PBS) or replaced by PBS in the control groups. Tumor volumes were assessed twice a week with a caliper and calculated with the formula $V = ½ (\text{length} \times \text{width}^2)$. Furthermore, a patient-derived xenograft, PDX-HBC-146, was generated and housed in the tumor model laboratory (LMT) of the Centre Léon Bérard. Briefly, following isoflurane anesthesia, mice were engrafted in the interscapular area with a $\approx$ 60 mm^3 patient-derived tumor. When tumors reached 120–150 mm^3, mice were injected subcutaneously with DAC (0.5 mg/kg) or PBS 3 times a week for 3 weeks and/or intraperitoneally with net1-mAb (10 mg/kg) or with a human IgG1 control isotype antibody (Ctrl IgG1, 10 mg/kg, Evitria, Switzerland) twice a week for 3 weeks. Concomitantly, in order to evaluate the effects of the treatments on DNA methylation, cell death, cell proliferation, tumor angiogenesis, and protein expression, some xenografted mice were treated for only one week (as described above) before tumor extraction for further analysis. All experiments were performed in accordance with the relevant guidelines and regulations required by the Animal Ethics Committee (accreditation of laboratory animal care by CECCAP, ENS Lyon-PBES).

Chicken model for tumor cell dissemination

As previously described (Delloye-Bourgeois *et al*, 2009b), MDA-MB-231 cells were initially treated for 3 days with DAC 10 μM or PBS

© 2016 The Authors

(vehicle) and then for 2 days with Control Iso-mAb or net1-mAb. After trypsinization, 2×10^6 cells were suspended in 100 μl of PBS/Matrigel (1:1) and seeded on the chorioallantoic membrane (CAM) of 10-day-old chicks. On day 17, lungs were harvested from the tumor-bearing embryos and genomic DNA was extracted with a NucleoSpin Tissue kit (Macherey-Nagel). Metastasis was quantified by PCR-based detection of the human Alu sequence, using primers for avian repeated element-specific sequences as controls (see Appendix Table S1). For both couples of primers, metastasis was assessed by polymerase activation at 95°C for 2 min followed by 40 cycles at 95°C for 30 s, 63°C for 30 s, and 72°C for 30 s. Genomic DNA extracted from chicken breast and lungs of healthy chick embryos was used to determine the threshold between neuroblastoma (NB) cell-invaded and non-invaded lungs. All experiments were performed in accordance with the relevant guidelines and regulations required by the Animal Ethics Committee (accreditation of laboratory animal care by CECCAP, ENS Lyon-PBES).

Immunohistochemistry analysis of xenografted cell lines and patient biopsies

Immunohistochemistry staining was performed on an automated immunostainer (Ventana Discovery XT, Roche, Meylan, France) using the DABmap Kit according to the manufacturer's instructions. Tissue samples were fixed in 10% buffered formalin and embedded in paraffin. Following antigen unmasking (citrate buffer pH 7.3, 98°C for 35 min), immunostainings were performed with a polyclonal rat anti-mouse netrin-1 antibody (R&D), a rabbit polyclonal anti-DAPK1 (Acris), or an UNC5B antibody (Sigma), using the Novolink kit (Leica) for revelation. Apoptotic cell staining was performed using a rabbit cleaved caspase-3-specific antibody (Cell Signaling) and the *In Situ* Cell Death Detection kit POD (Roche). Angiogenesis was measured using a rabbit polyclonal CD31 (Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1) antibody (ANASPEC), and the rate of cell proliferation was determined using a mouse monoclonal MIB-1-specific antibody (DAKO). Image analysis was performed using a light microscope (Eclipse E400, Nikon France, Champigny, France) equipped with a tri-CDD video camera (Sony, Japan). Quantitative values were determined by morphometric analysis (Histolab, Microvision Instruments, Evry, France) of at least 40 fields per staining at a ×200 magnification for the xenograft tumor sections, and one field per staining of the total tissue section at ×40 magnification for the tissue microarray. The total surface occupied by the tumor was automatically measured, and the positively stained at each surface was expressed as a percentage of the total surface for each field analyzed.

RNA isolation

Total RNA was extracted from biopsies and xenografts using the TRIzol-Reagent (Ambion, Life Technologies) and from cell lines using the Nucleospin RNAII kit (Macherey-Nagel, Hoerdt, Germany), according to the manufacturer's instructions. For RNA-seq experiments, RNA purity, integrity, and quantification were assessed using agarose gel electrophoresis and a NanoDrop 1000 (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA). Pools of three to five independent extractions were sent for high-throughput sequencing to the Beijing Genomics Institute (BGI, Hong-Kong, China).

Reverse transcription and quantitative real-time RT–PCR

One microgram of RNA was reverse-transcribed, using the iScript cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad, Ivry, France). Quantitative RT–PCR was performed using a Mini opticon (Bio-Rad) and the SYBR supermix qPCR kit (Bio-Rad). Polymerase was activated at 95°C for 3 min, followed by 45 cycles of amplification and 30 s of cooling. Moreover, gene expression profiles of human samples and cell lines were validated using 3 other standard housekeeping genes, namely *PBGD*, *GAPDH,* and *MBD2*, to confirm the results. Primer sequences for the genes targeted are shown in Appendix Table S1.

DNA extraction

Biopsy samples and xenografted cell lines were cryogrinded in liquid nitrogen. DNA was then extracted and purified using the Nucleospin tissue DNA extraction kit (Macherey-Nagel), according to the manufacturer's protocol. DNA from cell lines was directly extracted using the standard protocol (Auriol *et al*, 2005).

Bisulfite treatment of genomic DNA

Two hundred nanograms of genomic DNA was added to 1.8 μg of standard plasmid DNA (pGL3 Basic) and converted using the Epitect Bisulfite kit (Qiagen), according to the manufacturer's protocol.

Amplification of bisulfite converted DNA and pyrosequencing

Sets of biotinylated *NTN1, DAPK1,* and primers were designed within the promoter region (Fig 1D). As a control, non-modified and modified *GAPDH* sets of primers were used to assess the efficiency of the bisulfite DNA conversion. Modified DNA was amplified in a total volume of 50 μl using the Hotstartaq (Qiagen) kit, in the presence of 1 mM $MgCl_2$ for the *DAPK1* and *NTN1* primers.

Thermal profiles were as follows: 95°C for 10 min followed by 50 cycles of 95°C for 30 s, 50°C (*NTN1*) or 52°C (*DAPK1*) for 30 s and 1 min 30 s (*NTN1* and *DAPK1*) of extension followed by a 10-min final elongation. The primer sequences are shown in Appendix Table S1. The quality and quantity of the PCR product were confirmed on a 2% agarose gel.

PCR products were then pyrosequenced using the Pyromark kit (Qiagen). Reverse single-stranded biotinylated templates were isolated using the PyroMark Vacuum Prep WorkStation (Qiagen). Forty microliters of PCR product was added to 38 μl of binding buffer (Qiagen) and 2 μl streptavidin sepharose high-performance beads (GE Healthcare®). The mixtures were shaken for 10 min at 200 *g* (revolution per minute). After agitation, beads covered with biotinylated DNA were collected and retained on the filter probes by permanent vacuum. The filter probes were successively immerged in different baths: in ethanol 70% for 5 s, in PyroMark denaturation solution for 5 s, and in PyroMark wash buffer 1× for 15 s (Qiagen). The vacuum was then turned off, and the beads fixing DNA strands were released into a 96-well plate containing 25 μl of annealing buffer with 0.3 μM of sequencing primer in each well. The sequencing plate was kept at 80°C for 2 min and at room temperature for 5 min. Pyrosequencing reactions were performed in a PyroMark Q96 system using PyroGold reagents (Qiagen). Results were analyzed using the PyroMark Software.

 © 2016 The Authors

DNA methylation analysis

Bisulfite sequencing, used to determine the CpG methylation patterns of *DAPK1* and *NTN1* 5′UTR regions (Appendix Table S1), was performed as described (Beygo *et al*, 2013). Briefly, after a first amplification using sequence-specific primers, PCR fragments were tagged in a second amplification step and sequenced using the Roche/454 GS junior system according to the manufacturer's protocol (Roche emPCR Amplification Method Manual—Lib-A and Roche Sequencing Method Manual). Data were analyzed using Amplikyzer (https://pypi.python.org/pypi/amplikyzer/0.97).

Methyl-Capture-sequencing (Methyl-Cap-seq)

Genomic DNAs (1 μg) were sheared to an average length of 300–600 bp. Methylated DNA fragments were isolated using beads containing the Methyl-CpG-binding domain of MBD2, according to manufacturer's recommendations (MethylMiner, InVitrogen). After sequencing, using the Illumina 2000 high-throughput sequencing technology by BGI service (Beijing, China), 30–40 million 50-bp reads were obtained for each input and bound fraction and analyzed using R and bioconductor packages.

RNA-seq analysis

Reads were aligned on the UCSC *Homo sapiens* hg19 genome using TopHat2. Differential expression analyses were performed as described (Kim *et al*, 2013), using the Galaxy server (https://usegalaxy.org/). Only genes with at least 1 read per million (RPM) were kept for subsequent analyses. Enriched Gene Ontology terms and KEGG pathways were identified using Gene Set Enrichment Analysis (Subramanian *et al*, 2005) with genes preranked according to their fold change induced by DAC treatment.

Data deposition

The MeDP and the RNAseq data from this publication have been submitted to the GEO database the accession number GSE80177.

Expanded View for this article is available online.

Acknowledgements
We are grateful to Drs. A Puisieux and AP Morel for the HMLER cells, and to Sandrine Viala for her nice and efficient work. We thank Dr B. Manship for editing of this manuscript and helpful discussions. This work was supported by institutional grants from the CNRS, the University of Lyon, the Centre Léon Bérard, the Ligue Contre le Cancer, the INCA, the ANR, the ERC, the EC FP7 Hermione-2man and from the Fondation Bettencourt. MG was supported by a fellowship grant from the LabEx DEVweCAN.

Author contributions
MG contributed to the experimental design and performed the work, with the help of PM, GD, BG, YB, AG, CF, IP, JGD. YB provided some scientific insight and technical support on 454 Junior DNA methylation sequencing experiments and their analysis. NG conducted immunohistochemical staining of xenografted murine samples. AB has provided the net1-mAb antibody and technical support. ZH and AG provided some scientific insight and technical support on pyrosequencing experiments and their analysis. MG participated in the writing of the manuscript. PM and RD proposed the project, experimental design, and wrote the manuscript.

The paper explained

Problem
In a substantial part of human cancers, netrin-1 (*NTN1)* is upregulated and this upregulation is inhibiting apoptosis induced by its so-called dependence receptors, DCC and UNC5H, and thus promotes tumor progression. However, in other cancers, the selective inhibition of this dependence receptor death pathway relies on the silencing of pro-apoptotic effector proteins. A large fraction of human breast tumors exhibits simultaneous DNA methylation-dependent loss of expression of *NTN1* and of *DAPK1*, a serine threonine kinase known to transduce the netrin-1 dependence receptor pro-apoptotic pathway.

Results
Results described in this manuscript propose that the inhibition of DNA methylation by drugs such as decitabine restores the expression of both *NTN1* and *DAPK1*, in netrin-1-low cancer cells. Combination of decitabine with *NTN1* silencing strategies or with an anti-netrin-1 neutralizing antibody potentiates tumor cell death and inhibits tumor growth in different animal models including patient-derived xenografts.

Impact
With more than 500,000 death worldwide in 2012, breast cancer is one of the most frequent cancer and represents a therapeutic challenge. Our data suggest that combining DNA methylation inhibitors with netrin-1 neutralizing agents could be a valuable strategy for combating netrin-1 low breast tumors cancer, which may represent 40% of breast cancers.

Conflict of interest
PM and AB declare having a conflict of interest in this study as co-founders and shareholders of Netris Pharma.

References

Auriol E, Billard LM, Magdinier F, Dante R (2005) Specific binding of the methyl binding domain protein 2 at the BRCA1-NBR2 locus. *Nucleic Acids Res* 33: 4243 – 4254

Azad N, Zahnow CA, Rudin CM, Baylin SB (2013) The future of epigenetic therapy in solid tumours–lessons from the past. *Nat Rev Clin Oncol* 10: 256 – 266

Baylin SB, Ohm JE (2006) Epigenetic gene silencing in cancer – a mechanism for early oncogenic pathway addiction? *Nat Rev Cancer* 6: 107 – 116

Bernet A, Mazelin L, Coissieux MM, Gadot N, Ackerman SL, Scoazec JY, Mehlen P (2007) Inactivation of the UNC5C Netrin-1 receptor is associated with tumor progression in colorectal malignancies. *Gastroenterology* 133: 1840 – 1848

Beygo J, Citro V, Sparago A, De Crescenzo A, Cerrato F, Heitmann M, Rademacher K, Guala A, Enklaar T, Anichini C *et al* (2013) The molecular function and clinical phenotype of partial deletions of the IGF2/H19 imprinting control region depends on the spatial arrangement of the remaining CTCF-binding sites. *Hum Mol Genet* 22: 544 – 557

Bongo JB, Peng DQ (2014) The neuroimmune guidance cue netrin-1: a new therapeutic target in cardiovascular disease. *J Cardiol* 63: 95 – 98

© 2016 The Authors

Castets M, Broutier L, Molin Y, Brevet M, Chazot G, Gadot N, Paquet A, Mazelin L, Jarrosson-Wuilleme L, Scoazec JY *et al* (2012) DCC constrains tumour progression via its dependence receptor activity. *Nature* 482: 534 – 537

Cirulli V, Yebra M (2007) Netrins: beyond the brain. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8: 296 – 306

Dawson MA, Kouzarides T (2012) Cancer epigenetics: from mechanism to therapy. *Cell* 150: 12 – 27

Delloye-Bourgeois C, Brambilla E, Coissieux MM, Guenebeaud C, Pedeux R, Firlej V, Cabon F, Brambilla C, Mehlen P, Bernet A (2009a) Interference with netrin-1 and tumor cell death in non-small cell lung cancer. *J Natl Cancer Inst* 101: 237 – 247

Delloye-Bourgeois C, Fitamant J, Paradisi A, Cappellen D, Douc-Rasy S, Raquin MA, Stupack D, Nakagawara A, Rousseau R, Combaret V *et al* (2009b) Netrin-1 acts as a survival factor for aggressive neuroblastoma. *J Exp Med* 206: 833 – 847

Devailly G, Grandin M, Perriaud L, Mathot P, Delcros JG, Bidet Y, Morel AP, Bignon JY, Puisieux A, Mehlen P *et al* (2015) Dynamics of MBD2 deposition across methylated DNA regions during malignant transformation of human mammary epithelial cells. *Nucleic Acids Res* 43: 5838 – 5854

Di Agostino S, Sorrentino G, Ingallina E, Valenti F, Ferraiuolo M, Bicciato S, Piazza S, Strano S, Del Sal G, Blandino G (2016) YAP enhances the pro-proliferative transcriptional activity of mutant p53 proteins. *EMBO Rep* 17: 188 – 201

Elenbaas B, Spirio L, Koerner F, Fleming MD, Zimonjic DB, Donaher JL, Popescu NC, Hahn WC, Weinberg RA (2001) Human breast cancer cells generated by oncogenic transformation of primary mammary epithelial cells. *Genes Dev* 15: 50 – 65

Fitamant J, Guenebeaud C, Coissieux MM, Guix C, Treilleux I, Scoazec JY, Bachelot T, Bernet A, Mehlen P (2008) Netrin-1 expression confers a selective advantage for tumor cell survival in metastatic breast cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 105: 4850 – 4855

Grandin M, Meier M, Delcros JG, Nikodemus D, Reuten R, Patel TR, Goldschneider D, Orriss G, Krahn N, Boussouar A *et al* (2016) Structural decoding of the Netrin-1/UNC5 interaction and its therapeutical implications in cancers. *Cancer Cell* 29: 173 – 185

Guenebeaud C, Goldschneider D, Castets M, Guix C, Chazot G, Delloye-Bourgeois C, Eisenberg-Lerner A, Shohat G, Zhang M, Laudet V *et al* (2010) The dependence receptor UNC5H2/B triggers apoptosis via PP2A-mediated dephosphorylation of DAP kinase. *Mol Cell* 40: 863 – 876

Harter PN, Zinke J, Scholz A, Tichy J, Zachskorn C, Kvasnicka HM, Goeppert B, Delloye-Bourgeois C, Hattingen E, Senft C *et al* (2014) Netrin-1 expression is an independent prognostic factor for poor patient survival in brain metastases. *PLoS One* 9: e92311

Hedrick L, Cho KR, Fearon ER, Wu TC, Kinzler KW, Vogelstein B (1994) The DCC gene product in cellular differentiation and colorectal tumorigenesis. *Genes Dev* 8: 1174 – 1183

Kilinc D, Ozdemir O, Ozdemir S, Korgali E, Koksal B, Uslu A, Gultekin YE (2012) Alterations in promoter methylation status of tumor suppressor HIC1, SFRP2, and DAPK1 genes in prostate carcinomas. *DNA Cell Biol* 31: 826 – 832

Kim D, Pertea G, Trapnell C, Pimentel H, Kelley R, Salzberg SL (2013) TopHat2: accurate alignment of transcriptomes in the presence of insertions, deletions and gene fusions. *Genome Biol* 14: R36

Krimpenfort P, Song JY, Proost N, Zevenhoven J, Jonkers J, Berns A (2012) Deleted in colorectal carcinoma suppresses metastasis in p53-deficient mammary tumours. *Nature* 482: 538 – 541

Llambi F, Causeret F, Bloch-Gallego E, Mehlen P (2001) Netrin-1 acts as a survival factor via its receptors UNC5H and DCC. *EMBO J* 20: 2715 – 2722

Llambi F, Lourenco FC, Gozuacik D, Guix C, Pays L, Del Rio G, Kimchi A, Mehlen P (2005) The dependence receptor UNC5H2 mediates apoptosis through DAP-kinase. *EMBO J* 24: 1192 – 1201

Lund P, Kotova I, Kedinger V, Khanwalkar H, Voltz E, Hahn WC, Gronemeyer H (2011) Transformation-dependent silencing of tumor-selective apoptosis-inducing TRAIL by DNA hypermethylation is antagonized by decitabine. *Mol Cancer Ther* 10: 1611 – 1623

Mehlen P, Rabizadeh S, Snipas SJ, Assa-Munt N, Salvesen GS, Bredesen DE (1998) The DCC gene product induces apoptosis by a mechanism requiring receptor proteolysis. *Nature* 395: 801 – 804

Mehlen P, Guenebeaud C (2010) Netrin-1 and its dependence receptors as original targets for cancer therapy. *Curr Opin Oncol* 22: 46 – 54

Mian OY, Wang SZ, Zhu SZ, Gnanapragasam MN, Graham L, Bear HD, Ginder GD (2011) Methyl-binding domain protein 2-dependent proliferation and survival of breast cancer cells. *Mol Cancer Res* 9: 1152 – 1162

Morel AP, Lievre M, Thomas C, Hinkal G, Ansieau S, Puisieux A (2008) Generation of breast cancer stem cells through epithelial-mesenchymal transition. *PLoS One* 3: e2888

Paradisi A, Creveaux M, Gibert B, Devailly G, Redoulez E, Neves D, Cleyssac E, Treilleux I, Klein C, Niederfellner G *et al* (2013) Combining chemotherapeutic agents and netrin-1 interference potentiates cancer cell death. *EMBO Mol Med* 5: 1821 – 1834

Pulling LC, Grimes MJ, Damiani LA, Juri DE, Do K, Tellez CS, Belinsky SA (2009) Dual promoter regulation of death-associated protein kinase gene leads to differentially silenced transcripts by methylation in cancer. *Carcinogenesis* 30: 2023 – 2030

Qi Q, Li DY, Luo HR, Guan KL, Ye K (2015) Netrin-1 exerts oncogenic activities through enhancing Yes-associated protein stability. *Proc Natl Acad Sci USA* 112: 7255 – 7260

Ramkhelawon B, Hennessy EJ, Menager M, Ray TD, Sheedy FJ, Hutchison S, Wanschel A, Oldebeken S, Geoffrion M, Spiro W *et al* (2014) Netrin-1 promotes adipose tissue macrophage retention and insulin resistance in obesity. *Nat Med* 20: 377 – 384

Raval A, Tanner SM, Byrd JC, Angerman EB, Perko JD, Chen SS, Hackanson B, Grever MR, Lucas DM, Matkovic JJ *et al* (2007) Downregulation of death-associated protein kinase 1 (DAPK1) in chronic lymphocytic leukemia. *Cell* 129: 879 – 890

Rodriguez-Paredes M, Esteller M (2011a) Cancer epigenetics reaches mainstream oncology. *Nat Med* 17: 330 – 339

Rodriguez-Paredes M, Esteller M (2011b) A combined epigenetic therapy equals the efficacy of conventional chemotherapy in refractory advanced non-small cell lung cancer. *Cancer Discov* 1: 557 – 559

Roulois D, Loo Yau H, Singhania R, Wang Y, Danesh A, Shen SY, Han H, Liang G, Jones PA, Pugh TJ *et al* (2015) DNA-demethylating agents target colorectal cancer cells by inducing viral mimicry by endogenous transcripts. *Cell* 162: 961 – 973

Shin SK, Nagasaka T, Jung BH, Matsubara N, Kim WH, Carethers JM, Boland CR, Goel A (2007) Epigenetic and genetic alterations in Netrin-1 receptors UNC5C and DCC in human colon cancer. *Gastroenterology* 133: 1849 – 1857

Subramanian A, Tamayo P, Mootha VK, Mukherjee S, Ebert BL, Gillette MA, Paulovich A, Pomeroy SL, Golub TR, Lander ES *et al* (2005) Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 15545 – 15550

Tang X, Wu W, Sun SY, Wistuba II, Hong WK, Mao L (2004) Hypermethylation of the death-associated protein kinase promoter attenuates the sensitivity

 © 2016 The Authors

to TRAIL-induced apoptosis in human non-small cell lung cancer cells. *Mol Cancer Res* 2: 685 – 691

Tsai HC, Li H, Van Neste L, Cai Y, Robert C, Rassool FV, Shin JJ, Harbom KM, Beaty R, Pappou E *et al* (2012) Transient low doses of DNA-demethylating agents exert durable antitumor effects on hematological and epithelial tumor cells. *Cancer Cell* 21: 430 – 446

Walker JA, Hughes DA, Hedges DJ, Anders BA, Laborde ME, Shewale J, Sinha SK, Batzer MA (2004) Quantitative PCR for DNA identification based on genome-specific interspersed repetitive elements. *Genomics* 83: 518 – 527

Wang J, Duncan D, Shi Z, Zhang B (2013) WEB-based GEne SeT AnaLysis Toolkit (WebGestalt): update 2013. *Nucleic Acids Res* 41: W77 – 83

Yang X, Lay F, Han H, Jones PA (2010) Targeting DNA methylation for epigenetic therapy. *Trends Pharmacol Sci* 31: 536 – 546

Yang D, Torres CM, Bardhan K, Zimmerman M, McGaha TL, Liu K (2012) Decitabine and vorinostat cooperate to sensitize colon carcinoma cells to Fas ligand-induced apoptosis in vitro and tumor suppression in vivo. *J Immunol* 188: 4441 – 4449

Zhu Y, Li Y, Haraguchi S, Yu M, Ohira M, Ozaki T, Nakagawa A, Ushijima T, Isogai E, Koseki H *et al* (2013) Dependence receptor UNC5D mediates nerve growth factor depletion-induced neuroblastoma regression. *J Clin Investig* 123: 2935 – 2947

License: This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Partie III : Dynamics of MBD2 deposition across methylated DNA regions during malignant transformation of human mammary epithelial cells

1. Préambule

Au sein du laboratoire, nous avons également réalisé une étude portant sur l'implication de la protéine MBD2 (Methyl-DNA-binding proteins 2) dans l'oncogenèse mammaire.

Plus précisément, nous avons utilisé un modèle cellulaire de transformation oncogénique mammaire, grâce aux lignées cellulaires : HMEC-hTERT, immortalisées mais non transformées et HMLER, immortalisées et transformées (Elenbaas *et al*, 2001).

Au cours de cette étude, nous avons pu montrer que la protéine MBD2 est présente sur de nombreux gènes méthylés présentant un faible niveau d'expression. MBD2 ayant des fonctions de répresseur transcriptionnelle, elle jouerait un rôle dans le contrôle de l'expression de ces gènes.

De plus au cours de la transformation cellulaire, modélisée ici par la comparaison des lignées HMEC-hTERT et HMLER, nous avons pu observer une redistribution de la protéine MBD2 parmi les régions méthylées sans observer de changement au niveau des taux de méthylation de ces régions. Les gènes présentant une baisse de leur taux d'expression au cours de la transformation montrent ainsi un gain de la protéine MBD2 au niveau de leur promoteur.

Cette étude a permis de montrer l'importance des protéines interprètes de la méthylation, permettant ainsi de mieux caractériser les évènements épigénétiques présents au cours de l'oncogenèse mammaire.

Ces travaux ont été réalisés par Guillaume Devailly, j'ai pour ma part participé aux expériences d'immuno-précipitations de la chromatine.

2. Article

5838–5854 *Nucleic Acids Research, 2015, Vol. 43, No. 12* *Published online 24 May 2015*
doi: 10.1093/nar/gkv508

Dynamics of MBD2 deposition across methylated DNA regions during malignant transformation of human mammary epithelial cells

Guillaume Devailly[1], Mélodie Grandin[1], Laury Perriaud[2], Pauline Mathot[1], Jean-Guy Delcros[1], Yannick Bidet[3], Anne-Pierre Morel[4], Jean-Yves Bignon[3], Alain Puisieux[4], Patrick Mehlen[1] and Robert Dante[1,*]

[1]Dependence Receptors, Cancer and Development Laboratory - Equipe labellisée 'La Ligue', LabEx DEVweCAN, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon (CRCL), INSERM U1052-CNRS UMR5286, Université de Lyon, Centre Léon Bérard, 69008 Lyon, France, [2]Institut Curie and INSERM U612, Centre Universitaire, 91405, Orsay, France, [3]Laboratoire d'Oncologie Moléculaire, Centre Jean Perrin, 63011 Clermont-Ferrand, France and [4]EMT and cancer cell plasticity Laboratory - Equipe labellisée 'La Ligue', LabEx DEVweCAN, CRCL, INSERM U1052-CNRS UMR5286, Université de Lyon, Centre Léon Bérard, 69008 Lyon, France

Received November 17, 2014; Revised April 11, 2015; Accepted May 5, 2015

ABSTRACT

DNA methylation is thought to induce transcriptional silencing through the combination of two mechanisms: the repulsion of transcriptional activators unable to bind their target sites when methylated, and the recruitment of transcriptional repressors with specific affinity for methylated DNA. The Methyl CpG Binding Domain proteins MeCP2, MBD1 and MBD2 belong to the latter category. Here, we present MBD2 ChIPseq data obtained from the endogenous MBD2 in an isogenic cellular model of oncogenic transformation of human mammary cells. In immortalized (HMEC-hTERT) or transformed (HMLER) cells, MBD2 was found in a large proportion of methylated regions and associated with transcriptional silencing. A redistribution of MBD2 on methylated DNA occurred during oncogenic transformation, frequently independently of local DNA methylation changes. Genes downregulated during HMEC-hTERT transformation preferentially gained MBD2 on their promoter. Furthermore, depletion of MBD2 induced an upregulation of MBD2-bound genes methylated at their promoter regions, in HMLER cells. Among the 3,160 genes downregulated in transformed cells, 380 genes were methylated at their promoter regions in both cell lines, specifically associated by MBD2 in HMLER cells, and upregulated upon MBD2 depletion in HMLER. The transcriptional MBD2-dependent downregulation occurring during oncogenic transformation was also observed in two additional models of mammary cell transformation. Thus, the dynamics of MBD2 deposition across methylated DNA regions was associated with the oncogenic transformation of human mammary cells.

INTRODUCTION

In vertebrates, DNA methylation at transcriptional start sites (TSSs) is an epigenetic modification associated with the downregulation of gene transcription (1). This epigenetic modification has been extensively studied during cell differentiation and neoplastic transformation, since DNA methylation changes are associated with these biological processes and may be involved in the control of gene expression (2–4). Although DNA methylation at specific sites can impair the direct binding of transcription factors to their targets and, in turn, may lead to transcriptional downregulation (5–8), these epigenetic signals are also interpreted by specific proteins (9). These proteins have been classified into three families (10–12) according to their methyl-DNA binding domain: the methyl-CpG binding domain (MBD) proteins; the UHRF proteins that bind methylated DNA through there SRA domain proteins; and a subclass of zinc finger proteins that preferentially bind methylated DNA sequences (ZBTB33, ZBTB4, ZBTB38, ZFP57, KLF4).

MeCP2, MBD1, MBD2 and MBD4 are members of the MBD protein family that recognize methylated CpG sites independently of their surrounding sequences *in vitro* (13). In human cells and *Xenopus* oocytes these proteins are found associated with chromatin remodeling complexes

*To whom correspondence should be addressed. Tel: +33 4 78 78 59 22; Fax: +33 4 78 78 27 20; Email: dante@univ-lyon1.fr

© The Author(s) 2015. Published by Oxford University Press on behalf of Nucleic Acids Research.
This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted reuse, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

along with histone deacetylases and/or histone methylases (14–18). The ability of these proteins to recruit repressor complexes at methylated CpG sites has suggested a direct relationship between DNA methylation and the establishment of a repressive chromatin architecture. However, more recent findings suggesting that MBD proteins may also be involved in other mechanisms such as alternative splicing and gene activation (19–21) have tempered this concept.

Several genome maps of MBD2 deposition have been constructed from human and mouse cells. Analysis of MBD2 binding sites at 25 000 promoter regions indicates that the promoter regions targeted by the endogenous MBD2 proteins are methylated and depleted for RNA polymerase II (22). Furthermore, parallel sequencing of chromatin immunoprecipitated fragments (ChIPseq) obtained from human HeLa and MCF7 cells expressing tagged-MBD2 vectors has shown that that MBD2 binding sites are methylated and that MBD2 deposition at TSS regions is associated with genes exhibiting repressive histone marks (21,23). A linear relationship between DNA methylation and MBD2 deposition is observed in mouse ES cells and derived neuronal cells expressing biotin-tagged MBD2 proteins from a single copy transgene (24). Although these studies show that a small fraction of MBD2 binding sites at promoter regions may be unmethylated and correspond to actively transcribed genes, these genome-wide analyses indicate that the presence of MBD2 at TSS regions is predominantly associated with methylated genes exhibiting a low transcriptional activity. Altogether, this suggests that MBD2 acts mainly as a methylation-dependent transcriptional repressor.

As expected from a transcriptional repressor involved in epigenetic mechanisms, MBD2 seems to play a role in the acquisition of specific phenotypes. MBD2 can block full reprogramming of somatic to iPS cells through direct binding to *NANOG* promoter elements thereby preventing transcriptional activation (25). In mice, MBD2 deletion alters the immune response (26), protects mice from hind-limb ischemia (27) and greatly reduces the number of intestinal adenoma in tumor-prone APC^{min} mice (28,29), mimicking the effects of experimentally induced DNA hypomethylation (30,31). Detailed gene candidate analysis indicates that MBD2 controls the expression of some exocrine pancreatic genes in a tissue-specific manner in mice (32). For example, *TFF2* is expressed in duodenum and silenced in colon, while this gene is methylated in both tissues. This tissue-specific repression is correlated with the tissue-specific presence of MBD2 at *TFF2* promoter and MBD2 deletion leads to *TFF2* upregulation in colon (32), suggesting that the dynamics of MBD2 binding has a direct effect on gene transcription. Taken together these data suggest that the cell-specific transcriptional repression occurring during differentiation or transformation may be associated, at least for some genes, with a redistribution of MBD2 proteins among methylated DNA regions.

In order to address this question we analyzed MBD2 binding sites in an isogenic cellular model of oncogenic transformation of human mammary epithelial cells constructed from the progression model described by Weinberg and colleagues (33). Human mammary cells were immortalized through the introduction of the human telomerase catalytic subunit gene (hTERT). The resulting immortalized cell line (HMEC-hTERT) was transformed by the introduction of the SV40 *T*/*t* antigens and oncogenic $H\text{-}RAS^{V12}$ genes (HMLER cell line). In a similar model constructed from human fetal lung fibroblasts (MRC-5 cells), it has been shown that DNA methylation changes occur predominantly during hTERT-induced immortalization while only subtle changes are associated with the transformation by SV40 large *T*-antigen and $H\text{-}RAS^{V12}$ (34). Thus, the comparison of HMEC-hTERT and HMLER cells offers the opportunity to investigate the potential modifications of MBD2 binding site associated with the acquisition of a specific phenotype in an isogenic background with a minor contribution of DNA methylation changes.

MATERIALS AND METHODS

Cell lines

HMEC-hTERT, HMLER, HME-ZEB1-RAS and mesenchymal HME-shP53-RAS cell lines were kindly provided by Anne-Pierre Morel (CRCL, Lyon, France) and cultured as previously described (35,36).

Treatments

Cells were seeded at 1.10^5 per well in six-well plates. The day after plating, cells were either transfected with 100 pmol of MBD2 targeting siRNA (siMBD2; sens: 5′-GGAGGAAGUGAUCCGAAAdTdT-3′) or control siRNA (siCtrl; Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA, MISSION siRNA Universal Negative Controls #1) using Lipofectamine-2000 (Sigma-Aldrich) as specified by the manufacturer's instructions, or treated every day with 10 μM of DAC (Sigma-Aldrich). Cells were collected 72 h after the start of the treatments.

Western-blot

Around 1.0×10^6 cells were lysed in NuPage LDS Sample Buffer and Reducing Agent (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Lysates were sonicated and heated at 95°C for 10 min. After migration and transfer, membranes were incubated with either anti-MBD2 (Santa Cruz, Heidelberg, Germany, sc-9397) or anti-ß-Actin (Sigma-Aldrich, A5441) antibodies.

RNA extraction

Total RNA was extracted using the NucleoSpin RNA kit (Macherey-Nagel, Hoerdt, France) following manufacturer's instructions. RNA purity, integrity and quantification were assessed using agarose gel-electrophoresis and analysis on a NanoDrop 1000 (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA). Pools of three to five independent extractions were sent for high-throughput sequencing to MGX-Montpellier GenomiX (library preparation with the TruSeq RNA sample preparation Kit from Illumina, followed by single-end 50 bp sequencing on Illumina HiSeq 2000).

Digestion of genomic DNA

Genomic DNA was extracted from cell lines using the QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France). Two hundred micrograms of DNA were digested overnight at 37°C with either HpaII or MspI restriction enzymes (New England BioLabs, Evry, France), and analyzed on ethidium bromide-containing agarose gels.

Methylated-DNA precipitation sequencing (MeDPseq)

Genomic DNA was sheared by sonication (final fragments ranged between 300 and 500 bp). Methylated-DNA precipitations (MeDP) were performed from 1 μg of sheared DNA using the MethylMiner Methylated DNA Enrichment Kit (Life Technologies). Library preparation and high-throughput sequencing (single-end 50 bp sequencing on Illumina HiSeq 2000) were performed at Beijing Genomics Institute (Hong-Kong, China) from pools of five independent experiments.

Chromatin immunoprecipitation

MBD2 Chromatin immunoprecipitations (ChIP) were performed as previously described (37). Briefly, sheared chromatin (with a mean fragment length between 300 and 500 bp) was obtained by sonication of formaldehyde cross-linked nuclei. ChIP were then performed with a custom-made rabbit polyclonal antiserum obtained after immunization with peptides corresponding to the N-terminal part of the MBD2 protein (Covalab, Villeurbanne, Lyon) (38) using the ChIP Assay Kit (Merck Millipore, Saint-Quentin-en-Yvelines, France) as specified by the manufacturer's instruction. Precipitated DNA was finally purified using NucleoSpin Gel and PCR Clean-up kit, (Macherey-Nagel) according to the manufacturer's protocol 'DNA clean-up of samples containing SDS.'

Input and bound fractions of DNA were dosed by fluorometry (Qubit 2.0, Life Technologies). Pools of five independent experiments were sent for high-throughput sequencing to ProfileXpert (Lyon, France) (library preparation and single-end 50 bp sequencing on Illumina HiSeq 2000).

Alternatively, enrichment in the bound fraction as compared to the input was measured by qPCR for several regions, using iQ SYBR Green supermix (BiroRad). Primer sequences and corresponding hybridization temperatures are listed in Supplementary Table S1.

ChIP-chip and MeDP-chip

ChIP-chip and MeDP-chip experiments were performed as previously described (22). Briefly, chromatin fragments were precipitated with anti-MBD2 antibody (Covalab), and DNA fragments were precipitated using a His_6-tagged recombinant protein containing four MBD domains cloned from MBD1 (39). The DNA fragments from the ChIP and MeDP experiments were amplified by random PCR. The samples were then labeled with the GeneChip WT Double-Stranded DNA Terminal Labeling Kit and hybridized to the human tiling arrays (Human Promoter 1.0R Arrays), which were then washed and scanned by ProfileXpert service (Lyon, France) according to Affymetrix protocols. Microarray signals were analyzed using aroma.affymetrix package on the hg18 reference genome.

DNA methylation analysis

Bisulfite sequencing, used to determine the CpG methylation patterns of tens regions (Supplementary Table S2), was performed as described in (40). Briefly, after a first amplification using sequence-specific primers, PCR fragments were tagged in a second amplification step and sequenced using the Roche/454 GS junior system according to the manufacturer's protocol (Roche emPCR Amplification Method Manual – Lib-A and Roche Sequencing Method Manual). The mean number of reads per sample was 475, see Supplementary Table S2. Data were analyzed using Amplikyzer (https://pypi.python.org/pypi/amplikyzer/0.97).

RNAseq analysis

Reads were aligned on the UCSC *Homo sapiens* hg19 genome using TopHat2 (41). Differential expression analysis was performed as described in (42), using the Bioconductor package edgeR (43). Only genes with at least 1 read per million (RPM) in at least two of the samples were kept for subsequent analyses. Enriched Gene Ontology terms and KEGG pathway were identified using Gene Set Enrichment Analysis (44) with genes pre-ranked according to their fold change induced by siMBD2 treatment.

ChIPseq analysis

Reads were aligned on the UCSC *Homo sapiens* hg19 genome using Bowtie (45). Duplicate reads were filtered using SAMTools (46) to limit PCR induced biases. Preliminary peak detection was performed using Model-based Analysis of ChIP-Seq (MACS) (47). Over sequenced regions were defined as 500 bp regions containing more than three times the median number of reads in at least one of the two inputs. Peaks were filtered against these over sequenced regions, as they represent suspicious false positive regions. Peaks in HMEC-hTERT and HMLER were compared using MAnorm (48), and peaks common to both cell lines or cell line specific peaks (P value ≤ 0.01) were determined. Read density visualization at specific locations were drawn with Sushi.R (49). K-mean clusterization of peaks and subsequent visualization were performed with seqMINER (50). Integrative analysis of ChIPseq, RNAseq and ChIP-chip data was performed using the Bioconductor package Repitools (51). Top enriched motifs in peaks were obtained using the RSAT oligo-diff tool (52).

Data deposition

The ChIPseq, the RNAseq and the microarray data from this publication have been submitted to the GEO database as entry GSE63237.

RESULTS

Identification of MDB2 binding sites and methylated DNA regions in HMEC-hTERT and HMLER cells

To identify possible modifications of MBD2 deposition profiles associated with phenotype changes, genome-wide analyses (ChIPseq) were performed in an isogenic cellular model (Figure 1A) constructed from immortalized HMEC cells (HMEC-hTERT cells) transformed by expressing SV40 *T/t* antigen and *H-RAS*^{V12} (33,35). In this study, we focused on the endogenous protein in order to take into account the potential changes in the regulation of MBD2 during the transformation process. In parallel, we identified methylated DNA regions by MeDPseq experiments performed in both cell lines using the MethylMiner kit (Invitrogen) for selecting methylated DNA regions.

Methylated DNA regions and MBD2 peaks were identified from the aligned reads (sequenced fragments) (Figure 1B). These data were compared with ChIP-chip and MeDP-chip data obtained using an array representing 25,500 promoter regions (Human Promoter 1.0R array, Affymetrix). Methylated regions identified by MeDPseq were enriched in MeDP-chip experiments performed with recombinant proteins containing four MBD domains from MBD1 (22,39) (Supplementary Figure S1A and B). Similarly, MBD2 peaks identified from ChIPseq were enriched in MBD2 ChIP-chip (Supplementary Figure S1C and D). Next, a group of genomic regions sharing the same characteristics (MBD2 binding and DNA methylation) in both cell lines was analyzed by ChIP-qPCR (Figure 2A). Data obtained indicated a good concordance between the two methods, qPCR (Figure 2A) and determination of the distribution of MBD2 reads by ChIPseq (Figure 2B–H). We also validated 14 cell-specific MBD2 binding sites (Supplementary Figure S2). For many of these, DNA methylation changes did not seem to be associated with the gain of MBD2 binding sites in HMLER cells (Supplementary Figure S2 regions 14q11.2, 12q11.22, 8q22.2 and 16p13.3). Ten of these regions were amplified by PCR from bisulfite-modified DNAs. Parallel sequencing of the PCR fragments validated their methylation status deduced from MeDP-seq experiments (Supplementary Table S2). On all the regions analyzed by qPCR, we confirmed that depletion of MBD2 by siRNA strongly reduced ChIP efficiency (Supplementary Figure S3), confirming the specificity of the antibody.

Endogenous MBD2 binding sites are methylated

MBD2 binding sites (2.5 kb up and down of the center of each peak) were visualized by heat maps showing read density from the MBD2 ChIPseq (MBD2-reads), the MeDPseq (MeDP-reads) and the negative control, Input-seq. As expected, strong signal intensities were observed when MBD2-reads were plotted against MBD2 peaks (Figure 1C, HMLER cells and 1F, HMEC-hTERT cells). The centers of MBD2 peaks were also enriched in MeDP-reads (Figure 1C and F), indicating that high density in DNA methylation signals was associated with MBD2 binding sites. However, K means clustering showed that a subset of MBD2 peaks is associated with weakly or unmethylated DNA regions (Figure 1C and F). Conversely, DNA methylation peaks identified by MeDPseq were enriched in MeDP-reads (Figure 1D and G).

The clustering of MeDP positive regions according to their MBD2 ChIPseq read densities suggested that up to a quarter of methylated DNA regions were bound by endogenous MBD2 (Figure 1D and G). Altogether, these data indicated that, in HMEC-hTERT and HMLER cells, the endogenous MBD2 proteins associated predominantly methylated DNA regions, as previously reported from ectopic expression of tagged-MBD2 proteins in other cellular models (23,24,53). The relationship between DNA methylation and MBD2 binding was also observed at Alu sequences. Alu sequenced are classified into three main groups depending on the age of the sequence (RepeatMasker table download from UCSC). The younger sequences, AluY, were found to be more methylated than the AluJ (older Alu sequences). The AluS, intermediate in age, exhibited an intermediate level of DNA methylation (Supplementary Figure S4C). The distribution of MBD2 read densities on these Alu sequences was parallel to the DNA methylation profiles (Supplementary Figure S4B).

When CpG islands (CGIs, UCSC database) were classified according to their length and plotted against MeDP-reads, the shorter CGIs tended to exhibit an increased read density (Figure 1E and H). These short CGIs were also enriched in MBD2 reads (Figure 1E and H), showing that MBD2 proteins targeted CpG-rich sequences when methylated. The clustering of CGIs according to their MBD2 ChIPseq or MeDPseq read densities led to the identification of a CGI subgroup where MBD2 binding or DNA methylation were detectable mainly on the shore of the islands, while another subgroup shown a preferential enrichment at the core sequences (Supplementary Figure S5A and D).

Identification of enriched K-mer in MBD2 peaks using RSAT tool failed to identify any sequence specificity except the presence of CpG sites (Supplementary Table S3). Altogether, these data indicated that DNA methylation is the main parameter driving MBD2 deposition.

MBD2 is a major DNA methylation-dependent transcriptional repressor

Transcriptomes of HMEC-hTERT and HMLER cells were determined from RNAseq experiments. Genes with a methylated DNA region within ±1 kb of their TSS showed a low transcriptional level (Supplementary Figure S5). Similarly, the transcriptional level of genes with MBD2 peaks within ±1 kb of their TSS was low (Supplementary Figure S6). Thus MBD2 binding of promoter was linked to gene silencing.

The effects of MBD2 depletion and DNA methylation inhibition on gene transcription were then assessed. High-throughput sequencing of poly-adenylated RNA (RNAseq) were performed with RNA extracted from HMLER cells treated with either siMBD2 (siRNA targeting *MBD2* transcripts (37,54)) or 5-aza-deoxycytidine (DAC). Non-specific siRNA was used as a control. The analysis of the data was performed from duplicate RNAseq experiments (Supplementary Table S4). RNAseq analysis indicated a reduction of 89.5 ± 0.33% of MBD2 mRNA in siMBD2-treated HMLER cells, while the levels of MeCP2 and MBD1 tran-

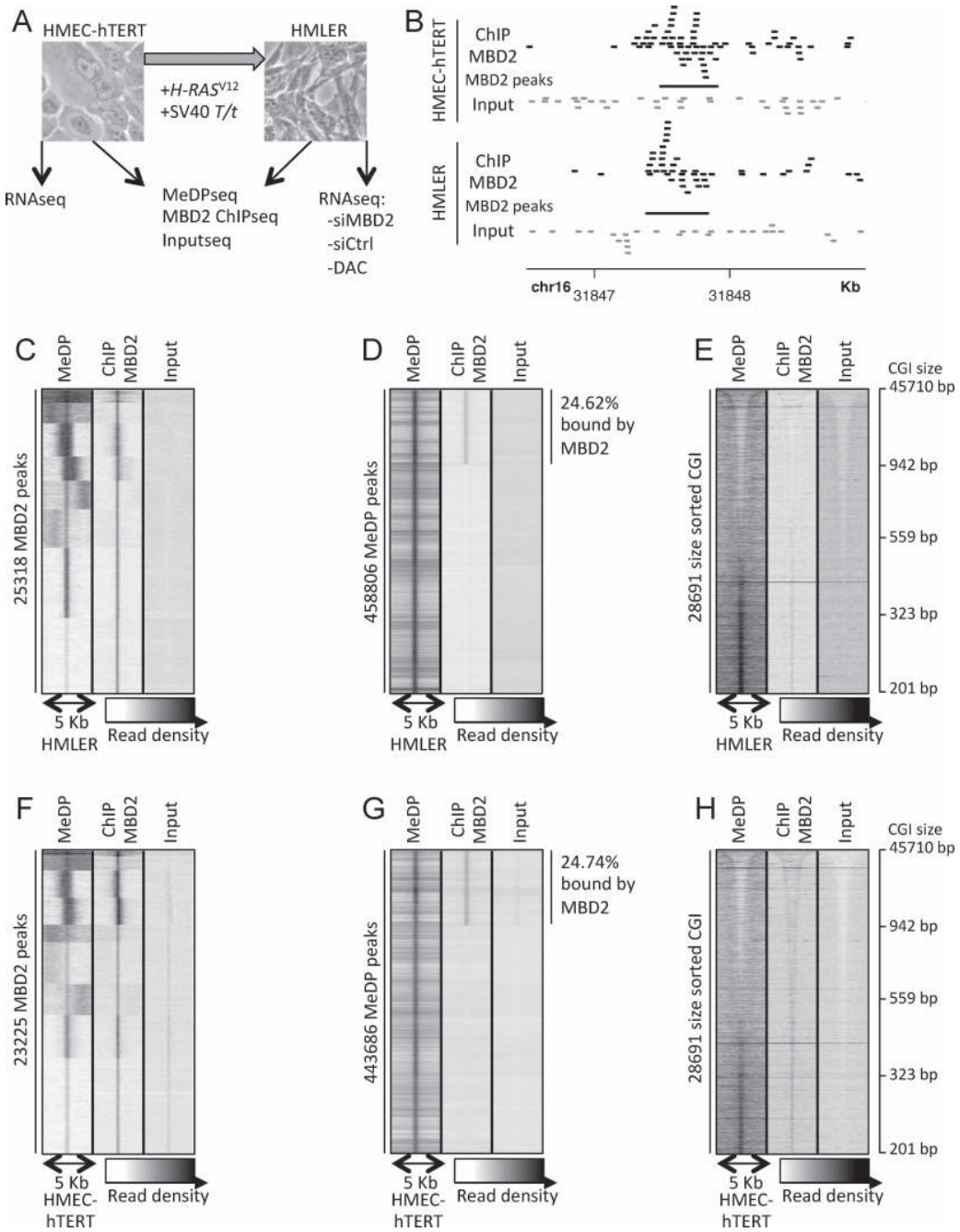


Figure 1. Endogenous MBD2 proteins bind methylated DNA regions. (**A**) Experimental scheme; the transformed mesenchymal HMLER cell line is derived from the immortalized epithelial HMEC-hTERT cells by oncogenic transformation using *H-RAS*^{V12} and SV40 *T*/*t* oncogenes. Sequencings were performed on a pool of five independent experiments. (**B**) Reads visualization at a MBD2 peak present in each cell line; MBD2 reads in black, input reads in gray, MBD2 peaks in black bars. Reads matching the + and − strands are on top and bottom, respectively. (**C** and **F**) Read density of MeDPseq, MBD2 ChIPseq and Input at each MBD2 peak. (**D** and **G**) Read density of MeDPseq, MBD2 ChIPseq and input at each MeDP peak. (**E** and **H**) Read density of MeDPseq, MBD2 ChIPseq and input at each CpG island (CGI), sorted by their size. (C to E) HMLER cell line. (F to H) HMEC-hTERT cell line.

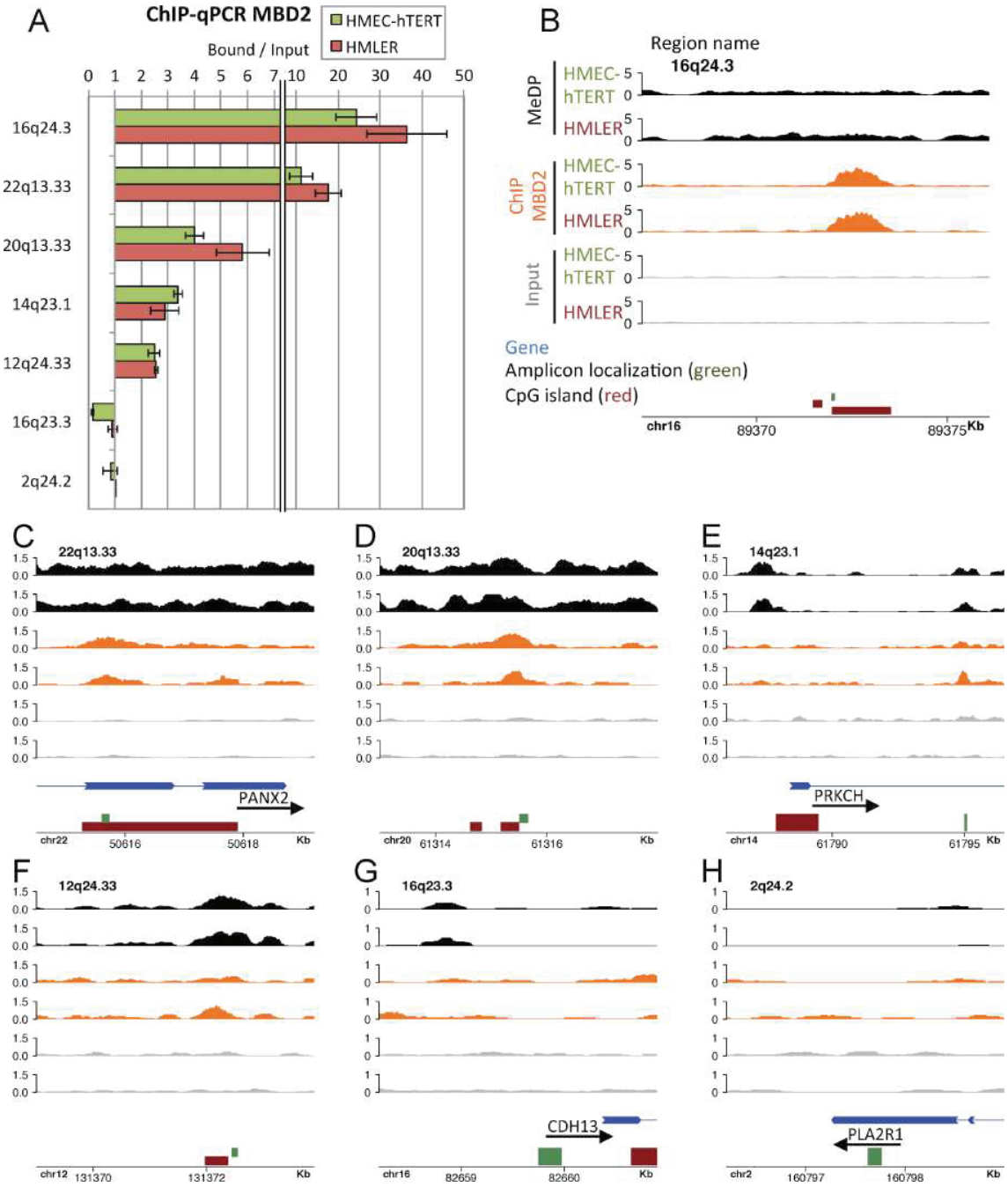


Figure 2. Concordance between ChIP-qPCR and ChIP-MBD2 at various genomic locations. (**A**) ChIP-qPCR experiments mapping MBD2 binding sites, in HMEC-hTERT cells (green) and HMLER cells (red). Each experiment was performed in duplicate. (**B**–**H**) Genome coverage for MeDPseq (black), MBD2 ChIPseq (orange) and Input-seq (gray) in HMEC-hTERT (upper tracks) and HMLER (bottom tracks) at the seven genomic location tested in A. Scales are in Fragments Per Million (FPM); Genes in blue, CpG islands in red; qPCR amplicon localization in green.

scripts were not affected (Supplementary Table S4). This downregulation was also observed at protein level as shown by western blot analysis (Figure 3A). Digestion of genomic DNA with HpaII, a restriction enzyme inhibited by CpG methylation, indicated that DAC induced a global DNA hypomethylation of HMLER cells (Supplementary Figure S7). Parallel sequencing of PCR fragments indicated that all the nine methylated genes analyzed were hypomethylated after DAC treatments (Supplementary Table S2). The classification of the sequenced molecules according to their methylation patterns indicated that this hypomethylation was not randomly distributed but corresponded to a mixture of fully demethylated molecules and unaffected molecules (data not shown).

Among the 14,814 genes whose expression level could be reliably assessed in our experiment (see materials and meth-

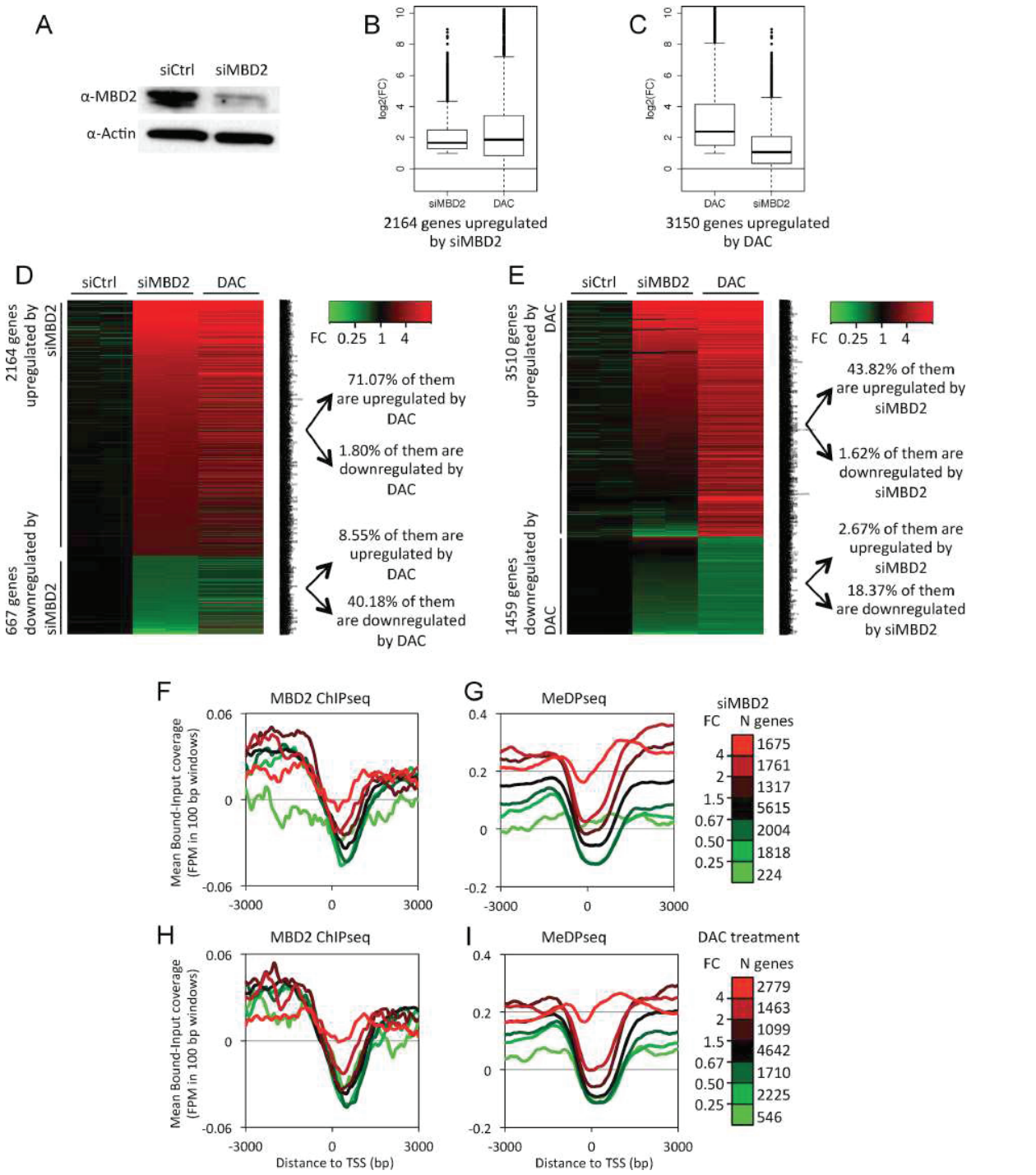


Figure 3. MBD2 is a methylation-dependent transcriptional repressor in HMLER cells. (**A**) Immunoblot analysis of MBD2 proteins in siRNA treated HMLER cells. (**B**) Box plots depicting the fold changes (FC) of the transcription levels of genes upregulated upon MBD2 depletion (siMBD2) and the FC of the same genes in 5-aza-deoxycytidine treated cells (DAC). The upregulated genes were defined as genes exhibiting a FC ≥ 2 with a P value ≤ 0.01. (**C**) Box plots depicting the FC of the transcription levels of genes upregulated upon DAC treatments and the FC of the same genes in MBD2-depleted HMLER cells. (**D**) Heat maps of genes upregulated or downregulated upon siRNA targeting MBD2. Most genes upregulated by MBD2 depletion were also upregulated by DAC treatments. (**E**) Heat maps of genes upregulated or downregulated upon DAC treatments. About 44% of the genes upregulated upon DAC treatments were also upregulated by MBD2 depletion. (**F** to **I**) Integrative analysis of ChIPseq and RNAseq. Mean coverages at gene promoters were plotted according to their responses to MBD2 siRNA or DAC treatments. Genes were classified into seven groups according to their responses to either MBD2 depletion or DNA methylation inhibition. N genes: number of genes in each group. For each gene cluster, mean MBD2-read densities and mean MeDP-read densities at the TSS ($\pm$ 3 kb) were determined. (F) MBD2-read density at TSS regions of genes classified by their response to siMBD2. (G) MeDP-read density at TSS regions of genes classified by their response to siMBD2. (H) MBD2-read density at TSS regions of genes classified by their response to DAC treatments. (I) MeDP-read density at TSS regions of genes classified by their response to DAC treatments.

ods section), 14.6% (2,164) were upregulated (fold change greater than 2, and P-value ≤ 0.01) upon siMBD2 treatments. In line with the previous experiments showing that MBD2 associated methylated DNA regions (Figure 1), a large proportion (∼70%) of these upregulated genes were also found upregulated in HMLER cells treated with DAC (Figure 3B and D). Conversely, a subset of genes (∼40%) upregulated in DAC-treated HMLER cells was also upregulated upon MBD2 depletion (Figure 3C and E).

Cross analyses of RNAseq, MBD2 ChIPseq and MeDPseq experiments were performed by plotting MBD2-read densities and MeDP-read densities at the TSS (±3 kb) of genes classified in seven clusters according to their responses to either MBD2 depletion or DNA methylation inhibition. These data are summarized in Figure 3F–I and indicated that the upregulated genes upon MBD2 depletion were enriched in MBD2-reads near their TSS in untreated cells (Figure 3F, red curves). Therefore, MBD2 gene repressions were likely due to MBD2 binding at promoter regions. As expected from the correlation between MBD2 binding and DNA methylation, the TSS regions of these upregulated genes were also enriched in MeDP-reads. (Figure 3G, red curve). Conversely, the genes upregulated upon hypomethylation of HMLER cells were enriched in MBD2-reads and MeDP-reads (Figure 3H and I, red curves).

Enhancers are distal regulatory elements that can impact gene transcription levels. Andersson *et al.* (55) identified 66,942 enhancer-TSS association in the human genome. The clustering of these enhancers according to their MBD2 ChIPseq (Supplementary Figure S8A) or MeDPseq read densities (Supplementary Figure S8B) indicated that 6.412 and 10,896 enhancers were bound by MBD2 or methylated, respectively, in HMLER cells. Genes associated with MBD2-positive enhancers or methylated enhancers were significantly underexpressed (Supplementary Figure S8C). A subset of these genes was upregulated upon treatments with siMBD2 (Supplementary Figure S8D) or with DAC (Supplementary Figure S8E).

Genes close to a CGi, exhibiting a methylated or a MBD2 positive core region, were expressed at a low level when compared with genes associated with unmethylated/MBD2-free CGi (Supplementary Figure S5B and E). Furthermore, DAC and siMBD2 treatments led to an upregualtion of the genes associated with methylated/MBD2-positive CGi-core regions (Supplementary Figure S5C and F). Although significantly less affected, the transcription level of genes associated with methylated or MBD2-positive CGi-shore regions were also downregulated (Supplementary Figure S5B and E), while inhibition of DNA methylation or MBD2 depletion upregulated these genes (Supplementary Figure S5C and F). Thus, the repressive forces of DNA methylation and MBD2 binding seem to be positively correlated with CpG density.

A similar effect of MBD2 depletion or inhibition of DNA methylation was also observed at repeated elements. Depletion of MBD2 or DAC treatments induced a small increase of the steady state level of transcripts corresponding to AluY elements while the transcription level of the unmethylated and MBD2-free AluJ elements were unaffected by these treatments (Supplementary Figure S4A).

These data highlighted the role of MBD2 in the DNA methylation-dependent gene repression and indicated that, for a large subset of genes, a loss of MBD2 or a demethylation have similar effects leading to their upregulation. Thus, we investigated the contribution of these two epigenetics events, MBD2 deposition and DNA methylation, on the downregulation associated with the transformation of immortalized HMEC-hTERT cells.

Dynamics of MBD2 deposition during oncogenic transformation

Differential MBD2 binding profiles between HMEC-hTERT and HMLER cells were determined by quantitative comparison of MBD-peaks (48) identified by ChIPseq analyses. A high number (17,899) of MBD2 peaks was not affected by the transformation process (Figure 4A). However, 5,326 regions (22.9%) associated by MBD2 in HMEC-hTERT cells lost MBD2 in HMLER, while 7,419 (29.3%) regions gained MBD2 binding in HMLER cells when compared with MBD2 profiles in HMEC-hTERT (Figure 4A). DNA methylation changes were more limited in proportion as HMEC-hTERT and HMLER cells shared 393,631 DNA methylation peaks while 49,995 regions (11.2%) were HMEC-hTERT specific and 65,115 regions (14.1%) were HMLER specific (Figure 4B).

To investigate if MBD2 redistributions were due to local DNA methylation changes, we analyzed changes in MeDPseq read density at MBD2 peaks shared by both cell lines, or unique to either HMEC-hTERT or HMLER (Figure 4C). The mean values (number of HMLER MeDP-reads minus HMEC-hTERT MeDP-reads) were near zero for all MBD2-peak categories. However, a few outliers did show a strong decrease of DNA methylation in regions losing MBD2, and a strong increase of DNA methylation in regions gaining MBD2. ChIP-qPCR experiments have exemplified this latter point at several chromosomal locations such as 10q11.22, 10p15.1 and 1p36.33 (Supplementary Figure S2A).

Thus, at some methylated sites MBD2 deposition was not observed in HMEC-hTERTcells, while these sites were associated by MBD2 in HMLER cells. These data indicated that MBD2 deposition is a dynamic process not exclusively driven by DNA methylation changes.

MBD2 is involved in the repression of genes downregulated in oncogenic HMLER cells

Interestingly, genes downregulated during the transformation of HMEC-hTERT gained MBD2-reads and MeDP-reads at TSS regions (Figure 4D and E, red curves). Furthermore, more than 50% (1,168 of 2,164) of genes upregulated upon MBD2 depletion in HMLER cells were genes downregulated during the transformation process (Figure 4F and G). Read densities at the MBD2 peaks nearest to the annotated TSS of these 1,168 genes were visualized by heat maps showing read density from the MBD2-reads and the MeDP-reads. At least half of these regions were enriched in MBD2 in HMLER cells when compared with HMEC-hTERT cells (Figure 4H).

Data obtained for *TFPI2*, *LINC00842*, *OSR2*, *CLDN6* and *TNFRSF12A* genes illustrate this analysis (Figure 5E–

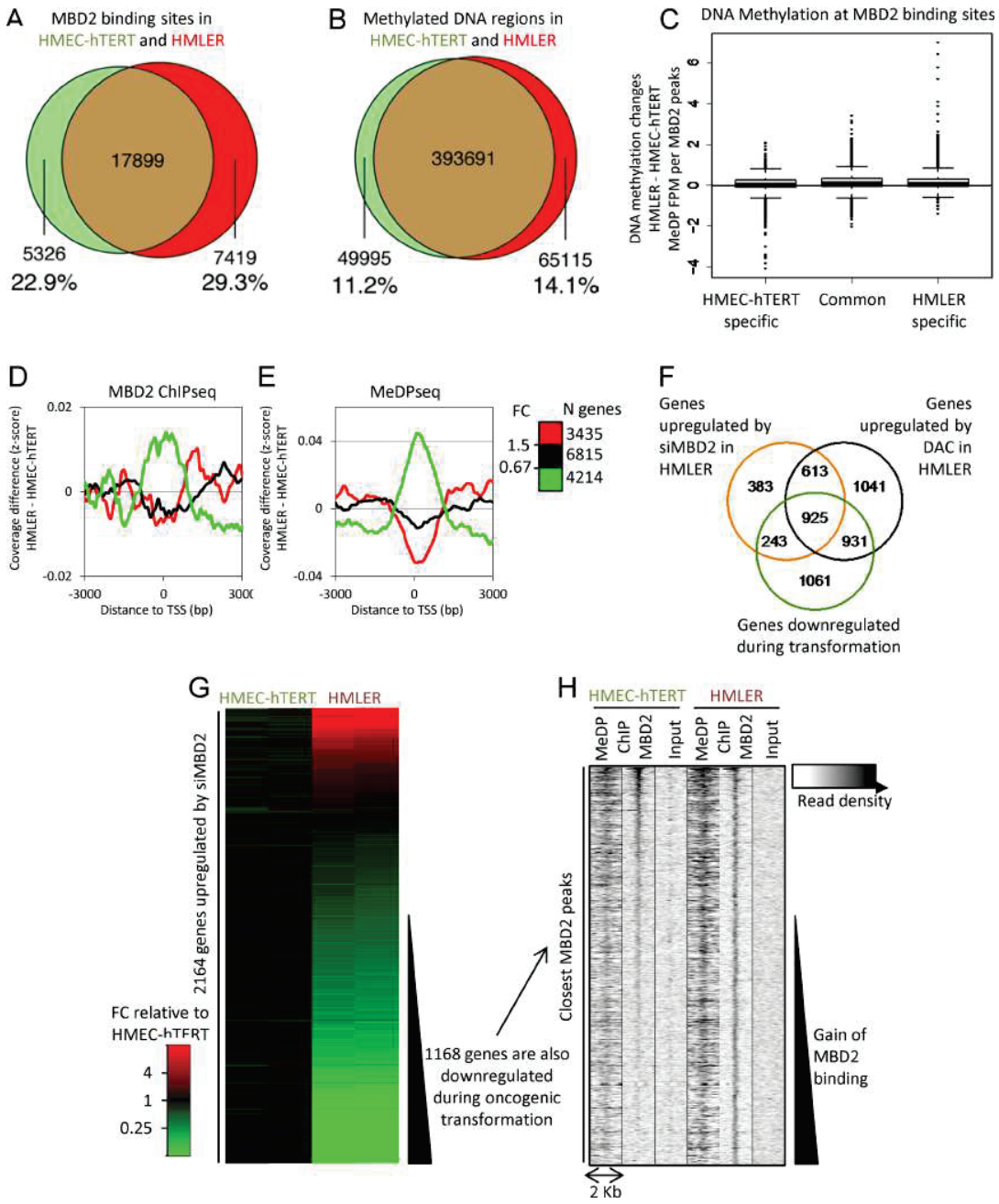


Figure 4. Dynamics of MBD2 distribution during oncogenic transformation. (**A**) Venn diagram depicting the overlap between MBD2 binding sites of HMEC-HTERT and HMLER cells; in green: regions that significantly lose MBD2 during transformation (P value ≤ 0.01), in red: regions that significantly gain MBD2 during transformation (P value ≤ 0.01), in brown: common regions. (**B**) Venn diagram depicting the overlap between methylated DNA regions of HMEC-HTERT and HMLER cells; in green: regions that significantly lose DNA methylation during transformation (P value ≤ 0.01), in red: regions that significantly gain DNA methylation during transformation (P value ≤ 0.01), in brown: common methylated DNA regions. (**C**) DNA methylation changes at MBD2 binding sites. Differences in MeDP coverage (FPM, Fragments Per Million) at MBD2 peaks were computed for regions bound by MBD2 in both cell lines, losing MBD2 or gaining MBD2 in HMLER when compared with HMEC-hTERT. (**D** and **E**) Genes were classified according to their differential expression level (FC) between HMEC-HTERT and HMLER cells. (D) Genes downregulated during oncogenic transformation gain MBD2-reads near their TSS (red curve), in contrast to unaffected (black curve) or downregulated genes (green curve). (E) Genes downregulated during oncogenic transformation exhibited gain of MeDP-reads near their TSS (red curve), in contrast to unaffected (black curve) or downregulated genes (green curve) (**F**) Venn diagram depicting the overlap between genes upregulated upon MBD2 depletion, DAC treatments and genes downregulated in HMLER cells when compared with HMEC-hTERT cells. A large proportion of genes downregulated during oncogenic transformation was also upregulated upon MBD2 depletion and DNA methylation inhibition in the transformed HMLER cell line. (**G**) Transcription level modification between HMEC-hTERT and HMLER, of the 2,164 genes upregulated after a siMBD2 treatment in HMLER. Around 1,168 of these genes are expressed at least two times less in HMLER than in HMEC-hTERT. (**H**) Read densities from MeDPseq, MBD2 ChIPseq and Input-seq in HMEC-hTERT and HMLER, at the closest MBD2 peaks in HMLER cells form the TSS of the 1,168 genes identified in (G). Around half of these regions shown an increase MBD2 ChIPseq read density in HMLER as compared to HMEC-hTERT.

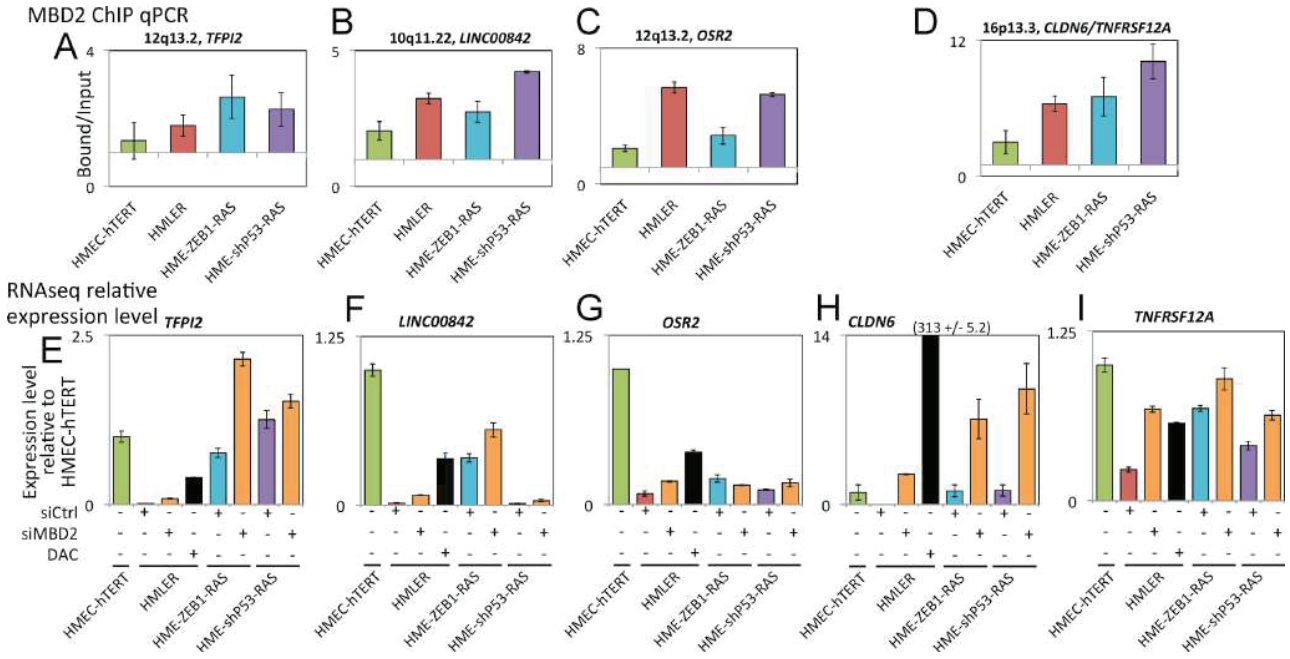


Figure 5. Examples of genes repressed by MBD2 during oncogenic transformation. (**A**–**D**) MBD2 ChIP-qPCR at four genomic regions corresponding to five gene promoters in the HMEC-hTERT cell line and the transformed HMLER, HME-ZEB1-RAS and HME-shP53-RAS cell lines. These regions exhibited an increase of MBD2 binding during oncogenic transformation. Each experiment was performed two times independently. (**E**–**I**) Relative expression of five genes in HMEC-hTERT, HMLER treated with a control siRNA (siCtrl), a siRNA targeting *MBD2* (siMBD2) or 5-aza-deoxycytidine (DAC), HME-ZEB1-RAS treated with a control siRNA or a siRNA targeting *MBD2* and in HME-shP53-RAS treated with a control siRNA or a siRNA targeting *MBD2*. Expression levels were estimated from RNA sequencing duplicates.

I and Supplementary Figure S9A). MBD2 deposition near the TSS of these genes was increased during oncogenic transformation (Supplementary Figure S2 and Figure 5A–D). These genes were downregulated during oncogenic transformation. Depletion of MBD2 by siRNA led to an upregulation of these genes in the transformed cell line HMLER (Figure 5E-I). These data indicated that MBD2 participated in the establishment of transcriptomic changes induced by oncogenic transformation.

Dynamics of MBD2 deposition upon oncogenic transformation of immortalized human mammary cells by ZEB1 expression or P53 depletion

Transcriptomic analyses of HMLER cells treated with siMBD2 or siControl indicated that MBD2 depletion led to an upregulation of genes that are silenced upon the transformation of HMEC-hTERT cells by expressing SV40 *T/t* antigens and *H-RAS*^{V12} genes. It has been shown that the expression of SV40-derived sequences affects several other pathways in addition to pRB and P53 (56), raising the possibility of a SV40-dependent redistribution of MBD2 proteins. Among the mechanisms able to cooperate with the expression of mutated *H-RAS* during neoplastic processes, the expression of the transcription factor *ZEB1* or the disruption of P53-pathways seem to play crucial roles (57,58). Thus, the involvement of MBD2 in the control of gene expression was investigated in two cellular models (Figure 6A) in which SV40 *T/t*-antigens expression were replaced by *ZEB1* gene expression (HME-ZEB1-RAS cell line) or a shRNA targeting *P53* transcripts (HME-shP53-RAS cell line) (35,36). When induced, both cell lines exhibited, as the HMLER cells, a mesenchymal phenotype and malignant properties (33,35,36).

We induced MBD2 depletion in HME-ZEB1-RAS and HME-shP53-RAS cells by siMBD2 treatments, and differential gene expression profiles between siMBD2 and siControl treated cells were determined from RNAseq experiments (Figure 6A). Transient transfection of siMBD2 resulted in a reduction of 89.0 $\pm$ 0.33% and 91.3 $\pm$ 0.25% of MBD2 transcripts in HME-ZEB1-RAS and HME-shP53-RAS cells, respectively (Supplementary Table S3), and a large decrease in MBD2 proteins was also observed from western blot analyses (Figure 5B).

We identified 584 genes upregulated by MBD2 depletion in at least two cell lines (Figure 5C, fold change $\geq$ 2, P value $\leq$ 0.01). A large subset (247, 42.3%) of these genes were downregulated during oncogenic transformation (Figure 6D). According to our ChIPseq data, at least half of the MBD2 peaks near the TSS of these 247 genes shown an increase MBD2 binding in HMLER as compare to HMEC-hTERT (Supplementary Figure S10). MBD2 ChIP-qPCR assays performed at genomic locations previously analyzed (Figure 2 and Supplementary Figure S2) indicated that MBD2 binding profiles identified in HMLER cells were frequently similar in HME-ZEB1-RAS and HME-shP53-RAS cells (Figure 7). Notably, various losses (17q25.3, 1q21.3) or gains (9q21.12, 10p15.1, 1p36.33, 8q22.2, 16p13.3) of MBD2 binding during oncogenic transformation were reproduced in these two models (Figures 5A–D, 7B and Supplementary Figure S9B). As ex-

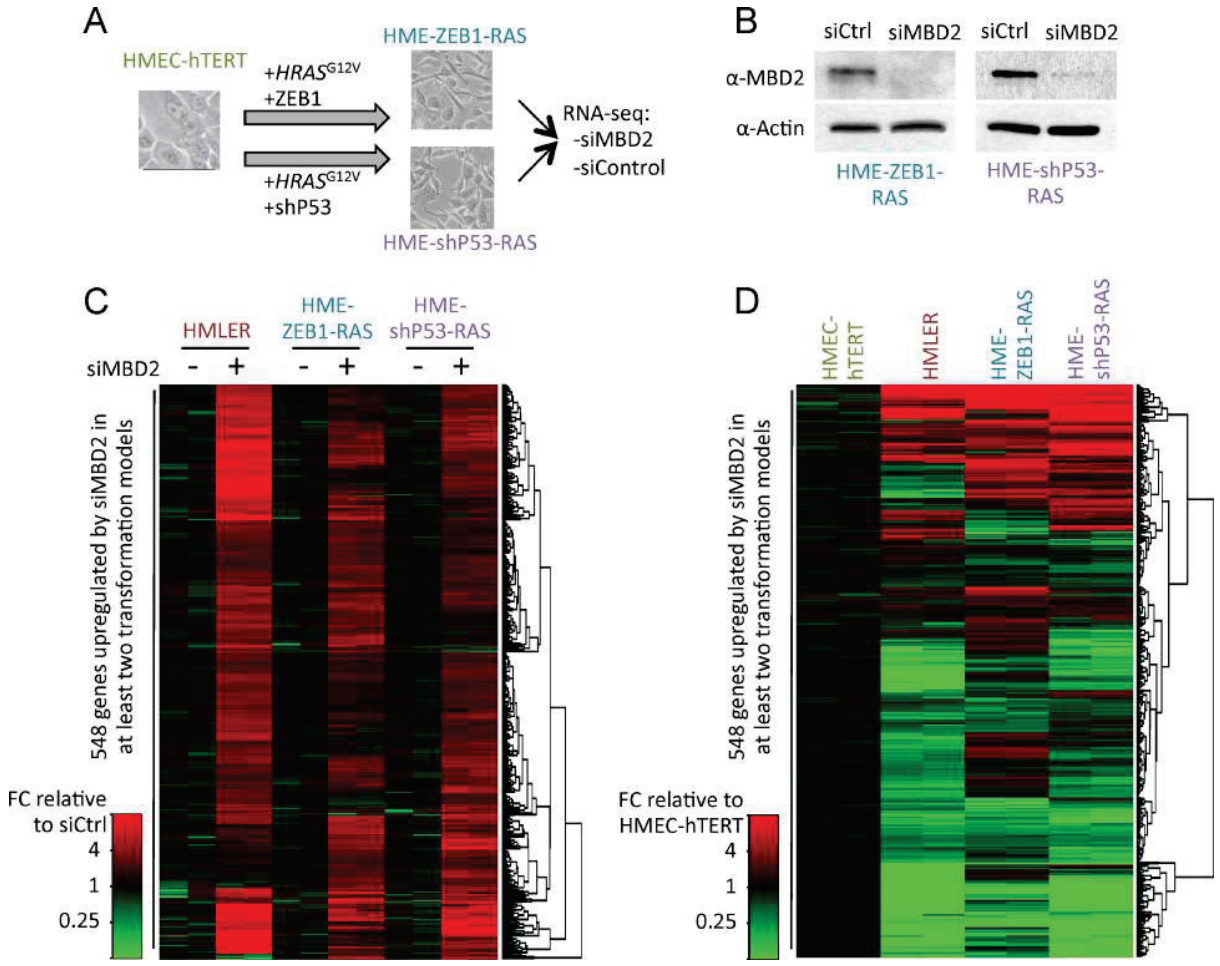


Figure 6. MBD2 repressed a common set of genes during oncogenic transformation. (**A**) Experimental scheme of generation of two cell lines from HMEC-hTERT cells by oncogenic transformation. HME-ZEB1-RAS cells were obtained by the expression of the embryonic transcription factor ZEB1 and H-RAS^{V12}, and HME-shP53-RAS cells were obtained by the expression of a shRNA targeting P53 and H-RAS^{V12} genes. (**B**) Immunoblot analysis of MBD2 protein level in HME-ZEB1-RAS and HME-shP53-RAS upon siRNA treatment targeting *MBD2*. (**C** and **D**) Heat maps summarizing genes downregulated (green) or upregulated (red). (C) A set of 548 genes was upregulated in MBD2 knockdown cell lines. (D) Most of these genes upregulated by siRNA against MBD2 in transformed cell lines were genes that are downregulated during oncogenic transformation.

pected from genome-wide data, parallel sequencing of PCR fragments obtained from bisulfite-modified DNA indicated that MBD2 deposition was correlated with DNA methylation in HME-ZEB1-RAS and HME-shP53-RAS cells at the 10 genes analyzed (Supplementary Table S2).

Altogether, these data suggest that MBD2 is involved in the regulation of gene expression during the transformation of HME-ZEB1-RAS and HME-shP53-RAS cells. This role is thus likely to be independent of the strategies involved in the abrogation of oncosuppressive barriers.

Genes repressed by MBD2 in transformed cell lines may contribute to the epithelial phenotype

Genes upregulated by MBD2 depletion in HMLER, HME-ZEB1-RAS and HME-shP53-RAS were investigated for their Gene Ontology terms and their KEGG pathways contributions by Gene Set Enrichment Analysis (GSEA). Enriched Gene Ontology terms were of various natures but include EXTRACELLULAR_REGION, BASEMENT_MEMBRANE, INTEGRIN_COMPLEX (Supplementary Table S5). Enriched KEGG pathways included KEGG_CELL_ADHESION_MOLECULES_CAMS, KEGG_FOCAL_ADHESION (Supplementary Table S4). Although genes repressed by MBD2 in the transformed cell lines showed a wide diversity of functions, some of them appeared to be associated with the epithelial phenotype. Their downregulation by MBD2 may contribute to the epithelio-mesenchymal transition induced by the oncogenic transformation of these cells.

DISCUSSION

It has long been known that DNA methylation patterns are altered in cancer cells (59,60), these modifications include global loss of 5-methylcytosines and local hypermethylations (61,62). Aberrant methylations at CpG islands have been extensively studied in past years since such hypermethylations have been found at the 5′ regulatory sequences of many tumor suppressor genes and associated with their

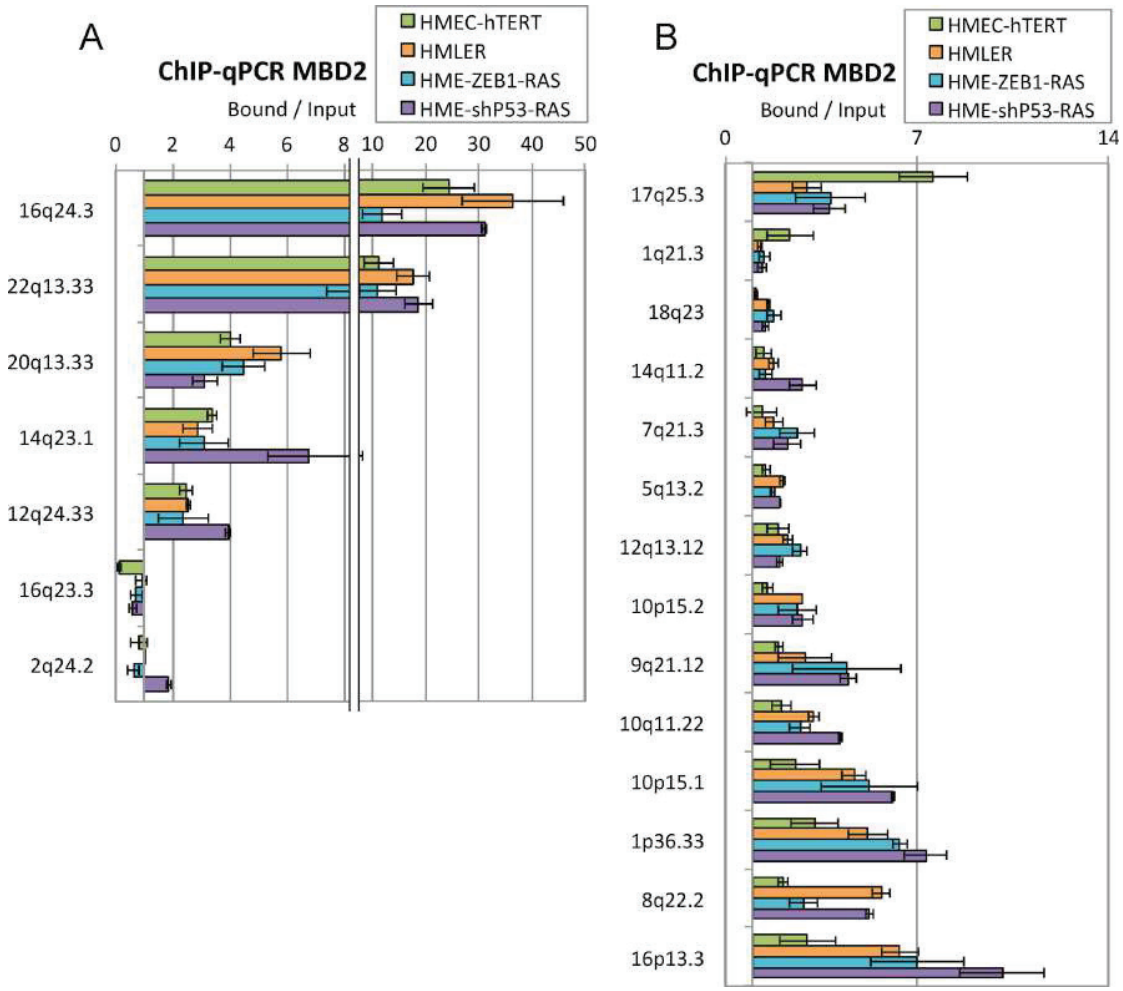


Figure 7. MBD2 ChIP-qPCR experiments from HMEC-HTERT, HMLER, HME-ZB1-RAS and HME-shP53 cell lines. Error bars represent average deviation from two independent experiments. (**A**) MBD2 binding at several positive and negative regions. (**B**) MBD2 redistribution in the genome during oncogenic transformation was frequently concordant in the different transformed cell lines.

silencing (3,63). Although the expression level of genes in their tissue of origin may influence their methylation status in the corresponding cancer cells (64), genome-wide studies have shown that hundreds of genes exhibiting hypermethylated CpG island at their 5′ end were never methylated from embryonic development onward (3).

From the first studies using *in vitro* methylated gene expression vectors, accumulating evidence indicates that the methylation of CpG rich sequences at the 5′ end of a gene provides a strong signal for maintaining/inducing gene silencing (65,66). In cell lines, inhibition of DNA methylation by cytosine analog (17) or DNMT1 knockdown (67,68) leads to the re-expression of many methylated genes. This relationship has been also observed in living animals. For example, conditional inactivation of DNMT1 causes aberrant gene expression of many genes in mouse fibroblasts (69).

Histone deacetylation, histone methylation and chromatin compaction are major events involved in gene repression and DNA methylation is associated with these chromatin modifications (70,71). The importance of proteins associating DNA sequences was suggested many years ago by *in vitro* transcription assays showing that the methylation of templates does not prevent transcription (72), while methylated vectors are not transcribed in living cell (65,73). From these pioneering works, it had been established that specific proteins from different families recognize methylated DNA. Among these proteins, the proteins containing a methyl-CpG binding domain were the first discovered (13,74) and many studies have indicated that the MBD proteins are good candidates for interpreting the methylation signals (9,10). In contrast with transcription factors, the sequence specificities of these proteins does not seem to be very stringent. *In vitro* assays indicate that MBD1 has a higher affinity for meCGCA or TGmeCGCAsites (75), while MeCP2 preferentially associates methylated CpG followed by a run of four or more A/T bases (76). However, the presence of symmetrically methylated CpGs seems to be the major determinant of their binding since multiple methylated CpGs can override their sequence preference at methylated sites (75,76). Biochemical studies of MBD2 have also indicated a preference for a short sequence CmeCGA

(77). In line with this finding, CCG sequences are preferentially found in many MBD2 genomic targets (77). However, this observation might be biased by over-representation of methylated CpG-rich sequences among the genomic targets of MBD2 (37,78–82).

The intracellular concentrations of each MBD protein may also influence their targeting, for example, in neurons MeCP2 is highly expressed and tracks methyl CpG densities (83). In HeLa cells, clearance of MBD2 by siRNA at the BRCA1-NBR2 locus does not promote the binding of the endogenous MeCP2 or MBD1 proteins. However, overexpression of a vector coding for MeCP2 induces its binding at this site (37). In mice, knockdown of the individual MBD proteins, MeCP2, MBD1 or MBD2 (84–86) results in the upregulation of many genes but not in global misexpression of endogenous methylated genes. Thus, other members of the family might compensate for the absence of a specific MBD since many cell and tissue types express multiple MBD proteins. Nevertheless, the deletion of a specific MBD protein leads to specific phenotypes (10), indicating a functional specificity for these proteins and gene candidate analysis has provided examples of gene specific upregulation.

Altogether, these data argue against a full redundancy between MeCP2, MBD1 and MBD2, and suggest that the distribution of MBD proteins across the methylated regions might represent an additional level in the interpretation of the DNA methylation marks. Indeed, our analysis of the MBD2 binding profiles during the oncogenic transformation of immortalized human mammary cells indicates that the modifications of MBD2 distribution are, for a subset of genes, independent of DNA methylations changes.

Although chromatin immuno-precipitation of endogenous MBD proteins has proven challenging (23,24,53), we have performed ChIPseq against endogenous MBD2 proteins in two isogenic cell lines in order to take into account the cell-specific regulation of MBD2. Despite the significant differences in technologies, ChIPseq data correlated well with those obtained from MBD2 ChIP-chip experiments. ChIP-qPCR on arbitrary chosen negative or positive regions also showed a good concordance between data obtained from ChIP-qPCR and ChIPseq experiments. Furthermore, MBD2 depletion upon siRNA treatments strongly reduced MBD2 ChIP efficiency on these regions. Thus, the data obtained from ChIPseq experiments performed from antibodies directed against the endogenous proteins seem to be representative of the MBD2 binding profiles of the studied cell lines.

The identification of MBD2 binding sites has provided an opportunity for the search of *in vivo* sequence preferences driving MBD2 deposition. In line with previous biochemical analyses, we did not detect any over-represented sequences in the MBD2 peaks, CG sequence excepted. Nevertheless, the proposed preference for a CCG sequence (77) may escape this analysis since this short sequence is over-represented in CpG islands.

The lack of consensus sequence and the strong enrichment in methylated CpGs at MBD2 peaks support a direct relationship between DNA methylation and MBD2 binding, at least in HMEC-hTERT and HMLER cells. The method used for the mapping of methylated DNA regions was based on the selection of methylated DNA fragments using recombinant proteins associating methylated CpGs. Thus, selected fragments can contain additional CpGs that were not methylated, preventing a direct evaluation of the methylated-CpG density. Nevertheless, combining the mapping of MBD2-tagged proteins with single base pair resolution methylomes allow the establishment of a linear relationship between MBD2 enrichment and methylation density, in neuronal cells (24). It should be noted that, for a minority of MBD2 binding sites, additional events participate in MBD2 deposition. Indeed, we observed that some MBD2 peaks were not associated with methylated DNA regions. In line with this observation, it has been proposed that the NuRD complex mediates the binding of MBD2 to unmethylated DNA regions (24). Altogether, these data indicate that the main determinant for MBD2 binding is the methylation status of the DNA in both HMEC-hTERT and HMLER cells. Furthermore, about 25% of the methylated DNA regions identified from MeDPseq matched MBD2 binding sites. Although we cannot exclude that other methyl DNA binding proteins associated the same methylated DNA regions (82), MBD2 seems to be an important player in the epigenetic machinery in HMEC-hTERT and HMLER cells.

MBD2 knockdown experiments were also in favor of an involvement of MBD2 in the downregulation of many methylated genes. Depletion of MBD2 by siRNA induced an upregulation of about 2,000 genes and 70% of these genes were also upregulated by a DAC treatments in HMLER cells. The analysis of TSS regions of genes upregulated upon MBD2 depletion in untreated HMLER cells indicated that these genes were enriched in MBD2 and DNA methylation marks when compared with genes unaffected or downregulated by MBD2 siRNA. Conversely, the TSS regions of genes upregulated by DAC were enriched in MBD2 when compared with unaffected or downregulated genes upon DNA hypomethylation. The impact of MBD2 depletion on gene expression was globally less stringent than DAC treatments. DNA hypomethylation induced the upregulation of a higher number of genes than MBD2 depletion and higher fold changes in gene expression. It is tempting to explain these differences by the involvement of other MBD proteins and of MBP proteins from other families in the repression of methylated genes. However, the distinct nature of both treatments prevents a quantitative comparison, since data may be biased by differences in treatment efficiencies and kinetics. Further analysis of our data at non-promoter regions indicated that DNA methylation at enhancer sequences was correlated with low transcriptional activity of the genes potentially regulated by these elements, as previously reported in embryonic stem cell (87). Furthermore, a correlation between MBD2 deposition at enhancer sequences and low transcriptional activity was also observed, suggesting that MBD2 may modulate the activity of regulatory regions not directly associated with the 5′ end gene regions. These data also confirm that MBD2 plays an important role in the interpretation of DNA methylation signal in HMLER cells.

In the isogenic cellular model studied, the immortalized cells (HMECT-hTERT) and the oncogenic cells HMLER, most of the MBD2 binding sites were shared by both cell lines. However, oncogenic transformation was associated with a partial redistribution of MBD2 pro-

teins, 5,326 MBD2-positive regions in HMEC-hTERT lost MBD2 binding in HMLER, while 7,419 regions in in HMEC-hTERT gained MBD2 in HMLER cells. Such redistribution may be in part explained by local DNA methylation changes. Nevertheless, the majority of the regions gaining or losing MBD2 in HMLER exhibited comparable MeDPseq-read densities in both cell lines. This redistribution of MBD2 was also observed at promoter regions and associated with the modulation of the transcriptional activity of the corresponding genes. Among the 3,160 genes downregulated in transformed cells, 380 genes were methylated at their promoter regions in both cell lines, specifically associated by MBD2 in HMLER cells, and upregulated upon MBD2 depletion in HMLER. Thus, the redistribution of MBD2 proteins occurring in HMLER cells seemed, at least for a subset of genes, independent of DNA methylation changes. As observed for MeCP2 (76), not all the potential MBD2 binding sites were precipitated by MBD2 antibodies suggesting that additional factors are involved in MBD2 deposition. Several hypotheses, not mutually exclusive, could explain these specific profiles: competition with transcription factors (26), steric hindrance due to chromatin proteins, stabilization of the interaction between MBD2 and methylated DNA by other proteins. Although the precise mechanisms driving the specificity of the MBD family protein profiles remain to be experimentally established, redistribution of MBD2 proteins across methylated DNA regions seems to be associated with the transformation process(es) occurring in the immortalized human mammary cell lines cells expressing the SV40 *T*/*t* antigens and *H-RAS*^{V12}, or either *ZEB*1 or a shP53.

HMLER cells were obtained by sequential introduction of hTERT, SV40 large *T*/small *t* antigens, oncogenic *H-RAS*^{V12} genes (33,35) in primary cultures of human mammary epithelial cells. The expression of SV40 sequences affects multiple pathways in human mammary cells (56), raising questions about a SV40-dependent redistribution of MBD2 proteins. We also suppressed the oncosuppressive barriers in HMEC-hTERT cells either by ectopic expression of the transcription factor *ZEB1* or a *P53* depletion. The resulting HMLER cell lines, after introduction of *H-RAS*^{V12} gene, exhibited oncogenic properties and a mesenchymal phenotype (36). In HME-ZEB1-RAS and HME-shP53-RAS, most of the 14 regions exhibiting a gain or loss of MBD2 in HMLER cells showed similar MBD2 binding changes. Furthermore, hundreds of genes upregulated by MBD2 depletion in HME-ZEB1-RAS and HME-shP53-RAS cells were also upregulated in HMLER upon treatment with the siRNA targeting *MBD2*. Thus, the dynamics of MBD2 deposition do seem to be independent of the strategy used for overcoming the oncosuppresive barriers. However, we cannot exclude that a large part of the MBD2 redistributions observed are linked to the introduction of *H-RAS*^{V12}. MBD2 redistribution and its consequences on gene expression have been investigated in experimental models. Nevertheless, it should be noted that ZEB1 reactivation is a common feature of aggressive and undifferentiated human breast cancers, especially in the claudin-low intrinsic subtype (88), and that alterations of P53-pathways play a crucial role in human cancers (89).

The involvement of MBD2 in the oncogenic process has been already suggested. For example, MBD2 repression of *Lect2* gene may participate in polyp formations via Wnt signaling pathways in mice carrying *Apc*^{Min} alleles (29). In human mammary cancer cell lines, the repression of *DAPK1* mediated by MBD2 seems to actively participate in maintenance of their aggressive phenotypes when xenografted into immuno-deficient mice (90). None of these genes was targeted by MBD2 during transformation in the cellular models studied here (Supplementary Table S4). The role of MBD2 in transformation is likely to be due to the repression of multiple targets, which may differ between experimental models or pathologies. Nevertheless, the genes downregulated during the oncogenic transformation of immortalized human mammary cells seem to be preferential targets for MBD2. Furthermore, these genes were preferentially reactivated by MBD2 depletion and enriched in MBD2 binding sites in cell lines constructed from the disruption of oncosuppressive barriers in immortalized cells. It has been reported that in similar cellular models, the major methylation changes at gene promoters occur during the immortalization step, while subsequent steps of oncogenic transformation are associated with subtle modifications of DNA methylation and gene expression (34). In line with these data, we only find minor modifications of the DNA methylation patterns between the immortalized cells, HMEC-hTERT and the oncogenic HMLER cells. Altogether, these data emphasize, at genome-wide level, the role played by the epigenetics readers of DNA methylation during oncogenic transformation. The reprograming of cancer cells may be due to a redistribution of methyl-DNA binding proteins in addition to DNA methylation alterations.

SUPPLEMENTARY DATA

Supplementary Data are available at NAR Online.

ACKNOWLEDGEMENT

We thank Dr Sarah Kabani for critical reading of this manuscript and helpful discussions. We are most grateful to Dr Adrian Bird for the pET-4xMBD vector. We are grateful to ProfileXpert, Monpellier GenomiX and Beijing Genomics Institute for library preparations and high-throughput sequencing experiments.

FUNDING

Ligue Contre le Cancer [to G.D. and P.M.]. LabEx DEVweCAN and Fondation ARC pour la Recherche sur le Cancer [to M.G]. Centre national de la recherche scientifique; University of Lyon; Centre Léon Bérard; Ligue Contre le Cancer; Institut National Du Cancer; Agence Nationale de la Recherche; European Research Council; Fondation Bettencourt. Funding for open access charge: Université Claude Bernard Lyon-1, 43 boulevard du 11 Novembre 1918, 69622 Villeurbanne cedex France.
Conflict of interest statement. None declared.

REFERENCES

1. Deaton,A.M. and Bird,A. (2011) CpG islands and the regulation of transcription. *Genes Dev.*, **25**, 1010–1022.

2. Esteller,M. (2008) Epigenetics in cancer. *N. Engl. J. Med.*, **358**, 1148–1159.
3. Baylin,S.B. and Jones,P.A. (2011) A decade of exploring the cancer epigenome – biological and translational implications. *Nat. Rev. Cancer*, **11**, 726–734.
4. Ehrlich,M. and Lacey,M. (2013) DNA methylation and differentiation: silencing, upregulation and modulation of gene expression. *Epigenomics*, **5**, 553–568.
5. Iguchi-Ariga,S.M. 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.
6. Kim,J. (2003) Methylation-sensitive binding of transcription factor YY1 to an insulator sequence within the paternally expressed imprinted gene, Peg3. *Hum. Mol. Genet.*, **12**, 233–245.
7. Campanero,M.R., Armstrong,M.I. and Flemington,E.K. (2000) CpG methylation as a mechanism for the regulation of E2F activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **97**, 6481–6486.
8. Watt,F. and Molloy,P.L. (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.
9. Bird,A. (2002) DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev.*, **16**, 6–21.
10. Defossez,P.-A. and Stancheva,I. (2011) Biological functions of methyl-CpG-binding proteins. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.*, **101**, 377–398.
11. Baubec,T. and Schübeler,D. (2014) Genomic patterns and context specific interpretation of DNA methylation. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **25**, 85–92.
12. Sasai,N. and Defossez,P.-A. (2009) Many paths to one goal? The proteins that recognize methylated DNA in eukaryotes. *Int. J. Dev. Biol.*, **53**, 323–334.
13. Hendrich,B. and Bird,A. (1998) Identification and characterization of a family of mammalian methyl-CpG binding proteins. *Mol. Cell. Biol.*, **18**, 6538–6547.
14. Nan,X., Ng,H.H., Johnson,C.A., Laherty,C.D., Turner,B.M., Eisenman,R.N. and Bird,A. (1998) Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. *Nature*, **393**, 386–389.
15. Fujita,N., Watanabe,S., Ichimura,T., Tsuruzoe,S., Shinkai,Y., Tachibana,M., Chiba,T. and Nakao,M. (2003) 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.
16. Sarraf,S.A. 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.
17. Jones,P.L., Veenstra,G.J., Wade,P.A., Vermaak,D., Kass,S.U., Landsberger,N., Strouboulis,J. and Wolffe,A.P. (1998) Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription. *Nat. Genet.*, **19**, 187–191.
18. Ng,H.H., Zhang,Y., Hendrich,B., Johnson,C.A., Turner,B.M., 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.
19. 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.
20. Yasui,D.H., Peddada,S., Bieda,M.C., Vallero,R.O., Hogart,A., Nagarajan,R.P., Thatcher,K.N., Farnham,P.J. and Lasalle,J.M. (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.
21. Dhasarathy,A. and Wade,P.A. (2008) The MBD protein family-reading an epigenetic mark? *Mutat. Res.*, **647**, 39–43.
22. Chatagnon,A., Perriaud,L., Nazaret,N., Croze,S., Benhattar,J., Lachuer,J. and Dante,R. (2011) Preferential binding of the methyl-CpG binding domain protein 2 at methylated transcriptional start site regions. *Epigenetics*, **6**, 1295–1307.
23. Günther,K., Rust,M., Leers,J., Boettger,T., Scharfe,M., Jarek,M., Bartkuhn,M. and Renkawitz,R. (2013) Differential roles for MBD2 and MBD3 at methylated CpG islands, active promoters and binding to exon sequences. *Nucleic Acids Res.*, **41**, 3010–3021.
24. Baubec,T., Ivánek,R., Lienert,F. and Schübeler,D. (2013) Methylation-dependent and -independent genomic targeting principles of the mbd protein family. *Cell*, **153**, 480–492.
25. Lee,M.R., Prasain,N., Chae,H.-D., Kim,Y.-J., Mantel,C., Yoder,M.C. and Broxmeyer,H.E. (2013) Epigenetic regulation of NANOG by miR-302 cluster-MBD2 completes induced pluripotent stem cell reprogramming. *Stem Cells*, **31**, 666–681.
26. 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.
27. Rao,X., Zhong,J., Zhang,S., Zhang,Y., Yu,Q., Yang,P., Wang,M.-H.H., Fulton,D.J., Shi,H., Dong,Z. *et al.* (2011) Loss of methyl-CpG-binding domain protein 2 enhances endothelial angiogenesis and protects mice against hind-limb ischemic injury. *Circulation*, **123**, 2964–2974.
28. Sansom,O.J., Berger,J., Bishop,S.M., Hendrich,B., Bird,A. and Clarke,A.R. (2003) Deficiency of Mbd2 suppresses intestinal tumorigenesis. *Nat. Genet.*, **34**, 145–147.
29. Phesse,T.J., Parry,L., Reed,K.R., Ewan,K.B., Dale,T.C., Sansom,O.J. and Clarke,A.R. (2008) Deficiency of Mbd2 attenuates Wnt signaling. *Mol. Cell. Biol.*, **28**, 6094–6103.
30. Laird,P.W., Jackson-Grusby,L., Fazeli,A., Dickinson,S.L., Jung,W.E., Li,E., Weinberg,R.A. and Jaenisch,R. (1995) Suppression of intestinal neoplasia by DNA hypomethylation. *Cell*, **81**, 197–205.
31. Eads,C.A., Nickel,A.E. and Laird,P.W. (2002) Complete genetic suppression of polyp formation and reduction of CpG-island hypermethylation in Apc(Min/+) Dnmt1-hypomorphic Mice. *Cancer Res.*, **62**, 1296–1299.
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. Elenbaas,B., Spirio,L., Koerner,F., Fleming,M.D., Zimonjic,D.B., Donaher,J.L., Popescu,N.C., Hahn,W.C. and Weinberg,R.A. (2001) Human breast cancer cells generated by oncogenic transformation of primary mammary epithelial cells. *Genes Dev.*, **15**, 50–65.
34. Gordon,K., Clouaire,T., Bao,X.X., Kemp,S.E., Xenophontos,M., de Las Heras,J.I. and Stancheva,I. (2014) Immortality, but not oncogenic transformation, of primary human cells leads to epigenetic reprogramming of DNA methylation and gene expression. *Nucleic Acids Res.*, **42**, 3529–3541.
35. Morel,A.-P., Lièvre,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.
36. Morel,A.-P., Hinkal,G.W., Thomas,C., Fauvet,F., Courtois-Cox,S., Wierinckx,A., Devouassoux-Shisheboran,M., Treilleux,I., Tissier,A., Gras,B. *et al.* (2012) EMT inducers catalyze malignant transformation of mammary epithelial cells and drive tumorigenesis towards claudin-low tumors in transgenic mice. *PLoS Genet.*, **8**, e1002723.
37. 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.
38. Perriaud,L., Lachuer,J. and Dante,R. (2013) The 'Methyl-CpG Binding Domain Protein 2′ plays a repressive role in relation to the promoter CpG content in the Normal Human Cell Line MRC5. *Curr. Pharm. Des.*, **5**, 1–6.
39. Jørgensen,H.F., Adie,K., Chaubert,P. and Bird,A.P. (2006) Engineering a high-affinity methyl-CpG-binding protein. *Nucleic Acids Res.*, **34**, e96.
40. Beygo,J., Citro,V., Sparago,A., De Crescenzo,A., Cerrato,F., Heitmann,M., Rademacher,K., Guala,A., Enklaar,T., Anichini,C. *et al.* (2013) The molecular function and clinical phenotype of partial deletions of the IGF2/H19 imprinting control region depends on the spatial arrangement of the remaining CTCF-binding sites. *Hum. Mol. Genet.*, **22**, 544–557.
41. Kim,D., Pertea,G., Trapnell,C., Pimentel,H., Kelley,R. and Salzberg,S.L. (2013) TopHat2: accurate alignment of transcriptomes in the presence of insertions, deletions and gene fusions. *Genome Biol.*, **14**, R36.
42. Anders,S., McCarthy,D., Chen,Y., Okoniewski,M., Smyth,G., Huber,W. and Robinson,M. (2013) Count-based differential

expression analysis of RNA sequencing data using R and Bioconductor. *Nat. Protoc.*, **8**, 1765–1786.
43. Robinson,M.D., McCarthy,D.J. and Smyth,G.K. (2010) edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics*, **26**, 139–140.
44. Subramanian,A., Tamayo,P., Mootha,V.K., Mukherjee,S., Ebert,B.L., Gillette,M.A., Paulovich,A., Pomeroy,S.L., Golub,T.R., Lander,E.S. *et al.* (2005) Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **102**, 15545–15550.
45. Langmead,B., Trapnell,C., Pop,M. and Salzberg,S.L. (2009) Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. *Genome Biol.*, **10**, R25.
46. Li,H., Handsaker,B., Wysoker,A., Fennell,T., Ruan,J., Homer,N., Marth,G., Abecasis,G. and Durbin,R. (2009) The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics*, **25**, 2078–2079.
47. Zhang,Y., Liu,T., Meyer,C.A., Eeckhoute,J., Johnson,D.S., Bernstein,B.E., Nusbaum,C., Myers,R.M., Brown,M., Li,W. *et al.* (2008) Model-based analysis of ChIP-Seq (MACS). *Genome Biol.*, **9**, R137.
48. Shao,Z., Zhang,Y., Yuan,G.-C., Orkin,S.H. and Waxman,D.J. (2012) MAnorm: a robust model for quantitative comparison of ChIP-Seq data sets. *Genome Biol.*, **13**, R16.
49. Phanstiel,D.H., Boyle,A.P., Araya,C.L. and Snyder,M.P. (2014) Sushi.R: flexible, quantitative and integrative genomic visualizations for publication-quality multi-panel figures. *Bioinformatics*, **30**, 2808–2810.
50. Ye,T., Krebs,A.R., Choukrallah,M.-A., Keime,C., Plewniak,F., Davidson,I. and Tora,L. (2011) seqMINER: an integrated ChIP-seq data interpretation platform. *Nucleic Acids Res.*, **39**, e35.
51. Statham,A.L., Strbenac,D., Coolen,M.W., Stirzaker,C., Clark,S.J. and Robinson,M.D. (2010) Repitools: an R package for the analysis of enrichment-based epigenomic data. *Bioinformatics*, **26**, 1662–1663.
52. Thomas-Chollier,M., Defrance,M., Medina-Rivera,A., Sand,O., Herrmann,C., Thieffry,D. and van Helden,J. (2011) RSAT 2011: regulatory sequence analysis tools. *Nucleic Acids Res.*, **39**, W86–W91.
53. Menafra,R., Brinkman,A.B., Matarese,F., Franci,G., Bartels,S.J.J., Nguyen,L., Shimbo,T., Wade,P.A., Hubner,N.C. and Stunnenberg,H.G. (2014) Genome-wide binding of MBD2 reveals strong preference for highly methylated loci. *PLoS One*, **9**, e99603.
54. 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.
55. Andersson,R., Gebhard,C., Miguel-Escalada,I., Hoof,I., Bornholdt,J., Boyd,M., Chen,Y., Zhao,X., Schmidl,C., Suzuki,T. *et al.* (2014) An atlas of active enhancers across human cell types and tissues. *Nature*, **507**, 455–461.
56. Hahn,W.C., Dessain,S.K., Brooks,M.W., King,J.E., Elenbaas,B., Sabatini,D.M., DeCaprio,J.A. and Weinberg,R.A. (2002) Enumeration of the simian virus 40 early region elements necessary for human cell transformation. *Mol. Cell. Biol.*, **22**, 2111–2123.
57. Chaffer,C.L., Marjanovic,N.D., Lee,T., Bell,G., Kleer,C.G., Reinhardt,F., D'Alessio,A.C., Young,R.A. and Weinberg,R.A. (2013) Poised chromatin at the ZEB1 promoter enables breast cancer cell plasticity and enhances tumorigenicity. *Cell*, **154**, 61–74.
58. Puisieux,A., Brabletz,T. and Caramel,J. (2014) Oncogenic roles of EMT-inducing transcription factors. *Nat. Cell Biol.*, **16**, 488–494.
59. Feinberg,A.P. and Vogelstein,B. (1983) Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts. *Nature*, **301**, 89–92.
60. Gama-Sosa,M.A., Slagel,V.A., Trewyn,R.W., Oxenhandler,R., Kuo,K.C., Gehrke,C.W. and Ehrlich,M. (1983) The 5-methylcytosine content of DNA from human tumors. *Nucleic Acids Res.*, **11**, 6883–6894.
61. Baylin,S.B., Herman,J.G., Graff,J.R., Vertino,P.M. and Issa,J.P. (1998) Alterations in DNA methylation: a fundamental aspect of neoplasia. *Adv. Cancer Res.*, **72**, 141–196.
62. Ehrlich,M. (2002) DNA methylation in cancer: too much, but also too little. *Oncogene*, **21**, 5400–5413.
63. Kulis,M. and Esteller,M. (2010) DNA methylation and cancer. *Adv. Genet.*, **70**, 27–56.
64. Sproul,D., Kitchen,R.R., Nestor,C.E., Dixon,J.M., Sims,A.H., Harrison,D.J., Ramsahoye,B.H. and Meehan,R.R. (2012) Tissue of origin determines cancer-associated CpG island promoter hypermethylation patterns. *Genome Biol.*, **13**, R84.
65. Vardimon,L., Kressmann,A., Cedar,H., Maechler,M. and Doerfler,W. (1982) Expression of a cloned adenovirus gene is inhibited by in vitro methylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **79**, 1073–1077.
66. Molloy,P.L. (1986) Effects of DNA methylation on specific transcription by RNA polymerase II in vitro. *Mol. Biol. Rep.*, **11**, 13–17.
67. Zhang,Q., Wang,H.Y., Marzec,M., Raghunath,P.N., Nagasawa,T. and Wasik,M.A. (2005) STAT3- and DNA methyltransferase 1-mediated epigenetic silencing of SHP-1 tyrosine phosphatase tumor suppressor gene in malignant T lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **102**, 6948–6953.
68. Wozniak,R.J., Klimecki,W.T., Lau,S.S., Feinstein,Y. and Futscher,B.W. (2007) 5-Aza-2′-deoxycytidine-mediated reductions in G9A histone methyltransferase and histone H3 K9 di-methylation levels are linked to tumor suppressor gene reactivation. *Oncogene*, **26**, 77–90.
69. Jackson-Grusby,L., Beard,C., Possemato,R., Tudor,M., Fambrough,D., Csankovszki,G., Dausman,J., Lee,P., Wilson,C., Lander,E. *et al.* (2001) Loss of genomic methylation causes p53-dependent apoptosis and epigenetic deregulation. *Nat. Genet.*, **27**, 31–39.
70. Lee,T.I. and Young,R.A. (2013) Transcriptional regulation and its misregulation in disease. *Cell*, **152**, 1237–1251.
71. Apostolou,E. and Hochedlinger,K. (2013) Chromatin dynamics during cellular reprogramming. *Nature*, **502**, 462–471.
72. Jove,R., Sperber,D.E. and Manley,J.L. (1984) Transcription of methylated eukaryotic viral genes in a soluble in vitro system. *Nucleic Acids Res.*, **12**, 4715–4730.
73. Stein,R., Razin,A. and Cedar,H. (1982) In vitro methylation of the hamster adenine phosphoribosyltransferase gene inhibits its expression in mouse L cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **79**, 3418–3422.
74. 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.
75. Clouaire,T., de las Heras,J.I., Merusi,C. and Stancheva,I. (2010) Recruitment of MBD1 to target genes requires sequence-specific interaction of the MBD domain with methylated DNA. *Nucleic Acids Res.*, **38**, 4620–4634.
76. Klose,R.J., Sarraf,S.A., Schmiedeberg,L., McDermott,S.M., Stancheva,I. and Bird,A.P. (2005) DNA binding selectivity of MeCP2 due to a requirement for A/T sequences adjacent to methyl-CpG. *Mol. Cell*, **19**, 667–678.
77. Scarsdale,J.N., Webb,H.D., Ginder,G.D. and Williams,D.C. (2011) Solution structure and dynamic analysis of chicken MBD2 methyl binding domain bound to a target-methylated DNA sequence. *Nucleic Acids Res.*, **39**, 6741–6752.
78. 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.
79. Singal,R., van Wert,J. and Bashambu,M. (2001) Cytosine methylation represses glutathione S-transferase P1 (GSTP1) gene expression in human prostate cancer cells. *Cancer Res.*, **61**, 4820–4826.
80. Bakker,J., Lin,X. and Nelson,W.G. (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.
81. Lin,X. and Nelson,W.G. (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.
82. 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.
83. Skene,P.J., Illingworth,R.S., Webb,S., Kerr,A.R.W., James,K.D., Turner,D.J., Andrews,R. and Bird,A.P. (2010) Neuronal MeCP2 is expressed at near histone-octamer levels and globally alters the chromatin state. *Mol. Cell*, **37**, 457–468.

84. Chen,R.Z., 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.
85. Guy,J., Hendrich,B., Holmes,M., Martin,J.E. and Bird,A. (2001) A mouse Mecp2-null mutation causes neurological symptoms that mimic Rett syndrome. *Nat. Genet.*, **27**, 322–326.
86. Hendrich,B., Guy,J., Ramsahoye,B., Wilson,V.A. and Bird,A. (2001) Closely related proteins MBD2 and MBD3 play distinctive but interacting roles in mouse development. *Genes Dev.*, **15**, 710–723.
87. Xie,W., Schultz,M.D., Lister,R., Hou,Z., Rajagopal,N., Ray,P., Whitaker,J.W., Tian,S., Hawkins,R.D., Leung,D. *et al.* (2013) Epigenomic analysis of multilineage differentiation of human embryonic stem cells. *Cell*, **153**, 1134–1148.
88. Prat,A., Parker,J.S., Karginova,O., Fan,C., Livasy,C., Herschkowitz,J.I., He,X. and Perou,C.M. (2010) Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. *Breast Cancer Res.*, **12**, R68.
89. Vogelstein,B. and Kinzler,K.W. (2004) Cancer genes and the pathways they control. *Nat. Med.*, **10**, 789–799.
90. Mian,O.Y., Wang,S.Z., Zhu,S.Z., Gnanapragasam,M.N., Graham,L., Bear,H.D. and Ginder,G.D. (2011) Methyl-binding domain protein 2-dependent proliferation and survival of breast cancer cells. *Mol. Cancer Res.*, **9**, 1152–1162.

Discussion générale

Nos trois études ont cherché à étudier l'importance de la méthylation au cours de l'oncogenèse mammaire à travers différents aspects.

D'une manière chronologique, la première étude réalisée par Guillaume Devailly a permis de mettre en évidence l'importance de la protéine MBD2 au cours de la transformation tumorale. Il semblerait qu'une part importante des changements d'expression observés au cours de cette transformation ne soient pas dus à des modifications des profils de méthylation mais à des mouvements de la protéine MBD2, interprète de la méthylation capable de réprimer l'expression des gènes. Plus précisément les gènes présentant une diminution de leurs taux d'expression au cours de la transformation cellulaire montrent un gain de la protéine MBD2 au niveau de leur promoteur. Selon cette étude la méthylation servirait de guide pour les protéines MBP qui régulent l'expression de leurs gènes cibles en fonction des différents signaux extérieurs. Si peu de modifications des taux de méthylation ont pu être observées dans ce modèle *in vitro* de transformation mammaire, des modifications des taux de méthylation ont pu être observées à de nombreuses reprises dans différents tissus tumoraux.

Sur ce point, parallèlement à cette première étude Mélodie Grandin a réalisé une étude plus appliquée, sur l'utilisation d'inhibiteur de la méthylation pour réactiver des cibles thérapeutiques. Comme nous le savons, les tissus tumoraux subissent des hyperméthylations locales de certains îlots CpG dans les régions promotrices de gènes suppresseurs de tumeurs, induisant leur répression transcriptionnelle. Parmi ces gènes on peut trouver des gènes codant pour d'éventuelles cibles thérapeutiques. Cette étude montre de façon très intéressante qu'il est possible de réactiver ces cibles thérapeutiques *via* des inhibiteurs de la méthylation. Nous nous sommes intéressés plus particulièrement à deux gènes cibles *NTN1* et *DAPK1*, cibles thérapeutiques potentielle *via* la voie des récepteurs à dépendance. Ces gènes montrent des taux de méthylation beaucoup plus importants dans les tissus tumoraux que dans les tissus normaux issus des même patientes. Ces hyperméthylations sont associées à une forte diminution de

leurs niveaux d'expression dans les tissus tumoraux et donc à une inefficacité des thérapeutiques ciblant ces gènes. Un traitement à la Décitabine, drogue capable d'inhiber la méthylation de l'ADN, induit une déméthylation et une réexpression de ces gènes cibles, permettant d'accroitre l'efficacité de ces thérapeutiques ciblées.
Par conséquent cette étude est la preuve d'un concept intéressant montrant la réactivation de cibles thérapeutiques grâce à des inhibiteurs de la méthylation de l'ADN.

De manière intéressante, nous avons pu observer à travers ces deux études que la méthylation pouvait intervenir de façon différente au cours de l'oncogenèse. A travers un modèle *in vitro* de transformation tumorale mammaire, les lecteurs de la méthylation semblent jouer un rôle majeur au profit des modifications du taux de méthylation. Alors qu'au sein de tumeurs mammaires, nous avons pu observer l'importance des changements du taux de méthylation de certains gènes dit suppresseurs de tumeurs dans les tissus tumoraux par rapport aux tissus normaux.

Ces deux études ont cherché à analyser la place de la méthylation dans la transformation des cellules cancéreuses à travers différents aspects. Mais plus précisément que se passe t-il dans une tumeur au sens large, c'est à dire au sein des cellules cancéreuses et de son microenvironnement. Le microenvironnement a t-il la capacité d'influencer l'épigénome des cellules cancéreuses ? Mon projet a cherché à répondre à cette question.

Nous nous sommes plus particulièrement intéressés aux fibroblastes associés au cancer car il s'agit du type cellulaire le plus abondant parmi les cellules du microenvironnement des tumeurs mammaires. Nous avons alors cherché à étudier l'effet des facteurs sécrétés par les CAFs sur les cellules cancéreuses. Afin de modéliser cela, nous avons utilisé des CAFs isolés à partir de quatre tumeurs mammaires. Après leur mise en culture nous avons récupéré leur surnagent c'est à dire le milieu conditionné de CAFs. Nous avons alors cultivé deux lignées cellulaires mammaires, les SKBR3 et le AU565 avec ce milieu conditionné et analysé son impact sur le transcriptome (RNAseq) et sur l'épigénome (puce méthylation) des cellules cancéreuses.

Après analyse du transcriptome des cellules cancéreuses, nous avons pu identifier une série de gènes uprégulés par les différents facteurs sécrétés par les CAFs *in vitro* (372 gènes) ainsi qu'une série de gènes insensibles à ces facteurs (3479 gènes).

De manière intéressante après analyse de la base de données TCGA, il s'est avéré que ces gènes uprégulés sont également uprégulés dans les tumeurs présentant plus de cellules stromales, validant ainsi notre liste de gènes *in vivo* à partir d'une cohorte importante de tumeurs mammaires. Plus précisément, dans la base de donnée TCGA les tumeurs ont été classées selon le niveau d'expression d'un set de gènes définissant une signature stromale (141 gènes). Cette signature stromale permet de classer les tumeurs selon leur enrichissement en différents types cellulaires du stroma et non uniquement des CAFs. Par conséquent cette analyse peut présenter un biais car elle prend également en compte d'autres types cellulaires présents dans le microenvironnement tumoral. Néanmoins la très forte corrélation observée entre les résultats *in vitro* et cette analyse *in vivo* nous a conforté sur la validité de nos listes de gènes.

Par la suite, nous avons étudié l'effet du milieu conditionné sur l'épigénome des cellules cancéreuses. Est ce que des modifications épigénétiques peuvent expliquer ces modifications transcriptomiques ?

Premièrement nous avons réalisé des puces méthylation permettant d'analyser le taux de méthylation de 850 000 CpGs sur l'ADN de cellules traitées ou non aux milieux conditionnés de CAFs. Nos premières analyses nous ont permis de montrer, de manière surprenante, que les facteurs sécrétés par les CAFs n'induisent pas de changement du taux de méthylation. Ces analyses ont été réalisé après 48h ou 96h de traitement au milieu conditionné, nous pouvons ainsi émettre l'hypothèse que des changements de méthylation pourraient voir le jour à la suite de traitement plus long ou à la suite de contacts directs entre les CAFs et les cellules cancéreuses. Toutefois au sein de la cohorte TCGA, nos 372 gènes identifiés *in vitro* ne présentent pas d'hyperméthylation dans les tumeurs présentant plus de cellules stromales.
Un autre point de discussion peut alors également être soulevé ici quant aux conditions de culture, en effet notre étude a été réalisée dans le but d'étudier les facteurs sécrétés par les CAFs c'est pourquoi les expériences ont été réalisées avec du milieu conditionné

issu de CAFs. D'autres modèles cellulaires modélisant le contact entre les CAFs et les cellules tumorales auraient également été intéressants. Nous pouvons par exemple imaginer la mise en place de co-culture composée de lignées cellulaires marquées et de CAFs. Par la suite un tri des cellules marquées, nous permettrait ainsi d'étudier les effets du contact des CAFs sur les cellules tumorales.

Ce résultat nous a permis de conclure que les changements d'expressions induits par le microenvironnement ne semblent pas être dus à des changements de méthylation, nous rapprochant des observations faites par Guillaume Devailly.

Une analyse plus détaillée des puces méthylation nous a permis d'observer que ces gènes uprégulés par les milieux conditionnés de CAFs présentent des taux de méthylation au niveau de leur TSS plus important que les gènes non affectés par les milieux conditionnés. Cette observation suggère alors que la méthylation joue bel et bien un rôle dans cette réponse malgré l'absence de changement de méthylation.
Au vu des résultats obtenus par Guillaume Devailly sur l'implication de la protéine MBD2 dans la transformation tumorale mammaire, nous nous sommes également intéressés à cette protéine.
Nous avons alors pu observer qu'une partie importante des gènes uprégulés par les CAFs sont également régulés par la protéine MBD2. De plus des expériences d'immuno-précipitation de la chromatine ont montré qu'une partie des gènes présentant une augmentation de leurs taux d'expression induits par les facteurs sécrétés par les CAFs, montrent une perte de la protéine MBD2 au niveau de leur promoteur. Néanmoins cette analyse s'est limitée à quelques gènes. Des expériences d'immuno-précipitation de la chromatine avec un anticorps anti-MBD2 suivi d'un séquençage haut débit ont également été réalisées dans notre laboratoire. Malheureusement des difficultés techniques dues notamment à des variations d'efficacité d'immuno-précipitation, ne nous ont pas permis d'exploiter les résultats. Ces expériences ont été réalisées avec un anticorps anti-MBD2 mis au point au sein du laboratoire. Il serait également important de voir si une amélioration des protocoles d'immuno-précipitation ainsi que l'utilisation de l'anticorps anti-MBD2 commercial récemment développé pourraient permettre une amélioration de ces résultats.

Néanmoins l'ensemble de ces données suggère l'implication de la protéine MBD2 ainsi que d'autres protéines interprètes de la méthylation dans la réponse des cellules cancéreuses mammaires aux facteurs sécrétés par les CAFs.

A partir de ces différentes observations notre hypothèse est que sous l'effet de différentes cytokines et facteurs de croissance sécrétés par les CAFs des protéines capables d'interpréter les marques de méthylation vont utiliser les marques de méthylation présentent sur certains gènes pour réguler l'expression de ces gènes face à ces signaux extérieurs.

L'interprétation des signaux de méthylation de l'ADN est un processus complexe faisant intervenir de nombreux acteurs pouvant être recrutés ou au contraire chassés par la méthylation de l'ADN. Notre étude a permis de montrer l'implication d'un acteur, MBD2, dans la réponse des cellules cancéreuses à son microenvironnement. Néanmoins la grande multiplicité et diversité de ces acteurs, dont de nombreux reste encore à découvrir limite la portée de notre observation. Par exemple, de nombreux facteurs de transcription peuvent être affectés par les marques de méthylation. Certains facteurs de transcription sont chassés de leurs sites de fixation par la méthylation de l'ADN réprimant ainsi la transcription de certains gènes. Un article a également montré récemment que certains facteurs de transcription peuvent directement se fixer sur des sites méthylés (Zhu *et al*, 2016). Le taux de méthylation de certains sites est ainsi directement impliqué dans la définition du site de fixation de certains facteurs de transcription. Il serait également intéressant d'étudier les différents facteurs de transcription impliqués dans la régulation de nos gènes induits par les CAFs, afin peut être d'identifier des facteurs de transcription commun impliqués dans la réponse des cellules cancéreuses au microenvironnement.

Tous au long de notre étude nous avons parlé d'une liste de gènes composée de 372 gènes uprégulés par les différents facteurs sécrétés par les CAFs. Mais plus précisément quels sont ces gènes ? Une analyse informatique montre un enrichissement en gènes impliqués dans des voies de signalisations importantes comme les voies JAK-STAT et MAPK. Plus précisément certains gènes ont attiré notre attention comme STAT5A, ETV7, ETV6, SOX4 et SOX9 pour leurs implications dans la cancérogénèse soulignant ainsi

l'importance de ce dialogue dans la tumorigenèse. Il aurait été également intéressant d'étudier plus précisément certains gènes spécifiques afin de mieux caractériser leur régulation épigénétique ainsi que leur réponse aux facteurs sécrétés par les CAFs.

Par ailleurs, il serait également intéressant d'utiliser ce modèle pour étudier les effets des cellules cancéreuses sur les fibroblastes associés au cancer. En effet au cours du développement tumoral les fibroblastes subissent des modifications induites par les cellules cancéreuses afin d'acquérir les caractéristiques des CAFs. Des études ont montré l'implication de mécanismes épigénétiques sur certains gènes spécifiques au cours de cette transformation (Tampe & Zeisberg, 2014; Zeisberg & Zeisberg, 2013; Li *et al*, 2015; Mrazek *et al*, 2014). Il serait ainsi également intéressant d'étudier les mouvements des protéines de liaison à l'ADN méthylé au cours de la transformation des fibroblastes en CAF.

Pour conclure notre étude a permis de montrer l'implication de la méthylation de l'ADN ainsi que de ses effecteurs dans la réponse des cellules cancéreuses aux signaux émis par son microenvironnement. D'autre part, notre étude décrit un modèle expérimental mimant une partie des interactions entre les cellules tumorales et les cellules stromales observées dans les tumeurs mammaires, pouvant être utilisé par la suite au cours d'autres études.

Représentation schématique des principaux résultats

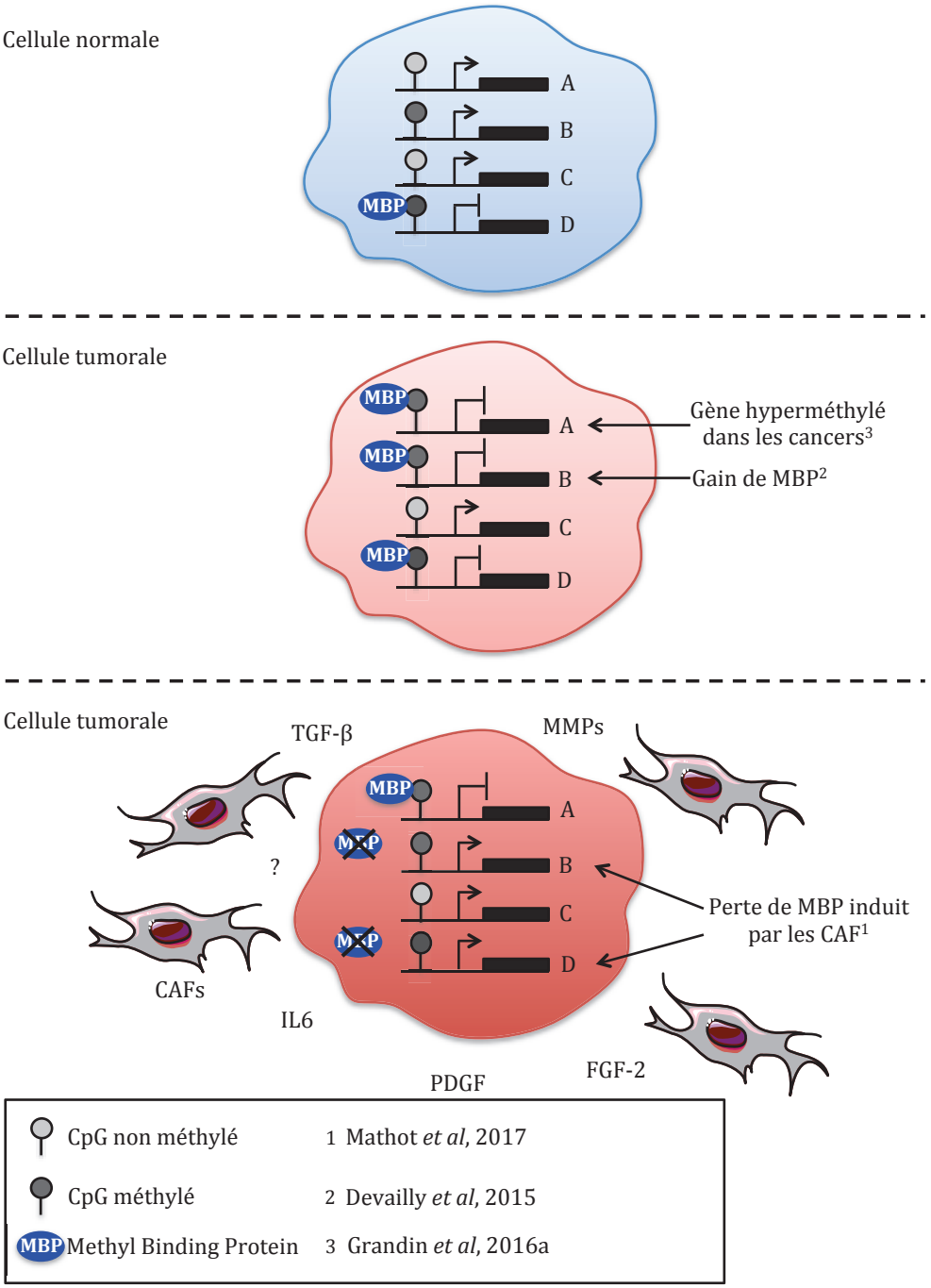


Figure 31: Représentation schématique des principaux résultats.

Dans une cellule normale la majorité des gènes présente un îlot CpG, au niveau de leur région promotrice, non méthylé associé à la transcription de celui-ci. C'est le cas des gènes A et C sur notre schéma. Au contraire certains gènes spécifiques de certains tissus

présentent quant à eux un îlot CpG méthylé fixé ou non par une protéine capable de lier l'ADN méthylé (MBP) induisant la répression de celui-ci. C'est le cas des gènes B et D.
Dans une cellule tumorale certains gènes comme les gènes suppresseurs de tumeurs subissent une hyperméthylation de leur région promotrice reconnue par des protéines MBP capables d'induire leur répression transcriptionnelle. C'est le cas du gène A faisant référence au résultat 3 (Grandin *et al*, 2016a). Certains gènes présentant déja des marques de méthylation sur leur promoteur peuvent quant à eux recruter des protéines MBP impliquées dans leur répression transcriptionnelle au cours de la transformation tumorale. C'est le cas du gène B faisant référence au résultat 2 (Devailly *et al*, 2015).

Dans une tumeur, les cellules du microenvironnement *via* la sécrétion de différents facteurs peuvent modifier les profils de fixation des protéines MBP sur les gènes méthylés conduisant à la réexpression de certains gènes. C'est le cas des gènes B et D faisant référence au résultat 1 (Mathot *et al*, 2017).

Collaborations

Partie I : The SCN9A channel and plasma membrane depolarization promote cellular senescence through Rb pathway

Marine Warnier[1], Jean-Michel Flaman[1], Christophe Chouabe[2], Clotilde Wiel[1], Baptiste Gras[1], Elena Blanc[1], Jean-Philippe Foy[1], Pauline Mathot[1], Pierre Saintigny[1], Fabien Vancoppenolle[2], David Vindrieux[1], Nadine Martin[1], David Bernard[1]

[1]Inserm U1052, CNRS UMR 5286, Université de Lyon & Centre Léon Bérard, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, Lyon, France.

[2]Inserm UMR-U1060 CarMeN Laboratory, University Lyon 1, INRA U1235, INSA-Lyon, Facultés de médecine Rockefeller, Lyon, France.

1. Préambule

L'équipe du Dr David Bernard s'intéresse particulièrement à un mécanisme anti-tumoral aboutissant à un arrêt stable de la prolifération cellulaire : **la sénescence**. Lors objectifs sont de décrire de nouveaux événements génétiques impliqués dans l'échappement des cellules tumorales à la sénescence.

Cette étude s'inscrit dans cette thématique, elle a permis de montrer l'implication de la protéine SCN9A dans l'activation de la sénescence *via* la voie Rb capable d'inhiber la progression du cycle cellulaire.

Mon implication dans cette étude concerne la réalisation d'expériences d'immuno-précipitations de la chromatine dirigés contre la protéine SCN9A.

C'est travaux sont actuellement en cours de soumission dans la revue *Cancer Research*.

2. Abstract

Oncogenic signals lead to premature senescence in normal human cells causing a proliferation arrest and the elimination of these defective cells by immune cells. Oncogene-induced senescence (OIS) prevents aberrant cell division and tumor initiation.

In order to identify new regulators of OIS, we performed a loss-of-function genetic screen and identified that the loss of SCN9A, in particular, allowed cells to escape from OIS. The expression of this sodium channel increased *in vitro* and *in vivo* in senescent cells during OIS. This upregulation was mediated by Rel/NF-κB transcription factors, which are well known regulators of senescence. Importantly, the induction of SCN9A by an oncogenic signal led to plasma membrane depolarization, which in turn, was able to induce premature senescence. Transcriptomic and bioinformatics analyses revealed that SCN9A and plasma membrane depolarization mediated the repression of mitotic genes through the Rb/E2F pathway to promote senescence.

Taken together, our work delineates a new pathway, which involves the Rel/NF-κB transcription factor, SCN9A expression, plasma membrane depolarization, the Rb/E2F pathway and mitotic gene repression in the regulation of OIS. This work thus provides new insight into the involvement of ion channels and plasma membrane potential in the control of senescence.

Partie II : Interfering with SHH interaction to its receptor Patched triggers tumor growth inhibition through Patched-induced apoptosis

Pauline Mathot[1]*, Pierre-Antoine Bissey[1,2]*, Mélissa Jasmin[1], Catherine Guix[1], Clélia Costechareyre[1], Jean-Guy Delcros[1], (Jean-Yves Scoazec), Robert Dante[1], Patrick Mehlen[1]* and Joanna Fombonne[1]*$

[1]Apoptosis, Cancer and Development Laboratory- Equipe labellisée 'La Ligue', CNRS UMR5238, Université de Lyon, Centre Léon Bérard, 69008 Lyon, France
[2]Present address:

*These authors contributed equally to this work.

$Corresponding author: J. Fombonne; FAX (33) 4 78 78 28 87; e-mail: Joanna.fombonne@lyon.unicancer.fr

1. Préambule

Cette étude réalisée au sein de notre équipe porte également sur le concept des récepteurs à dépendance (définit page 95).

Elle se concentre plus précisément sur le récepteur à dépendance Patched et son ligand SHH. En absence de SHH, le récepteur Patched permettrait le recrutement d'un complexe protéique appelé **Dépendosome** composé des protéines DRAL, TUCAN et NEDD4 capable d'induire l'apoptose des cellules *via* les protéines Caspases 9 et 3 (Figure 31).

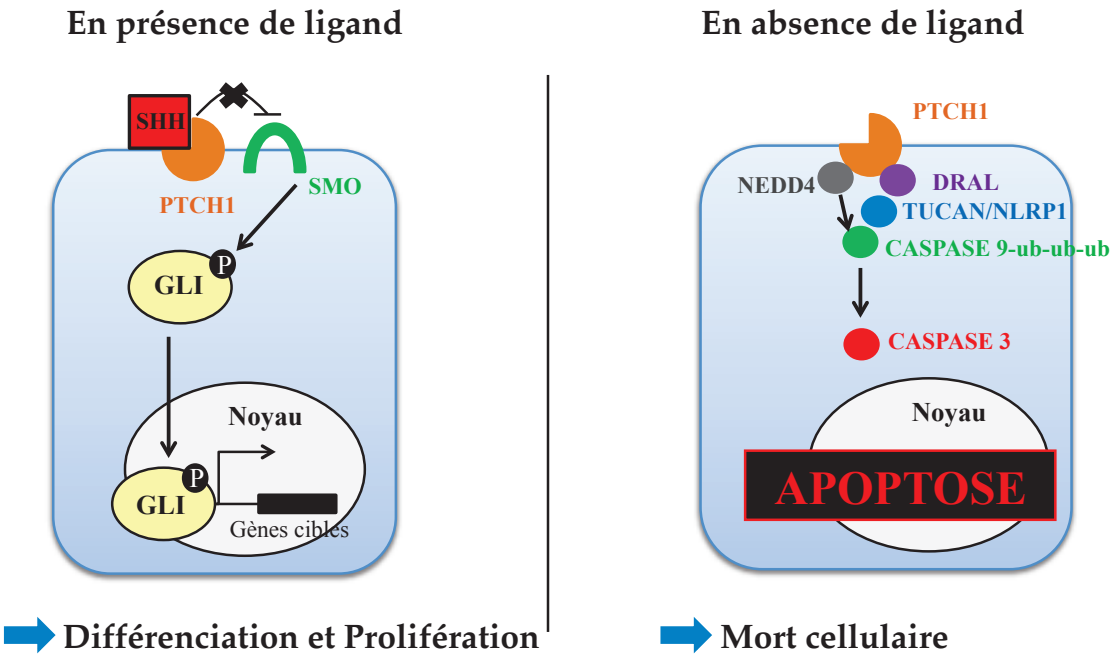


Figure 32: Schéma représentant l'activité du récepteur Patched en présence et en absence de son ligand SHH.

SHH et son récepteur Patched ont été impliqués dans de nombreux cancers notamment *via* des mutations ou perte du récepteur Patched ainsi que des surexpressions du ligand SHH. Par conséquent de nombreuses thérapies visent à inhiber cette voie positive de prolifération cellulaire comme par exemple le Vismodegib actuellement utilisées en clinique dans le traitement des carcinomes basocellulaires.

Cette étude montre l'implication de la voie «récepteur à dépendance » associé au récepteur Patched dans la réponse des cellules cancéreuses aux traitements visant à bloquer l'interaction de SHH avec son récepteur.

Pour ma part, j'ai réalisé les analyses bioinformatiques permettant d'étudier l'expression des gènes codant pour les protéines du dépendosome dans différents cancers via l'utilisation de la base de donnée TCGA (Zhu *et al*, 2014). C'est travaux sont actuellement en cours de soumission dans la revue *Oncotarget*.

2. Abstract

The classic morphogen Sonic Hedgehog (SHH), has been shown to play a key role in cancer. Its main receptor Patched (Ptc) has been described as a tumor suppressor and abnormal induction of SHH signaling through different means –e.g., downregulation or mutation in SHH receptor or effectors, autocrine or paracrine expression of SHH-, has been associated with many different types of human cancers.

As a consequence, SHH and its downstream signaling currently turn as exciting targets for anti-cancer strategies. These putative therapies are all willing to antagonize the "canonical" signaling pathway induced after SHH/Ptc interaction –i.e., Ptc-Smothened (Smo)-Gli-.

However, we recently reported that Ptc is not only transducing a signaling through Smo-Gli in the presence of its ligand but is also a dependence receptor. As such, Ptc triggers apoptosis in the absence of SHH, generating a state of dependence on SHH for survival.

We show here that the anti-tumor effect observed upon SHH interference is not due to the inhibition of the Ptc-Smo-Gli signaling but rather to the activation of Ptc-induced apoptosis.

Partie III : Participation aux congrès

J'ai eu la chance de participer au congrès EpiBrest où j'ai pu réaliser une présentation orale intitulée : *« Implication of epigenetic events in the crosstalk between stromal cells and tumor cells »*



Bibliographie

Ahmed Z & Bicknell R (2009) Angiogenic signalling pathways. *Methods Mol. Biol.* **467:** 3–24

Albrengues J, Bertero T, Grasset E, Bonan S, Maiel M, Bourget I, Philippe C, Herraiz Serrano C, Benamar S, Croce O, Sanz-Moreno V, Meneguzzi G, Feral CC, Cristofari G & Gaggioli C (2015) Epigenetic switch drives the conversion of fibroblasts into proinvasive cancer-associated fibroblasts. *Nat. Commun.* **6:** 10204

Angrisano T, Lembo F, Pero R, Natale F, Fusco A, Avvedimento VE, Bruni CB & 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

Ao M, Franco OE, Park D, Raman D, Williams K & Hayward SW (2007) Cross-talk between paracrine-acting cytokine and chemokine pathways promotes malignancy in benign human prostatic epithelium. *Cancer Res.* **67:** 4244–4253

Aoki A, Suetake I, Miyagawa J, Fujio T, Chijiwa T, Sasaki H & Tajima S (2001) Enzymatic properties of de novo-type mouse DNA (cytosine-5) methyltransferases. *Nucleic Acids Res.* **29:** 3506–3512

Auriol E, Billard L-M, Magdinier F & Dante R (2005) Specific binding of the methyl binding domain protein 2 at the BRCA1-NBR2 locus. *Nucleic Acids Res.* **33:** 4243–4254

Babbio F, Pistore C, Curti L, Castiglioni I, Kunderfranco P, Brino L, Oudet P, Seiler R, Thalman GN, Roggero E, Sarti M, Pinton S, Mello-Grand M, Chiorino G, Catapano C V, Carbone GM & Bonapace IM (2012) The SRA protein UHRF1 promotes epigenetic crosstalks and is involved in prostate cancer progression. *Oncogene* **31:** 4878–4887

Bader S, Walker M, McQueen HA, Sellar R, Oei E, Wopereis S, Zhu Y, Peter A, Bird AP & Harrison DJ (2003) MBD1, MBD2 and CGBP genes at chromosome 18q21 are infrequently mutated in human colon and lung cancers. *Oncogene* **22:** 3506–3510

Barone I, Catalano S, Gelsomino L, Marsico S, Giordano C, Panza S, Bonofiglio D, Bossi G, Covington KR, Fuqua SAW & Ando S (2012) Leptin mediates tumor-stromal interactions that promote the invasive growth of breast cancer cells. *Cancer Res.* **72:** 1416–1427

Basset P, Bellocq JP, Wolf C, Stoll I, Hutin P, Limacher JM, Podhajcer OL, Chenard MP, Rio MC & Chambon P (1990) A novel metalloproteinase gene specifically expressed in stromal cells of breast carcinomas. *Nature* **348:** 699–704

Baubec T, Ivanek R, Lienert F & Schubeler D (2013) Methylation-dependent and -independent genomic targeting principles of the MBD protein family. *Cell* **153:** 480–492

Baubec T & Schubeler D (2014) Genomic patterns and context specific interpretation of DNA methylation. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **25:** 85–92

Baubec T, Schubeler D, Rodriguez-Ubreva J, Ciudad L, Gomez-Cabrero D, Parra M, Bussmann LH, di Tullio A, Kallin EM, Tegner J, Graf T, Ballestar E, Scarsdale JN, Webb HD, Ginder GD, Williams DCJ, Portela A, Esteller M, Angrisano T, Lembo F, et al (2016) Breast Cancer-Associated Fibroblasts : Where We Are and Where We Need to Go. *Nucleic Acids Res.* **7:** 1–19 Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25515522

Bechtel W, McGoohan S, Zeisberg EM, Muller GA, Kalbacher H, Salant DJ, Muller CA, Kalluri R & Zeisberg M (2010) Methylation determines fibroblast activation and fibrogenesis in the kidney. *Nat. Med.* **16:** 544–550

Bedford MT & van Helden PD (1987) Hypomethylation of DNA in pathological conditions of the human prostate. *Cancer Res.* **47:** 5274–5276
Berger J & Bird A (2005) Role of MBD2 in gene regulation and tumorigenesis. *Biochem. Soc. Trans.* **33:** 1537–1540
Bergers G & Song S (2005) The role of pericytes in blood-vessel formation and maintenance. *Neuro. Oncol.* **7:** 452–464
Billard L-M, Magdinier F, Lenoir GM, Frappart L & Dante R (2002) MeCP2 and MBD2 expression during normal and pathological growth of the human mammary gland. *Oncogene* **21:** 2704–2712
Bird A (2002) DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev.* **16:** 6–21
Bird A (2007) Perceptions of epigenetics. *Nature* **447:** 396–398
Bird AP (1980) DNA methylation and the frequency of CpG in animal DNA. *Nucleic Acids Res.* **8:** 1499–1504
Bird AP & Wolffe AP (1999) Methylation-induced repression--belts, braces, and chromatin. *Cell* **99:** 451–454
Bissell MJ & Hines WC (2011) Why don't we get more cancer? A proposed role of the microenvironment in restraining cancer progression. *Nat. Med.* **17:** 320–329
Boire A, Covic L, Agarwal A, Jacques S, Sherifi S & Kuliopulos A (2005) PAR1 is a matrix metalloprotease-1 receptor that promotes invasion and tumorigenesis of breast cancer cells. *Cell* **120:** 303–313
Bourc'his D, Xu GL, Lin CS, Bollman B & Bestor TH (2001) Dnmt3L and the establishment of maternal genomic imprints. *Science* **294:** 2536–2539
Brueckner B, Garcia Boy R, Siedlecki P, Musch T, Kliem HC, Zielenkiewicz P, Suhai S, Wiessler M & Lyko F (2005) Epigenetic reactivation of tumor suppressor genes by a novel small-molecule inhibitor of human DNA methyltransferases. *Cancer Res.* **65:** 6305–6311
Buchsbaum RJ & Oh SY (2016) Breast Cancer-Associated Fibroblasts : Where We Are and Where We Need to Go. *Cancers (Basel).* **8:** 1–19
Bussard KM, Mutkus L, Stumpf K, Gomez-manzano C & Marini FC (2016) Tumor-associated stromal cells as key contributors to the tumor microenvironment. *Breast Cancer Res.***:** 1–11 Available at: http://dx.doi.org/10.1186/s13058-016-0740-2
Calon A, Espinet E, Palomo-Ponce S, Tauriello DVF, Iglesias M, Cespedes MV, Sevillano M, Nadal C, Jung P, Zhang XH-F, Byrom D, Riera A, Rossell D, Mangues R, Massague J, Sancho E & Batlle E (2012) Dependency of colorectal cancer on a TGF-beta-driven program in stromal cells for metastasis initiation. *Cancer Cell* **22:** 571–584
Campanero MR, Armstrong MI & Flemington EK (2000) CpG methylation as a mechanism for the regulation of E2F activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97:** 6481–6486
de Capoa A, Musolino A, Della Rosa S, Caiafa P, Mariani L, Del Nonno F, Vocaturo A, Donnorso RP, Niveleau A & Grappelli C (2003) DNA demethylation is directly related to tumour progression: evidence in normal, pre-malignant and malignant cells from uterine cervix samples. *Oncol. Rep.* **10:** 545–549
Casbas-Hernandez P, Fleming JM & Troester MA (2011) Gene expression analysis of in vitro cocultures to study interactions between breast epithelium and stroma. *J. Biomed. Biotechnol.* **2011:** 520987
Cavalli G & Misteli T (2013) Functional implications of genome topology. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **20:** 290–299
Cedar H (1988) DNA methylation and gene activity. *Cell* **53:** 3–4
Chang C-H, Qiu J, O'Sullivan D, Buck MD, Noguchi T, Curtis JD, Chen Q, Gindin M, Gubin

MM, van der Windt GJW, Tonc E, Schreiber RD, Pearce EJ & Pearce EL (2015) Metabolic Competition in the Tumor Microenvironment Is a Driver of Cancer Progression. *Cell* **162:** 1229–1241

Chatagnon A, Perriaud L, Nazaret N, Croze S, Benhattar J, Lachuer J & Dante R (2011) Preferential binding of the methyl-CpG binding domain protein 2 at methylated transcriptional start site regions. *Epigenetics* **6:** 1295–1307

Chedin F, Lieber MR & Hsieh C-L (2002) The DNA methyltransferase-like protein DNMT3L stimulates de novo methylation by Dnmt3a. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99:** 16916–16921

Chen W-J, Ho C-C, Chang Y-L, Chen H-Y, Lin C-A, Ling T-Y, Yu S-L, Yuan S-S, Chen Y-JL, Lin C-Y, Pan S-H, Chou H-YE, Chen Y-J, Chang G-C, Chu W-C, Lee Y-M, Lee J-Y, Lee P-J, Li K-C, Chen H-W, et al (2014a) Cancer-associated fibroblasts regulate the plasticity of lung cancer stemness via paracrine signalling. *Nat. Commun.* **5:** 3472

Chen XL, Chinchilla P, Fombonne J, Ho L, Guix C, Keen JH, Mehlen P & Riobo NA (2014b) Patched-1 proapoptotic activity is downregulated by modification of K1413 by the E3 ubiquitin-protein ligase Itchy homolog. *Mol. Cell. Biol.* **34:** 3855–3866

Chin HG, Ponnaluri VKC, Zhang G, Esteve P-O, Schaus SE, Hansen U & Pradhan S (2016) Transcription factor LSF-DNMT1 complex dissociation by FQI1 leads to aberrant DNA methylation and gene expression. *Oncotarget* **7:** 83627–83640

Chiquet-Ehrismann R, Mackie EJ, Pearson CA & Sakakura T (1986) Tenascin: an extracellular matrix protein involved in tissue interactions during fetal development and oncogenesis. *Cell* **47:** 131–139

Clevers H (2011) The cancer stem cell: premises, promises and challenges. *Nat. Med.* **17:** 313–319

Cook PC, Owen H, Deaton AM, Borger JG, Brown SL, Clouaire T, Jones G-R, Jones LH, Lundie RJ, Marley AK, Morrison VL, Phythian-Adams AT, Wachter E, Webb LM, Sutherland TE, Thomas GD, Grainger JR, Selfridge J, McKenzie ANJ, Allen JE, et al (2015) A dominant role for the methyl-CpG-binding protein Mbd2 in controlling Th2 induction by dendritic cells. *Nat. Commun.* **6:** 6920

Coolen MW, Stirzaker C, Song JZ, Statham AL, Kassir Z, Moreno CS, Young AN, Varma V, Speed TP, Cowley M, Lacaze P, Kaplan W, Robinson MD & Clark SJ (2010) Consolidation of the cancer genome into domains of repressive chromatin by long-range epigenetic silencing (LRES) reduces transcriptional plasticity. *Nat. Cell Biol.* **12:** 235–246

Correia AL & Bissell MJ (2012) The tumor microenvironment is a dominant force in multidrug resistance. *Drug Resist. Updat.* **15:** 39–49

Cui Y & Irudayaraj J (2015) Dissecting the behavior and function of MBD3 in DNA methylation homeostasis by single-molecule spectroscopy and microscopy. *Nucleic Acids Res.* **43:** 3046–3055

Cunningham F, Amode MR, Barrell D, Beal K, Billis K, Brent S, Carvalho-Silva D, Clapham P, Coates G, Fitzgerald S, Gil L, Giron CG, Gordon L, Hourlier T, Hunt SE, Janacek SH, Johnson N, Juettemann T, Kahari AK, Keenan S, et al (2015) Ensembl 2015. *Nucleic Acids Res.* **43:** D662-9

Dangi-Garimella S, Yun J, Eves EM, Newman M, Erkeland SJ, Hammond SM, Minn AJ & Rosner MR (2009) Raf kinase inhibitory protein suppresses a metastasis signalling cascade involving LIN28 and let-7. *EMBO J.* **28:** 347–358

Daniel JM, Spring CM, Crawford HC, Reynolds AB & 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
Darby IA, Laverdet B, Bonte F & Desmouliere A (2014) Fibroblasts and myofibroblasts in wound healing. *Clin. Cosmet. Investig. Dermatol.* **7:** 301–311
Daskalos A, Oleksiewicz U, Filia A, Nikolaidis G, Xinarianos G, Gosney JR, Malliri A, Field JK & Liloglou T (2011) UHRF1-mediated tumor suppressor gene inactivation in nonsmall cell lung cancer. *Cancer* **117:** 1027–1037
Deaton A & Bird A (2011) CpG islands and the regulation of transcription. *Genes Dev.* **25:** 1010–1022 Available at: http://genesdev.cshlp.org/content/25/10/1010.short
Defossez P-A & Stancheva I (2011a) Biological functions of methyl-CpG-binding proteins. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* **101:** 377–398
Defossez PA & Stancheva I (2011b) Biological functions of methyl-CpG-binding proteins. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* **101:** 377–398
DeNardo DG, Andreu P & Coussens LM (2010) Interactions between lymphocytes and myeloid cells regulate pro- versus anti-tumor immunity. *Cancer Metastasis Rev.* **29:** 309–316
Devailly G, Grandin M, Perriaud L, Mathot P, Delcros J-G, Bidet Y, Morel A-P, Bignon J-Y, Puisieux A, Mehlen P & Dante R (2015) Dynamics of MBD2 deposition across methylated DNA regions during malignant transformation of human mammary epithelial cells. *Nucleic Acids Res.* **43:** 5838–5854
Direkze NC, Hodivala-Dilke K, Jeffery R, Hunt T, Poulsom R, Oukrif D, Alison MR & Wright NA (2004) Bone marrow contribution to tumor-associated myofibroblasts and fibroblasts. *Cancer Res.* **64:** 8492–8495
Du H & Che G (2017) Genetic alterations and epigenetic alterations of cancer-associated fibroblasts. *Oncol. Lett.* **13:** 3–12
Du Q, Luu P-L, Stirzaker C & Clark SJ (2015) Methyl-CpG-binding domain proteins: readers of the epigenome. *Epigenomics* **7:** 1051–1073
Du T & Zamore PD (2005) microPrimer: the biogenesis and function of microRNA. *Development* **132:** 4645–4652
Dvorak HF (1986) Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing. *N. Engl. J. Med.* **315:** 1650–1659
Easwaran HP, Van Neste L, Cope L, Sen S, Mohammad HP, Pageau GJ, Lawrence JB, Herman JG, Schuebel KE & Baylin SB (2010) Aberrant silencing of cancer-related genes by CpG hypermethylation occurs independently of their spatial organization in the nucleus. *Cancer Res.* **70:** 8015–8024
Ehrlich M (2002) DNA methylation in cancer: too much, but also too little. *Oncogene* **21:** 5400–5413
Ehrlich M & Lacey M (2013) DNA methylation and differentiation: silencing, upregulation and modulation of gene expression. *Epigenomics* **5:** 553–68
Ehrlich M, Woods CB, Yu MC, Dubeau L, Yang F, Campan M, Weisenberger DJ, Long T, Youn B, Fiala ES & Laird PW (2006) Quantitative analysis of associations between DNA hypermethylation, hypomethylation, and DNMT RNA levels in ovarian tumors. *Oncogene* **25:** 2636–2645
Elenbaas B, Spirio L, Koerner F, Fleming MD, Zimonjic DB, Donaher JL, Popescu NC, Hahn WC & Weinberg RA (2001) Human breast cancer cells generated by oncogenic transformation of primary mammary epithelial cells. *Genes Dev.* **15:** 50–65
Elenbaas B & Weinberg RA (2001) Heterotypic signaling between epithelial tumor cells and fibroblasts in carcinoma formation. *Exp. Cell Res.* **264:** 169–184
Esteller M (2002) CpG island hypermethylation and tumor suppressor genes: a booming present, a brighter future. *Oncogene* **21:** 5427–5440

Farmer P, Bonnefoi H, Anderle P, Cameron D, Wirapati P, Becette V, Andre S, Piccart M, Campone M, Brain E, Macgrogan G, Petit T, Jassem J, Bibeau F, Blot E, Bogaerts J, Aguet M, Bergh J, Iggo R & Delorenzi M (2009) A stroma-related gene signature predicts resistance to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *Nat. Med.* **15:** 68–74

Filion GJP, Zhenilo S, Salozhin S, Yamada D, Prokhortchouk E & Defossez P-A (2006) A family of human zinc finger proteins that bind methylated DNA and repress transcription. *Mol. Cell. Biol.* **26:** 169–181

Filippakopoulos P, Qi J, Picaud S, Shen Y, Smith WB, Fedorov O, Morse EM, Keates T, Hickman TT, Felletar I, Philpott M, Munro S, McKeown MR, Wang Y, Christie AL, West N, Cameron MJ, Schwartz B, Heightman TD, La Thangue N, et al (2010) Selective inhibition of BET bromodomains. *Nature* **468:** 1067–1073

Fraga MF, Ballestar E, Villar-Garea A, Boix-Chornet M, Espada J, Schotta G, Bonaldi T, Haydon C, Ropero S, Petrie K, Iyer NG, Perez-Rosado A, Calvo E, Lopez JA, Cano A, Calasanz MJ, Colomer D, Piris MA, Ahn N, Imhof A, et al (2005) Loss of acetylation at Lys16 and trimethylation at Lys20 of histone H4 is a common hallmark of human cancer. *Nat. Genet.* **37:** 391–400

Fujita N, Watanabe S, Ichimura T, Tsuruzoe S, Shinkai Y, Tachibana M, Chiba T & Nakao M (2003) 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

Furne C, Rama N, Corset V, Chedotal A & Mehlen P (2008) Netrin-1 is a survival factor during commissural neuron navigation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105:** 14465–14470

Gaggioli C, Hooper S, Hidalgo-Carcedo C, Grosse R, Marshall JF, Harrington K & Sahai E (2007) Fibroblast-led collective invasion of carcinoma cells with differing roles for RhoGTPases in leading and following cells. *Nat. Cell Biol.* **9:** 1392–1400

Gama-Sosa MA, Slagel VA, Trewyn RW, Oxenhandler R, Kuo KC, Gehrke CW & Ehrlich M (1983) The 5-methylcytosine content of DNA from human tumors. *Nucleic Acids Res.* **11:** 6883–6894

Gardiner-Garden M & Frommer M (1987) CpG islands in vertebrate genomes. *J. Mol. Biol.* **196:** 261–282

Gascard P & Tlsty TD (2016) Carcinoma-associated fibroblasts: orchestrating the composition of malignancy. *Genes Dev.* **30:** 1002–1019

Gaudet F, Hodgson JG, Eden A, Jackson-Grusby L, Dausman J, Gray JW, Leonhardt H & Jaenisch R (2003) Induction of tumors in mice by genomic hypomethylation. *Science* **300:** 489–492

Gilbert N, Thomson I, Boyle S, Allan J, Ramsahoye B & Bickmore WA (2007) DNA methylation affects nuclear organization, histone modifications, and linker histone binding but not chromatin compaction. *J. Cell Biol.* **177:** 401–411

Girard A & Hannon GJ (2007) [The role of piRNAs in mouse spermatogenesis.]. *J. Soc. Biol.* **201:** 411–418

Goelz SE, Vogelstein B, Hamilton SR & Feinberg AP (1985) Hypomethylation of DNA from benign and malignant human colon neoplasms. *Science* **228:** 187–190

Goldschneider D & Mehlen P (2010) Dependence receptors: a new paradigm in cell signaling and cancer therapy. *Oncogene* **29:** 1865–1882

Goll MG, Kirpekar F, Maggert KA, Yoder JA, Hsieh C-L, Zhang X, Golic KG, Jacobsen SE & Bestor TH (2006) Methylation of tRNAAsp by the DNA methyltransferase homolog Dnmt2. *Science* **311:** 395–398

Gordon K, Clouaire T, Bao XX, Kemp SE, Xenophontos M, de Las Heras JI & Stancheva I (2014) Immortality, but not oncogenic transformation, of primary human cells leads to epigenetic reprogramming of DNA methylation and gene expression. *Nucleic Acids Res.* **42:** 3529–3541

Grandin M, Mathot P, Devailly G, Bidet Y, Ghantous A, Favrot C, Gibert B, Gadot N, Puisieux I, Herceg Z, Delcros J-G, Bernet A, Mehlen P & Dante R (2016a) Inhibition of DNA methylation promotes breast tumor sensitivity to netrin-1 interference. *EMBO Mol. Med.* **8:** 863–877

Grandin M, Meier M, Delcros JG, Nikodemus D, Reuten R, Patel TR, Goldschneider D, Orriss G, Krahn N, Boussouar A, Abes R, Dean Y, Neves D, Bernet A, Depil S, Schneiders F, Poole K, Dante R, Koch M, Mehlen P, et al (2016b) Structural Decoding of the Netrin-1/UNC5 Interaction and its Therapeutical Implications in Cancers. *Cancer Cell* **29:** 173–185

Grandin M, Meier M, Delcros JG, Nikodemus D, Reuten R, Patel TR, Goldschneider D, Orriss G, Krahn N, Boussouar A, Abes R, Dean Y, Neves D, Bernet A, Depil S, Schneiders F, Poole K, Dante R, Koch M, Mehlen P, et al (2016c) Structural Decoding of the Netrin-1/UNC5 Interaction and its Therapeutical Implications in Cancers. *Cancer Cell* **29:** 173–185

Grewal SIS & Jia S (2007) Heterochromatin revisited. *Nat. Rev. Genet.* **8:** 35–46

Gruenbaum Y, Stein R, Cedar H & Razin A (1981) Methylation of CpG sequences in eukaryotic DNA. *FEBS Lett.* **124:** 67–71

Grum-Schwensen B, Klingelhofer J, Berg CH, El-Naaman C, Grigorian M, Lukanidin E & Ambartsumian N (2005) Suppression of tumor development and metastasis formation in mice lacking the S100A4(mts1) gene. *Cancer Res.* **65:** 3772–3780

Le Guezennec X, Vermeulen M, Brinkman AB, Hoeijmakers WAM, Cohen A, Lasonder E & Stunnenberg HG (2006) MBD2/NuRD and MBD3/NuRD, two distinct complexes with different biochemical and functional properties. *Mol. Cell. Biol.* **26:** 843–851

Hajkova P, Jeffries SJ, Lee C, Miller N, Jackson SP & Surani MA (2010) Genome-wide reprogramming in the mouse germ line entails the base excision repair pathway. *Science* **329:** 78–82

Hanahan D & Coussens LM (2012) Accessories to the crime: functions of cells recruited to the tumor microenvironment. *Cancer Cell* **21:** 309–322

Hanahan D & Weinberg RA (2011) Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **144:** 646–674

Hashimoto H, Liu Y, Upadhyay AK, Chang Y, Howerton SB, Vertino PM, Zhang X & Cheng X (2012) Recognition and potential mechanisms for replication and erasure of cytosine hydroxymethylation. *Nucleic Acids Res.* **40:** 4841–4849

He Y-F, Li B-Z, Li Z, Liu P, Wang Y, Tang Q, Ding J, Jia Y, Chen Z, Li L, Sun Y, Li X, Dai Q, Song C-X, Zhang K, He C & Xu G-L (2011) Tet-mediated formation of 5-carboxylcytosine and its excision by TDG in mammalian DNA. *Science* **333:** 1303–1307

Heard E, Clerc P & Avner P (1997) X-chromosome inactivation in mammals. *Annu. Rev. Genet.* **31:** 571–610

Heldin C-H, Rubin K, Pietras K & Ostman A (2004) High interstitial fluid pressure - an obstacle in cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* **4:** 806–813

Hendrich B & Bird A (1998) Identification and characterization of a family of mammalian methyl-CpG binding proteins. *Mol. Cell. Biol.* **18:** 6538–6547

Hendrich B, Guy J, Ramsahoye B, Wilson VA & Bird A (2001) Closely related proteins MBD2 and MBD3 play distinctive but interacting roles in mouse development.

Genes Dev. **15:** 710–723
Hendrich B, Hardeland U, Ng HH, Jiricny J & Bird A (1999) The thymine glycosylase MBD4 can bind to the product of deamination at methylated CpG sites. *Nature* **401:** 301–304
Hervouet E, Lalier L, Debien E, Cheray M, Geairon A, Rogniaux H, Loussouarn D, Martin SA, Vallette FM & Cartron P-F (2010) Disruption of Dnmt1/PCNA/UHRF1 interactions promotes tumorigenesis from human and mice glial cells. *PLoS One* **5:** e11333
Hirata E, Girotti MR, Viros A, Hooper S, Spencer-Dene B, Matsuda M, Larkin J, Marais R & Sahai E (2015) Intravital imaging reveals how BRAF inhibition generates drug-tolerant microenvironments with high integrin beta1/FAK signaling. *Cancer Cell* **27:** 574–588
Hoffmann MJ & Schulz WA (2005) Causes and consequences of DNA hypomethylation in human cancer. *Biochem. Cell Biol.* **83:** 296–321
Hu M, Yao J, Cai L, Bachman KE, van den Brule F, Velculescu V & Polyak K (2005) Distinct epigenetic changes in the stromal cells of breast cancers. *Nat. Genet.* **37:** 899–905
Hu Y, Yan C, Mu L, Huang K, Li X, Tao D, Wu Y & Qin J (2015) Fibroblast-Derived Exosomes Contribute to Chemoresistance through Priming Cancer Stem Cells in Colorectal Cancer. *PLoS One* **10:** e0125625
Iguchi-Ariga SM & 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
Ingham PW & McMahon AP (2001) Hedgehog signaling in animal development: paradigms and principles. *Genes Dev.* **15:** 3059–3087
Issa JP (2000) CpG-island methylation in aging and cancer. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **249:** 101–118
Issa JP & Baylin SB (1996) Epigenetics and human disease. *Nat. Med.* **2:** 281–282
Ito S, Shen L, Dai Q, Wu SC, Collins LB, Swenberg JA, He C & Zhang Y (2011) Tet proteins can convert 5-methylcytosine to 5-formylcytosine and 5-carboxylcytosine. *Science* **333:** 1300–1303
Iwano M, Plieth D, Danoff TM, Xue C, Okada H & Neilson EG (2002) Evidence that fibroblasts derive from epithelium during tissue fibrosis. *J. Clin. Invest.* **110:** 341–350
Izzo A & Schneider R (2010) Chatting histone modifications in mammals. *Brief. Funct. Genomics* **9:** 429–443
Jenuwein T & Allis CD (2001) Translating the histone code. *Science* **293:** 1074–1080
Johansson M, Denardo DG & Coussens LM (2008) Polarized immune responses differentially regulate cancer development. *Immunol. Rev.* **222:** 145–154
Jones PA & Liang G (2009) Rethinking how DNA methylation patterns are maintained. *Nat. Rev. Genet.* **10:** 805–811
Jorgensen HF, Ben-Porath I & Bird AP (2004) Mbd1 is recruited to both methylated and nonmethylated CpGs via distinct DNA binding domains. *Mol. Cell. Biol.* **24:** 3387–3395
Jove R, Sperber DE & Manley JL (1984) Transcription of methylated eukaryotic viral genes in a soluble in vitro system. *Nucleic Acids Res.* **12:** 4715–4730
Junttila MR & de Sauvage FJ (2013) Influence of tumour micro-environment heterogeneity on therapeutic response. *Nature* **501:** 346–354
Kahlert C & Kalluri R (2013) Exosomes in tumor microenvironment influence cancer progression and metastasis. *J. Mol. Med. (Berl).* **91:** 431–437

Kalluri R (2016) The biology and function of fibroblasts in cancer. *Nat. Rev. Cancer* **16:** 582–598
Kalluri R & Zeisberg M (2006) Fibroblasts in cancer. *Nat. Rev. Cancer* **6:** 392–401
Kanai Y, Ushijima S, Nakanishi Y & Hirohashi S (1999) Reduced mRNA expression of the DNA demethylase, MBD2, in human colorectal and stomach cancers. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **264:** 962–966
Kim D, Pertea G, Trapnell C, Pimentel H, Kelley R & Salzberg SL (2013) TopHat2: accurate alignment of transcriptomes in the presence of insertions, deletions and gene fusions. *Genome Biol.* **14:** R36
Kim J (2003) Methylation-sensitive binding of transcription factor YY1 to an insulator sequence within the paternally expressed imprinted gene, Peg3. *Hum. Mol. Genet.* **12:** 233–245
Kim K, Chadalapaka G, Lee S-O, Yamada D, Sastre-Garau X, Defossez P-A, Park Y-Y, Lee J-S & Safe S (2012) Identification of oncogenic microRNA-17-92/ZBTB4/specificity protein axis in breast cancer. *Oncogene* **31:** 1034–1044
Klemm F & Joyce JA (2015) Microenvironmental regulation of therapeutic response in cancer. *Trends Cell Biol.* **25:** 198–213 Available at: http://dx.doi.org/10.1016/j.tcb.2014.11.006
Klose RJ, Sarraf SA, Schmiedeberg L, McDermott SM, Stancheva I & 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
Kojima Y, Acar A, Eaton EN, Mellody KT, Scheel C, Ben-Porath I, Onder TT, Wang ZC, Richardson AL, Weinberg RA & Orimo A (2010) Autocrine TGF-beta and stromal cell-derived factor-1 (SDF-1) signaling drives the evolution of tumor-promoting mammary stromal myofibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107:** 20009–20014
Kondo E, Gu Z, Horii A & 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
Kraman M, Bambrough PJ, Arnold JN, Roberts EW, Magiera L, Jones JO, Gopinathan A, Tuveson DA & Fearon DT (2010) Suppression of antitumor immunity by stromal cells expressing fibroblast activation protein-alpha. *Science* **330:** 827–830
Kriaucionis S & Heintz N (2009) The nuclear DNA base 5-hydroxymethylcytosine is present in Purkinje neurons and the brain. *Science* **324:** 929–930
Kuchnio A, Moens S, Bruning U, Kuchnio K, Cruys B, Thienpont B, Broux M, Ungureanu AA, Leite de Oliveira R, Bruyere F, Cuervo H, Manderveld A, Carton A, Hernandez-Fernaud JR, Zanivan S, Bartic C, Foidart J-M, Noel A, Vinckier S, Lambrechts D, et al (2015) The Cancer Cell Oxygen Sensor PHD2 Promotes Metastasis via Activation of Cancer-Associated Fibroblasts. *Cell Rep.* **12:** 992–1005
Kumari N, Dwarakanath BS, Das A & Bhatt AN (2016) Role of interleukin-6 in cancer progression and therapeutic resistance. *Tumour Biol.* **37:** 11553–11572
Lamouille S & Derynck R (2007) Cell size and invasion in TGF-beta-induced epithelial to mesenchymal transition is regulated by activation of the mTOR pathway. *J. Cell Biol.* **178:** 437–451
Lee MR, Prasain N, Chae H-D, Kim Y-J, Mantel C, Yoder MC & Broxmeyer HE (2013) Epigenetic regulation of NANOG by miR-302 cluster-MBD2 completes induced pluripotent stem cell reprogramming. *Stem Cells* **31:** 666–681
Levental KR, Yu H, Kass L, Lakins JN, Egeblad M, Erler JT, Fong SFT, Csiszar K, Giaccia A, Weninger W, Yamauchi M, Gasser DL & Weaver VM (2009) Matrix crosslinking forces tumor progression by enhancing integrin signaling. *Cell* **139:** 891–906

Li E (2002) Chromatin modification and epigenetic reprogramming in mammalian development. *Nat. Rev. Genet.* **3:** 662–673

Li P, Shan J-X, Chen X-H, Zhang D, Su L-P, Huang X-Y, Yu B-Q, Zhi Q-M, Li C-L, Wang Y-Q, Tomei S, Cai Q, Ji J, Li J-F, Chouchane L, Yu Y-Y, Sun F-Z, Xu Z-H, Liu B-Y & Zhu Z-G (2015) Epigenetic silencing of microRNA-149 in cancer-associated fibroblasts mediates prostaglandin E2/interleukin-6 signaling in the tumor microenvironment. *Cell Res.* **25:** 588–603

Li R, He Q, Han S, Zhang M, Liu J, Su M, Wei S, Wang X & Shen L (2017) MBD3 inhibits formation of liver cancer stem cells. *Oncotarget* **8:** 6067–6078

Liu C, Teng Z-Q, Santistevan NJ, Szulwach KE, Guo W, Jin P & Zhao X (2010) Epigenetic regulation of miR-184 by MBD1 governs neural stem cell proliferation and differentiation. *Cell Stem Cell* **6:** 433–444

Liu M, Zhou J, Chen Z & Cheng AS-L (2017) Understanding the epigenetic regulation of tumours and their microenvironments: opportunities and problems for epigenetic therapy. *J. Pathol.* **241:** 10–24

Llambi F, Causeret F, Bloch-Gallego E & Mehlen P (2001) Netrin-1 acts as a survival factor via its receptors UNC5H and DCC. *EMBO J.* **20:** 2715–2722

Lochter A, Galosy S, Muschler J, Freedman N, Werb Z & Bissell MJ (1997) Matrix metalloproteinase stromelysin-1 triggers a cascade of molecular alterations that leads to stable epithelial-to-mesenchymal conversion and a premalignant phenotype in mammary epithelial cells. *J. Cell Biol.* **139:** 1861–1872

Lopes EC, Valls E, Figueroa ME, Mazur A, Meng F-G, Chiosis G, Laird PW, Schreiber-Agus N, Greally JM, Prokhortchouk E & Melnick A (2008) Kaiso contributes to DNA methylation-dependent silencing of tumor suppressor genes in colon cancer cell lines. *Cancer Res.* **68:** 7258–7263

Lopez-Serra L, Ballestar E, Fraga MF, Alaminos M, Setien F & 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

Di Lorenzo A & Bedford MT (2011) Histone arginine methylation. *FEBS Lett.* **585:** 2024–2031

Lu Y, Loh Y-H, Li H, Cesana M, Ficarro SB, Parikh JR, Salomonis N, Toh C-XD, Andreadis ST, Luckey CJ, Collins JJ, Daley GQ & Marto JA (2014) Alternative splicing of MBD2 supports self-renewal in human pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* **15:** 92–101

Luga V & Wrana JL (2013) Tumor-stroma interaction: Revealing fibroblast-secreted exosomes as potent regulators of Wnt-planar cell polarity signaling in cancer metastasis. *Cancer Res.* **73:** 6843–6847

Luo H, Tu G, Liu Z & Liu M (2015) Cancer-associated fibroblasts : A multifaceted driver of breast cancer progression. *Cancer Lett.* **361:** 155–163 Available at: http://dx.doi.org/10.1016/j.canlet.2015.02.018

Madar S, Goldstein I & Rotter V (2013) 'Cancer associated fibroblasts'--more than meets the eye. *Trends Mol. Med.* **19:** 447–453

Magdinier F, Billard LM, Wittmann G, Frappart L, Benchaib M, Lenoir GM, Guerin JF & Dante R (2000) Regional methylation of the 5' end CpG island of BRCA1 is associated with reduced gene expression in human somatic cells. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **14:** 1585–1594

Magdinier F, D'Estaing SG, Peinado C, Demirci B, Berthet C, Guerin JF & Dante R (2002) Epigenetic marks at BRCA1 and p53 coding sequences in early human embryogenesis. *Mol. Hum. Reprod.* **8:** 630–635

Malanchi I, Santamaria-Martinez A, Susanto E, Peng H, Lehr H-A, Delaloye J-F & Huelsken J (2011) Interactions between cancer stem cells and their niche govern metastatic colonization. *Nature* **481:** 85–89

Martin M, Ancey P-B, Cros M-P, Durand G, Le Calvez-Kelm F, Hernandez-Vargas H & Herceg Z (2014) Dynamic imbalance between cancer cell subpopulations induced by transforming growth factor beta (TGF-beta) is associated with a DNA methylome switch. *BMC Genomics* **15:** 435

Martinez-Outschoorn UE, Lisanti MP & Sotgia F (2014) Catabolic cancer-associated fibroblasts transfer energy and biomass to anabolic cancer cells, fueling tumor growth. *Semin. Cancer Biol.* **25:** 47–60

Marusyk A, Tabassum DP, Janiszewska M, Place AE, Trinh A, Rozhok AI, Pyne S, Guerriero JL, Shu S, Ekram M, Ishkin A, Cahill DP, Nikolsky Y, Chan TA, Rimawi MF, Hilsenbeck S, Schiff R, Osborne KC, Letai A & Polyak K (2016) Spatial Proximity to Fibroblasts Impacts Molecular Features and Therapeutic Sensitivity of Breast Cancer Cells Influencing Clinical Outcomes. *Cancer Res.*

Maunakea AK, Nagarajan RP, Bilenky M, Ballinger TJ, D'Souza C, Fouse SD, Johnson BE, Hong C, Nielsen C, Zhao Y, Turecki G, Delaney A, Varhol R, Thiessen N, Shchors K, Heine VM, Rowitch DH, Xing X, Fiore C, Schillebeeckx M, et al (2010) Conserved role of intragenic DNA methylation in regulating alternative promoters. *Nature* **466:** 253–257

McDonald LT & LaRue AC (2012) Hematopoietic stem cell derived carcinoma-associated fibroblasts: a novel origin. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* **5:** 863–873

McDonel P, Demmers J, Tan DWM, Watt F & Hendrich BD (2012) Sin3a is essential for the genome integrity and viability of pluripotent cells. *Dev. Biol.* **363:** 62–73

McMillin DW, Negri JM & Mitsiades CS (2013) The role of tumour-stromal interactions in modifying drug response: challenges and opportunities. *Nat. Rev. Drug Discov.* **12:** 217–228

Mehlen P & Bredesen DE (2004) The dependence receptor hypothesis. *Apoptosis* **9:** 37–49

Mehlen P, Rabizadeh S, Snipas SJ, Assa-Munt N, Salvesen GS & Bredesen DE (1998) The DCC gene product induces apoptosis by a mechanism requiring receptor proteolysis. *Nature* **395:** 801–804

Mehlen P & Thibert C (2004) Dependence receptors: between life and death. *Cell. Mol. Life Sci.* **61:** 1854–1866

Mian OY, Wang SZ, Zhu SZ, Gnanapragasam MN, Graham L, Bear HD & Ginder GD (2011) Methyl-binding domain protein 2-dependent proliferation and survival of breast cancer cells. *Mol. Cancer Res.* **9:** 1152–1162

Moran S, Arribas C & Esteller M (2016) Validation of a DNA methylation microarray for 850,000 CpG sites of the human genome enriched in enhancer sequences. *Epigenomics* **8:** 389–399

Morel A-P, Lievre M, Thomas C, Hinkal G, Ansieau S & Puisieux A (2008) Generation of breast cancer stem cells through epithelial-mesenchymal transition. *PLoS One* **3:** e2888

Morris TJ, Butcher LM, Feber A, Teschendorff AE, Chakravarthy AR, Wojdacz TK & Beck S (2014) ChAMP: 450k Chip Analysis Methylation Pipeline. *Bioinformatics* **30:** 428–430

Mrazek AA, Carmical JR, Wood TG, Hellmich MR, Eltorky M, Bohanon FJ & Chao C (2014) Colorectal Cancer-Associated Fibroblasts are Genotypically Distinct. *Curr. Cancer Ther. Rev.* **10:** 97–218

Murdoch C, Muthana M, Coffelt SB & Lewis CE (2008) The role of myeloid cells in the promotion of tumour angiogenesis. *Nat. Rev. Cancer* **8:** 618–631
Nan X, Ng HH, Johnson CA, Laherty CD, Turner BM, Eisenman RN & Bird A (1998) Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. *Nature* **393:** 386–389
Nguyen CT, Gonzales FA & 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
O'Connell JT, Sugimoto H, Cooke VG, MacDonald BA, Mehta AI, LeBleu VS, Dewar R, Rocha RM, Brentani RR, Resnick MB, Neilson EG, Zeisberg M & Kalluri R (2011) VEGF-A and Tenascin-C produced by S100A4+ stromal cells are important for metastatic colonization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108:** 16002–16007
Ogawa M, LaRue AC & Drake CJ (2006) Hematopoietic origin of fibroblasts/myofibroblasts: Its pathophysiologic implications. *Blood* **108:** 2893–2896
Ohki I, Shimotake N, Fujita N, Nakao M & Shirakawa M (1999) Solution structure of the methyl-CpG-binding domain of the methylation-dependent transcriptional repressor MBD1. *EMBO J.* **18:** 6653–6661
Ohlund D, Elyada E & Tuveson D (2014) Fibroblast heterogeneity in the cancer wound. *J. Exp. Med.* **211:** 1503–1523
Okano M, Xie S & Li E (1998) Cloning and characterization of a family of novel mammalian DNA (cytosine-5) methyltransferases. *Nat. Genet.* **19:** 219–220
Olumi AF, Grossfeld GD, Hayward SW, Carroll PR, Tlsty TD & Cunha GR (1999a) Carcinoma-associated fibroblasts direct tumor progression of initiated human prostatic epithelium. *Cancer Res.* **59:** 5002–5011
Olumi AF, Grossfeld GD, Hayward SW, Carroll PR, Tlsty TD & Cunha GR (1999b) Carcinoma-associated fibroblasts direct tumor progression of initiated human prostatic epithelium. *Cancer Res.* **59:** 5002–5011
Orimo A, Gupta PB, Sgroi DC, Arenzana-seisdedos F, Delaunay T, Naeem R, Carey VJ, Richardson AL, Weinberg RA & Ornon V (2005) Stromal Fibroblasts Present in Invasive Human Breast Carcinomas Promote Tumor Growth and Angiogenesis through Elevated SDF-1 / CXCL12 Secretion. **121:** 335–348
Orimo A, Tomioka Y, Shimizu Y, Sato M, Oigawa S, Kamata K, Nogi Y, Inoue S, Takahashi M, Hata T & Muramatsu M (2001) Cancer-associated myofibroblasts possess various factors to promote endometrial tumor progression. *Clin. Cancer Res.* **7:** 3097–3105
Ortmann CA, Eisele L, Nuckel H, Klein-Hitpass L, Fuhrer A, Duhrsen U & Zeschnigk M (2008) Aberrant hypomethylation of the cancer-testis antigen PRAME correlates with PRAME expression in acute myeloid leukemia. *Ann. Hematol.* **87:** 809–818
Ozdemir BC, Pentcheva-Hoang T, Carstens JL, Zheng X, Wu C-C, Simpson TR, Laklai H, Sugimoto H, Kahlert C, Novitskiy S V, De Jesus-Acosta A, Sharma P, Heidari P, Mahmood U, Chin L, Moses HL, Weaver VM, Maitra A, Allison JP, LeBleu VS, et al (2014) Depletion of carcinoma-associated fibroblasts and fibrosis induces immunosuppression and accelerates pancreas cancer with reduced survival. *Cancer Cell* **25:** 719–734
Pakneshan P, Tetu B & Rabbani SA (2004) Demethylation of urokinase promoter as a prognostic marker in patients with breast carcinoma. *Clin. Cancer Res.* **10:** 3035–3041
Pal S, Vishwanath SN, Erdjument-Bromage H, Tempst P & Sif S (2004) Human SWI/SNF-

associated PRMT5 methylates histone H3 arginine 8 and negatively regulates expression of ST7 and NM23 tumor suppressor genes. *Mol. Cell. Biol.* **24:** 9630–9645

De Palma M, Murdoch C, Venneri MA, Naldini L & Lewis CE (2007) Tie2-expressing monocytes: regulation of tumor angiogenesis and therapeutic implications. *Trends Immunol.* **28:** 519–524

Park S-J, Nakagawa T, Kitamura H, Atsumi T, Kamon H, Sawa S-I, Kamimura D, Ueda N, Iwakura Y, Ishihara K, Murakami M & Hirano T (2004) IL-6 regulates in vivo dendritic cell differentiation through STAT3 activation. *J. Immunol.* **173:** 3844–3854

Pasquale EB (2010) Eph receptors and ephrins in cancer: bidirectional signalling and beyond. *Nat. Rev. Cancer* **10:** 165–180

Patra SK, Patra A, Zhao H, Carroll P & 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

Pavlides S, Whitaker-Menezes D, Castello-Cros R, Flomenberg N, Witkiewicz AK, Frank PG, Casimiro MC, Wang C, Fortina P, Addya S, Pestell RG, Martinez-Outschoorn UE, Sotgia F & Lisanti MP (2009) The reverse Warburg effect: aerobic glycolysis in cancer associated fibroblasts and the tumor stroma. *Cell Cycle* **8:** 3984–4001

Pena C, Cespedes MV, Lindh MB, Kiflemariam S, Mezheyeuski A, Edqvist P-H, Hagglof C, Birgisson H, Bojmar L, Jirstrom K, Sandstrom P, Olsson E, Veerla S, Gallardo A, Sjoblom T, Chang AC-M, Reddel RR, Mangues R, Augsten M & Ostman A (2013) STC1 expression by cancer-associated fibroblasts drives metastasis of colorectal cancer. *Cancer Res.* **73:** 1287–1297

Petersen OW, Nielsen HL, Gudjonsson T, Villadsen R, Rank F, Niebuhr E, Bissell MJ & Ronnov-Jessen L (2003) Epithelial to mesenchymal transition in human breast cancer can provide a nonmalignant stroma. *Am. J. Pathol.* **162:** 391–402

Pichler G, Wolf P, Schmidt CS, Meilinger D, Schneider K, Frauer C, Fellinger K, Rottach A & Leonhardt H (2011) Cooperative DNA and histone binding by Uhrf2 links the two major repressive epigenetic pathways. *J. Cell. Biochem.* **112:** 2585–2593

Pidsley R, Zotenko E, Peters TJ, Lawrence MG, Risbridger GP, Molloy P, Van Djik S, Muhlhausler B, Stirzaker C & Clark SJ (2016) Critical evaluation of the Illumina MethylationEPIC BeadChip microarray for whole-genome DNA methylation profiling. *Genome Biol.* **17:** 208

Pollex T & Heard E (2012) Recent advances in X-chromosome inactivation research. *Curr. Opin. Cell Biol.* **24:** 825–832

Portela A & Esteller M (2010) Epigenetic modifications and human disease. *Nat. Biotechnol.* **28:** 1057–1068

Prokhortchouk A, Hendrich B, Jorgensen H, Ruzov A, Wilm M, Georgiev G, Bird A & Prokhortchouk E (2001) The p120 catenin partner Kaiso is a DNA methylation-dependent transcriptional repressor. *Genes Dev.* **15:** 1613–1618

Prokhortchouk A, Sansom O, Selfridge J, Caballero IM, Salozhin S, Aithozhina D, Cerchietti L, Meng FG, Augenlicht LH, Mariadason JM, Hendrich B, Melnick A, Prokhortchouk E, Clarke A & Bird A (2006) Kaiso-deficient mice show resistance to intestinal cancer. *Mol. Cell. Biol.* **26:** 199–208

Provenzano PP, Cuevas C, Chang AE, Goel VK, Von Hoff DD & Hingorani SR (2012) Enzymatic targeting of the stroma ablates physical barriers to treatment of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Cell* **21:** 418–429

Pulukuri SM & Rao JS (2006) CpG island promoter methylation and silencing of 14-3-3sigma gene expression in LNCaP and Tramp-C1 prostate cancer cell lines is

associated with methyl-CpG-binding protein MBD2. *Oncogene* **25:** 4559–4572
Pulukuri SMK, Estes N, Patel J & Rao JS (2007) Demethylation-linked activation of urokinase plasminogen activator is involved in progression of prostate cancer. *Cancer Res.* **67:** 930–939
Qiao A, Gu F, Guo X, Zhang X & Fu L (2016) Breast cancer-associated fibroblasts: their roles in tumor initiation, progression and clinical applications. *Front. Med.* **10:** 33–40
Qiu W, Hu M, Sridhar A, Opeskin K, Fox S, Shipitsin M, Trivett M, Thompson ER, Ramakrishna M, Gorringe KL, Polyak K, Haviv I & Campbell IG (2008) No evidence of clonal somatic genetic alterations in cancer-associated fibroblasts from human breast and ovarian carcinomas. *Nat. Genet.* **40:** 650–655
Quail DF & Joyce JA (2013) Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. *Nat. Med.* **19:** 1423–1437
Quante M, Tu SP, Tomita H, Gonda T, Wang SSW, Takashi S, Baik GH, Shibata W, Diprete B, Betz KS, Friedman R, Varro A, Tycko B & Wang TC (2011) Bone marrow-derived myofibroblasts contribute to the mesenchymal stem cell niche and promote tumor growth. *Cancer Cell* **19:** 257–272
Raza A, Franklin MJ & Dudek AZ (2010) Pericytes and vessel maturation during tumor angiogenesis and metastasis. *Am. J. Hematol.* **85:** 593–598
Reik W, Dean W & Walter J (2001) Epigenetic reprogramming in mammalian development. *Science* **293:** 1089–1093
Restifo NP, Dudley ME & Rosenberg SA (2012) Adoptive immunotherapy for cancer: harnessing the T cell response. *Nat. Rev. Immunol.* **12:** 269–281
Rodriguez-Ubreva J, Ciudad L, Gomez-Cabrero D, Parra M, Bussmann LH, di Tullio A, Kallin EM, Tegner J, Graf T & Ballestar E (2012) Pre-B cell to macrophage transdifferentiation without significant promoter DNA methylation changes. *Nucleic Acids Res.* **40:** 1954–1968
Rokavec M, Oner MG & Hermeking H (2016) lnflammation-induced epigenetic switches in cancer. *Cell. Mol. Life Sci.* **73:** 23–39
Roloff TC, Ropers HH & Nuber UA (2003) Comparative study of methyl-CpG-binding domain proteins. *BMC Genomics* **4:** 1
Roussel-Gervais A, Naciri I, Kirsh O, Kasprzyk L, Velasco G, Grillo G, Dubus P & Defossez P-A (2017) Loss of the Methyl-CpG-Binding Protein ZBTB4 Alters Mitotic Checkpoint, Increases Aneuploidy, and Promotes Tumorigenesis. *Cancer Res.* **77:** 62–73
Ruoslahti E (2002) Specialization of tumour vasculature. *Nat. Rev. Cancer* **2:** 83–90
Saito M & 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
Saito Y, Liang G, Egger G, Friedman JM, Chuang JC, Coetzee GA & Jones PA (2006) Specific activation of microRNA-127 with downregulation of the proto-oncogene BCL6 by chromatin-modifying drugs in human cancer cells. *Cancer Cell* **9:** 435–443
Sansom OJ, Berger J, Bishop SM, Hendrich B, Bird A & Clarke AR (2003) Deficiency of Mbd2 suppresses intestinal tumorigenesis. *Nat. Genet.* **34:** 145–147
Sansom OJ, Maddison K & Clarke AR (2007) Mechanisms of disease: methyl-binding domain proteins as potential therapeutic targets in cancer. *Nat. Clin. Pract. Oncol.* **4:** 305–315
Sappino AP, Skalli O, Jackson B, Schurch W & Gabbiani G (1988) Smooth-muscle differentiation in stromal cells of malignant and non-malignant breast tissues. *Int. J.*

cancer **41:** 707–712
Sarma K & Reinberg D (2005) Histone variants meet their match. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **6:** 139–149
Sarraf SA & 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
Sasai N, Matsuda E, Sarashina E, Ishida Y & Kawaichi M (2005) Identification of a novel BTB-zinc finger transcriptional repressor, CIBZ, that interacts with CtBP corepressor. *Genes Cells* **10:** 871–885
Sasai N, Nakao M & Defossez P-A (2010) Sequence-specific recognition of methylated DNA by human zinc-finger proteins. *Nucleic Acids Res.* **38:** 5015–5022
Sasidharan R & Gerstein M (2008) Genomics: protein fossils live on as RNA. *Nature* **453:** 729–731
Scarsdale JN, Webb HD, Ginder GD & Williams DCJ (2011) Solution structure and dynamic analysis of chicken MBD2 methyl binding domain bound to a target-methylated DNA sequence. *Nucleic Acids Res.* **39:** 6741–6752
Scourzic L, Mouly E & Bernard OA (2015) TET proteins and the control of cytosine demethylation in cancer. *Genome Med.* **7:** 9
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 & Koseki H (2007) The SRA protein Np95 mediates epigenetic inheritance by recruiting Dnmt1 to methylated DNA. *Nature* **450:** 908–912
Shekhar MP, Werdell J, Santner SJ, Pauley RJ & Tait L (2001) Breast stroma plays a dominant regulatory role in breast epithelial growth and differentiation: implications for tumor development and progression. *Cancer Res.* **61:** 1320–1326
Shiga K, Hara M, Nagasaki T, Sato T, Takahashi H & Takeyama H (2015) Cancer-Associated Fibroblasts: Their Characteristics and Their Roles in Tumor Growth. *Cancers (Basel).* **7:** 2443–2458
Shimbo T, Du Y, Grimm SA, Dhasarathy A, Mav D, Shah RR, Shi H & Wade PA (2013) MBD3 localizes at promoters, gene bodies and enhancers of active genes. *PLoS Genet.* **9:** e1004028
Shukla S, Kavak E, Gregory M, Imashimizu M, Shutinoski B, Kashlev M, Oberdoerffer P, Sandberg R & Oberdoerffer S (2011) CTCF-promoted RNA polymerase II pausing links DNA methylation to splicing. *Nature* **479:** 74–79
SINSHEIMER RL (1955) The action of pancreatic deoxyribonuclease. II. Isomeric dinucleotides. *J. Biol. Chem.* **215:** 579–583
Slotkin RK & Martienssen R (2007) Transposable elements and the epigenetic regulation of the genome. *Nat. Rev. Genet.* **8:** 272–285
Smith ZD, Chan MM, Mikkelsen TS, Gu H, Gnirke A, Regev A & Meissner A (2012) A unique regulatory phase of DNA methylation in the early mammalian embryo. *Nature* **484:** 339–344
Sternlicht MD, Lochter A, Sympson CJ, Huey B, Rougier JP, Gray JW, Pinkel D, Bissell MJ & Werb Z (1999) The stromal proteinase MMP3/stromelysin-1 promotes mammary carcinogenesis. *Cell* **98:** 137–146
Stirzaker C, Song JZ, Ng W, Du Q, Armstrong NJ, Locke WJ, Statham AL, French H, Pidsley R, Valdes-Mora F, Zotenko E & Clark SJ (2016) Methyl-CpG-binding protein MBD2 plays a key role in maintenance and spread of DNA methylation at CpG islands and shores in cancer. *Oncogene*
Straussman R, Morikawa T, Shee K, Barzily-Rokni M, Qian ZR, Du J, Davis A, Mongare

MM, Gould J, Frederick DT, Cooper ZA, Chapman PB, Solit DB, Ribas A, Lo RS, Flaherty KT, Ogino S, Wargo JA & Golub TR (2012) Tumour micro-environment elicits innate resistance to RAF inhibitors through HGF secretion. *Nature* **487:** 500–504

Sztainberg Y, Chen H, Swann JW, Hao S, Tang B, Wu Z, Tang J, Wan Y-W, Liu Z, Rigo F & Zoghbi HY (2015) Reversal of phenotypes in MECP2 duplication mice using genetic rescue or antisense oligonucleotides. *Nature* **528:** 123–126

Taddei ML, Giannoni E, Comito G & Chiarugi P (2013) Microenvironment and tumor cell plasticity: an easy way out. *Cancer Lett.* **341:** 80–96

Tahiliani M, Koh KP, Shen Y, Pastor WA, Bandukwala H, Brudno Y, Agarwal S, Iyer LM, Liu DR, Aravind L & Rao A (2009) Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1. *Science* **324:** 930–935

Takai D & Jones PA (2002) Comprehensive analysis of CpG islands in human chromosomes 21 and 22. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99:** 3740–3745

Tammela T & Alitalo K (2010) Lymphangiogenesis: Molecular mechanisms and future promise. *Cell* **140:** 460–476

Tampe B & Zeisberg M (2014) Contribution of genetics and epigenetics to progression of kidney fibrosis. *Nephrol. Dial. Transplant* **29 Suppl 4:** iv72-9

Tan CP & Nakielny S (2006) Control of the DNA methylation system component MBD2 by protein arginine methylation. *Mol. Cell. Biol.* **26:** 7224–7235

Thibert C, Teillet M-A, Lapointe F, Mazelin L, Le Douarin NM & Mehlen P (2003) Inhibition of neuroepithelial patched-induced apoptosis by sonic hedgehog. *Science* **301:** 843–846

Thomson JP, Skene PJ, Selfridge J, Clouaire T, Guy J, Webb S, Kerr ARW, Deaton A, Andrews R, James KD, Turner DJ, Illingworth R & Bird A (2010) CpG islands influence chromatin structure via the CpG-binding protein Cfp1. *Nature* **464:** 1082–1086

Tiwari N, Tiwari VK, Waldmeier L, Balwierz PJ, Arnold P, Pachkov M, Meyer-Schaller N, Schubeler D, van Nimwegen E & Christofori G (2013) Sox4 is a master regulator of epithelial-mesenchymal transition by controlling Ezh2 expression and epigenetic reprogramming. *Cancer Cell* **23:** 768–783

Trapnell C, Williams BA, Pertea G, Mortazavi A, Kwan G, van Baren MJ, Salzberg SL, Wold BJ & Pachter L (2010) Transcript assembly and quantification by RNA-Seq reveals unannotated transcripts and isoform switching during cell differentiation. *Nat. Biotechnol.* **28:** 511–515

Unoki M, Nishidate T & Nakamura Y (2004) ICBP90, an E2F-1 target, recruits HDAC1 and binds to methyl-CpG through its SRA domain. *Oncogene* **23:** 7601–7610

Vermeulen L, De Sousa E Melo F, van der Heijden M, Cameron K, de Jong JH, Borovski T, Tuynman JB, Todaro M, Merz C, Rodermond H, Sprick MR, Kemper K, Richel DJ, Stassi G & Medema JP (2010) Wnt activity defines colon cancer stem cells and is regulated by the microenvironment. *Nat. Cell Biol.* **12:** 468–476

de Visser KE, Eichten A & Coussens LM (2006) Paradoxical roles of the immune system during cancer development. *Nat. Rev. Cancer* **6:** 24–37

Vogelmann J, Valeri A, Guillou E, Cuvier O & Nollmann M (2011) Roles of chromatin insulator proteins in higher-order chromatin organization and transcription regulation. *Nucleus* **2:** 358–369

Wan YY & Flavell RA (2007) 'Yin-Yang' functions of transforming growth factor-beta and T regulatory cells in immune regulation. *Immunol. Rev.* **220:** 199–213

Wang F, Yang Y-Z, Shi C-Z, Zhang P, Moyer MP, Zhang H-Z, Zou Y & Qin H-L (2012) UHRF1 promotes cell growth and metastasis through repression of p16(ink(4)a) in colorectal cancer. *Ann. Surg. Oncol.* **19:** 2753–2762

Wang H, Huang ZQ, Xia L, Feng Q, Erdjument-Bromage H, Strahl BD, Briggs SD, Allis CD, Wong J, Tempst P & Zhang Y (2001) Methylation of histone H4 at arginine 3 facilitating transcriptional activation by nuclear hormone receptor. *Science* **293:** 853–857

Wang J, Duncan D, Shi Z & Zhang B (2013) WEB-based GEne SeT AnaLysis Toolkit (WebGestalt): update 2013. *Nucleic Acids Res.* **41:** W77-83

Wang K-Y & James Shen C-K (2004) DNA methyltransferase Dnmt1 and mismatch repair. *Oncogene* **23:** 7898–7902

Watt F & 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

Weber A, Marquardt J, Elzi D, Forster N, Starke S, Glaum A, Yamada D, Defossez P-A, Delrow J, Eisenman RN, Christiansen H & Eilers M (2008) Zbtb4 represses transcription of P21CIP1 and controls the cellular response to p53 activation. *EMBO J.* **27:** 1563–1574

Weisenberger DJ, Campan M, Long TI, Kim M, Woods C, Fiala E, Ehrlich M & Laird PW (2005) Analysis of repetitive element DNA methylation by MethyLight. *Nucleic Acids Res.* **33:** 6823–6836

Wilson TR, Fridlyand J, Yan Y, Penuel E, Burton L, Chan E, Peng J, Lin E, Wang Y, Sosman J, Ribas A, Li J, Moffat J, Sutherlin DP, Koeppen H, Merchant M, Neve R & Settleman J (2012) Widespread potential for growth-factor-driven resistance to anticancer kinase inhibitors. *Nature* **487:** 505–509

Wood KH & Zhou Z (2016) Emerging Molecular and Biological Functions of MBD2 , a Reader of DNA Methylation. **7:** 1–14

Wu H & Zhang Y (2014) Reversing DNA methylation: mechanisms, genomics, and biological functions. *Cell* **156:** 45–68

Yang C, Bolotin E, Jiang T, Sladek FM & Martinez E (2007) Prevalence of the initiator over the TATA box in human and yeast genes and identification of DNA motifs enriched in human TATA-less core promoters. *Gene* **389:** 52–65

Yee D, Rosen N, Favoni RE & Cullen KJ (1991) The insulin-like growth factors, their receptors, and their binding proteins in human breast cancer. *Cancer Treat. Res.* **53:** 93–106

Yoo CB & Jones PA (2006) Epigenetic therapy of cancer: past, present and future. *Nat. Rev. Drug Discov.* **5:** 37–50

Yoon H-G, Chan DW, Reynolds AB, Qin J & Wong J (2003) N-CoR mediates DNA methylation-dependent repression through a methyl CpG binding protein Kaiso. *Mol. Cell* **12:** 723–734

Yoshihara K, Shahmoradgoli M, Martinez E, Vegesna R, Kim H, Torres-Garcia W, Trevino V, Shen H, Laird PW, Levine DA, Carter SL, Getz G, Stemke-Hale K, Mills GB & Verhaak RGW (2013) Inferring tumour purity and stromal and immune cell admixture from expression data. *Nat. Commun.* **4:** 2612

Yu Y, Xiao C-H, Tan L-D, Wang Q-S, Li X-Q & Feng Y-M (2014a) Cancer-associated fibroblasts induce epithelial–mesenchymal transition of breast cancer cells through paracrine TGF-β signalling. *Br. J. Cancer* **110:** 724–732 Available at: http://www.nature.com/doifinder/10.1038/bjc.2013.768

Yu Y, Xiao C-H, Tan L-D, Wang Q-S, Li X-Q & Feng Y-M (2014b) Cancer-associated

fibroblasts induce epithelial-mesenchymal transition of breast cancer cells through paracrine TGF-beta signalling. *Br. J. Cancer* **110:** 724–732

Yun M, Wu J, Workman JL & Li B (2011) Readers of histone modifications. *Cell Res.* **21:** 564–578

Zeisberg EM, Potenta S, Xie L, Zeisberg M & Kalluri R (2007) Discovery of endothelial to mesenchymal transition as a source for carcinoma-associated fibroblasts. *Cancer Res.* **67:** 10123–10128

Zeisberg EM & Zeisberg M (2013) The role of promoter hypermethylation in fibroblast activation and fibrogenesis. *J. Pathol.* **229:** 264–273

Zhang J, Gao Q, Li P, Liu X, Jia Y, Wu W, Li J, Dong S, Koseki H & Wong J (2011) S phase-dependent interaction with DNMT1 dictates the role of UHRF1 but not UHRF2 in DNA methylation maintenance. *Cell Res.* **21:** 1723–1739

Zhao Q, Rank G, Tan YT, Li H, Moritz RL, Simpson RJ, Cerruti L, Curtis DJ, Patel DJ, Allis CD, Cunningham JM & Jane SM (2009) PRMT5-mediated methylation of histone H4R3 recruits DNMT3A, coupling histone and DNA methylation in gene silencing. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **16:** 304–311

Zheng X, Carstens JL, Kim J, Scheible M, Kaye J, Sugimoto H, Wu C-C, LeBleu VS & Kalluri R (2015) Epithelial-to-mesenchymal transition is dispensable for metastasis but induces chemoresistance in pancreatic cancer. *Nature* **527:** 525–530

Zhou T, Xiong J, Wang M, Yang N, Wong J, Zhu B & Xu R-M (2014) Structural basis for hydroxymethylcytosine recognition by the SRA domain of UHRF2. *Mol. Cell* **54:** 879–886

Zhu H, Wang G & Qian J (2016) Transcription factors as readers and effectors of DNA methylation. *Nat. Rev. Genet.* **17:** 551–565

Zhu Y, Qiu P & Ji Y (2014) TCGA-assembler: open-source software for retrieving and processing TCGA data. *Nat. Methods* **11:** 599–600

Zong Y, Huang J, Sankarasharma D, Morikawa T, Fukayama M, Epstein JI, Chada KK & Witte ON (2012) Stromal epigenetic dysregulation is sufficient to initiate mouse prostate cancer via paracrine Wnt signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109:** E3395-404

Résumé - Abstract

Mécanismes épigénétiques et réponse des cellules cancéreuses au microenvironnement. Implication de la méthylation de l'ADN et de l'un de ses interprètes, MBD2.

Les cancers du sein ont la particularité de développer un microenvironnement tumoral important où les fibroblastes associés au cancer (CAF) jouent un rôle crucial dans la tumorigénèse *via* la sécrétion de différents facteurs de croissance, cytokines, protéases et composants de la matrice extracellulaire. Ces différents facteurs secrétés par les CAFs sont impliqués dans de nombreuses voies de signalisation suggérant que la reprogrammation des cellules cancéreuses par les CAFs peut affecter de nombreux gènes.

Le séquençage des ARN messagers (RNAseq) de lignées cellulaires de cancer du sein cultivées en présence de milieux conditionnés de CAF, nous a permis d'identifier 372 gènes surexprimés *in vitro* par les facteurs sécrétés par les CAF et *in vivo* selon la teneur en cellules stromales des tumeurs mammaires. De façon inattendue, nous avons pu constater que les facteurs sécrétés par les CAF ainsi que le contenu en cellules stromales des tumeurs n'induisent pas de changements significatifs de méthylation de l'ADN mais activent de manière spécifique des gènes caractérisés par une signature méthylation. Différentes approches expérimentales, telles que l'inhibition de la méthylation de l'ADN, l'inhibition de l'expression de la protéine MBD2 (protéines de liaison à l'ADN méthylé) et des expériences d'immuno-précipitation de la chromatine (ChIP) ont permis de montrer l'implication de ces marques de méthylation et des protéines de liaison à l'ADN méthylé dans la réponse des cellules cancéreuses aux facteurs sécrétés par les CAFs. Ces résultats ont permis l'identification d'événements moléculaires impliqués dans la réponse des cellules tumorales aux signaux sécrétés par les cellules stromales dans les tumeurs mammaires mettant en lumière l'importance des marques épigénétiques dans la reprogrammation des cellules cancéreuses induites par les cellules stromales.

Mots clefs : *Epigénétique, Méthylation de l'ADN, Fibroblastes associés au cancer, Protéines de liaison à l'ADN méthylés.*

Epigenetic and response of cancer cells to the microenvironment. Involvement of DNA methylation and one of its interpreters, MBD2.

Breast cancers develop in complex tissue environments where cancer associated fibroblasts (CAF) play a crucial role in tumorigenesis by secreting various growth factors, cytokines, proteases and extracellular matrix components. Soluble factors secreted by CAFs are involved in many pathways including inflammation, metabolism, proliferation, and epigenetic modulation suggesting that CAF-dependent reprograming of cancer cells affects a large set of genes.

From RNAseq data obtained from breast cancer cell lines grown in presence of CAF-secreted factors, we identified 372 upregulated genes exhibiting an expression level positively correlated with the stromal content of breast cancer specimens. Furthermore, we observed that gene expression changes were not mediated through significant DNA methylation changes. Nevertheless CAF-secreted factors but also stromal content of the tumors remarkably activated specific genes characterized by a DNA methylation signature: hypermethylation at transcription start site (TSS) and shore regions. Experimental approaches (inhibition of DNA methylation, knockdown of MBD2, and ChIP assays) demonstrated the implication of DNA methylation and methyl DNA binding protein in the response of cancers cells to CAF-secreted factors. These data put in light the importance of epigenetics marks in the cancer cell reprogramming induced by stromal cell and indicate that the interpreters of the DNA methylation signal play a major role in the response of the cancer cells to the microenvironment.

Keywords: *Epigenetic, DNA methylation, Cancer associated fibroblasts, Methyl DNA Binding Proteines.*