



Les protéines MBD2 et ZBTB4 répriment la transcription de nombreux gènes méthylés. MBD2 est redistribuée sur l'ADN méthylé dans des modèles de transformation oncogénique.

Guillaume Devailly

► **To cite this version:**

Guillaume Devailly. Les protéines MBD2 et ZBTB4 répriment la transcription de nombreux gènes méthylés. MBD2 est redistribuée sur l'ADN méthylé dans des modèles de transformation oncogénique.. Biologie cellulaire. Université Claude Bernard Lyon 1, 2014. Français. NNT : . tel-01502496

HAL Id: tel-01502496

<https://hal.science/tel-01502496>

Submitted on 5 Apr 2017

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

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

THESE

En vue de l'obtention du grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LYON

Université Claude Bernard Lyon 1

Ecole Doctorale de Biologie Moléculaire, Intégrative et Cellulaire

**Les protéines MBD2 et ZBTB4 répriment
la transcription de nombreux gènes
méthylés.**

**MBD2 est redistribuée sur l'ADN méthylé
dans des modèles de transformation
oncogénique.**

Par Guillaume Devailly

A soutenir publiquement le 19 décembre 2014 devant le jury composé de :

Monsieur Gilles SALBERT	UMR CNRS 6026, Rennes	Rapporteur
Monsieur Michaël WEBER	UMR CNRS 7242, Strasbourg	Rapporteur
Monsieur Philippe BOUVET	ISBP, Lyon I	Examineur
Monsieur Pierre-Antoine DEFOSSEZ	UMR CNRS 7216, Paris VII	Examineur
Monsieur Patrick MEHLEN	UMR CNRS 5286, Lyon I	Examineur
Monsieur Robert DANTE	UMR CNRS 5286, Lyon I	Directeur de thèse

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

Président de l'Université

M. François-Noël GILLY

Vice-président du Conseil d'Administration

M. le Professeur Hamda BEN HADID

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

M. le Professeur Philippe LALLE

Vice-président du Conseil Scientifique

M. le Professeur Germain GILLET

Directeur Général des Services

M. Alain HELLEU

COMPOSANTES SANTE

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard

Directeur : M. le Professeur J. ETIENNE

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. le Professeur Y. MATILLON

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. FLEURY

Département Chimie Biochimie

Directeur : Mme Caroline FELIX

Département GEP

Directeur : M. Hassan HAMMOURI

Département Informatique

Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE

Département Mathématiques

Directeur : M. le Professeur Georges TOMANOV

Département Mécanique

Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID

Département Physique

Directeur : M. Jean-Claude 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. P. FOURNIER

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

**Les protéines MBD2 et ZBTB4 répriment la transcription de nombreux gènes méthylés.
MBD2 est redistribuée sur l'ADN méthylé dans des modèles de transformation oncogénique.**

La méthylation de l'ADN est une marque épigénétique répressive impliquée dans de nombreux processus physiologiques et pathologiques. Des hyperméthylations de promoteurs sont ainsi responsables de répressions transcriptionnelles de gènes suppresseurs de tumeurs dans les cancers. La méthylation de l'ADN serait capable d'induire une répression transcriptionnelle par la combinaison de deux mécanismes principaux : l'éloignement de facteurs de transcription activateurs, et le recrutement de protéines répressives liant spécifiquement l'ADN méthylé. MBD2 est une protéine de liaison à l'ADN méthylé capable de recruter les complexes répresseurs NuRD et SIN3A. ZBTB4 est capable de se lier à l'ADN méthylé *in vitro* et induit une répression de la transcription de plasmides méthylés lorsqu'elle est surexprimée. Son rôle de répresseur transcriptionnel dépendant de la méthylation de l'ADN reste toutefois peu documenté.

Nous avons identifiés par RNAseq les modifications du transcriptome induites par une déplétion de MBD2 ou de ZBTB4. Les gènes surexprimés après déplétion de MBD2 ou ZBTB4 sont méthylés sur leur promoteur, et sont aussi surexprimés après traitement avec des agents déméthylants. Des résultats d'immuno-précipitations de chromatine réalisées contre les deux protéines endogènes montrent que la quasi-totalité des sites de fixation de MBD2 et qu'une partie des sites de fixations de ZBTB4 correspondent à des régions méthylés. Ces résultats confirment à l'échelle du génome que MBD2 endogène est bien un interprète majeur de la méthylation de l'ADN, et que ZBTB4 réprime bien la transcription de gènes méthylés. Nous avons aussi observé une redistribution importante de MBD2 sur le génome dans des modèles de progression tumorale. Nos résultats montrent que les gènes réprimés pendant la transformation oncogénique le sont en partie par MBD2. L'expression de certains de ces gènes peut être induite dans les lignées transformées par déplétion de MBD2 par siRNA.

Mots clefs : *épigénétique, méthylation de l'ADN, répression transcriptionnelle, protéines de liaison à l'ADN méthylés, transformation tumorale, MBD2, ZBTB4, RNAseq, ChIPseq.*

**MBD2 and ZBTB4 proteins repress the transcription of numerous methylated genes.
MBD2 is redistributed on methylated DNA in models of oncogenic transformation.**

DNA methylation is an epigenetic mark that plays a role in many physiological and pathological processes. Indeed, silencing of tumor suppressor genes in cancer is frequently caused by promoter hypermethylation. Transcriptional repression induced by DNA methylation is likely caused by the combination of two mechanisms: the repulsion of activator transcription factors, and the recruitment of repressor proteins able to specifically recognize methylated DNA. MBD2 is a methyl DNA binding protein that can recruit NuRD or SIN3A repressor complexes. ZBTB4 is able to bind methylated DNA *in vitro*, and can repress the transcription of methylated plasmids when overexpressed. Its methylation-dependent transcriptional repressor function remains poorly documented.

By RNAseq, we have identified transcriptomic modifications induced by the depletion of either MBD2 or ZBTB4. Genes up regulated after MBD2 or ZBTB4 depletion were methylated on their promoter, and were also up regulated after treatment with demethylating agents. Chromatin immunoprecipitation experiments against endogenous proteins showed that almost all MBD2 binding sites, and that a part of ZBTB4 binding sites, correspond to methylated DNA regions. These results confirmed at genome wide scale that endogenous MBD2 is a major reader of DNA methylation and that ZBTB4 does repress the transcription of methylated genes. We observed an important redistribution of MBD2 on the genome in models of tumor progression. Our results showed that MBD2 plays a role in gene repressions occurring during oncogenic transformation. Some of those repressed genes can be re-expressed in transformed cell lines after depletion of MBD2 by siRNA.

Keywords: *epigenetics, DNA methylation, transcriptional repression, methyl DNA binding proteins, malignant transformation, MBD2, ZBTB4, RNAseq, ChIPseq.*

Remerciements

Je commence par adresser un grand merci à **Robert Dante**. Robert m'a accueilli dans son laboratoire à bras ouverts, malgré le lapin que je lui ai posé à notre première rencontre. Il m'a donné les moyens matériels, financiers et scientifiques de réaliser ces travaux de recherche sur mon domaine d'intérêt, la régulation transcriptionnelle. Grâce à son impulsion, j'ai pu découvrir et réaliser en parallèle travail de paillasse et analyses bioinformatiques de nos résultats. Cette double casquette m'est et me sera précieuse par la suite. J'ai pu approfondir avec lui le monde de la méthylation de l'ADN qu'il m'avait déjà enseigné quelques années plus tôt, et m'initier aux techniques de séquençages haut débits et à leur analyse. Un grand merci à **Patrick Mehlen** pour m'avoir intégré dans son équipe, alors que mon sujet de thèse est un peu éloigné des sujets d'investigations principaux de l'équipe. Merci de m'avoir fait bénéficier de la force de frappe expérimentale dont tu disposes. Ces années d'immersion au cœur des Récepteurs à Dépendances laisseront des traces indélébiles que je ne regretterai pas, et ont déjà données lieu à deux collaborations fructueuses.

Merci au **Centre Léon Bérard** et au **Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon** pour le soin qu'ils portent à leurs chercheurs. Grâce à eux, j'ai pu bénéficier de conditions de travail quasi inédites dans le domaine de la recherche fondamentale en France. S'ils restent bien sûr une marge de manœuvre pour améliorer l'ensemble, ce centre est largement à la hauteur de son excellence réputée. Merci à **l'ENS de Lyon** pour m'avoir fait confiance et m'avoir financé ces sept dernières années. Merci à la **Ligue Contre le Cancer** pour m'avoir permis de finaliser ces travaux confortablement en me finançant ces derniers mois.

Un immense merci à **Mélodie Grandin** qui a travaillé à mes côtés ces quatre dernières années (!). Ton soutien infailible, tant sur le plan expérimental que scientifique et moral, m'aura été précieux. Je te souhaite la meilleure continuation possible et un post-doc au soleil. Merci à **Laury Perriaud** pour m'avoir transmis le flambeau de la maîtrise du ChIP à mon arrivée. Cette technique a été ma fidèle alliée ces dernières années, et je lui dois quatre ou cinq (futurs) publications. Sans tes bons conseils et ton travail de mise au point, tout cela aurait été autrement plus compliqué. Merci à **Pauline Mathot** pour m'avoir aidé en réalisant des expériences indispensables que je n'avais plus le temps de faire pendant la rédaction de ma thèse. Bon courage à toi ! Je te souhaite une thèse pleine de résultats.

Merci à **Véronique Corset**, **Catherine Guix** et **Anne-Pierre Morel** pour leurs bons conseils à propos respectivement de la microscopie à fluorescence, des Western-blot et de la culture cellulaire. Merci à **Pierre-Antoine Defossez**, **Benoît Miotto**, **Olivier Kirsh** et **Audrey Roussel-Gervais** pour leur soutien, leurs conseils et leurs remarques concernant ZBTB4. Espérons que tout ce travail soit fructueux !

Un grand merci à **Andrea Paradisi, David Bernard, David Vindrieux et Laurent Bartholin** pour m'avoir proposé des collaborations passionnantes. J'espère que nous pourrons travailler ensemble à nouveau. Merci aussi à **David Bernard** et à **Saadi Khochbin** pour avoir été de talentueux membres de mes comités de thèses. Merci aux membres du jury pour avoir accepté d'évaluer mes travaux de thèse : **Gilles Salbert, Michael Weber et Philippe Bouvet**, en plus de **Pierre-Antoine Defossez et Patrick Mehlen**. Merci à **Anagha Joshi** qui garde au chaud pour moi un poste de bioinformaticien à Edimbourg. J'ai ainsi pu finir sereinement ma thèse sans avoir à m'inquiéter pour la suite. Merci à **Nicole Mounier, Frédéric Moret, Patrick Ravel-Chapuis, Laurent Pays, Michèle Ottmann, Anne-Laure Genevois, Doriane Ripoche et Magali Roche** pour avoir partagé avec moi les joies de l'enseignement universitaire. L'expérience m'a plu énormément, et je vais tout faire pour y revenir au plus vite !

Merci à ma femme **Clémence** pour son soutien inébranlable toutes ces années, en supportant sans (trop) broncher ces longues journées de travail, finissant parfois tard et se prolongeant certains week-ends et jours fériés (mais pas si souvent non plus), et ces congés un peu brefs. Merci aussi d'avoir relu mes textes abscons lorsque j'en avais besoin. Merci à ma fille **Julie** pour avoir été cette angélique petite chipie créatrice de joie de vivre depuis son arrivée au début de ma thèse. Merci à mon père **Etienne** pour s'être infligé la totalité de ce manuscrit à la recherche de fautes. Sans toi, il en resterait dix fois plus ! Merci à ma mère **Elisabeth** pour s'être occupé de Julie et de moi quand il le fallait.

Sommaire

Résumé - Abstract	4
Remerciements	5
Sommaire	7
Index des figures et tableaux	11
Introduction	13
I : Régulation de la transcription, épigénétique et oncogenèse	13
A) Organisation du génome eucaryote et régulation transcriptionnelle	13
1) Un exemple de promoteur eucaryote : le promoteur de <i>CDH13</i> , la cadhérine 13 humaine	14
2) Organisation du génome humain	14
3) Composition du génome humain	16
4) Régulation transcriptionnelle et organisation de la chromatine	16
5) Régulation transcriptionnelle et ARN non-codant	18
B) Information épigénétique et régulation transcriptionnelle	19
1) Information génétique et information épigénétique	19
2) Epigénétique et régulation transcriptionnelle	21
3) Empreinte, inactivation du X, réparation de l'ADN	21
a) L'empreinte parentale	21
b) L'inactivation du X	22
c) Réparation de l'ADN	23
C) Oncogenèse et régulation transcriptionnelle	23
II : La méthylation de l'ADN chez les mammifères	25
A) Structure, méthylation et déméthylation	25
1) Structure de la 5-méthylCytosine et impact sur la conformation de l'ADN	25
2) Synthèse	27
a) Mécanisme réactionnel	27
b) Les enzymes responsables de la méthylation de l'ADN	28
i) DNMT1	29
ii) La famille DNMT3	29
iii) TRDMT1 (ex DNMT2)	30
3) La déméthylation de l'ADN	30
a) Déméthylation passive	30
b) Déméthylation active	31
i) Via le mécanisme d'excision – réparation	31
ii) Via la 5-hydroxyméthylcytosine	31
B) Fonctions	32
1) Localisation de la méthylation de l'ADN sur le génome	32
2) La méthylation de l'ADN, une marque répressive	34
a) Méthylation de l'ADN et état de la chromatine	34
b) Méthylation du promoteur et répression des gènes	35
c) Méthylation du corps des gènes	36
d) Méthylation de l'ADN et compaction des éléments répétés	36
3) Méthylation et réparation de l'ADN	37
4) Méthylation de l'ADN, développement et vieillissement des organismes	37
a) Evolution du taux de méthylation lors de l'embryogenèse	37
b) Méthylation de l'ADN et inactivation du chromosome X	38
c) Empreinte parentale	38
d) Vieillissement du méthylome	39

5) Méthylation de l'ADN et cancer.....	39
C) Evolution.....	41
1) Impact de la méthylation sur l'évolution des génomes	41
a) Ilots CpG.....	41
b) Méthylation de l'ADN et conversion génique biaisée.....	42
2) Histoire évolutive de la méthylation de l'ADN.....	42
III : Les protéines de liaisons à l'ADN méthylé	44
A) Protéines impliquées.....	44
1) La famille MBD.....	46
a) MECP2.....	46
b) MBD1	47
c) MBD2	47
d) MBD4	48
e) MBD3	49
f) MBD5, MBD6 et autres protéines à domaine MBD	49
2) Les MBP à doigts de zinc	50
a) KAISO – ZBTB33	50
b) ZBTB4	51
c) ZBTB38	52
d) ZFP57	52
e) KLF4	52
3) La famille UHRF	53
a) UHRF1	53
b) UHRF2.....	53
4) Et d'autres protéines	54
B) Redondances et spécificités des MBP.....	55
1) Spécificités des MBP répressives	55
2) Redondances possibles au sein des MBP répressives.....	57
C) MBP et cancers	58
D) Histoire évolutive.....	58
Résultats	60
I) Dynamique de la fixation de MBD2 sur les régions méthylées de l'ADN lors de la transformation maligne de cellules épithéliales mammaires humaines	60
A) Préambule	60
B) Abstract	60
C) Introduction.....	61
D) Materials and methods	63
1) Cell lines	63
2) Treatments	63
3) Western-blot	63
4) RNA extraction.....	63
5) Digestion of genomic DNA	65
6) Methylated-DNA precipitation sequencing (MeDPseq)	65
7) Chromatin Immunoprecipitation (ChIP).....	65
8) ChIP-chip and MeDP-chip	66
9) RNAseq analysis.....	67
10) ChIPseq analysis.....	67
11) Data deposition	67
E) Results	68
1) Identification of MBD2 binding sites and methylated DNA regions in HMEC-hTERT and HMLER cells.....	68
2) Endogenous MBD2 binding sites are methylated	70

3) MBD2 is a major DNA methylation-dependent transcriptional repressor	71
4) Dynamics of MBD2 deposition during oncogenic transformation.....	72
5) MBD2 is involved in the repression of genes downregulated in oncogenic HMER cells73	
6) Dynamics of MBD2 deposition upon oncogenic transformation of immortalized human mammary cells by ZEB1 expression or p53 depletion.....	74
7) Genes repressed by MBD2 in transformed cell lines may contribute to the epithelial phenotype	75
F) Discussion.....	77
G) Acknowledgements	81
H) Funding	81
I) Supplementary material	82
1) Supplementary figures	82
2) Supplementary tables	87
II) Etude du rôle de ZBTB4 dans la répression transcriptionnelle dépendante de la méthylation de l'ADN.....	90
A) Résumé.....	90
B) Introduction	90
C) Matériels et méthodes.....	91
1) Cultures cellulaires, traitements et microscopie confocale.....	91
2) Immuno-blots	92
3) Extractions d'ARN.....	92
4) Précipitation d'ADN méthylé et séquençage haut débit	92
5) Immuno-précipitations de chromatine, qPCR et séquençage haut débit	93
6) Analyses bioinformatiques.....	94
D) Résultats	95
1) Les gènes surexprimés après une déplétion de ZBTB4 sont des gènes méthylés	95
2) Fonctions des gènes réprimés par ZBTB4	96
3) Les gènes surexprimés après déplétions de ZBTB4 ont légèrement plus de sites Z4BS sur leur promoteur.....	97
4) Un ensemble de gènes réprimés conjointement par ZBTB4 et MBD2	98
5) Certains sites de fixations de ZBTB4 sont méthylés	100
E) Discussion.....	102
Discussion et conclusion générale.....	105
Annexes	109
I) Collaborations.....	109
A) Articles publiés	109
1) Combiner agent chimiothérapeutique et interférence à la Nétrine-1 potentialise la mort des cellules cancéreuses.....	109
a) Préambule.....	109
b) Article	110
2) La répression de PLA2R1 par c-MYC et HIF2 α favorise la croissance cancéreuse 127	
a) Préambule.....	127
b) Article	127
B) Article en révision	141
1) L'inhibition de la méthylation de l'ADN favorise la sensibilité des tumeurs à l'interférence à la nétrine-1	141
a) Préambule.....	141
b) Abstract	141
II) Participations aux congrès.....	142
A) Présentations orales.....	142

B) Posters	142
1) Co-deposition of MBD2 and ZBTB4 on methylated DNA in human mammary cell lines	142
2) MBD2 and ZBTB4, two methylated DNA binding proteins belonging to distinct families, frequently bind the same methylated regions.....	147
Bibliographie	151

Index des figures et tableaux

Figure 1 : Le promoteur de la cadhérine 13 humaine.	14
Figure 2 : Etats de compactions de la chromatine.	18
Figure 3 : Structures chimiques de bases azotées.	25
Figure 4 : Méthylation des CpG et structure de l'ADN.	26
Figure 5 : Méthylation de maintenance de l'ADN.	27
Figure 6 : Le <i>flip-out</i> de la cytosine par la DNA méthyl-transférase bactérienne HhaI.	28
Figure 7 : La déméthylation passive.	30
Figure 8 : Méthylation moyenne des îlots CpG du génome humain (cellules mononucléaires circulantes).	33
Figure 9 : Réplication, méthylation de l'ADN et hétérochromatinisation.	34
Figure 10 : Les protéines de liaison à l'ADN méthylé.	44
Figure 11 : Domaines de liaisons à l'ADN méthylé.	50
Figure 12 : Endogenous MBD2 proteins bind methylated DNA regions.	64
Figure 13 : Concordance between ChIP-qPCR and ChIP-MBD2 at various genomic locations.	66
Figure 14 : MBD2 is a methylation-dependent transcriptional repressor in HMLER cells.	69
Figure 15 : Dynamics of MBD2 distribution during oncogenic transformation.	73
Figure 16 : Examples of genes repressed by MBD2 during oncogenic transformation.	74
Figure 17 : MBD2 repressed a common set of genes during oncogenic transformation.	76
Figure 18 : MBD2 ChIP-qPCR experiments from HMEC-HTERT, HMLER, HME-ZB1-RAS, and HME-shP53 cell lines.	77
Figure 19 : Comparison between high-throughput sequencing and tiling array technologies.	82
Figure 20 : Examples of MBD2 redistribution during oncogenic transformation.	83
Figure 21 : Depletion of MBD2 by siRNA strongly decreased MBD2 ChIP efficiency.	84
Figure 22 : Transcription at AluY element sites is repressed by MBD2 and DNA methylation.	84
Figure 23 : Genes exhibiting MBD2 binding sites or with DNA methylation at their TSS regions have low transcriptional activity.	85
Figure 24 : 5-aza-deoxycytidine treatment induce a DNA demethylation.	85
Figure 25 : Expression levels of genes gaining MBD2 at their TSS regions in HMLER, HME-ZEB1-RAS, and HME-shP53-RAS cells compared with HMEC-hTERT cells.	86
Figure 26 : Les gènes surexprimés par une déplétion de ZBTB4 le sont aussi après traitement à la 5-aza-déoxycytidine.	93
Figure 27 : Niveaux de méthylation moyens du promoteurs des gènes dérégulés par une déplétion de ZBTB4.	95
Figure 28 : Densité en sites Z4BS autour des promoteurs des gènes dérégulés par déplétion de ZBTB4.	96
Figure 29 : Un ensemble de gènes réprimés conjointement par ZBTB4 et MBD2.	97
Figure 30 : Des régions méthylées sont enrichies par un ChIPseq ZBTB4.	99
Figure 31 : Validation par ChIP-qPCR de quelques régions identifiées par ChIPseq.	101
Figure 32 : L'expression des gènes de protéines impliqués dans la méthylation de l'ADN n'est que faiblement modifiée par le traitement au siRNA ciblant ZBTB4.	102
Figure 33 : Le concept des récepteurs à dépendance.	109
Tableau 1 : Composition du génome humain.	16
Tableau 2 : Exemples de modifications de queues d'histones, <i>writers</i> , <i>readers</i> et <i>erasers</i> associés.	20

Tableau 3 : Exemples de variants d'histones.....	22
Tableau 4 : Sites préférentiels de fixations des MBP répressives et répresseurs transcriptionnels recrutés.....	55
Tableau 5 : Sequences and hybridization temperatures of primers used in qPCR experiments...	87
Tableau 6 : Analysis of enriched K-mers sequences in MBD2 peaks in HMEC-hTERT and HMLER. Genomic sequences of MBD2 peaks were analyzed using RSAT oligo-diff tools [290].....	87
Tableau 7 : Top 15 GO terms or KEGG pathway enriched in genes up regulated by MBD2 depletion in HMLER, HME-ZEB1-RAS or HME-shP53-RAS (GSEA analysis).	89
Tableau 8 : Séquences des amorces de qPCR utilisés dans cette étude.....	91
Tableau 9 : 15 premiers termes <i>Gene Ontology</i> enrichis dans les gènes surexprimés après déplétion de ZBTB4.....	102
Tableau 10 : 15 premier <i>KEGG pathways</i> enrichis dans les gènes surexprimés après déplétion de ZBTB4.	103

Introduction

I : Régulation de la transcription, épigénétique et oncogenèse

A) Organisation du génome eucaryote et régulation transcriptionnelle

Le vivant est constitué autour de molécules d'acides désoxyribonucléiques (ADN), porteuses d'informations et étant répliquées et distribuées également lors de la mitose. L'ensemble des molécules d'ADN d'une cellule constitue son génome. Le génome des cellules eucaryotes est contenu dans leur noyau, dans leurs mitochondries et dans leurs éventuels plastes (*i.e.* chloroplastes). Ce génome est exprimé en différents gènes qui assurent le bon fonctionnement de la cellule. Ces gènes peuvent être des gènes ARN (acide ribonucléiques) ou protéiques. Dans ce dernier cas, l'ADN est tout de même exprimé sous la forme d'un ARN intermédiaire appelé ARN messager (mRNA). Ce dernier est par la suite traduit en protéine dans le cytoplasme. La transcription désigne l'étape de synthèse d'une molécule d'ARN à partir d'ADN. Comprendre le vivant, c'est comprendre comment ce génome est exprimé en gènes et comprendre comment ces gènes assurent les différentes fonctions physiologiques indispensables à la survie et à la reproduction des organismes. Pour comprendre comment une molécule d'ADN linéaire est exprimée en gènes de natures et d'abondances diverses, il est nécessaire de se pencher sur l'organisation des génomes.

1) Un exemple de promoteur eucaryote : le promoteur de *CDH13*, la cadhérine 13 humaine

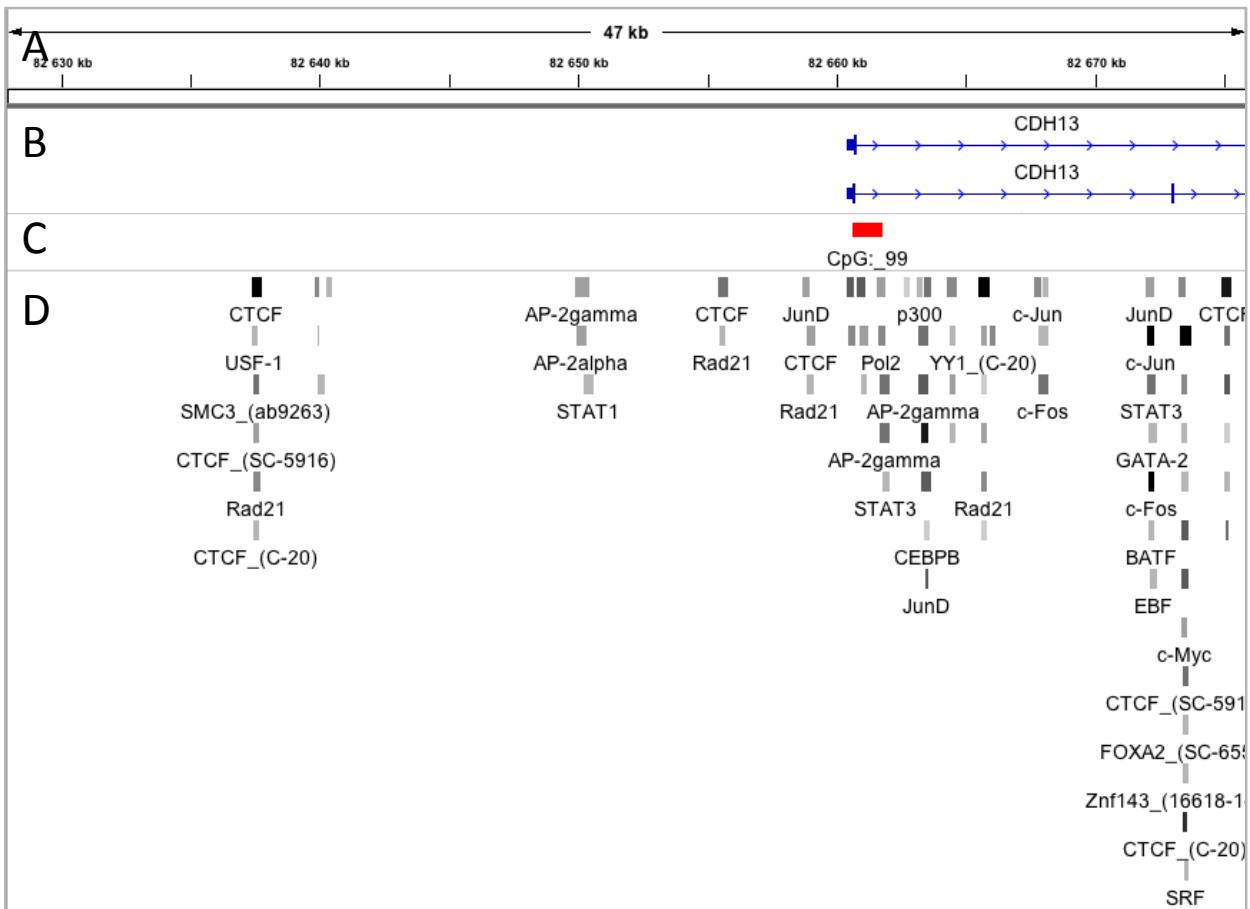


Figure 1 : Le promoteur de la cadhérine 13 humaine.

A. Localisation génomique au niveau du chromosome 16 (*hg19*). La fenêtre totalise 47 000 paires de base de long. **B.** Position de du gène *CDH13*. Deux transcrits alternatif sont représentés, qui se distinguent notamment par l'inclusion optionnelle du deuxième exon. Trait bleu moyen : Région non traduite en 5' (5'UTR). Trait bleu épais : exons. Trait bleu fin : introns. Flèches : sens de la transcription. **C.** En rouge, présence d'un îlot CpG à proximité du site d'initiation de la transcription. **D.** Sites de fixations de facteurs de transcriptions, identifiés par ChIPseq par le consortium ENCODE [1].

2) Organisation du génome humain

On compte entre 20 000 et 35 000 gènes chez l'homme selon les définitions. En effet, la limite entre gène et pseudo-gène est parfois arbitraire, et souvent historiquement temporaire. De même, les locus comme celui *CDKN2A* qui contient le code des protéines p16INK4A et p14ARF doivent-ils être dénombré comme un ou plusieurs gènes ? Les multiples copies des ARN ribosomaux et des ARN de transferts sont-ils des gènes ? En pratique, on utilise donc des listes de gènes produites par divers instituts (*i.e.* RefSeq [2], UCSC [3], ENSEMBL [4]), comportant nécessairement une certaine dose d'arbitraire. On peut classer les gènes selon l'ARN polymérase qui les transcrits. Ainsi l'ARN polymérase I transcrit principalement des ARN ribosomiques, l'ARN polymérase II transcrit les gènes protéiques et d'autres grands ARN, l'ARN polymérase III est responsable de la transcriptions des ARN de transferts et de

l'ARN ribosomique 5S, et l'ARN polymérase IV transcrit les gènes de l'ADN mitochondrial. Cette distinction est cruciale d'un point de vue de la régulation, car les différentes polymérases ne seront pas recrutées et activées par les mêmes facteurs *cis* et *trans*. Les différentes polymérases ne sont donc pas recrutées par les mêmes types de promoteurs.

Les gènes eucaryotes transcrits par l'ARN polymérase II sont majoritairement divisés en plusieurs exons, qui peuvent être inclus ou exclus par le biais de l'épissage alternatif, et d'introns systématiquement exclus après transcription via le mécanisme d'épissage. Ils possèdent un ou plusieurs sites d'initiation de la transcription (TSS – *Transcription Start Site*) et un ou plusieurs sites de terminaison de la transcription (TES – *Transcription End Site*). A un gène donné peut donc correspondre tout un répertoire de transcrits différents. La région des ARN messagers (ARNm) contenue entre le TSS et le codon d'initiation de la traduction est appelée 5'UTR, pour *5' untranslated region* (région non traduite en 5'). Celle entre le codon stop et le site de terminaison de la transcription est appelée 3'UTR, pour *3' untranslated region* (région non traduite en 3'). Elles peuvent jouer des rôles essentiels dans la régulation de ces ARN (cibles de micros ARN (miRNA), zones d'interactions avec des protéines, IRES (zone interne d'entrée de ribosome – *Internal Ribosom Entry Site*), etc.). En 3' du messenger, on retrouve fréquemment un signal de poly-adénylation, induisant la formation d'une queue poly-adénylé (queue polyA), qui joue des rôles dans l'export et la traduction des ARNm. Les gènes sont composés à leur extrémité 3' d'une région promotrice, de taille mal définie (environ -1kb à +1kb pour le promoteur minimal, -10kb à +1kb pour le promoteur étendu) pouvant contenir un îlot CpG (au moins 50% des gènes, [5]), un élément BRE (*B Responsive Element*), une boîte TATA (environ 24% des gènes humains, [6])¹ un élément Inr (*Initiator Element*, environ 46% des gènes humains [6]), et de nombreux autres sites de fixations de facteurs de transcriptions (Figure 1). Îlots CpG, éléments BRE, boîtes TATA et éléments Inr permettent le recrutement direct ou indirect des protéines TBP (*TATA Binding Proteins*) [5], qui recruteront l'ARN polymérase II. Îlots CpG et boîtes TATA ont tendance à être mutuellement exclusifs au niveau des promoteurs [5]. Cette région promotrice contient, par définition, tous les éléments en *cis* nécessaire à la régulation de la transcription du gène.

Le génome est aussi composé d'éléments répétés, c'est à dire retrouvés à de nombreuses reprises en divers endroits du génome sous une forme identique ou quasi-identique. Les éléments transposables en font partie. Ces éléments sont capables (ou ont été capables), par différents mécanismes, de se dupliquer et de se transposer dans une nouvelle région du génome. La plupart de ces séquences ne sont plus actives car mutées ou présentes sous formes tronquées. Elles sont classées en rétro-transposons, passant par une forme ARN (avec domaine LTR – *Long Terminal Repeat* comme les rétrovirus endogènes, ou sans LTR comme les LINE – *Long INterspersed Elements* ou les SINE – *Short INterspersed Elements*), et en transposons à ADN, transposés sans passage par un ARN. D'autres classes d'éléments répétés sont

¹ Notons que îlots CpG et boîtes TATA sont plutôt mutuellement exclusifs, les promoteurs ayant l'un n'ont en générale pas l'autre [6], [325].

incapables de se transposer, telles que les séquences de faible complexité ou les séquences microsatellites. Leur origine évolutive pourrait résulter d'accidents lors de la réplication ou de la recombinaison. Les gènes des ARN de transferts et des ARN ribosomiaux, présents en de multiples copies, peuvent être comptés comme des éléments répétés. Ils sont ainsi présents dans les tables d'éléments répétés fournies par RepeatMasker [7]. Ces éléments répétés constituent la majorité du génome humain en général. On les retrouve au niveau des régions inter-géniques et des introns, mais certains peuvent se retrouver présents au niveau d'exons, via le processus évolutif d'exonisation.

3) Composition du génome humain

	Génome nucléaire			Génome mitochondrial		
	%	Taille	Nombre	%	Taille	Nombre
Total	-	3.1 Gb	22 + X (+Y) chromosomes	-	16.6 Kb	1 chromosome circulaire
Exons protéiques	1.1%	34.1 Kb	~ 21 000 gènes protéiques	66.0%	11 Kb	13 gènes protéiques
Gènes ARN et séquences régulatrices	4.0%	124 Kb	> 6 000 gènes ARN	32.0%	5.3 Kb	24 gènes ARN
Eléments transposables	45.0%	1.4 Gb	-	-	-	-
dont Line	21.0%	651 Kb	> 850 000	-	-	-
dont Alu	10.7%	332 Kb	> 1 000 000	-	-	-
Hétérochromatine constitutive	6.5%	202 Kb	-	-	-	-
Autres séquences	44.0%	1.36 Gb	-	< 2%	< 300 pb	-

Tableau 1 : Composition du génome humain.

Source : *Human Molecular Genetics*, chapitre 9 [8].

4) Régulation transcriptionnelle et organisation de la chromatine

Les niveaux de transcriptions du génome sont très hétérogènes. Ces taux de transcriptions différents structurent l'organisation nucléaire en définissant des domaines aux propriétés distinctes. Le (ou les) nucléole(s) est ainsi bien visible en microscopie optique, c'est le lieu d'une transcription intense des ARN ribosomiaux. Le reste du génome est organisé soit sous forme d'hétérochromatine, principalement péri-nucléolaire et périphérique, soit sous forme d'euchromatine plus centrale. Les niveaux de compactions de l'ADN sont différents dans chacun des trois compartiments : peu compacté dans le nucléole, sous forme de « collier de perle », un peu plus compacté dans l'euchromatine, et avec un haut degré de compaction dans l'hétérochromatine, avec notamment le recrutement de la protéine histone H1 liant les octamères d'histones (deux dimers H2A H2B et un tétramère de deux H3 et deux H4) entre eux (Figure 2). L'hétérochromatine regroupe la plupart des régions à très faible taux de transcription (régions inter-géniques et gènes non exprimés) tandis que l'euchromatine regroupe des régions plus

fortement transcrites (exons et introns de gènes exprimés) et leurs promoteurs. Certaines régions du génome se retrouvent dans l'hétérochromatine quel que soit le type cellulaire, on parle alors d'hétérochromatine constitutive, tandis que d'autres ne sont à l'état d'hétérochromatine que dans certaines lignages cellulaires, on parle alors de régions d'hétérochromatines facultatives. Les nucléosomes de l'euchromatine et de l'hétérochromatine diffèrent notamment au niveau de modifications post-traductionnelles des queues d'histones (acétylations, méthylations, phosphorylations, ubiquitinations, biotinylation, ADP-ribosylations, etc.)¹. Lors de la mitose, le génome prend une forme ultra-condensée sous forme de chromosomes métaphasiques, puis est décompacté lors de l'anaphase, soit faiblement (hétérochromatine), soit fortement (euchromatine et nucléole). Il est à noter que lors de la phase S du cycle cellulaire, l'hétérochromatine réputée réfractaire aux protéines externes est tout de même répliquée par la machinerie du même nom. Ainsi lors d'un cycle cellulaire complet, chaque région de l'ADN passe par un état de compaction maximal lors de la mitose et par un état de compaction minimal lors de la phase S.

Outre l'ADN et des protéines histones et non histones, la chromatine est aussi constituée de polyamines et d'ARN de diverses natures et fonctions.

¹ Cf infra p 18.

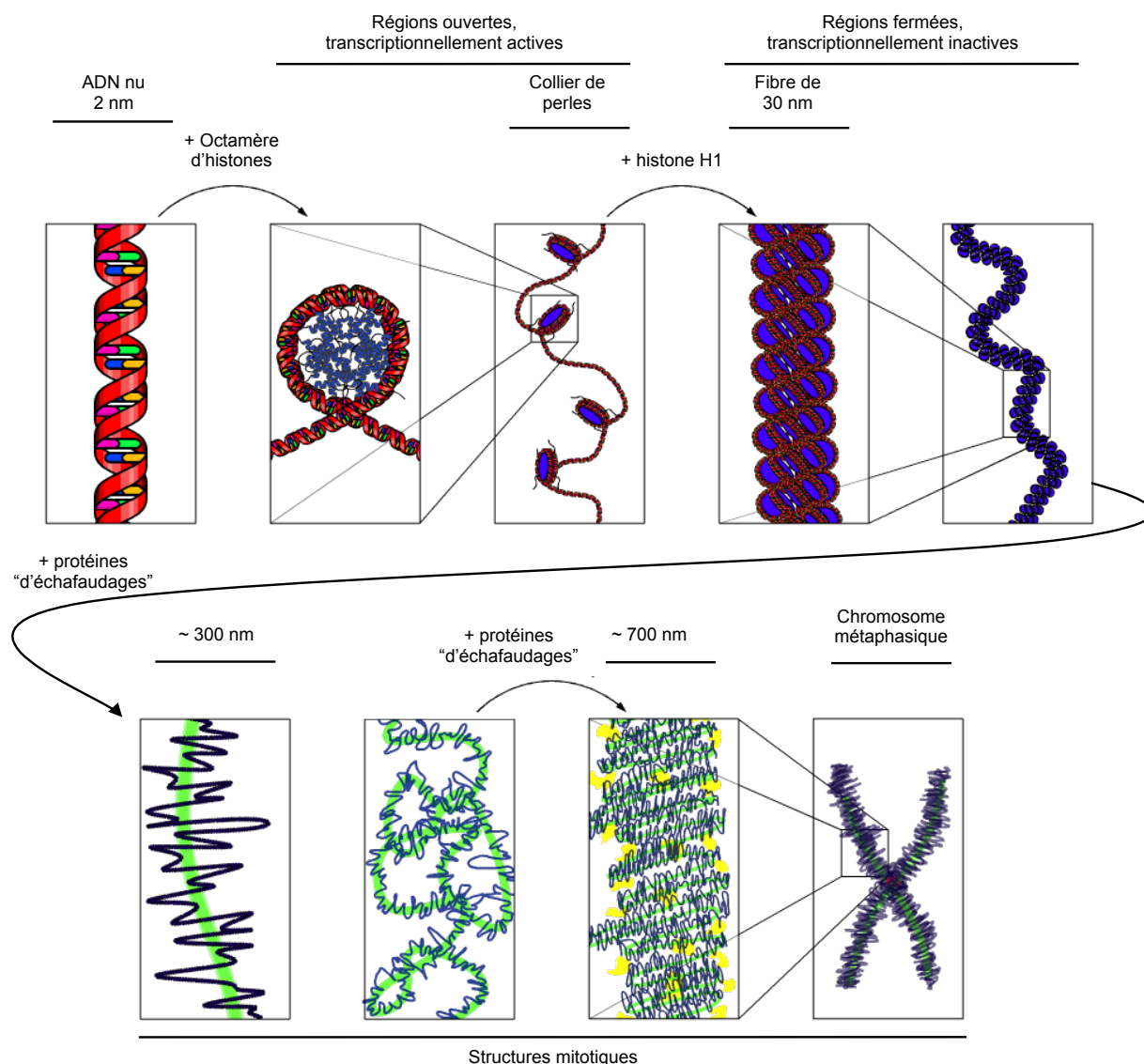


Figure 2 : Etats de compactions de la chromatine.

L'ADN nucléaire interphasique est sous forme d'euchromatine, correspondant à une faible compaction de type « collier de perles », et d'hétérochromatine plus compactée, principalement sous forme de fibre de 30 nm, localement surenroulée en fibre de 300 nm. Les chromosomes métaphasiques sont intégralement compactés sous forme de bras de 700 nm de larges, autour de protéines « d'échafaudages ». Iconographie d'après *Chromatin Structures*, Richard Wheeler, Wikimedia Commons CC BY-SA 3.0.

5) Régulation transcriptionnelle et ARN non-codant

De nombreux ARN transcrits par la cellule jouent un rôle majeur dans la régulation de l'expression des gènes [8]. Le trio ARN messager (mRNA), ARN de transferts (tRNA) et ARN ribosomiaux (rRNA) est nécessaire à la traduction des ARN messagers en protéines. D'autres ARN interviennent après la transcription et la maturation des ARN messagers, en limitant leur capacité à être traduite et/ou en favorisant leur dégradation. C'est le cas de la plupart des siRNA, miRNA et de certains piRNA (ARN piwi) et de lncRNA (*long non-coding RNA*, ARN long non codant). D'autres interviennent dans la maturation des ARN : épissage avec des snRNA (*small nuclear RNA*, petit ARN nucléaire) et des lncRNA ou modification chimique avec des snoRNA (*small nucleolar RNA*, petit ARN nucléolaire).

Enfin, de nombreux ARN participent à la régulation de la transcription des gènes, en étant soit activateurs de la transcription (miRNA, certains lncRNA, et RNAa pour RNA *activation*, activation par ARN), soit plutôt répresseurs (certains lncRNA) de la transcription. Les lncRNA *Xist* et *Tsix* sont en particulier impliqués dans l'inactivation du chromosome X¹. Certains lncRNA joueraient aussi un rôle dans la persistance des marques épigénétiques lors de la phase S et de la mitose [9]. Chez les plantes, des siRNA pourraient participer au ciblage *de novo* de la méthylation de l'ADN (méthylation de l'ADN dirigée par des petits ARN, *small RNA-directed DNA methylation*) [10].

B) Information épigénétique et régulation transcriptionnelle

1) Information génétique et information épigénétique

Lors de la mitose, la cellule mère transmet aux deux cellules filles la totalité de son génome, et donc de son information génétique contenue dans la séquence primaire de l'ADN. Cependant, un fibroblaste dermique se divisant donnera deux fibroblastes dermiques alors qu'il a transmis la même information génétique qu'un hépatocyte du même individu. Ce dernier en se divisant donnera bien deux hépatocytes. Il y a donc, dans ces exemples, transmission d'une information non génétique lors de la mitose : l'identité cellulaire des cellules filles est contrainte par la cellule mère, sans altération du génome. Une partie de cette information est extrinsèque : le microenvironnement hépatique est bien différent du microenvironnement dermique et participe au maintien de l'identité des cellules qui le compose. Mais comme le montre la mise en culture *in vitro* de ces cellules, une part importante de cette information est intrinsèque aux cellules, mais non génétique : on parle d'information épigénétique. L'information épigénétique peut être ainsi définie : il s'agit d'une information non génétique, intrinsèque à la cellule, transmise lors de la mitose². D'autres définitions de l'épigénétique existent [11].

¹ Cf infra p 21.

² Une partie de cette information est aussi transmise lors de la méiose.

Marque épigénétique	Fonctions principales	Exemples de <i>writers</i>	Exemples d' <i>erasers</i>	Exemples de <i>readers</i>
Méthylations des histones				
H3K4me1/me2/me3	Activation transcriptionnelle	SET1, MLL1-5	LSD1, JARID	JMJD2, ING2, TFIID
H3K9me1/me2	Inhibition transcriptionnelle	G9A, KMT1C	JHDM2, LSD1, PHF2	
H3K9me3	Inhibition transcriptionnelle, hétérochromatinisation	SUV39H1, ESET, SETDB1	JMJD2	HP1, MECP2, UHRF1, G9a, CDY
H3K27me1/me2/me3	Inhibition transcriptionnelle	EZH1-2	JMJD3, UTX	CDY, PC, CBX7
H3K36me	Activation transcriptionnelle	HYBP		
H3K79me1/me2/me3	Activation transcriptionnelle	DOT1		53BP1
H3R2me2	Inhibition transcriptionnelle	PRMT6	JMJD6, PADI4	TDRD3
H4K20me1/me2/me3	Inhibition transcriptionnelle, réparation de l'ADN	SUV4-20H1-2		PHF20, LRWD1
Acétylations des histones				
H2AK5ac	Activation transcriptionnelle, réparation de l'ADN	P300, CBP, HAT1	HDACs	
H3K14ac	Activation transcriptionnelle, réparation de l'ADN, réplication de l'ADN	GCN5, P300	HDACs	DPF3B
H4K5ac	Activation transcriptionnelle, réparation de l'ADN, réplication de l'ADN	ATF2, P300, HAT1	HDACs	BRDT
H4K8ac	Activation transcriptionnelle, réparation de l'ADN, réplication de l'ADN	PCAF, TIP60, TAF1	HDACs	BRDT
H4K16ac	Activation transcriptionnelle, réparation de l'ADN	MOF, TIP60	HDACs	GCN5
Phosphorylation des histones				
H3S10P	Activation transcriptionnelle	MSK1, AURKB		GCN5
H2AXP	Réparation de l'ADN	ATM, ATR	PP2A	MDC1, BRCA1
Ubiquitination des histones				
H2AK119Ub	Activation transcriptionnelle, réparation de l'ADN	RING1B		
H2BK120Ub	Activation transcriptionnelle, réparation de l'ADN	RNF20		WDR82

Tableau 2 : Exemples de modifications de queues d'histones, *writers*, *readers* et *erasers* associés.

Adapté d'après les références [12]–[14].

Les bases moléculaires de cette information épigénétique sont multiples. Elles influent sur la régulation de l'expression des gènes ou sur la capacité d'une telle régulation. On y inclut, selon les auteurs [11], les modifications chimiques de l'ADN non répliqués par la machinerie de réplication *stricto sensu* (5mC, 5hmC, etc.), les modifications post-traductionnelles des queues d'histone (Tableau 2), les variant d'histones intégrés à la chromatine (Tableau 3), les ARN non codant dont les miRNA, piRNA, lncRNA et les facteurs de transcriptions capables de maintenir eux même leur niveau d'expression (c'est à dire impliqué dans une boucle de rétroaction positive). L'ensemble de ces bases moléculaires, en

particulier la méthylation de l'ADN et les modifications des histones, définissent l'épigénome d'une cellule. Si les génomes d'un fibroblaste dermique et d'un hépatocyte sont similaires, leurs épigénomes sont eux très différents.

Les modifications de l'épigénome (parfois appelés épi-mutations) ont la particularité d'être potentiellement réversibles, contrairement aux modifications du génome (mutation). C'est en particulier le cas lors des processus de différenciation et dé-différenciation cellulaire.

Les marques épigénétiques (modifications des bases de l'ADN et des queues d'histones) sont mises en places par des enzymes, que les anglophones désignent *epigenetic writers*, sont interprétées par des protéines (*epigenetic readers*) et peuvent être enlevées par de nouvelles enzymes (*epigenetic eraser*) (Tableau 2). Par définitions, ces marques épigénétiques doivent être transmissibles lors de la mitose. C'est notamment le cas de la méthylation de l'ADN¹.

2) Epigénétique et régulation transcriptionnelle

La plupart des acteurs moléculaires épigénétiques influent sur l'expression des gènes en contrôlant leur taux de transcription, l'épissage des ARNm, la stabilité des ARNm et leur taux de traduction. Pour les marques contrôlant le niveau de transcription, on distingue les marques le plus souvent associées à une répression (marques répressives) et celles le plus souvent associées à une activation (marques activatrices). Parmi les marques répressives, on retrouve la méthylation de l'ADN², et la tri-méthylation de la lysine 9 de l'histone 3 (H3K9me3). Parmi les marques activatrices, on retrouve l'acétylation des histones et la tri-méthylation de la lysine 4 de l'histone 3 (Tableau 2). L'ensemble de ces marques contribue à l'établissement des domaines euchromatiniens et hétérochromatiniens, via le recrutement de protéines interprètes, les *epigenetic readers*. La multiplicité de ces marques, leur possibilité de combinaisons, et les cross-talk existant entre les différentes marques³ a fait que certains auteurs parlent de code épigénétique [15] ou de code histone [16], en référence au code génétique.

3) Empreinte, inactivation du X, réparation de l'ADN

a) L'empreinte parentale

Le phénomène d'empreinte parentale qualifie les cas d'expression d'uniquement un des deux allèles d'un gène de façon systémique : soit seul l'allèle paternel est exprimé, soit seul l'allèle maternel est exprimé⁴. Ce phénomène d'empreinte parental est établi lors de la gamétogenèse et est maintenu

¹ Cf infra Figure 5.

² Cf infra p 32.

³ Voir par exemple la Figure 9.

⁴ Voir aussi p 37.

pendant le développement embryonnaire par des mécanismes épigénétiques (méthylation de l'ADN, marques d'histones). Près d'une centaine de ces gènes ont été identifiés chez l'homme et chez la souris, dont la plupart jouent un rôle dans le développement embryonnaire [17].

Variant d'histones	Fonctions principales	Localisations	Chaperonnes
Variants de H2A			
H2AX	Réparation des cassures double brins, répressions des gènes méiotiques	Diffuse + sites de cassure double brins	FACT, Nucléoline
H2AZ	Activation transcriptionnelle, stabilité du génome	Promoteurs, <i>enhancers</i> , insulateurs, régions péri-centromériques	SRCAP, p400/TIP60
macroH2A	Répression transcriptionnelle	Promoteurs, télomères, chromosome X inactivé	ATRX
Variants de H3			
CENP-A	Structures des centromères et du kinétochore	Centromérique	HJURP, Mis18
H3.3	Activation transcriptionnelle, maintient des télomères	Euchromatine, promoteurs, télomères, régions péri-centromériques	ATRX, HIRA, DEK

Tableau 3 : Exemples de variants d'histones.

D'après Vardabasso *et al.* [18].

b) L'inactivation du X

Chez les mammifères, les mâles possèdent un chromosome X à l'état aploïde relativement grand et contenant de nombreux gènes, et un petit chromosome Y. Les femelles possèdent le chromosome X à l'état diploïde. On pourrait s'attendre à ce que les gènes portés par le chromosome X soient en moyenne deux fois plus exprimés chez les femelles, mais cela n'irait pas sans poser de problèmes tant on sait que la présence d'une copie de chromosome excédentaire peut avoir des lourdes conséquences (létalité embryonnaire le plus souvent, trisomies 17 et 21 chez l'Homme). Il se trouve qu'il existe chez les femmes et femelles un mécanisme de compensation aboutissant à l'inactivation complète d'un chromosome X. Ce chromosome X se retrouve à l'état d'hétérochromatine, et forme une structure visualisable en microscopie : le corpuscule de Barr. Le choix du chromosome X inactivé se fait durant le développement embryonnaire de façon aléatoire dans chaque cellule, mais est ensuite transmis aux cellules filles lors de la mitose. Il en résulte des lignages complets de cellules inactivant le même chromosome X, ce qui est parfois visualisable lorsque ces chromosomes X portent des allèles différents impliqué dans la pigmentation. La répression de ce chromosome X est donc épigénétique.

Le chromosome X inactivé exprime le gène *XIST*, qui code pour un lncRNA. Cet ARN est retrouvé associé à la totalité du chromosome X (en particulier au niveau des séquences LINE) et participe à sa répression. *XIST* recruterait des complexes répresseurs induisant un état chromatinien répressif et

compacté [19]. La méthylation de l'ADN, qui intervient après l'inactivation originelle du chromosome X, est tout de même essentielle au maintien de l'état réprimé au cours des divisions¹.

Le chromosome X non inactivé exprime un autre lncRNA, antisens à *XIST*, *TSIX*. *TSIX* participe à la répression transcriptionnelle de *XIST* sur le chromosome X non inactivé, il serait notamment capable d'induire la méthylation de son promoteur en recrutant DNMT3A [20].

c) Réparation de l'ADN

De nombreuses marques d'histones et variant d'histones marquent les zones d'ADN nécessitant réparation. Ils servent à guider la machinerie de réparation de l'ADN et sont indispensables au maintien de la stabilité du génome. Le variant d'histone H2AX, présent de façon diffuse tout le long du génome, est phosphorylé par ATM ou ATR en cas de cassure double brins (Tableau 2 et Tableau 3). Cette phosphorylation servira au recrutement de la machinerie de réparation, notamment *via* MDC1 [21].

C) Oncogenèse et régulation transcriptionnelle

Sous l'appellation de cancer sont regroupées de nombreuses pathologies différentes possédant un certain nombre de caractéristiques communes : il s'agit de maladies résultant d'un clone de cellules acquérant des capacités de prolifération excessives, formant une tumeur, et pouvant envahir les tissus environnants ou atteindre un caractère systémique *via* le développement de métastases. Une sous classification des cancers distingue les carcinomes, issus de cellules d'un épithélium, les sarcomes, issus de cellules d'un tissu conjonctif, et les cancers hématopoïétiques dont les cellules sont issues d'une lignée hématopoïétique. Les cancers sont un enjeu de santé publique majeur dans les sociétés vieillissantes occidentales, car le risque de développer une de ces maladies augmente avec l'âge. En effet ces maladies résultent d'une accumulation d'altérations touchant un clone de cellule², accumulation d'altérations conduisant aux stades pathologiques les plus avancés.

Ces altérations confèrent aux cellules cancéreuses un certain nombre de caractéristiques communes nécessaires au développement de la pathologie, et qui sont donc autant de pistes de stratégies thérapeutiques. Pour reprendre les caractéristiques décrites par D. Hanahan et R.A. Weinberg [22] dans un ordre arbitraire : i) signalisation cellulaire aboutissant à une prolifération soutenue, ii) échappement aux mécanismes de limitation de la prolifération, iii) échappement à la surveillance immunitaire, iv) capacité répliquative infinie, v) promotion d'un microenvironnement inflammatoire facilitant le développement de la tumeur, vi) capacité d'envahir les tissus environnant et de développer des métastases, vii) induction de l'angiogenèse, viii) une instabilité génomique et une accumulation de

¹ Cf infra p 36.

² Une unique cellule est potentiellement à l'origine de chaque cancer.

mutations, ix) une résistance aux voies de morts cellulaires, et x) métabolisme cellulaire dérégulé. Ces caractéristiques sont acquises par des altérations du transcriptome dans les cellules cancéreuses.

Ces altérations sont de natures multiples, en lien avec les causes multifactorielles conduisant aux développements de cancers. Elles peuvent être d'origine génétique, soit sous formes de mutations zygotiques associées à des cas de cancers familiaux (par exemple les mutations des gènes BRCA1 et BRCA2 associés au développement de cancers du sein et de l'ovaire), soit sous forme de mutation somatique acquise lors de la vie de l'individu (expositions à des mutagènes : drogues ou rayonnements, ou mutations spontanées). Elles peuvent être d'origine épigénétique : hyperméthylation de l'ADN¹, modification des queues d'histones, miRNA, etc. Enfin elles peuvent être d'origine micro-environnementale : une tumeur ou métastase ne peut se développer que dans un microenvironnement permissif (propice à l'immunosuppression et à la pro-angiogenèse en particulier). Le microenvironnement tumoral peut jouer un rôle important dans le développement de la maladie, par exemple en sécrétant de façon excessive des facteurs trophiques. Enfin, des virus sont capables d'induire le développement de tumeur (par exemple les papillomavirus induisant le développement de cancer du col de l'utérus), et peuvent être porteurs d'oncogènes.

Ces altérations aboutissent pour la cellule cancéreuse à l'activation de gènes pro-oncogéniques (oncogènes) et à la répression de gènes anti-oncogéniques (suppresseurs de tumeur). Bien souvent les altérations agissent de façon synergiques : un allèle de gène suppresseur de tumeur peut être perdu par mutation et l'autre copie par hyperméthylation de son promoteur.

Transformer expérimentalement une cellule normale en une cellule tumorale ne requière que relativement peu d'étapes. Par exemple, Elenbaas *et al.* [23] ont transformé des cellules mammaires épithéliales humaines primaires (HMEC, Human Mammary Epithelial Cells) à l'aide de seulement trois transgènes : le gène de l'unité catalytique de la télomérase (TERT) pour immortaliser les cellules en supprimant la sénescence répllicative, les oncogènes viraux T/t du SV40 qui permettent notamment l'inhibition des suppresseurs de tumeur P53 et pRb, et une forme muté de *HRAS* (G12V) activant certaines voix oncogéniques. Par la suite a été montré que les oncogènes viraux T/t pouvaient être remplacé par des facteurs de transcription embryonnaires *TWIST1*, *ZEB1* ou *ZEB2*, ou encore directement par une inhibition de P53 par shRNA [24]. Les lignées cellulaires ainsi obtenues ont réalisée une transition épithélio-mésenchymateuses, et sont capable de former des tumeurs lorsqu'elles sont greffées chez des souris immunodéprimées. Il existe des modèles de transformation analogue pour d'autres types de tissus comme le poumon [25].

¹ Cf infra p 37.

II : La méthylation de l'ADN chez les mammifères

A) Structure, méthylation et déméthylation

1) Structure de la 5-méthylcytosine et impact sur la conformation de l'ADN

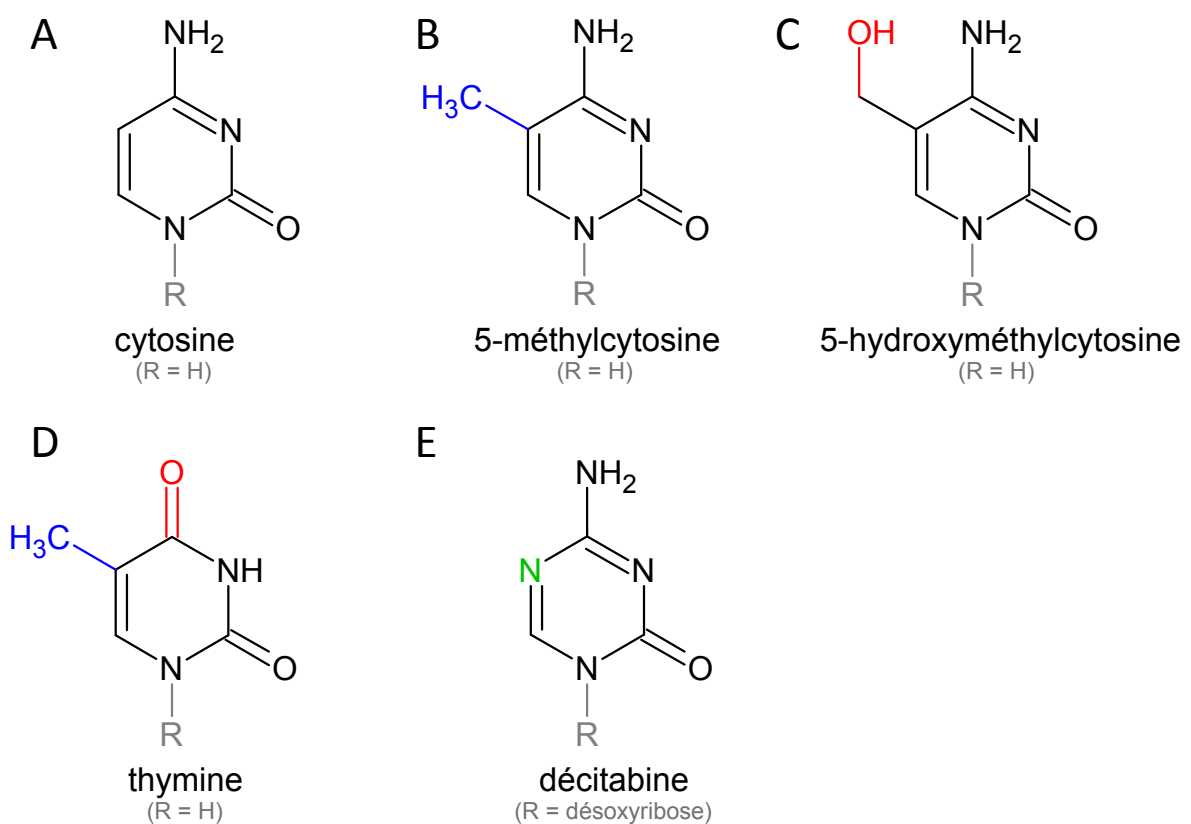


Figure 3 : Structures chimiques de bases azotées.

A. Cytosine. Cytidine lorsque le radical R est un ribose. **B.** 5-méthylcytosine. Le 1^{er} atome est l'azote lié au radical, la numérotation se fait ici dans le sens antihoraire. **C.** 5-hydroxyméthylcytosine. **D.** Thymine. Une oxydation-déamination de la 5 méthylcytosine au niveau du carbone 4 (le plus en haut du cycle) peut aboutir à la formation d'une thymine. Thymidine lorsque R est un ribose. **E.** Décitabine, une drogue pouvant inhiber les enzymes méthylant l'ADN. Notez la ressemblance de structure avec la cytidine. Un analogue de cette drogue existe, l'azacytidine, où le radical R est un ribose et non un désoxyribose.

Les quatre bases de l'ADN, Adénine (A), Cytosine (C), Guanine (G) et Thymine (T), peuvent être modifiées biochimiquement, ce qui peut leur conférer des propriétés particulières pouvant influencer l'interaction de protéines avec l'ADN. Ces bases modifiées peuvent jouer un rôle physiologique (régulation transcriptionnelle, réparation de l'ADN) ou résultent plus simplement de dégradations ou d'oxydations spontanées, ce qui met à mal l'intégrité du génome.

La plus courante de ces modifications chez les mammifères est la méthylation du carbone 5 des cytosines pour donner des 5-méthylcytosines (abrégé en méthylcytosine, 5mC ou mC). C'est bien souvent cette modification qui est désignée par le terme « méthylation de l'ADN », même si des méthylations sur d'autres carbones ou sur d'autres bases azotées sont possibles. Chez les mammifères adultes, la 5mC est présente quasi-exclusivement au niveau des dinucléotides 5'-Cytidine-Guanosine-3' (abrégé en CpG) de façon symétrique sur les deux cytosines des deux brins. La présence de 5-méthylcytosine dans le génome d'un mammifère fut observée pour la première fois en 1948 par chromatographie sur papier d'hydrolysats d'acides nucléiques de thymus de veau [26].

Cette méthylation de l'ADN est une marque physiologique, synthétisée à l'aide d'enzymes¹ et de cofacteurs, et dont la présence ou l'absence sur un site donné est fortement régulée.

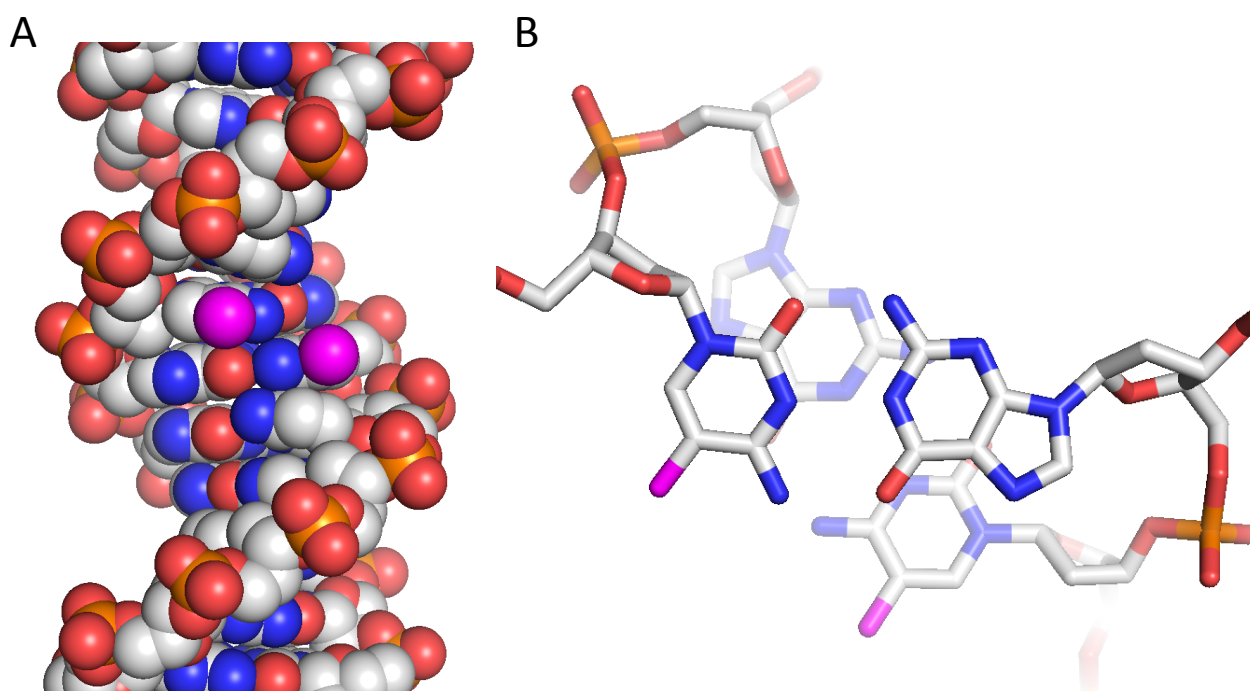


Figure 4 : Méthylation des CpG et structure de l'ADN.

La structure d'un octamère contenant un CpG central méthylyé a été obtenue par cristallisation [27] (PDB 329D). Rose: groupe méthyle des 5-méthylcytosines. Blanc : autres carbones. Bleu : azotes. Rouge : oxygènes. Orange : phosphores. **A.** La méthylation de l'ADN ne modifie pas la structure globale de la double hélice d'ADN. Le groupe méthyle est localisé dans le grand sillon. **B.** La méthylation de l'ADN ne modifie pas l'appariement des cytosines et des guanines.

La présence de 5mC dans la double hélice d'ADN ne modifie que marginalement ses propriétés : elle garde une même conformation dite de double hélice B (Figure 4). De plus, la 5-méthylcytosine forme toujours un appariement de type Watson-Crick avec la guanidine. La présence de 5mC modifie cependant la forme et la surface électrostatique du petit et (surtout) du grand sillon de l'ADN. Ainsi la méthylation d'un site CpG sera capable d'empêcher la fixation de certains facteurs de transcriptions, et recrutera spécifiquement d'autres protéines². L'ADN peut adopter une conformation en double hélice Z, qui diffère

¹ Cf infra p 26.

² Cf infra p 42.

de la double hélice B part ces caractéristiques (c'est notamment une hélice gauche alors que l'ADN B est une hélice droite) [28]. *In vivo*, cette conformation de l'ADN ne sera présente que de façon locale et transitoire. Hors la méthylation des CpG diminue la stabilité de la double hélice B augmente la stabilité de la double hélice Z [29]. La méthylation de l'ADN favorisera donc la transition vers une double hélice Z. De même, au moins *in vitro*, la méthylation de l'ADN stabilisera la structure en double hélice de type A [30].

La 5mC peut subir une réaction de désamination spontanée au taux estimé de $5,8 \times 10^{-13} \text{ s}^{-1}$ (soit à peu près deux cytosines méthylées sur 100 000 tous les ans) [31], ou bien catalysée enzymatiquement [32]. Contrairement à la cytidine qui se désamine en uridine, la réaction de désamination de la 5mC aboutit à la formation d'une thymine (Figure 3). On comprend bien le défi que cela représente pour la machinerie de réparation lorsqu'une telle désamination arrive dans la double hélice ! La thymine étant une base conventionnelle, la machinerie doit donc réparer un mésappariement T-G soit en C-G, soit en T-A, ce qui s'avérerait mutagène. Cette réaction de désamination spontanée n'est donc pas sans conséquence sur l'évolution des génomes¹.

La 5mC peut être hydroxylée en 5-hydroxyméthylcytosine (hydroxyméthylcytosine, 5hmC, ou hmC) via une réaction enzymatique².

2) Synthèse

a) Mécanisme réactionnel

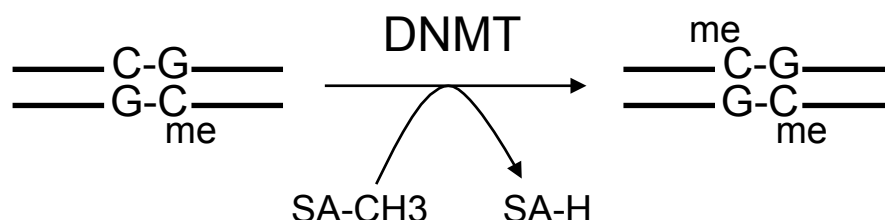


Figure 5 : Méthylation de maintenance de l'ADN.

Les sites CpG hémi-méthylés sont la cible de DNA méthyltransférases de maintenance (DNMT1 principalement), qui catalysent la réaction de méthylation. Le groupe méthyle est donné par le cofacteur S-adenosylméthionine (SA-CH₃), qui devient une S-adenosyl-L-homocystéine (SA-H). Cette réaction explique la persistance de la méthylation des sites CpG au cours des divisions cellulaires.

La réaction de méthylation de l'ADN est catalysée par des enzymes (DNMT1 et DNMT3A/B chez les mammifères). Cette réaction nécessite un cofacteur : la S-adenosylméthionine (SAM). Ce métabolite est synthétisé à partir d'ATP et de l'acide aminé méthionine à l'aide de méthionine adenosyltransférases. Le cofacteur SAM intervient dans d'autres réactions de méthylations, dont les méthylations d'histones

¹ Cf infra p 39.

² Cf infra p 30.

catalysé par les histones méthyl-transférases (HMT). Pendant la réaction, la SAM transfère un groupement méthyle et devient une S-adénosyl-L-homocystéine (SAH), qui pourra être recyclée par la suite.

b) Les enzymes responsables de la méthylation de l'ADN

Les ADN méthyltransférases (DNMT) sont les enzymes catalysant la réaction de méthylation de l'ADN. Chez l'homme les DNMT appartiennent à une famille de protéines paralogues composée de cinq membres : *DNMT1*, *TRDMT1* (ex *DNMT2*), *DNMT3A*, *DNMT3B* et *DNMT3L*. Seules les protéines codées par *DNMT1*, *DNMT3A* et *DNMT3B* sont capables de méthyler l'ADN. Elles agissent uniquement sur le carbone 5 des cytosines et ont une forte affinité pour les cytosines incluses dans un site CpG. La cytosine cible s'insère dans le site catalytique des DNMT et est par là même extraite de l'intérieur de la double hélice d'ADN (*flip out*, Figure 6) [33]–[35]. DNMT1 et les protéines DNMT3 ont aussi des fonctions non catalytiques¹. De plus, comme de nombreuses autres protéines, elles sont soumises à des modifications post-traductionnelles pouvant modifier leurs fonctions. Enfin, les gènes de la familles DNMT sont exprimés sous la forme de divers transcrits alternatifs.

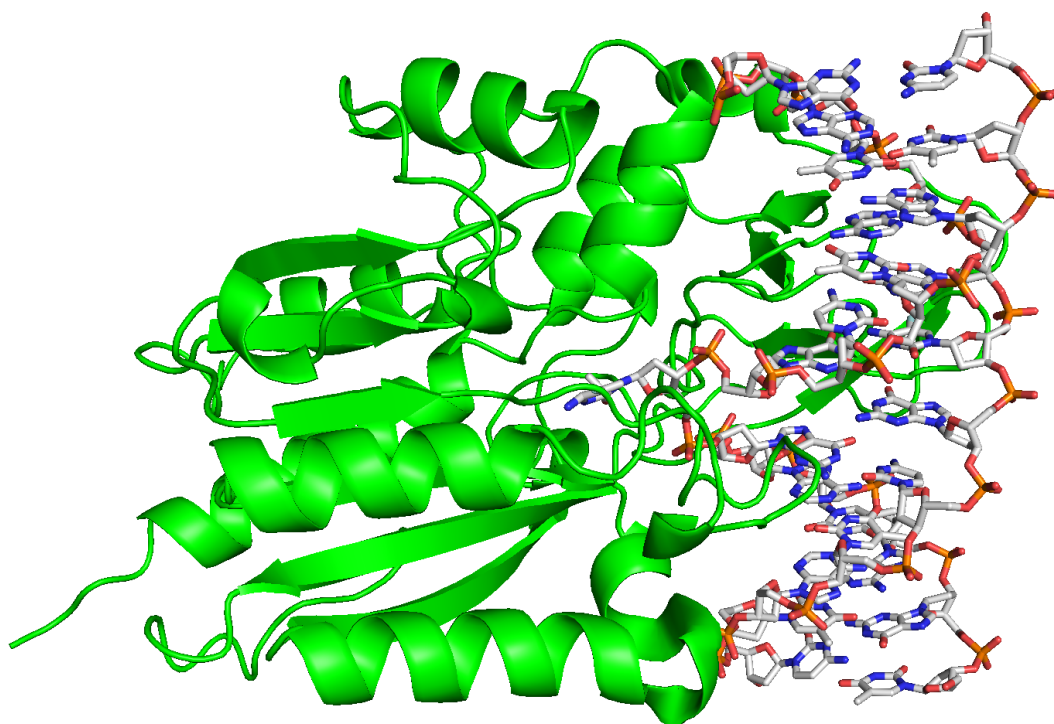


Figure 6 : Le *flip-out* de la cytosine par la DNA méthyl-transférase bactérienne Hha1.

La structure a été obtenue par cristallisation et diffraction aux rayons X [34] (PDB 1MHT). En vert l'enzyme Hha1.

¹ Cf infra p 27 et p 28.

i) *DNMT1*

Le gène *DNMT1* est localisé sur le chromosome 19 chez l'Homme (19p13.2). Deux principales isoformes sont générées par inclusion facultative de l'exon 5 : DNMT1a (avec l'exon 5) et DNMT1b (sans l'exon 5), ainsi qu'une variante spécifique de l'ovaire : DNMT1o.

DNMT1 est l'enzyme principale assurant la maintenance de la méthylation de l'ADN sur les sites CpG lors de la réplication. En effet, la réplication semi-conservative d'un dimère CpG symétriquement méthylé (mCpG/GpCm) aboutit à la synthèse de deux dimers CpG hémi-méthylés (mCpG/GpC) (Figure 5). Hors, *in vitro*, DNMT1 est plus active sur les sites CpG hémi-méthylés que sur les sites CpG non méthylés [36]. De plus, il s'agit de la DNMT la plus abondamment exprimées dans la plupart des tissus [37]. DNMT1b est exprimé de façon moins abondante que DNMT1a. Elle possède une activité catalytique similaire à DNMT1a mais ne catalyse, du fait de sa moindre abondance, que environ 5% des réactions de méthylations catalysées par une DNMT1 [38].

L'inactivation de ce gène chez la souris par la technique du *knock-out* (KO) aboutit à une mort embryonnaire précoce (E10.5) par apoptose, mais des cellules souches embryonnaires (ES – *embryonic stem cells*) *dmnt1*^{-/-} peuvent être mises en culture [39]. Ces cellules présentent un taux de méthylation fortement réduit, mais non nul. D'autres DNMT jouent donc un rôle mineur dans la maintenance de la méthylation de l'ADN.

DNMT1 peut interagir avec de nombreuses protéines, et est intégrée dans des complexes protéiques de fonctions diverses : réplication de l'ADN [40], répression transcriptionnelle [41], réparation de l'ADN [42], contrôle du cycle cellulaire [43]. L'expression de *DNMT1* est cyclique au cours du cycle cellulaire, avec un pic pendant la phase S, en lien avec sa fonction de maintenance de la méthylation pendant la phase S [44], [45].

ii) La famille *DNMT3*

La famille DNMT3 est composée de trois gènes paralogues, *DNMT3A* (2p23), *DNMT3B* (20q11.2) et *DNMT3L* (21q22.3). Seules DNMT3A et DNMT3B sont capables de méthyler l'ADN, DNMT3L n'ayant pas de site catalytique actif. *In vitro*, DNMT3A et DNMT3B ont une même efficacité sur les CpG non méthylés et sur les CpG hémi-méthylés, contrairement à DNMT1. Elles joueraient un rôle préférentiel dans la méthylation *de novo* de l'ADN [46], même si un rôle minoritaire leur est aussi prêté dans la méthylation de maintenance. DNMT3A et DNMT3B codent pour de nombreux transcrits alternatifs. Il en résulte des variants protéiques aux propriétés parfois différentes. Par exemple, les variants DNMT3B3 et DNMT3B4 sont non catalytiques, contrairement aux variants DNMT3B1 et DNMT3B2 [47].

Des mutations du gène DNMT3B sont la cause d'un syndrome sévère : le syndrome ICF (pour *Immunodeficiency, Centromeric region instability, Facial anomalies*, soit immunodéficiences, instabilité

des régions centromériques, dysmorphies faciales) [46]. Ce n'est pas le cas de mutation de DNMT3A ; DNMT3B possède donc des fonctions spécifiques, notamment dans la méthylation des régions centromériques [46].

DNMT3L est inactive catalytiquement (elle est d'ailleurs incapable de lier le cofacteur SAM [48]), mais joue cependant un rôle d'activateur des autres DNMT, en particulier de DNMT3A et DNMT3B [49], [50]. Elle joue un rôle déterminant dans l'établissement de l'empreinte parentale [51].

iii) *TRDMT1* (ex *DNMT2*)

TRDMT1 (10p15.1) est paralogue aux autres DNMT. Cependant elle semble incapable de catalyser une réaction de méthylation de l'ADN *in vivo*, mais catalyse une réaction de méthylation d'un acide ribonucléique de l'ARN de transfert de l'acide aspartique (abrégé D) [52]. Elle méthyle en effet le 38^{ème} acide ribonucléique de cet ARNt, qui est une cytosine. Son nouveau nom reflète cette fonction : *tRNA aspartic acid methyltransferase 1*.

3) La déméthylation de l'ADN

a) Déméthylation passive

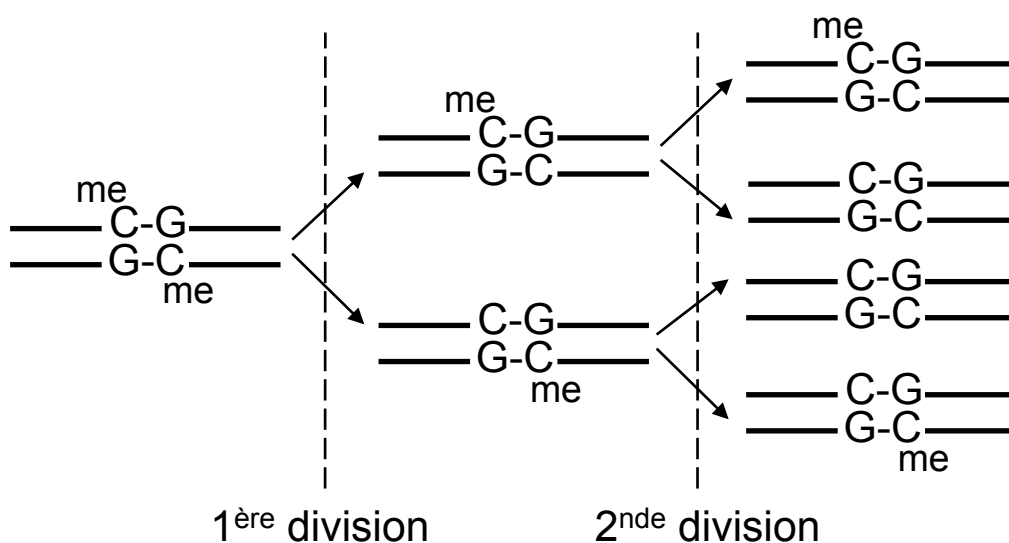


Figure 7 : La déméthylation passive.

En absence de maintenance de la méthylation, les sites CpG bi-méthylés se retrouvent hémi-méthylés après une première division. Une deuxième réplication sans maintenance aboutira à la formation deux chromatides déméthylés au niveau du site en question.

Pour la machinerie répliquative, la 5mC n'est pas distinguable d'une cytosine non méthylé. De plus il n'existe pas de désoxycytidine triphosphate pré-méthylé. Les sites CpG méthylés symétriquement se retrouvent donc hémi-méthylé après réplication. Si la maintenance de la méthylation n'est pas assurée (pour de multiple raisons possibles, pour ce site précis ou à l'échelle du génome), une deuxième réplication dans les cellules filles entrainera la formation de deux sites entièrement déméthylés et de deux

sites hémi-méthylés. De même, au bout de trois réplifications et divisions cellulaires, on trouvera dans les huit cellules filles six non méthylés et deux hémi-méthylés. Dans les tissus prolifératifs, il suffit donc d'un arrêt de la méthylation de maintenance, ou une baisse de l'activité de celle-ci, pour entraîner une déméthylation de l'ADN. La déméthylation issue de ce processus est qualifiée de « passive », par opposition à la déméthylation « active ». Cette déméthylation passive jouerait un rôle important dans la baisse du taux global de méthylation lors des premières divisions cellulaires des zygotes [53].

b) Déméthylation active

i) *Via le mécanisme d'excision - réparation*

Certains processus de réparation de l'ADN fonctionnent par excision d'un fragment d'ADN suivie d'une resynthèse de l'ADN manquant à partir du brin complémentaire ou de la chromatide sœur. Hors lors de la synthèse d'ADN, les cytosines intégrées sont non méthylées. En absence de re-méthylation, une réparation de l'ADN à proximité d'un site CpG méthylé peut donc entraîner sa déméthylation partielle ou totale. C'est en particulier le cas des mécanismes de réparation par excision de base (BER – *Base Excision Repair*) et de réparation par excision de nucléotides (NER – *Nucleotide excision repair*). Ces mécanismes peuvent être déclenchés par une déamination catalysée des cytosines méthylées par des désaminases (AID, APOBEC1), suivies d'une réparation du mésappariement T-G ainsi généré [54].

Ces mécanismes de déméthylation pourraient jouer un rôle important dans la déméthylation de cellules quiescentes (bloquées en G0) ou à très faible taux de division, tels les neurones ou les cellules musculaires. Ils participent aussi au dynamisme (*turn over*) de la méthylation dans les cellules.

ii) *Via la 5-hydroxymethylcytosine*

La 5-methylcytosine peut être hydroxylée en 5-hydroxymethylcytosine via des enzymes de la famille TET (*Ten Eleven Translocation methylcytosine dioxygenase*). Trois sont présentes chez l'homme, codées par les gènes *TET1* (10q21), *TET2* (4q24) et *TET3* (2q13.1) et semblent catalytiquement actives. Les enzymes de la famille TET sont capables de métaboliser la 5hmC en 5-formylcytosine (5fC) puis en 5-carboxycytosine (5caC), mais l'abondance et l'importance de ces réactions *in vivo* chez les mammifères reste mal caractérisée. 5hmC, 5fC et 5caC pourraient être ensuite détectées par la machinerie de réparation de l'ADN, en particulier par les *thymine DNA glycosylases* (TDG) et remplacées par des cytosines non méthylés. Ainsi la 5hmC serait un intermédiaire réactionnel de la déméthylation des cytosines [55], [56]. Tandis que la méthylation de l'ADN serait plutôt une marque répressive sur la transcription, l'hydroxyméthylation de l'ADN serait une marque plutôt neutre ou activatrice [57]. L'abondance de la 5hmC est estimée à 1 à 5 % de celle de la mC dans les cellules humaines [58]. Les neurones et les cellules souches embryonnaires présentent un taux de 5hmC relativement élevé [58]–[60]. Des techniques sont mise au point afin de mieux identifier sa présence à l'échelle du génome [61].

B) Fonctions

1) Localisation de la méthylation de l'ADN sur le génome

Les profils et taux globaux de méthylation de l'ADN varient sensiblement d'un type cellulaire à l'autre. Le taux global de méthylation des cytosines peut être estimé depuis longtemps par des techniques de chromatographies et des techniques de digestion à l'aide d'enzymes de restrictions sensibles à la méthylation. Dans les tissus adultes, il est autour de 2 à 7% du nombre total de cytosines [62], [63]. Des techniques plus raffinées et mises au point plus récemment, telle que le traitement de l'ADN au bisulfite suivi de séquençage ciblé ou total (séquençage du génome entier après traitement au bisulfite, WGBS – *Whole Genome Bisulfite Sequencing*) ont permis de raffiner la localisation de cette méthylation dans différents types cellulaires.

Ainsi chez l'Homme adulte, la méthylation est localisée à plus de 99% dans un contexte CpG [63]. Entre 60 et 80% des sites CpG se retrouvent méthylés chez l'adulte, de façon symétrique. Les sites CpG sont relativement rares dans le génome, et leur distribution est très hétérogène. Pour une séquence donnée, on peut calculer son taux de C+G et en déduire un nombre de CpG attendus. Dans la plupart des régions du génome, le taux CpG observés / CpG attendus est faible, autour de 0,2. Les sites CpG de ces régions pauvres sont pratiquement tous méthylés. Certaines régions du génome ont un taux CpG observés / CpG attendus plus élevé : on les nomme îlot CpG. La définition exacte de ces îlots CpG varie selon les espèces et les auteurs, la définition la plus communément admise étant la suivante : ce sont des zones de plus de 200 paires de bases, riches en G + C (supérieure à 50%) dont le taux CpG observés / CpG théoriques est supérieur à 0,6 [64]. Une autre définition plus stringente correspond à des zones de plus de 500 paires de bases à contenu en G+C supérieure à 55 % et au taux CpG observés / CpG théoriques supérieur à 0.65 [65]. Ces îlots sont présents à proximité des sites d'initiation de la transcription de plus de la moitié des gènes humains, dont près de la totalité des gènes ubiquitaires. Les CpG de ces îlots sont peu méthylés en générale, et en particulier dans les lignées germinales. Plus de la moitié des promoteurs de gènes possèdent un îlot CpG, très généralement peu méthylé sur l'ADN mais enrichie en H3K4me3, ce qui permet entre autre de recruter le facteur du complexe de pré-initiation de la transcription TFIID [5].

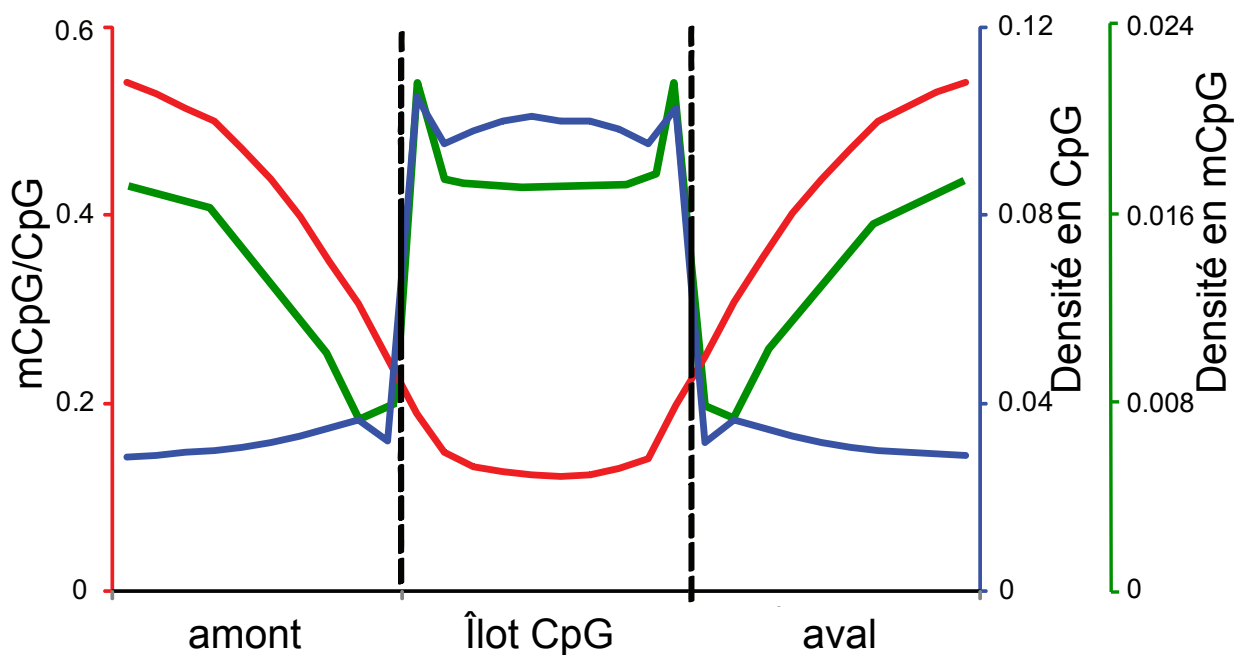


Figure 8 : Méthylation moyenne des îlots CpG du génome humain (cellules mononucléaires circulantes).

En rouge, ratio de méthylation des CpG. Ce ratio diminue fortement au niveau des îlots. En bleu, densité en CpG (pour une base donnée, fréquence de couverture par un CpG). Cette densité augmente fortement au niveau des îlots, par définition. En vert, densité en méthylation (pour une base donnée, fréquence d'être dans un CpG méthylé). La densité en méthylation du cœur des îlots est en moyenne équivalente à la densité en méthylation des autres régions du génome. Ce taux de méthylation moyen est cependant non représentatif de la diversité des profils de méthylation de ces îlots. D'après [63], figure S11.

Notons toutefois que le taux de méthylation de l'ADN peut se mesurer selon deux méthodes distinctes : pour une région de taille donnée (disons un kilobase), on peut mesurer le pourcentage de sites CpG méthylés, ou plus simplement le nombre de cytosines méthylées (densité de méthylation). Ces deux mesures peuvent donner des résultats sensiblement différents. En dehors des îlots CpG, le pourcentage de CpG méthylé est supérieur à 60% tandis que la densité en méthylation est fortement corrélée à la densité en site CpG. Au sein des îlots CpG, le pourcentage de CpG méthylé est plus faible (inférieur à 20%), mais du fait de la forte densité en CpG, la densité de méthylation est globalement similaire au reste du génome (Figure 8, courbe verte). La méthylation de ces îlots CpG est cependant hétérogène. Certains îlots peuvent se retrouver fortement méthylés dans des lignées somatiques [66] : empreinte parentale, gènes du chromosome X inactivé, îlots non associés à un gène, gènes tissus spécifiques non exprimés ou encore dans le cadre de pathologies. Les bordures (ou épaules) des îlots CpG sont d'une manière générale plus fortement méthylées que leurs centres [63]. De même, la méthylation des îlots CpG dépend de leur taille : les petits îlots ont tendance à être plus fortement méthylés que le cœur des plus long îlots [67]. Enfin, les îlots non associé à un promoteur de gène (îlots orphelins) sont plus fréquemment méthylés [67].

2) La méthylation de l'ADN, une marque répressive

a) Méthylation de l'ADN et état de la chromatine

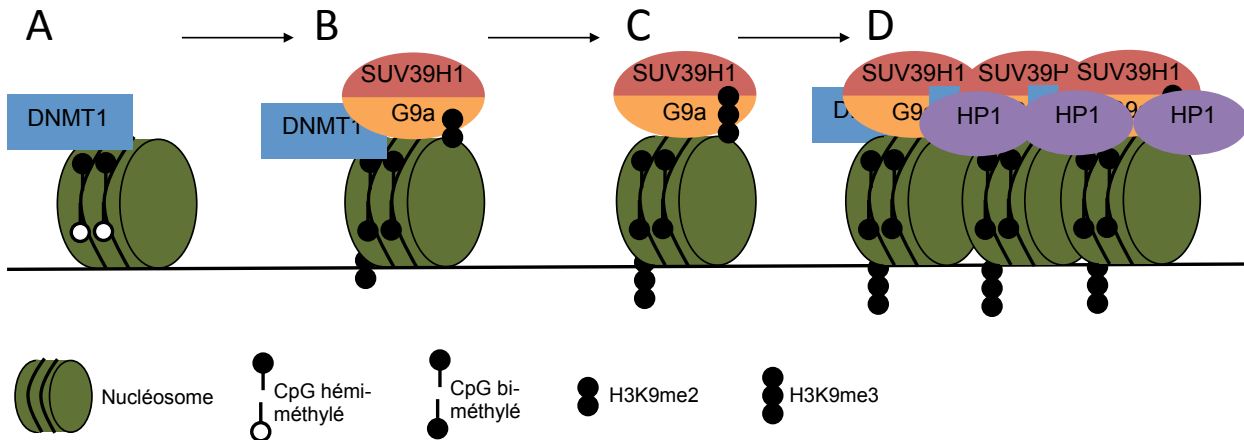


Figure 9 : Réplication, méthylation de l'ADN et hétérochromatinisation.

A. Après le passage de la fourche de réplication, DNMT1 est recruté sur les sites CpG hémi-méthylés, possiblement via PCNA ou UHRF1. **B.** DNMT1 méthyle les sites CpG hémi-méthylés et recrute des histones méthyl-transférase, dont G9a (EHMT2) et SUV39H1, qui vont respectivement **B.** bi- et **C.** tri-méthyliser les lysines 9 des histones 3 (H3K9). Ces histones méthyl-transférases peuvent aussi être recrutées sur des régions d'ADN méthylées *via* les protéines de liaisons à l'ADN méthylés. **D.** La protéine HP1 est recrutée par la tri-méthylation des H3K9, et pontre les nucléosomes entre eux, induisant une compaction de la chromatine. Adapté d'après Estève *et al.* [68].

Un traitement modéré de noyaux à la DNase I entraîne une digestion de l'ADN facilement accessible (sous forme d'euchromatine), mais ne digère pas l'ADN compacté (sous forme d'hétérochromatine). Cette technique couplée à une détection de la méthylation de l'ADN permet de mettre en évidence que la majorité de l'ADN méthylé est sous forme d'hétérochromatine [69]. La détermination des liens causaux entre méthylation de l'ADN et hétérochromatinisation est complexe, car pouvant se faire dans les deux sens.

L'ADN génomique est décompacté entièrement pendant la réplication. Après réplication, les sites CpG bi-méthylés deviennent hémi-méthylés. De plus, un nucléosome sur deux intégré à l'ADN répliqué sera nécessairement d'origine exogène. DNMT1 peut être recruté sur les sites hémi-méthylés, de façon spontanée où via une interaction avec PCNA [40] ou UHRF1 [70]. Les sites en question seront re-méthylés. DNMT1, ainsi que d'autres protéines de liaisons à l'ADN méthylés recrutent alors des histones méthyl-transférases et des histones désacétylases, dont SUV39H1 (*Suppressor of Variegation 3-9 Homolog 1*) ou SETDB1. Cette dernière va tri-méthyliser les lysines 9 de l'histone 3, ce qui aboutit au recrutement de la protéine HP1 (*Histone Protein 1*) [41], et donc à une compaction de chromatine. Ainsi la méthylation de l'ADN est capable d'induire une hétérochromatinisation après réplication. Notons que la méthylation de l'ADN seule n'induit pas de compaction des nucléosomes [71] : il faut nécessairement l'action d'autres protéines.

Les interactions protéines-protéines fonctionnent dans les deux sens. Une zone de chromatine compactée aboutira possiblement au recrutement de DNMT1 et de DNMT3A/B via des complexes répresseurs (dont SUV39H1), et donc à terme à sa méthylation potentielle.

b) Méthylation du promoteur et répression des gènes

La méthylation du promoteur d'un gène est très souvent associée à sa répression transcriptionnelle. Cette corrélation a été faite sur de nombreux gènes à de nombreuses reprises (voir par exemple [72]) et a été confirmée par des études à l'échelle du génome. Quel est le lien causal reliant méthylation et répression transcriptionnelle ?

La capacité de la méthylation de l'ADN d'induire une répression transcriptionnelle peut être mise en évidence par des expériences de transfection de plasmides méthylés *in vitro* et de mesure du taux de transcription du gène rapporteur contenu, en le comparant au même plasmide non méthylé. En général, le gène contenu dans le plasmide méthylé est exprimé à des taux cent fois plus faibles que le gène du plasmide non méthylé [72]. Il existe deux analogues de nucléosides, la 5-aza-desoxycytidine et la 5-azacytidine (Figure 3) qui peuvent se lier de façon covalente aux DNMT, qui se retrouvent piégées. Lors des réplifications suivantes, le reste du génome subit une déméthylation passive par défaut de maintenance de la méthylation. Ces drogues sont donc capables d'induire une hypométhylation dans les cellules proliférantes [73]. Le traitement par ces drogues entraîne une réexpression des gènes méthylés [74], démontrant une fois de plus le rôle causale de la méthylation dans la répression de la transcription des gènes.

Weber *et al.* [75] ont proposé de classifier les gènes en fonction du contenu en CpG de leur promoteur. Deux catégories non chevauchantes peuvent être définies : les gènes au promoteur riche en CpG (HCP, *High CpG Promoters*), c'est à dire à îlot CpG, et les gènes au promoteur pauvre en CpG (LCP, *Low CpG Promoters*). Une catégorie tampon a été définie, les gènes au promoteur à niveau intermédiaire de CpG (ICP, *Intermediate CpG Promoters*). La corrélation entre méthylation du promoteur et répression transcriptionnelle est forte pour les HCP et ICP, mais faible, inexistante, voir inverse pour les LCP [75].

L'inhibition continue de l'expression d'un gène (par exemple par mutagenèse, siRNA ou différenciation cellulaire) peut aussi à terme entraîner son hyperméthylation [76], [77], probablement *via* des mécanismes d'hétérochromatinisation et de maintenance de l'hétérochromatine. La répression transcriptionnelle semble donc aussi capable de causer une méthylation de l'ADN.

Comment la méthylation de l'ADN induit-elle une répression transcriptionnelle ? La méthylation de l'ADN en elle même n'entraîne pas de baisse de l'activité de l'ARN polymérase II, comme le montrent des expériences de transcription *in vitro* [78], il s'agit donc d'un mécanisme indirect nécessitant des facteurs en *trans* [79]. La méthylation de l'ADN peut être qualifiée de marque épigénétique, qui doit par la suite être interprété par d'autres facteurs (en l'occurrence des protéines) pour avoir un effet. On

explique la répression de l'ADN par deux mécanismes principaux : *i*) de nombreux facteurs de transcriptions activateurs ne reconnaissent plus leur site de fixation lorsque ce dernier est méthylé (c'est le cas par exemple de CTCF [80]–[82], CREB [83], E2F1 [84], c-Myc [85], n-Myc [86], STAT1 [87] et UBF1 [88]), *ii*) des protéines sont capables de se fixer spécifiquement sur l'ADN méthylé et entraînent une répression transcriptionnelle via le recrutement de complexes répresseurs (c'est le cas des DNMT, mais surtout des MBP¹). Une synergie de ces deux mécanismes (perte de facteurs activateurs et gain de facteurs répresseurs) expliquerait la répression transcriptionnelle induite par l'ADN méthylé.

c) Méthylation du corps des gènes

Les profils de méthylation du corps des gènes sont bien marqués. En particulier, les exons apparaissent plus fortement méthylés que les introns. Le niveau de méthylation des exons est positivement corrélé au niveau de transcription des gènes [63]. De même, pour un même gène, les exons inclus dans le transcrit mature sont plus méthylés que les exons non inclus [89].

Le fort taux de méthylation des exons inclus suggère que la méthylation de l'ADN joue un rôle dans le guidage de la machinerie d'épissage. Un des mécanismes possible serait le ralentissement de la vitesse de transcription de l'ARN polymérase II au niveau des exons inclus, induit par la méthylation de l'ADN [90], [91], notamment via MECP2 [89]. Ce ralentissement favoriserait l'activation de la machinerie d'épissage.

Un autre rôle possible de cette méthylation intra-génique serait l'inhibition d'éventuels promoteurs internes alternatifs [92], notamment d'ARN anti-sens naturels.

d) Méthylation de l'ADN et compaction des éléments répétés

La méthylation de l'ADN touche quantitativement d'abord les séquences extra-géniques, en particulier les éléments répétés. Cette méthylation des zones extra-géniques en général et des éléments répétés en particulier semble jouer trois rôles principaux : répression de la transcription des éléments transposables, maintien de l'organisation nucléaire, et maintien de l'intégrité du génome.

Certains éléments transposables de notre génome sont potentiellement actifs [93]. Pour se transposer, les éléments de types LINE, SINE ou rétrovirus endogènes doivent d'abord être transcrits. La méthylation de l'ADN participe à la répression transcriptionnelle de ces éléments répétés [94].

Un grand nombre de séquences répétées qui ne sont pas des éléments transposables sont localisées au niveau des centromères, sous formes de séquences satellites. Ces séquences sont méthylées et compactées, et forment le chromocentre des chromosomes interphasiques. Un traitement de cellules à la

¹ Cf partie III p 42.

5-aza-deoxycytidine, drogue entraînant une déméthylation, entraîne une désorganisation des chromocentres [95]. De même, le syndrome ICF, causé par des mutations de *DNMT3B*¹, est en partie caractérisé par une instabilité centromérique. La méthylation de l'ADN participe au maintien de ces régions dans l'hétérochromatine. DNMT1 [96] et DNMT3B [97] ont aussi été impliquées dans la bonne organisation des nucléoles.

Les éléments répétés, de par la présence de séquences proches en de multiples endroits du génome, posent un défi pour la machinerie de recombinaison homologue. Deux éléments répétés homologues entre eux peuvent être localisés sur des chromosomes non homologues. La méthylation de ces séquences permet leur maintien dans l'hétérochromatine, ce qui défavorise la recombinaison sur ces sites [98]. Ce dernier mécanisme permet de lutter contre les éléments transposables à intermédiaire à ADN (transposons *stricto sensu*, dit de classe II).

3) Méthylation et réparation de l'ADN

Le rôle de la méthylation de l'ADN dans la réparation reste mal compris, mais est supporté par plusieurs observations. DNMT1 est recruté au niveau des sites de réparations de l'ADN [42], et semble capable d'induire (potentiellement avec DNMT3) une hyperméthylation de ces zones [99]. Ce couplage de l'activité de réparation de l'ADN et de méthylation de l'ADN a peut-être pour fonction de permettre une bonne re-méthylation des régions réparées.

4) Méthylation de l'ADN, développement et vieillissement des organismes

a) Evolution du taux de méthylation lors de l'embryogenèse

Les profils de méthylations de l'ADN varient fortement lors de l'embryogenèse précoce. Les premières cellules du zygote voient leur taux de méthylation diminuer fortement au cours des divisions cellulaires. Les parts respectives des processus de déméthylations actives et passives dans ce phénomène sont encore soumises à controverse. Il semble que le mécanisme de déméthylation du pronucléus femelle soit une déméthylation passive, tandis que celle du pronucléus male sera plus rapide et pourra passer par l'hydroxyméthylation des cytosines. Les cellules du zygote subissent ensuite une phase de re-méthylation de leur génome, qui débute après l'implantation de l'embryon dans la paroi utérine [100], [101]. La re-méthylation du génome des cellules des feuillets extra-embryonnaires est moins rapide et moins importante que pour celle des feuillets embryonnaires. Ainsi le placenta est l'un des tissus le moins méthylé. Notons que les cellules embryonnaires présentent alors un faible taux de méthylation des

¹ Cf supra p 28.

cytosines hors sites CpG [62], en particulier sur des sites CpA. L'origine et le rôle de ces méthylations hors site CpG sont mal compris. On peut supposer qu'elles résultent « d'accidents » de l'activité *de novo* des DNMT lors de la phase de re-méthylation. Ces méthylations seraient par la suite perdues lors des divisions successives, la maintenance de la méthylation ayant lieu préférentiellement au niveau des sites CpG. Ce cycle de déméthylation re-méthylation participe à l'établissement de l'identité cellulaire des différents lignages générés, en permettant la répression de gènes tissus spécifiques [66].

Les cellules germinales primordiales subissent spécifiquement un deuxième cycle de déméthylation re-méthylation plus tardif, qui permettrait entre autre une remise à zéro de l'empreinte parentale¹.

b) Méthylation de l'ADN et inactivation du chromosome X

Un des mécanismes impliqué dans l'inactivation du chromosome X chez les femelles mammifères² est la méthylation de l'ADN. Le chromosome X inactivé est en effet fortement méthylé. Cette méthylation intervient aux stades E4-E8 chez l'embryon de souris, après que l'inhibition transcriptionnelle du chromosome X ait été établie via *Xist* et l'induction d'un état chromatinien restrictif. Cette méthylation secondaire servirait de verrou et agit de façon complémentaire aux autres mécanismes de répressions du chromosome X [102].

Le gène *Xist* est bien réprimé sur le chromosome X activée. La méthylation de l'ADN participe au maintien de cette inactivation [103].

c) Empreinte parentale

De façon tout à fait remarquable, certains gènes d'un individu ne sont exprimés qu'à l'état mono-allélique, l'autre copie étant inactivée par des mécanismes épigénétiques, dont la méthylation de l'ADN. Pour un certain nombre de gènes, l'allèle réprimé a une même origine parentale chez tous les individus : tantôt cette méthylation et inactivation touche l'allèle d'origine paternelle (par exemple *IGF2R* [104], *H19* [105] ou *CDKN1C* [106]), tantôt elle a lieu sur l'allèle d'origine maternelle (par exemple *IGF2* [104]). On parle alors d'empreinte parentale. Cette empreinte semble être établie lors de la gamétogenèse, via le recrutement de DNMT1/3A/3B par DNMT3L [51]. Elle résisterait à la déméthylation – re-méthylation observée ailleurs sur le génome lors des premières divisions cellulaires embryonnaires [107], mais serait effacée dans les lignées germinales [54]. On estime le nombre de gènes soumis à l'empreinte à près d'une centaine [17].

¹ Cf infra p 37.

² Cf supra p 21.

Une des théories proposées pour expliquer ce mécanisme d’empreinte aborde les relations trophiques conflictuelles existant entre un embryon et sa mère. L’embryon mammifère se développe en puisant dans les ressources maternelles. Il existerait ainsi des gènes « pro-trophiques » favorisant l’absorption des ressources maternelles par l’embryon, et des gènes « anti-trophiques » limitant cette absorption. D’un point de vu évolutif, un père a tout intérêt génétique à ce que l’embryon puise le plus de ressources possible chez la mère. Les gamètes males auront donc tendance à être méthylés sur le promoteur des gènes « anti-trophique » afin de limiter leurs actions. D’un point de vu évolutif, une mère a tout intérêt génétique à ce que l’embryon actuel ne puise pas toutes ses ressources. Les gamètes femelles auront donc tendance à être méthylés sur les gènes « pro-trophiques » afin de limiter leurs actions. La sélection naturelle de ces deux effets antagonistes assurerait leur bon équilibre et le développement harmonieux de l’embryon [108].

d) Vieillissement du méthylome

Si les profils de méthylations sont assez fidèlement transmis lors de la réplication et de la mitose, ils n’en accumulent pas moins au fil du temps des altérations. Une étude comparative des profils de méthylations de personnes jeunes et âgées a montré une hypométhylation globale avec l’âge (de l’ordre de 10% après 80 ans) des lymphocytes T CD4+ circulant [109], associée à un léger gain de méthylation dans les îlots CpG. Notons qu’on retrouve ce même genre d’altérations dans les cancers.

5) Méthylation de l’ADN et cancer

Les cellules cancéreuses ont un transcriptome profondément altéré par rapport aux cellules normales de leurs tissus d’origine. La méthylation de l’ADN jouant un rôle important lors de la régulation de ce transcriptome, il n’est pas étonnant que ces profils de méthylations soient altérés dans les cancers. On observe en effet une baisse du taux global de méthylation de l’ADN dans les cellules cancéreuses, de l’ordre de 10 à 30% [110]–[112]. Cette baisse peut avoir pour conséquence une instabilité génomique, en limitant la répression transcriptionnelle de certains éléments transposables et en désorganisant l’hétérochromatine. De plus elle peut induire une expression ectopique de gènes, par exemple des gènes qualifiés de *Cancer/testis antigens* (antigènes spécifiques des testicules et des cancers) ou de *melanoma associated antigens* (antigènes associées au mélanome) [113].

En parallèle de cette baisse de méthylation, des hyperméthylations locales sont observées, en particulier sur certains promoteurs de gènes suppresseurs de tumeurs. Ces hyperméthylations de promoteurs participent à la répression de ces gènes dans les cancers, et participent donc à l’échappement tumoral aux mécanismes de sauvegardes de l’homéostasie cellulaire telle que l’apoptose ou la sénescence. Ces hyperméthylations jouent un rôle si déterminant dans la progression tumorale qu’elles font maintenant partie de la définition des gènes suppresseurs de tumeurs : un gène capable de réduire la croissance ou l’invasion tumorale et qui est spécifiquement perdu dans certains cancers par

hyperméthylation du promoteur peut être considéré comme suppresseur de tumeur. Notons que lorsqu'un allèle d'un gène suppresseur de tumeurs est perdu ou altéré par mutation, l'autre copie est fréquemment perdue par hyperméthylation dans la tumeur. C'est en partie le cas des formes familiales de cancers où une mutation se retrouve présente dans tout l'organisme, mais à l'état hétérozygote. La survenue d'un cancer ne se déclenchera alors que si l'autre allèle est à son tour altéré (par mutation somatique, perte d'hétérozygotie, miRNA ou hyperméthylation du promoteur) [114].

Le rôle premier de l'hyperméthylation dans la perte transcriptionnelle des gènes suppresseurs de tumeurs est débattu : la méthylation pourrait n'arriver qu'une fois une répression transcriptionnelle acquise par d'autres mécanismes répresseurs. L'hyperméthylation du promoteur viendrait alors dans un second temps verrouiller la répression de ces gènes empêchant toute future réactivation [115].

Les origines de ces altérations de la méthylation de l'ADN sont multiples et mal comprises. Comme le montre l'étude de Heyn *et al.* [109], les tissus normaux des personnes âgées semblent en partie affecté par ces hyperméthylations locales associées à une baisse globale du taux de méthylation de l'ADN. Une partie des changements de méthylation observé viendrait donc du simple vieillissement et de la simple prolifération des cellules. Cette hypothèse est corroborée par la récente étude de Gordon *et al.* [25] montrant que l'immortalisation d'une lignée cellulaire entraînait plus de changement du méthylome que sa transformation oncogénique.

On peut aussi observer que la perte de méthylation de l'ADN dans les cellules cancéreuses va de pair avec une certaine dé-différenciation cellulaire, hors les cellules embryonnaires sont généralement peu méthylés.

Le rôle majeur de l'hyperméthylation de l'ADN dans la répression des gènes suppresseurs de tumeur a conduit au développement de thérapies ciblant ce mécanisme. Ainsi 5-aza-deoxycytidine et 5-aza-cytidine sont actuellement utilisées comme traitement de syndromes myélodysplasiques et de certains lymphomes [116]. De nombreux essais cliniques sont en cours sur des tumeurs solides, en particulier dans le cadre de combinaisons de drogues. Au laboratoire, nous essayons nous aussi ce genre de combinaison, à un niveau de recherche fondamental, en couplant 5-aza-deoxycytidine et anticorps activant la voie des récepteurs à dépendances¹. Le mécanisme d'action de ces deux molécules est complexe : certes elles agissent en titrant les DNMT et en induisant une déméthylation passive dans les cellules proliférantes, mais elles ont aussi un effet cytostatique important. C'est en particulier le cas de la 5-aza-cytidine qui est capable de s'intégrer aux ARN. Ces molécules ont une très faible durée de vie dans l'organisme, leur demi-vie sanguine étant de l'ordre de la demi-heure. D'autres molécules inhibitrices de la méthylation ont donc été (par exemple la Zébularine) ou sont donc activement recherchées [116].

¹ Cf infra p 104.

Comme la méthylation de l'ADN joue un rôle dans le développement des cancers, il n'est pas surprenant de constater que les enzymes de la méthylation (DNMT et TET) sont elles aussi impliquées dans ces pathologies. Ces implications sont toutefois complexes à déchiffrer. Par exemple, une baisse d'expression de DNMT1 chez la souris suffit à induire la formation de lymphomes [117], tandis que sa transfection permet une transformation de certaines lignées cellulaires [118]. Si une hausse de l'expression de DNMT1 est détectable dans certaines tumeurs [119], ce ne semble pas être un phénomène généralisé, et ne permet pas d'expliquer les hypométhylations observées. Des mutations de DNMT1, DNMT3A, DNMT3B et TET2 ont été identifiées dans diverses tumeurs [120].

C) Evolution

1) Impact de la méthylation sur l'évolution des génomes

a) Îlots CpG

La désamination spontanée des cytosines méthylées conduit à la formation d'une thymine, et donc d'une paire non mendélienne T-G. La machinerie de réparation doit prendre en charge ce mésappariement et le réparer en paire C-G non mutagène, ou bien en T-A mutagène. On comprend bien alors pourquoi les sites CpG méthylés sont considérés comme des points chauds de mutations. Si la paire C-G est à nouveau méthylée, la méthylcytosine pourra à nouveau se désaminer. Sur le long terme évolutif, les sites CpG méthylés ont donc tendance à disparaître pour devenir des sites TpG. Ce mécanisme explique le très faible taux actuel du ratio CpG observés / CpG attendus des génomes de mammifères (de l'ordre de 0,2).

Comment alors expliquer la présence d'îlots CpG¹ dans nos génomes ? Trois explications non mutuellement exclusives peuvent être invoquées, ici présentées par ordre d'importance : *i*) ces îlots CpG sont des régions faiblement méthylées, voir entièrement déméthylées, en particulier dans les lignées germinales. Les CpG non méthylés ne sont pas des points chauds de mutations ; leur taux de mutation est similaire au reste du génome. Une fois l'équilibre atteint, les mutations de ces régions ont donc autant de chance de détruire des sites CpG que d'en créer de nouveaux, *ii*) ce sont des régions fortement soumises à la sélection naturelle. En effet plus de la moitié des îlots sont localisés à proximité d'un site d'initiation de la transcription d'un gène. Une mutation de ces régions a des chances non négligeables d'entraîner une baisse de la *fitness*² des individus la portant, de les rendre stériles, ou encore d'être létale. La sélection naturelle pourrait donc en partie compenser le taux supérieur de mutation de ces régions, *iii*) certaines de ces régions peuvent être apparues relativement récemment dans l'histoire de l'évolution, par duplication d'un autre îlot par exemple. Ainsi, certains îlots méthylés dans la lignée germinale ne seraient que

¹ Cf supra p 30.

² Valeur sélective d'un individu, c'est à dire quantification mathématique de son potentiel de survie et de reproduction.

transitoirement présents, en train d'accumuler progressivement des mutations les conduisant tout droit au déclassement par un appauvrissement en CpG.

b) Méthylation de l'ADN et conversion génique biaisée

La conversion génique biaisée (*Biased Gene Conversion*) est un phénomène subtil pouvant biaiser certaines études évolutives en faisant croire faussement qu'il y a sélection naturelle entre deux allèles. La présence d'un tel biais est fortement suspectée dans les génomes de primates [121]. Lors de la méiose, il y a association des deux chromosomes homologues par association locale des brins d'ADN de chacun des chromosomes. En cas de polymorphisme, il pourra y avoir mésappariement lors de cette association. Ce mésappariement peut être pris en charge par la machinerie de réparation. S'il on est dans le cas où l'un des chromosomes est porteur d'un site T-A et l'autre d'un site C-G, il y aura formation d'un mésappariement T-G (et d'un autre C-A, mais il nous intéresse moins ici). Or la machinerie de réparation choisit préférentiellement de réparer les mésappariement T-G en paire C-G (et ce afin de compenser l'hyper-mutabilité des CpG méthylés¹). Les principales enzymes pouvant réparer ces mésappariements sont MBD4² et TDG [122], qu'elles réparent toute les deux en appariement C-G. A terme, l'allèle T-A pourra donc laisser sa place à l'allée C-G, non par sélection naturelle mais par biais de réparation de la machinerie de réparation des mésappariements lors de la recombinaison homologue. Ces biais de mésappariements étant en partie apparus afin de compenser l'hyper-mutabilité des cytosines méthylés des sites CpG, on peut donc dire que la méthylation de l'ADN est indirectement à l'origine d'un phénomène de conversion génique biaisée observé dans le génome des mammifères.

2) Histoire évolutive de la méthylation de l'ADN

L'histoire évolutive de la méthylation de l'ADN est complexe. Chez les procaryotes (Bactéries et Archées), on observe diverses méthylations, dont la 5-méthylCytosine, la 4-méthylCytosine et la 6-méthylAdénosine. Ces méthylations ont divers rôle, dont la lutte contre les éléments transposables et les bactériophages *via* un système d'enzymes de restrictions sensibles à la méthylation, qui digèrent tout ADN contenant un site de restriction non méthylé.

Chez les Eucaryotes, la présence de 5mC dans le génome varie beaucoup d'un taxon à l'autre, d'une espèce à l'autre. Ainsi la méthylation de l'ADN semble largement absente des levures *Schizosaccharomyces pombe* et *Saccharomyces cerevisiae*. De même, les métazoaires *Drosophila melanogaster* et *Caenorhabditis elegans* ont un taux de 5mC dans leur génome extrêmement faible. On retrouve en revanche des taux importants de 5mC chez les plantes, dont *Arabidopsis thaliana* et certains champignons [123] (du genre *Fungi*), ainsi que chez de nombreux vertébrés, mammifères et poissons tel

¹ Cf supra p 24 et p 39.

² Cf infra p 46.

Danio rerio. Une partie des enzymes méthylant l'ADN et protéines de liaisons à l'ADN méthylés sont homologues entre plantes et vertébrés (les protéines des familles *DNMT* et les *MBD*, entre autre), ce qui plaide pour une origine précoce de la méthylation de l'ADN chez les eucaryotes, et de multiples pertes indépendantes dans différents taxons [124].

On peut postuler que la méthylation de l'ADN est d'abord apparue comme un moyen de réprimer la transcription des éléments transposables afin de limiter leur envahissement du génome, puis que la machinerie répressive mise en place a été détournée pour permettre des répressions de gènes spécifiquement dans certains tissus chez les organismes multicellulaires.

III : Les protéines de liaisons à l'ADN méthylé

A) Protéines impliquées

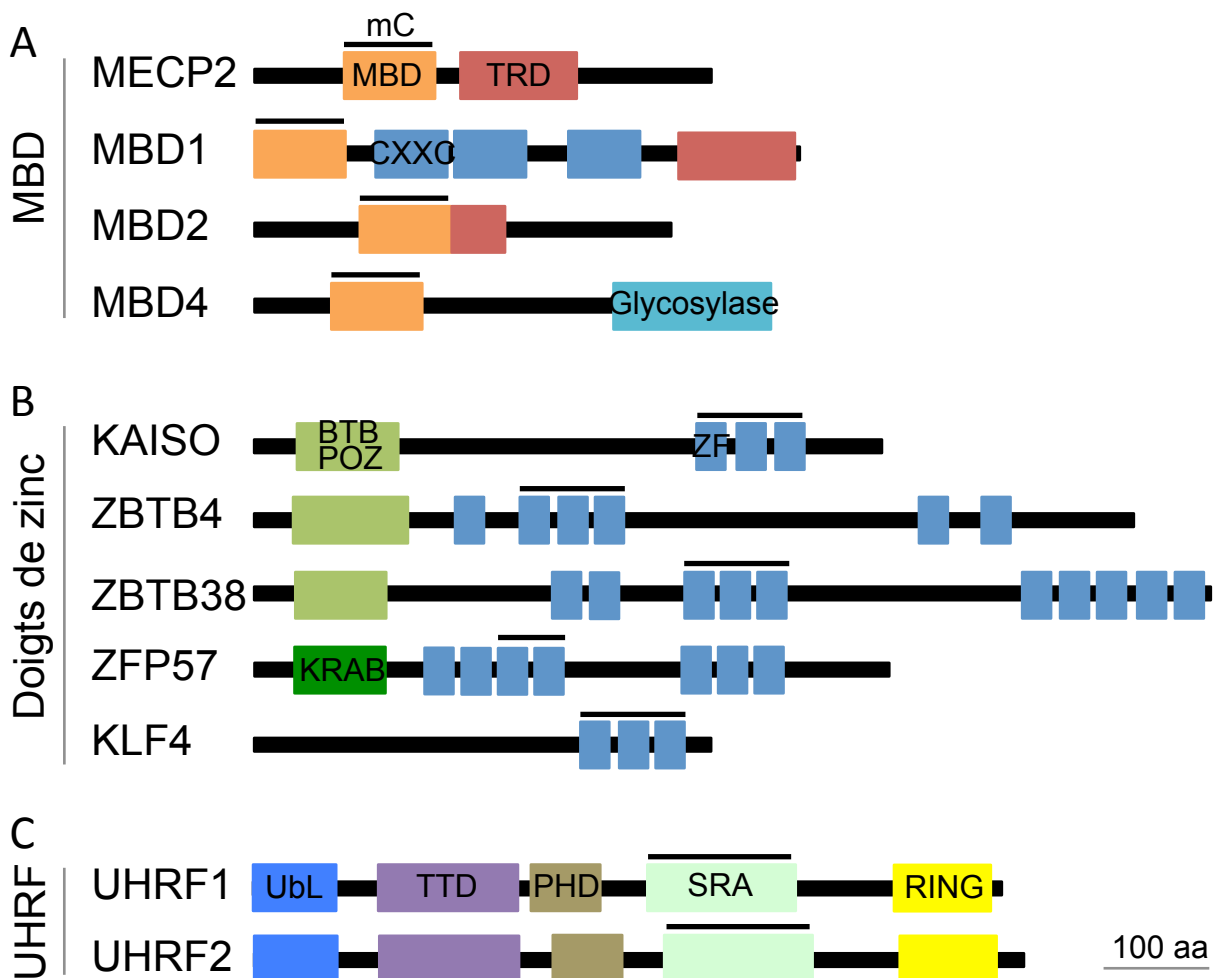


Figure 10 : Les protéines de liaison à l'ADN méthylé.

mC : site d'interaction avec l'ADN méthylé. **A.** Famille MBD. MBD : *Methyl-CpG Binding Domain*. TRD : *Transcription Repression Domain*. CXXC : Domaine à doigts de zinc de type CXXC. **B.** Protéines à doigts de zinc. Les doigts de zinc de KAISO, ZBTB4 et ZBTB38 s'associant à l'ADN méthylé sont homologues entre eux, mais sont différents de ceux de ZFP57 et de KLF4. BTB/POZ : *BR-c, ttk and bab / Pox virus and Zing finger*. ZF : doigt de zinc (*Zinc Finger*). KRAB : *Krüppel-associated box*. **C.** Famille UHRF. UbL : *Ubiquitin-like domain*. TTD : *Tandem Tudor Domain*. PHD : *Plant Homeodomain*. SRA : *SET and RING finger Associated domain*. RING : *Really Interesting New Gene finger domain*. D'après [125]–[127].

La première protéine eucaryote identifiée comme étant capable de se lier à l'ADN méthylé, au moins *in vitro*, fut purifiée à partir d'extraits nucléaires de placentas humains [128]. Elle fut nommée *Methyl DNA Binding Protein*, (MDBP). Il s'avérera par la suite qu'il s'agissait de RFX1 (*Regulatory Factor X 1*) [129]. Il a ensuite été mis en évidence que MDBP/RFX1 se liait avec une plus forte affinité sur des sites non méthylés de l'ADN *in vitro* [130]. Enfin, la fixation *in vivo* de la protéine endogène sur

de l'ADN méthylé n'a jamais été formellement démontrée. Sa capacité à se lier *in vitro* sur de l'ADN méthylé viendrait de la ressemblance entre la thymine et la méthylcytosine. Ainsi, son site de fixation consensuel contient une séquence TpG, et elle possède donc une faible affinité *résiduelle* pour certains sites contenant un CpG méthylé. MDBP/RFX1 n'est plus aujourd'hui considérée comme une protéine de liaison à l'ADN méthylé, mais elle est régulièrement retrouvée fixée sur de l'ADN méthylé dans diverses expériences *in vitro* [131].

Les protéines capables de se fixer sur l'ADN méthylé peuvent être regroupées sous une forme de famille de protéines non homologues : les *methyl DNA binding proteins* ou MBP (protéines de liaisons à l'ADN méthylé). A partir du contre-exemple MDBP/RFX1, on peut tenter de définir cette famille.

Une protéine fait partie des MBP si elle a une plus grande affinité pour une séquence méthylée que pour toutes autres séquences non méthylées. Ceci est mesurable par exemple par des expériences de retard sur gel en présence de deux sondes en compétitions. Le répertoire des séquences non méthylées étant cependant quasi-infini, on ne peut bien sûr pas le tester entièrement expérimentalement. Les protéines décrites comme MBP par cette technique le sont donc jusqu'à preuve du contraire.

Toute protéine qui remplit cette première définition et dont la fixation sur de l'ADN méthylé peut être démontrée *in vivo* au niveau endogène peut être considérée comme une MBP *bona fide*. Cela peut être fait expérimentalement par des techniques de ChIP (*Chromatin immunoprecipitation*, immunoprécipitation de chromatine) associées à des mesures de détections de la méthylation de l'ADN.

Enfin, il s'agit de définir l'aspect principal ou secondaire de l'activité de liaison à l'ADN méthylé dans la fonction de la protéine. Cela passe par exemple par une quantification du nombre de site de fixations dépendant de la méthylation par rapport à des sites de fixations indépendant de la méthylation, pouvant se faire par ChIP-seq (ChIP suivi de séquençage parallèle des fragments d'ADN immunoprécipités). Ainsi l'importance, sinon l'existence, d'une activité MBP de KAISO est aujourd'hui remise en question [132] ; sa place dans la famille des MBP est donc actuellement reconsidérée. De même, si les DNMT possèdent bien une capacité de MBP¹, cette dernière n'est que secondaire par rapport à leur fonction enzymatique. Elles sont communément exclues de la famille des MBP.

A ce jour sont communément admises comme MBP des protéines issues de trois familles homologues : la famille MBD (possédant un domaine MBD pour *MethylDNA Binding Domain*, domaine de liaison à l'ADN méthylé), la famille UHRF (*Ubiquitin-like with PHD and ring finger domains*), et des protéines à domaine doigts de zinc [125]. D'autres protéines sont régulièrement identifiées comme capable de fixer l'ADN méthylé, leur appartenance à la famille MBP demande à être confirmée.

¹ Cf supra p 26.

1) La famille MBD

Adrian Bird et ses collègues ont identifié deux complexes protéiques capables de se fixer spécifiquement sur de l'ADN méthylé : les complexes MeCP1 [133] et MeCP2 [134] (*methyl CpG binding proteins*). La protéine responsable de la fixation du complexe MeCP2 sur l'ADN méthylé fut identifiée en premier et nommée du nom du complexe : MECP2. Un domaine protéique de cette protéine fut identifié comme ayant une forte affinité pour l'ADN méthylé : le domaine MBD (*methyl DNA binding domain*), d'une centaine d'acides aminés [135] et dont la structure tertiaire est maintenant bien caractérisée (Figure 11) [136]. Il interagit avec le grand sillon de la double hélice d'ADN. Par homologie de séquence avec ce domaine MBD, d'autres protéines de cette famille furent identifiées : MBD1, MBD2, MBD3 et MBD4 [137], puis MBD5 et MBD6 [138]. Il se trouvera que MBD2 est en fait la protéine responsable de la fixation du complexe MeCP1 sur l'ADN méthylé [139], [140], elle aurait donc pu s'appeler MECP1.

Les domaines MBD de MECP2, MBD1 et MBD2 ont une forte affinité pour l'ADN méthylé *in vitro* [137]. Ils sont utilisés dans différents protocoles de précipitation d'ADN précipités (MeDP, *Methyl DNA Precipitation*) avec une efficacité au moins égale aux anticorps utilisés pour réaliser des immunoprécipitations d'ADN méthylé (MeDIP, *Methyl DNA Immuno Precipitation*) [141].

a) MECP2

Le gène *MECP2* est situé chez l'Homme sur le chromosome X (Xq28). Il est exprimé de façon ubiquitaire, comme la plupart des MBP, mais son niveau d'expression varie beaucoup d'un tissu à l'autre [142]. *MECP2* est ainsi fortement exprimé dans les neurones, à des taux proches des protéines histones. Deux transcrits alternatifs ont été identifiés pour *MECP2*, *MECP2A* étant le plus long, *MECP2B* n'intégrant pas le petit exon 2. Les protéines MECP2A et MECP2B diffèrent donc essentiellement à leur extrémité N terminale, sans qu'un rôle spécifique de l'une des deux isoformes n'ait pu être identifié à ce jour.

La protéine MECP2 contient deux principaux domaines protéiques : un domaine MBD responsable de sa fixation à l'ADN méthylé, et un domaine TRD (*Trans Repressive Domain*). Ce domaine TRD permet le recrutement de complexes répresseurs, pour MECP2 essentiellement SIN3A [143]. Ce complexe contient entre autre des enzymes modifiant les queues d'histones, HDAC et HMT. MECP2 fait donc le lien entre méthylation de l'ADN et désacétylation et méthylation des queues d'histones, tout comme d'autres MBP répressives.

MECP2 est connu pour son implication dans le syndrome de Rett, syndrome de retard mental féminin. Son origine est en effet imputée à des mutations du gène *MECP2* [144]. Des souris femelles *Mecp2*^{-/-} développent un phénotype pouvant être l'équivalent murin de ce syndrome [145]. MECP2 serait indispensable au bon développement embryonnaire chez l'homme. En effet, les embryons X^{MECP2 muté} / Y

seraient non viables [144]. Des duplications de *MECP2* sont aussi la cause de troubles neuronaux observés chez certains patients, hommes ou femmes. Le syndrome en question est nommé *Syndrome de la duplication du gène MECP2* (ou *MECP2 duplication syndrome*) [146], [147].

In vitro, MECP2 présente une affinité préférentielle pour les sites CpG flanqués d'adénines ou de thymines [148], ce qui pourrait expliquer une partie des spécificités de liaisons à l'ADN méthylés observées *in vivo*. Dans les neurones, son abondance serait telle qu'elle perdrait sa spécificité de liaison. Ainsi sa fixation sur le génome des neurones est principalement corrélée à la densité locale en sites CpG [142]. MECP2 est capable d'interagir directement avec les nucléosomes, en particulier lorsqu'ils sont méthylés au niveau H3K9 [149], et est capable d'induire directement une compaction de la chromatine [150]. Ainsi elle pourrait jouer un rôle similaire à la protéine HP1 dans certains types cellulaires, dont les neurones. MECP2 semble en particulier fortement impliqué dans le développement des neurones GABAergique et glutamatergiques [151].

MECP2 est entre autre capable d'interagir directement avec MBD2 [152] et la protéine Hungtintine [153], et est capable de se dimériser [152].

b) MBD1

MBD1 est chez l'homme situé sur le chromosome 18 (18q21). Au moins 14 isoformes de son ARN messager ont été identifiées à ce jour ; il existe donc de nombreux variants de la protéine MBD1, encore mal caractérisés, et mesurant entre 50 et 70 kDa.

En plus du domaine MBD, MBD1 possède un domaine TRD capable de recruter des complexes répresseurs SUV39H1 [154] et SETDB1 [155]. Elle possède aussi trois domaines à doigts de zinc de type CXXC. Ces domaines permettraient à MBD1 de se lier sur l'ADN de façon indépendante de la méthylation, sur des séquences CpG non méthylés [156]. Le domaine MBD de MBD1 semble lier préférentiellement les sites TmeCGCA ou TGmeCGCA, mais cette préférence de séquence est faible [157].

Les souris invalidés pour MBD1 sont viables et fertiles, mais présentent des problèmes de différenciations neuronales, un comportement proche de l'autisme [158], ainsi qu'une instabilité génomique liée à la réexpression de rétrovirus endogènes murins, les IAP (*intracisternal A particle*) [159].

c) MBD2

MBD2 humain est autosomique (18q21), proche de *MBD1*. Il possède un domaine MBD à forte affinité pour les sites CpG méthylés, mais à faible spécificité de séquences adjacentes [160]. On retrouve dans la partie N-terminale de MBD2 des domaines de type *GR repeats*.

Le gène MBD2 humain code pour au moins quatre isoformes distinctes. MBD2a, la plus longue (414 acides aminés) se distinguerait de MBD2b en ayant potentiellement une activité activatrice de la transcription [161]. MBD2c serait un troisième variant spécifique des cellules souches et participerait à leur maintien à l'état pluripotent [162]. Enfin, un quatrième variant est spécifique des testicules ; sa fonction est mal caractérisée.

La cristallisation du domaine MBD de MBD2 de poulet avec un fragment d'ADN méthylé montrerait une préférence pour les sites mCpGpG (et leurs complémentaires CpmCpG) [163].

MBD2 possède un TRD capable de recruter les complexes NuRD [164], [165] et SIN3A [166]. Elle est donc capable de recruter des complexes répresseurs de la transcription sur l'ADN méthylé.

Chez la souris, le KO *mbd2* donne des animaux viables et fertiles [167]. Les souris présentent cependant des anomalies de comportement (disparition de l'instinct maternel) et un certain nombre d'expressions aberrantes de gènes, notamment dans les lymphocytes T [168], [169]. Un croisement de ces souris avec un modèle de prédisposition aux tumeurs intestinales *APC^{Min/+}* a montré que les souris *Apc^{Min/+} Mbd2^{-/-}* étaient moins susceptibles de développer des tumeurs que les souris *Apc^{Min/+} Mbd2^{+/+}* [170]. Ceci suggère un rôle pour MBD2 dans l'échappement tumoral : MBD2 assurerait la répression transcriptionnelle de gènes suppresseurs de tumeurs hyperméthylés lors de la transformation. C'est en particulier le cas du gène *Lect2*, de la signalisation Wnt [171]. Une invalidation de MBD2 par ARN interférence est capable de réduire la tumorigénicité de lignées tumorales mammaires humaines, en partie *via* une réexpression du gène pro-apoptotique DAPK1 [172].

MBD2 intervient dans la différenciation cellulaire, en réprimant l'expression de gènes de manière tissus-spécifique. Par exemple, le gène *TFF2* est méthylé dans le colon et le duodénum, mais n'est réprimé que dans le colon, par MBD2 [173]. MBD2 participe à la répression transcriptionnelle de la globine embryonnaire *ε-globin* [174]. MBD2 contrôle aussi la différenciation des lymphocytes TH17 en réprimant dans ces cellules *Tbx21* et *Hlx* [175]. Les souris *Mbd2^{-/-}* sont d'ailleurs résistantes au modèle de maladie auto-immune *encéphalomyélite auto-immune expérimentale* [175].

Il a été suggéré que MBD2 jouerait un rôle dans la déméthylation active de l'ADN, voir qu'elle posséderait une activité déméthylase, mais ces fonctions sont controversées et demandent confirmations.

Le laboratoire a publié précédemment une étude de la distribution de MBD2 endogène sur les promoteurs des gènes des cellules HeLa par *ChIP on chip*, démontrant que MBD2 est globalement associé au promoteurs de gènes méthylés et non liés par l'ARN polymérase 2 [176]. Des ChIPseq dirigés contre des protéines MBD2 tagguées ont confirmé ce résultat [160], [177], [178].

d) MBD4

MBD4 (3q21.3 chez l'Homme) est capable de se lier à l'ADN méthylé *via* son domaine MBD. Il pourrait jouer un rôle de répresseur transcriptionnel dépendant de la méthylation, notamment des gènes codant pour les protéines p16 [179] et p21 [180] *via* SIN3A. Sa fonction la mieux caractérisée est toutefois son activité enzymatique Thymine-DNA Glycosylase, impliquée dans la réparation des mésappariements T-G en paires mendéliennes C-G [181]. Ces mésappariements T-G sont fréquemment le résultat d'une déamination spontanée des cytosines méthylées¹.

Les souris ko pour *Mbd4* sont viables et fertiles, mais présentent un taux de transition des cytosines vers les thymines anormalement élevées, en particulier au niveau des sites CpG [182]. Elles sont aussi plus susceptibles de développer des tumeurs dans un contexte *APC^{Min/+}*, sans doute du fait de leur hypermutabilité. MBD4 serait capable de recruter FADD sur les sites de réparation de l'ADN, et éventuellement d'activer l'apoptose en cas d'accumulation de dommages non réparés [183].

e) MBD3

MBD3 possède un domaine homologue au MBD de MECP2, MBD1 et MBD2, mais ce dernier n'est pas capable de lier l'ADN méthylé [184]. Ainsi, si MBD3 appartient à la famille homologue MBD, elle n'appartient pas à la famille fonctionnelle des MBP.

MBD3 est situé chez l'Homme sur le chromosome 19 (19p13.3). Il interagit avec - ou fait partie du - complexe répresseur NuRD [185]. Des données contradictoires existent concernant son interaction avec MBD2 (MBD2 interagit elle aussi avec NuRD). Le Guezennec *et al.* [186] présentent que MBD2 et MBD3 sont mutuellement exclusifs au sein du complexe NuRD, d'autres articles supportent le fait que MBD2 et MBD3 puissent faire partie des mêmes complexes protéiques [160], [167]. Le KO *mbd3* chez la souris entraîne une mort embryonnaire précoce [167], qui serait associée à son rôle dans le complexe NuRD. Ce dernier est en effet essentiel au bon développement embryonnaire, en assurant la correcte répression de gènes dans différents lignages. La déplétion MBD3 serait capable de grandement augmenter l'efficacité de l'induction à un retour à l'état pluripotent (iPS – *Induced Pluripotent Stem cells*) par les facteurs OSKM [187], sa surexpression aussi [188].

Un article a proposé que MBD3 serait capable de se fixer spécifiquement sur la 5-hydroxyméthylCytosine [189], mais cela ne semble pas avoir été confirmé par d'autres études [177], [190], [191].

f) MBD5, MBD6 et autres protéines à domaine MBD

D'autres protéines possèdent un domaine MBD mais ne semblent pas capables de lier l'ADN méthylé. C'est le cas de MBD5 et MBD6 [138], deux protéines capables de recruter le complexe

¹ Cf supra p 24.

Polycomb PR-DUB sur certaines régions de l'ADN [192]. MBD5 serait le gène responsable du syndrome rare de la micro-délétion 2q23.1 [193].

On retrouve un domaine MBD chez les protéines SETDB1 et SETDB2, des histones méthyltransférases, et chez BAZ2A et BAZ2B, des protéines présentement dans des complexes de remodelage de la chromatine [194].

MBD3L1, *MBD3L2*, *MBD2L3L* (*LOC729458*), *MBD3L3*, *MBD3L4* et *MBD3L5* sont des gènes ou pseudogènes présentant des homologues avec *MBD3* (et *MBD2*), mais ne possèdent pas le domaine MBD [195]. *MBD3L1* et *MBD3L2* interagissent avec le complexe NuRD [196], [197].

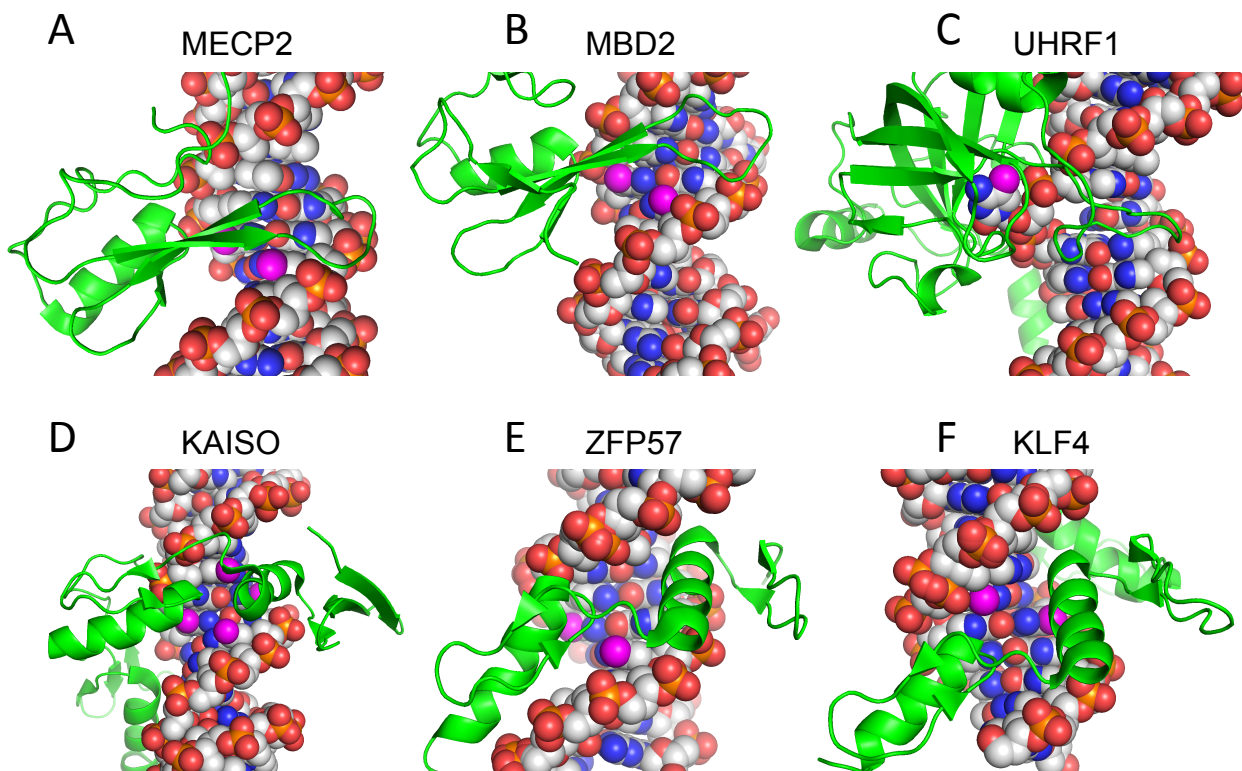


Figure 11 : Domaines de liaisons à l'ADN méthylé.

Vert : Domaines protéiques de liaison à l'ADN méthylé mettant en évidence les hélices alpha et feuillets bêta. La double hélice d'ADN est représentée sous forme de boules de couleurs. Rose: groupe méthyl des 5-méthylcytosines. Blanc : autres carbones. Bleu : azotes. Rouge : oxygènes. Orange : phosphores. **A.** domaine MBD de MECP2 (PDB 3C2I). **B.** Domaine MBD de MBD2 (PDB 2KY8). L'interaction du domaine MBD de MBD2 avec l'ADN méthylé est grossièrement similaire à celle de MECP2. **C.** Domaine SRA de UHRF1 (PDB 3F8I). Le domaine SRA sort la cytosine méthylée de la double hélice. **D-F.** Domaines à doigt de zinc de KAISO (**D**, PDB 4F6N), ZFP57 (**E**, PDB 4M9E) et KLF4 (**F**, PDB 4GZN) en contact avec de l'ADN méthylé. La position des deux hélices vis-à-vis des cytosines méthylées diffère d'une protéine à l'autre.

2) Les MBP à doigts de zinc

a) KAISO – ZBTB33

KAISO (Xq23) fut d'abord identifié comme étant un transducteur de la voie β -caténine *via* son interaction à la p120-caténine. L'interaction avec la p120-caténine empêche KAISO de se fixer sur ses

cibles dans le noyau [198]–[200]. *In vitro*, cette protéine est capable de se fixer à l'ADN de façon bimodale : elle peut se fixer d'une part sur les sites non méthylés CTGCNA [198]; et d'autre part sur les sites bi-méthylés ^mCG^mCG [201]. La structure de ses doigts de zinc interagissant avec de l'ADN méthylé ou non a été obtenue par résonance magnétique nucléaire (RMN) [202].

KAISO contient trois domaines à doigts de zinc responsables de son interaction avec l'ADN, ainsi qu'un domaine POZ/BTB. Elle fait partie de la grande famille de facteur de transcription ZBTB, son nom officiel chez l'Homme est d'ailleurs *ZBTB33*. Par homologie de séquence de ses domaines à doigts de zinc, G Fillion *et al.* [203] ont identifié deux autres protéines de cette famille capables de se fixer à l'ADN méthylé : ZBTB4 et ZBTB38.

KAISO est capable de recruter le complexe répresseur N-CoR [204], et peut donc jouer un rôle de répresseur transcriptionnel. Il réprimerait de nombreuses cibles de la voie Wnt [199]. Les souris KO pour *Kaiso* sont viables et fertiles [205]. Elles présentent une hypertrophie de la rate, probablement due à une surexpression de *Bcl6* [206]. Tout comme les souris *mbd2* KO, elles présentent une résistance à la formation de tumeur dans le modèle de prédisposition génétique *APC^{Min/+}* [205]. En revanche, *xKaiso* semble essentiel au bon développement du Xénope : sa délétion entraîne une réexpression précoce de nombreux gènes, ce qui induit un arrêt du développement dès le stade *blastula* [207].

Une étude [131] suggère qu'*in vitro*, Kaiso serait capable d'interagir à la fois avec la méthylcytosine et l'hydroxyméthylcytosine.

Récemment, une analyse par ChIP-seq des sites de fixation réalisée par ENCODE et analysés par A. Blatter *et al.* [132] n'a révélé aucune association préférentielle de KAISO sur de l'ADN méthylé *in vivo* dans des cellules humaines. Cette étude lève donc un doute sur la réalité d'une fonction MBP de KAISO *in vivo* chez l'Homme, et par extension remet aussi en cause les fonctions MBP de ZBTB4 et ZBTB38. D'autres études sont donc nécessaires pour conclure, en particulier en variant l'anticorps utilisé pour ce ChIPseq.

b) ZBTB4

Le facteur de transcription ZBTB4 (17p13.1) est lui aussi capable de se lier à l'ADN de façon bimodale *via* ses domaines à doigts de zinc : d'une part sur des sites non méthylés C(C/T)GCCATC, d'autre part sur des sites méthylés (C/A)^mCGC(C/T)AT [130]. Il est capable d'interagir avec ZBTB38 [203] et de recruter le complexe répresseur SIN3A [208].

De même que pour KAISO, ZBTB4 [131] semble capable d'interagir à la fois avec la méthylcytosine et l'hydroxyméthylcytosine *in vitro*.

Les rôles de cette protéine décrits à ce jour sont largement indépendants de son activité de liaison à l'ADN méthylé. Il est capable de se fixer sur le promoteur de p21 (*CDKN1A*) de façon indépendante de la

méthylation de l'ADN, et de réprimer sa transcription [208]. ZBTB4 entrerait aussi en compétition avec les protéines Sp pour la fixation sur leurs sites de liaisons [209]. ZBTB4 voit son expression fréquemment diminuer dans les cancers mammaires, en partie *via* l'activation des microARN miR17-92 [209]. Il aurait un rôle suppresseur de tumeur.

c) ZBTB38

Le facteur de transcription ZBTB38 (3q23), aussi nommé Cibz chez la souris, se fixe *in vitro* sur les sites d'ADN méthylés (C/A)^mCGC(C/T)AT [130]. Des SNP (*Single Nucleotide Variations*) de ZBTB38 ont été impliqués dans la régulation de la taille humaine [210] et bovine [211], mais le mécanisme sous-jacent à cette association n'a pas encore été élucidé.

ZBTB38 est capable de recruter le complexe répresseur CtBP/HDAC [212]. Il interviendrait dans la régulation de la réplication de l'ADN et dans la stabilité des sites fragiles [213]. Il réprime de façon dépendante de la méthylation la myogénine [214].

d) ZFP57

ZFP57 est une autre protéine à doigts de zinc qui est capable de se fixer sur de l'ADN méthylé [215]. Elle reconnaît en particulier les sites TGC^mCGC [216]. Les oocytes des souris *Zfp57*^{-/-} n'arrivent pas à établir l'empreinte parentale maternelle, et les zygotes *Zfp57*^{-/-} n'arrivent pas à maintenir l'empreinte paternelle et maternelle [217]. ZFP57 permet en effet le maintien de l'empreinte parentale *via* le recrutement de DNMT1 sur certaines régions méthylées via le complexe KAP1/TRIM28/TIF1β [218]. Des mutations de ZFP57 seraient impliquées dans certains diabètes néonataux [219], probablement en lien avec les gènes soumis à l'empreinte *IGF2* et *IGF2R*¹.

e) KLF4

Une étude de Hu *et al.* [220] de *screening* à grande échelle d'interaction entre facteurs de transcription et sondes d'ADN méthylés a permis d'identifier 41 facteurs capables de se fixer *in vitro* à l'ADN méthylé, le plus souvent de façon spécifique des séquences adjacentes aux CpG méthylés. Parmi ces 41 candidats², les auteurs se sont concentrés sur KLF4, le facteur de transcription célèbre pour son appartenance au groupe des quatre facteurs capables d'induire un retour à l'état pluripotent « OSKM » [221]. Ils ont validé *in vivo* par ChIPseq sur la protéine endogène que près de 25% des sites de fixations de KLF4 dans les cellules humaines H1 étaient méthylés. KLF4 se fixerait sur l'ADN méthylé *via* l'un de ces deux domaines à doigts de zinc de type C2H2. KLF4 est donc bien selon cet article une MBP.

¹ Cf supra p 20.

² Cf infra p 52.

Cette fixation de KLF4 sur l'ADN méthylé a été découverte simultanément dans une autre étude chez la souris [131]. Dans cette dernière, les auteurs ont identifié par spectrométrie de masse les protéines interagissant avec les cytosines nues, les 5-méthylcytosines, les 5-hydroxyméthylcytosine, les 5-formylcytosines et les 5-carboxyméthylcytosine à partir d'extraits de cellules souches embryonnaires (ES), de précurseurs neuronaux, et de cerveaux. Parmi les nombreuses protéines¹ capables de se lier à l'ADN méthylé, les auteurs ont identifiés Klf2, Klf4 et Klf5. Enfin, un troisième article [127] présente une mesure de son affinité pour les sites méthylés, qui est légèrement supérieure à celle pour ses sites non méthylés, et a réussi à obtenir la structure de ses doigts de zinc en interaction avec de l'ADN méthylé par cristallographie au rayons X.

3) La famille UHRF

a) UHRF1

UHRF1 (ou ICBP90 ou Np95) (19p13.3) reconnaît l'ADN méthylé via son domaine SRA. Comme le domaine DNMT, ce domaine « sort » la cytosine méthylée de la double hélice (*flip out*, Figure 11) [222]. Contrairement aux DNMT qui « sortent » la cytosine non méthylée, UHRF1 « sort » la cytosine méthylée. *In vitro* UHRF1 a une plus grande affinité pour les sites CpG hémi-méthylés que pour les sites CpG bi-méthylés [70]. Elle est de plus capable d'interagir avec DNMT1 [70], [223]. Cette protéine jouerait donc un rôle dans la maintenance de la méthylation de l'ADN lors de la réplication en recrutant DNMT1 sur les sites hémi-méthylés. Ce rôle de UHRF1 dans la maintenance de la méthylation de l'ADN expliquerait la létalité embryonnaire précoce observée chez les souris *Uhrf1*^{-/-} [223]. Les cellules ES *Uhrf1*^{-/-} présentent un taux de méthylation de l'ADN fortement diminué, et présentent une réexpression de gènes et d'éléments répétés normalement réprimés par la méthylation de l'ADN.

UHRF1 semble aussi capable de réprimer la transcription de gènes, dont Rb [224], *p16INK4A* et *p14ARF* [225], p21 [226] et *BRCA1* [227]. Cette répression passerait par le recrutement de l'histone méthyltransférase G9a et de l'histone désacétylase HDAC1. Il est cependant difficile de distinguer le rôle répresseur direct du rôle de maintenance de la méthylation du promoteur de ces gènes, un défaut de maintenance de la méthylation pouvant conduire à leur réexpression.

Les domaines PHD et TTD d'UHRF1 seraient capables d'interagir avec les lysines 9 des histones 3 lorsqu'elles sont tri-méthylées [228], [229]. UHRF1 est donc susceptible d'être recrutée sur des zones d'hétérochromatines par cette marque, ce qui pourrait induire leur méthylation *de novo*. En effet, UHRF1 est aussi capable d'interagir avec DNMT3A / DNMT3B [230].

b) UHRF2

¹ Cf infra p 52.

La protéine UHRF2 (9p24.1) ne présenterait une affinité pour la méthylation de l'ADN que lorsque qu'elle est aussi liée à la marque K3K9me3 par son domaine TTD [231]. Son expression augmente au cours de la différenciation cellulaire [231]. Contrairement à UHRF1, UHRF2 ne semble pas impliquée dans la maintenance de la méthylation au cours de la réplication [232]. En revanche, le domaine SRA de UHRF2 aurait une affinité préférentielle pour la 5-hydroxyméthylCytosine [131], [233]. Sa fonction *in vivo* pourrait donc ne pas dépendre de la méthylation de l'ADN mais plutôt de l'hydroxyméthylation de l'ADN, et le statut de MBP de UHRF2 reste à confirmer. UHRF2 est recrutée sur les sites de réparation de l'ADN dans les cellules musculaires lisses squelettiques, et participerait au recrutement et/ou à la phosphorylation du variant d'histone H2AX [234], elle est capable d'interagir avec la protéine MPG de la voie de réparation BER (tout comme UHRF1) [235]. Tout comme UHRF1, UHRF2 possède une activité ubiquitine ligase de type E3, capable notamment d'ubiquitiner p53 [236]. Elle pourrait aussi jouer un rôle dans la régulation du cycle cellulaire [237].

4) Et d'autres protéines

D'autres protéines de notre génome sont certainement capables de fixer l'ADN méthylé *in vivo*. La famille des MBP grandit et grandira probablement au fil des années : d'ores et déjà de nombreux candidats poussent à la porte.

Le séquençage complet du génome humain et des analyses par homologie de séquence font qu'il est peu probable que les familles homologues MBD et UHRF s'agrandissent. Des pseudogènes homologues à ces familles ont été identifiés, par exemple LOC728688/UHRF3 [238]. Le nombre de protéines MBD et UHRF possédant une activité MBP et donc probablement déjà fixé, même si l'importance de cette activité MBP dans le rôle de ces protéines peut être remis en cause.

En revanche, les facteurs de transcriptions à doigts de zinc en général, et les protéines ZBTB en particulier fournissent un répertoire protéique conséquent dont nous sommes loin d'avoir découvert tous les sites de fixation possible. Le mécanisme de liaison des doigts de zinc de KAISO avec l'ADN méthylé étant relativement « banal », il est probable que d'autres protéines à doigts de zinc se révèlent capables d'interagir spécifiquement *in vivo* avec l'ADN méthylé [125]. De même, la découverte d'un nouveau domaine d'interaction à l'ADN méthylé n'est pas à exclure.

Deux expériences récentes visant à identifier des protéines liant l'ADN méthylé par des approches *in vitro* ont retenu mon attention. Dans les candidats identifiés de la première [220], on trouve les protéines à doigts de zinc DIDO1, GATA3, GATA4, PPARG, RNF138, RXRA, SCAPER, ZCCHC7, ZNF114, ZNF416, ZNF461 et ZNF695, la protéine à *homeobox* HOXA5, et la protéine E2F3. L'interaction de certains de ces facteurs avec l'ADN méthylé a été vérifiée *in vivo* en surexpression. La réalité physiologique de ces interactions et l'identification de leurs fonctions éventuelles demandent cependant de nouvelles études. Une expérience préliminaire de cet article montre que HOXA5 et DIDO1 sont capables d'induire la transcription de gènes rapporteurs inclus dans des plasmides méthylés. Ils

agiraient donc comme activateurs de la transcription autour de ces sites méthylés. Dans les très nombreux candidats de la deuxième étude [131], réalisée chez la souris, on retrouve les protéines à doigts de zinc Gata2a, Gata2b, Zbtb40, Zbtb44 Zfp295, Zfp597 et Zfp710, les protéines à domaine *homeobox* Hox1.3, Hox2.4, Hoxb9, Nkx2.2, Pbx3, Zfh4, Zfh5 et les protéines à domaine WH (*winged-helix*) Kansl1, Rfxank, Rfxap, Rfx3, Rfx4, Rfx5. De même, la réalité physiologique de ces interactions demande à être confirmée. Notons que cette étude a identifié de nombreux facteurs interagissant spécifiquement avec la 5-hydroxyméthylcytosine, et un nombre plus restreint de facteurs capables d'interagir avec plusieurs état de modification des cytosine dans un même contexte, soit C et mC, soit C et hmC, soit mC et hmC.

RBPJ, un facteur de transcription de la voie *notch*, est capable de se fixer *in vitro* sur de l'ADN méthylé, d'une façon séquence spécifique [239]. La présence de RBPJ *in vivo* sur un site méthylé n'a cependant pas encore été mise en évidence à notre connaissance.

B) Redondances et spécificités des MBP

MBP répressive	Séquence préférentielle de fixation <i>in vitro</i>	Répresseurs recrutés
MECP2	^m CGN _{n1} (A/T) _{n2} (n1>=2, n2>=4)	SIN3A
MBD1	T ^m CGCA, TG ^m GCA	SUV39H1, SETDB1
MBD2	^m CGG	NuRD, SIN3A
MBD4	mésappariement TG - G ^m C	SIN3A
KAISO	^m CG ^m CG, CTGCNA	N-CoR
ZBTB4	(C/A) ^m CGC(C/T)AT, C(C/T)GCCATC	SIN3A
ZBTB38	(C/A) ^m CGC(C/T)AT, ?	CtBP/HDAC
ZFP57	TGC ^m CGC	DNMT1/KAP1
UHRF1	sites hémi-méthylés ^m CG - GC	DNMT1, G9a

Tableau 4 : Sites préférentiels de fixations des MBP répressives et répresseurs transcriptionnels recrutés.

mC : 5-méthylCytosine. N : A, T, C ou G. Références citées dans le texte ci-dessus, II-A p 44.

1) Spécificités des MBP répressives

De nombreuses MBP sont capables d'assurer le lien entre méthylation de l'ADN et répression transcriptionnelle : MECP2, MBD1, MBD2, MBD4, KAISO, ZBTB4, ZBTB38, ZFP57, et UHRF1¹. On peut regrouper ces protéines sous le terme de « MBP répressives ». Une grande partie de ces protéines est exprimée de façon ubiquitaire, même si leurs niveaux d'expressions peuvent varier d'un tissu à l'autre. Quelle est donc la part de redondance et de spécificité de ces protéines ?

¹ Cf supra p 42.

Si toutes ces MBP sont par définitions capables de lier spécifiquement l'ADN méthylé, elles n'en ont pas moins de fonctions différentes, voir spécifiques. Ainsi, chez la souris sont observés des phénotypes spécifiques des MBP invalidées, ce qui démontre que les MBP ne sont pas totalement interchangeables. MBD4 est par exemple la seule MBP impliquée dans la réparation de l'ADN (plus précisément dans la réparation des mésappariements T-G). UHRF1 est la seule à avoir été fortement impliquée dans la maintenance de l'ADN méthylé lors de la réplication (et dans une moindre mesure, ZFP57 au niveau des sites à empreinte parentale). Certaines MBP possèdent des fonctions indépendantes de leurs liaisons à l'ADN méthylés. Ces fonctions peuvent leur être spécifiques.

Mais des différences significatives existent au cœur même de l'activité de recrutement de complexes répresseurs sur des régions méthylées du génome, que l'on peut résumer ainsi : les MBP répressives ne se lient pas toutes aux mêmes endroits, et ne recrutent pas toutes les mêmes complexes répresseurs. *In vitro*, les MBP répressives s'associent à l'ADN méthylé de façon plus ou moins dépendante du contexte dans lequel le site CpG méthylé est placé (Tableau 4). Certaines présentent des spécificités pour des séquences plutôt longues (ZBTB4, ZBTB38), d'autres pour des séquences plus courtes (KAISO, MECP2, MBD1), d'autres enfin ne présentent que peu de spécificités *in vitro* (MBD2). Même si ces spécificités de liaisons demandent à être confirmées *in vivo* (elles n'ont en tout cas pas été retrouvées par ChIPseq sur les protéines taguées MECP2, MBD1, MBD2 et MBD4 [177]), elles laissent à penser que les sites de fixations des MBP répressives ne sont pas strictement chevauchants. Le laboratoire a par exemple observé qu'un locus du promoteur *BRAC1/NBR2* dans les cellules HeLa est lié par MBD2, mais pas par MECP2 ou MBD1, et ce même après déplétion de MBD2 par siRNA [240]. MBD2 est parfois spécifiquement recrutée sur des zones d'ADN pas ou peu méthylé via son interaction avec MBD3 et d'autres membres du complexe NuRD [160], [177]. Le niveau d'expression des MBP varie d'un tissu à l'autre, ce qui peut influencer sur le nombre et la spécificité de leurs sites de fixations. Ainsi MECP2 est bien plus fortement exprimé dans certains neurones, où elle lie plus de sites méthylés avec une spécificité de séquences réduite [142]. Seule MBD2 a été impliquée dans la répression de *Xist* sur le chromosome X actif des cellules femelles [103], tandis que MBD1 participe à l'inactivation du chromosome X inactivé [241]. MECP2 participerait à l'inactivation de *Tsix* sur le chromosome X inactivé [242].

Les MBP répressives ne recrutent pas non plus les mêmes complexes répresseurs (Tableau 4). Elles peuvent donc avoir des propriétés répressives différentes dépendant du complexe recruté (modifications de queues d'histones spécifiques, force et étendue de la répression variable, etc.).

Ces indices suggèrent donc que les MBP répressives ont bien des fonctions spécifiques, et ce même dans la répression transcriptionnelle liée à la méthylation de l'ADN. Ceci est corroboré par leurs implications différentielles dans diverses maladies. Seule MECP2 a été impliquée dans le syndrome de Rett¹. Dans le cancer du sein, tandis que ZBTB4 est assez largement sous-exprimée [209], MBD2 est surexprimée dans une partie des tumeurs [243]. De même, MBD2 seule semble être impliquée dans la

¹ Cf supra p 44.

physiologie des cellules T régulatrices, et jouerait potentiellement un rôle dans l'établissement des maladies auto-immunes¹.

2) Redondances possibles au sein des MBP répressives

Si l'existence de fonctions spécifiques à chacune des MBP semble indéniable, plusieurs arguments plaident en faveur d'un certain degré de redondance entre les MBP répressives.

Tout d'abord, les KO (*knock out*) des MBP répressives MECP2, MBD1, MBD2 et KAISO sont viables et fertiles, et ne présentent que des phénotypes modérés. En revanche, les KO DNMT1 et DNMT3 sont létaux à l'état embryonnaire, en lien avec les rôles essentiels assurés par la méthylation de l'ADN lors du développement embryonnaire. On s'attendrait à ce que les KO des interprètes principaux de la méthylation de l'ADN aient un phénotype comparable sinon similaire à celui des enzymes établissant cette marque épigénétique. Or ce n'est pas le cas, ce qui laisse à penser qu'en absence d'une MBP répressive, d'autres prennent le relai. Pour essayer de démontrer cette redondance, des doubles KO *Mecp2/Kaiso* et triples KO *Mecp2/Mbd2/Kaiso* ont été générés, donnant naissance à des individus viables et fertiles et dont les phénotypes peuvent se résumer à la simple addition des phénotypes des KO simples [244]. On peut émettre quatre hypothèses expliquant cette dissemblance entre phénotypes des KO *Dnmt* et des KO de MBP répressives : *i*) les combinaisons testées en KO jusqu'à présent ne sont pas les « bonnes ». On peut se demander ce que donnerait un KO *Mecp2/Mbd1/Mbd2*, ou une invalidation de toutes les MBP répressives. *ii*) d'autres MBP répressives importantes existent et n'ont pas été décrites. *iii*) l'effet de la méthylation sur la transcription passe principalement par l'éloignement des facteurs de transcriptions activateurs ; les MBP répressives ne joueraient qu'un rôle secondaire. *iv*) le phénotype observé dans les KO *Dnmt* n'est pas principalement lié à leur activité enzymatique sur l'ADN (hypothèse la moins vraisemblable).

La faible spécificité de séquence de MECP2, MBD1 et MBD2 fait qu'on les retrouve fréquemment sur les mêmes régions méthylées. Cela a été démontré à l'échelle du génome en surexprimant des MBD taggués [177], ou bien sur les protéines endogènes sur un plus faible nombre de régions [245]. Autre exemple, le gène *CDKN1A* (p21CIP1) peut être réprimé par MBD4 [180], ZBTB4 [208] ou UHRF1 [226]. Plus artificiellement, dans des fibroblastes murins KO pour *Mbd2*, la répression transcriptionnelle des plasmides méthylés est partiellement levée. Or une surexpression de *Mecp2* [246], *Kaiso*, *Zbtb4* ou *Zbtb38* [203] permet de rétablir en partie ou complètement cette répression. Dans cette expérience, certes artificielle mais fonctionnelle, plusieurs MBP sont donc bien capables de remplacer fonctionnellement l'absence de MBD2.

¹ Cf supra p 45.

C) MBP et cancers

Au vu du rôle important joué par la méthylation de l'ADN dans les cancers, les MBP ont été intensément étudiées dans ces pathologies.

De nombreuses MBP participent à la répression de gènes suppresseurs de tumeurs dans les cancers, fréquemment suite à l'hyperméthylation de leur promoteur [245]. Cela leur confère des propriétés pro-oncogéniques. Ce rôle pro-oncogénique des MBP a été confirmé expérimentalement. Les souris *Mbd2*^{-/-} [170] ou *Kaiso*^{-/-} [205] sont ainsi plus résistantes à la formation de tumeurs dans un contexte *APC*^{Min/+}. De même, une déplétion de MBD2 par shARN diminue la tumorigénicité de plusieurs lignées cellulaires mammaires [172]. Cependant, ZBTB4 aurait lui un rôle anti-oncogénique, et pourrait même être un gène suppresseur de tumeur dans les cancers du sein [209]. Cette activité suppresseur de tumeur de ZBTB4 viendrait plutôt de ses fonctions indépendantes de sa fixation sur l'ADN méthylé.

Les profils d'expressions des MBP sont parfois altérés dans les cancers. MBD2 et MECP2 sont surexprimés dans certains cancer du sein [243], tandis que ZBTB4 est plus généralement perdu dans ces cancers (sa perte serait en partie dû à l'activation d'un miRNA) [209].

Les propriétés pro-oncogénique de certaines MBP en font des cibles potentielles de nouvelles épithérapies [247]. Une invalidation de MECP2, MBD1 ou MBD2 par siRNA dans des cellules cancéreuses aboutit à la réexpression de gènes suppresseurs de tumeurs [248], [249]. Des petites molécules inhibitrices des MBP répressives, en particulier les MBD, sont activement recherchées par plusieurs laboratoires, dont le nôtre. Deux domaines peuvent être visés : le domaine MBD, afin d'inhiber l'interaction ADN méthylé – MBD, et les domaines TRD afin d'inhiber le recrutement de complexe répresseurs sur des promoteurs hyperméthylés liés par ces MBD. Ces petites molécules pourraient entraîner une réexpression des gènes suppresseurs de tumeurs perdus dans les cancers par hyperméthylation du promoteur [247], [249]. Elles pourraient remplacer ou être complémentaires aux drogues ciblant les DNMT (Décitabine, Azacytidine).

D) Histoire évolutive

Des protéines à domaine MBD ont été identifiées dans le génome de plantes, notamment 13 dans le génome d'*Arabidopsis thaliana* et 17 dans le génome du riz [250]. Parmi celles-ci atMBD4, atMBD5, atMBD6, atMBD7 et atMBD11 sont capables de lier l'ADN méthylé [251]. Cela suggère donc que des protéines à domaine MBD liaient déjà l'ADN méthylé chez les eucaryotes précoces, avant la séparation lignée verte – métazoaires.

Il en est de même pour le domaine SRA des protéines UHRF : des protéines homologues ont été identifiées chez *Arabidopsis thaliana*, dont certaines se lient sur les cytosines méthylées. Ces dernières ne

sont pas nécessairement situées dans un contexte CpG. atSUVH4 et atSUVH9 se fixent ainsi sur l'ADN méthylé via leurs domaines SRA, et participent à la maintenance de la méthylation sur et en dehors des sites CpG [252], [253]. C'est aussi le cas de atVIM1, atVIM2 et atVIM3 [254]. Ainsi on peut donc supposer que le domaine SRA de ces protéines était capable de lier l'ADN méthylé chez l'ancêtre commun aux métazoaires et à la lignée verte.

Les protéines liant l'ADN méthylé par un doigt de zinc se fixent sur l'ADN via un mécanisme classique [255]. Si les doigts de zinc de KAISO, ZBTB4 et ZBTB38 sont proches [203], ils sont aussi différents de ceux de KLF4 et ZFP57 que de ceux de tout autre facteur de transcription à doigts de zinc [125]. Il semble donc y avoir eu convergence évolutive de ces domaines à doigts de zinc pour leurs fixations sur l'ADN méthylé. Cette convergence a eu lieu au moins à trois reprises. Il existe sans doute de nombreuses autres protéines à doigts de zinc capables de se fixer sur de l'ADN méthylé¹.

¹ Cf supra p 52.

Résultats

I) Dynamique de la fixation de MBD2 sur les régions méthylées de l'ADN lors de la transformation maligne de cellules épithéliales mammaires humaines

Guillaume Devailly, Mélodie Grandin, Laury Perriaud, Pauline Mathot, Jean-Guy Delcros, Anne-Pierre Morel, Alain Puisieux, Patrick Mehlen et Robert Dante ont participé à ce travail.

A) Préambule

Ces travaux sont l'objet d'un article scientifique dont le manuscrit peut être trouvée ci-dessous. Ce manuscrit a été soumis au journal à comité de lecture *Nucleic Acids Research* pour évaluation. Comme le veut l'usage, ce manuscrit est rédigé en anglais.

B) Abstract

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

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. However, the exact contribution of each of these proteins to DNA methylation-dependent transcriptional repression occurring during development and diseases remains elusive.

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 independent of local DNA methylation changes. Genes downregulated during this transformation preferentially gained MBD2 on their promoter. Furthermore, depletion of MBD2 induced upregulation of MBD2-bound genes methylated in their promoter regions, in HMLER cells. 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.

C) Introduction

In vertebrates, DNA methylation at transcriptional start sites (TSS) is an epigenetic modification associated with the downregulation of gene transcription [256]. 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 [257]–[259]. 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 [83], [84], [260], [261], these epigenetic signals are also interpreted by specific proteins [262]. These proteins have been classified into three families [263]–[265] according to their methyl-DNA binding domain: the methyl-CpG binding domain (MBD) proteins; the UHRF proteins that bind methylated DNA through their SRA domain proteins; and several zinc finger proteins (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* [184]. In human cells and *Xenopus* oocytes these proteins are found associated with chromatin remodeling complexes along with histone deacetylases and/or histone methylases [140], [143], [154], [155], [266]. 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 [267]–[269] 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 [176]. 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 [160], [269]. 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 [177]. 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 [270]. In mice, MBD2 deletion alters the immune response [271], protects mice from hind-limb ischemia [272], and greatly reduces the number of intestinal adenoma in tumor-prone *APC^{min}* mice [170], [171], mimicking the effects of experimentally induced DNA hypomethylation [273], [274]. Detailed gene candidate analysis indicates that MBD2 controls the expression of some exocrine pancreatic genes in a tissue-specific manner in mice [173]. 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 [173], 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 [23]. 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-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-RAS^{V12}* [25]. 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.

D) Materials and methods

1) 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 [24], [275].

2) 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, MISSION siRNA Universal Negative Controls #1) using Lipofectamine-2000 (Sigma-Aldrich) as specified by the manufacturer's instructions, or treated every day with 10 μ M of 5-aza-2'-deoxycytidine (Sigma-Aldrich). Cells were collected 72 h after the start of the treatments.

3) Western-blot

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

4) RNA extraction

Total RNA was extracted using the NucleoSpin RNA kit (Macherey-Nagel, Hoerd, 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). 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).

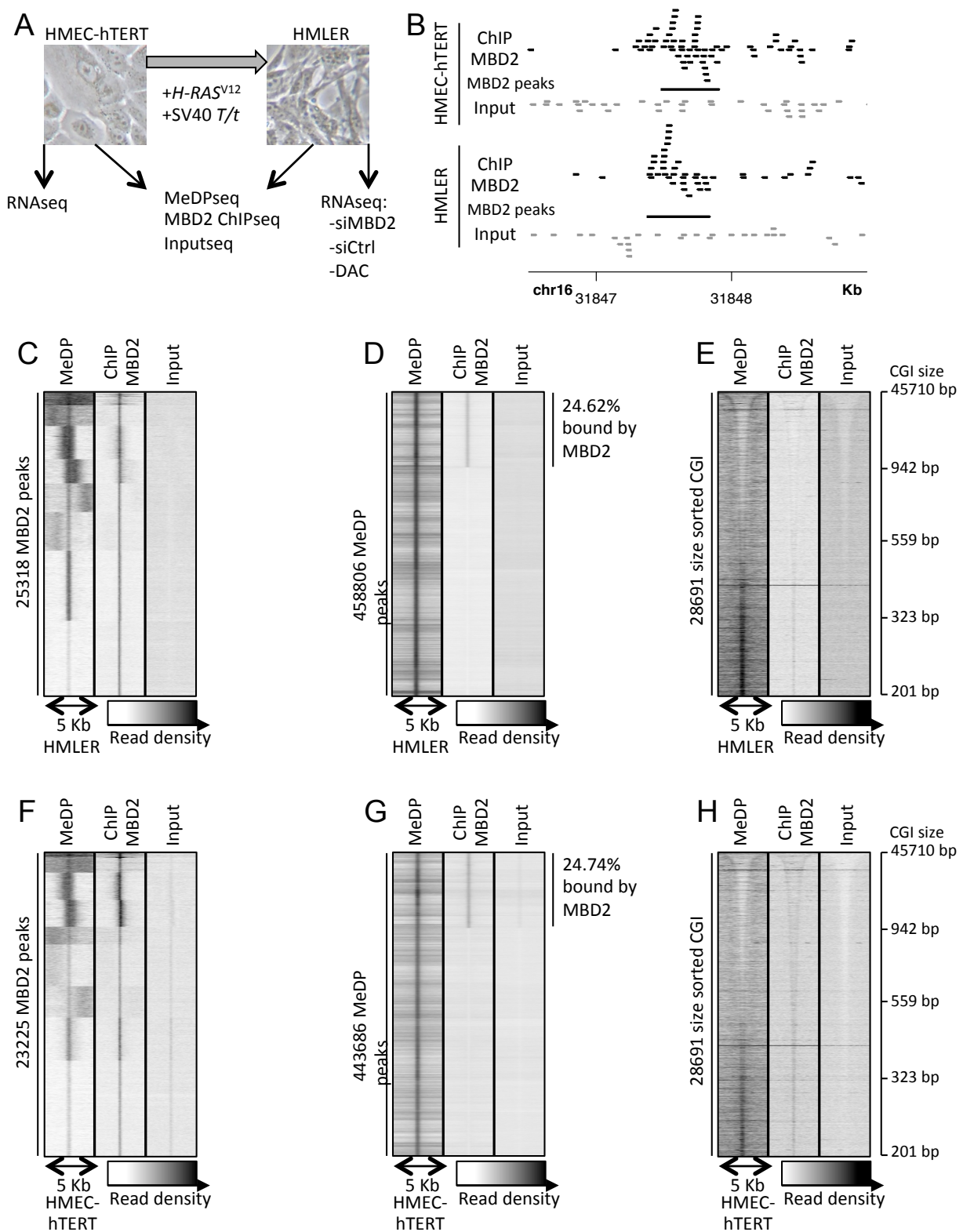


Figure 12 : Endogenous MBD2 proteins bind methylated DNA regions.

A. Experimental scheme; the transformed mesenchymal HMLER cell line is derived from the immortalized epithelial HMEC-hTERT cells by oncogenic transformation using H-RASV12 and SV40 T/t oncogenes. Sequencings were performed on a pool of 5 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.

5) 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 ethidium bromide –containing agarose gels.

6) Methylated-DNA precipitation sequencing (MeDPseq)

Genomic DNA was sheared to a mean fragment length of 300-500 bp through sonication. Methylated-DNA precipitation (MeDP) was performed using the MethylMiner Methylated DNA Enrichment Kit with 1µg of sheared DNA. Pools of 5 independent experiments were sent for high throughput sequencing to Beijing Genomics Institute (Hong-Kong) (library preparation and single-end 50 bp sequencing on Illumina HiSeq 2000).

7) Chromatin Immunoprecipitation (ChIP)

MBD2 Chromatin Immunoprecipitations (ChIP) were performed as previously described [276]. Briefly, sheared chromatin (with a mean fragment length between 300 and 500 bp) was obtained by sonication of formaldehyde cross-linked nuclei. ChIPs 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) [277] 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 5 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 (Biorad). Primer sequences and corresponding hybridization temperatures are listed in Tableau 5.

precipitated using a His₆-tagged recombinant protein containing 4 MBD domains cloned from MBD1 [278]. 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.

9) RNAseq analysis

Reads were aligned on the UCSC *Homo sapiens* hg19 genome using TopHat2 [279]. Differential expression analysis was performed as previously described in reference [280], using the Bioconductor package edgeR [281]. Only genes with at least 1 read per million (RPM) in at least 2 of the samples were kept for subsequent analyses. Enriched Gene Ontology terms and KEGG pathway were identified using Gene Set Enrichment Analysis[282] with genes pre-ranked according to their fold change induced by siMBD2.

10) ChIPseq analysis

Reads were aligned on the UCSC *Homo sapiens* hg19 genome using Bowtie [283]. Duplicate reads were filtered using SAMTools [284] to limit PCR induced biases. Preliminary peak detection was performed using MACS [285]. Over sequenced regions were defined as 500 bp regions containing more than 3 times the median number of reads in at least 1 of the 2 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 [286], 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 [287]. K-mean clusterization of peaks and subsequent visualization were performed with seqMINER [288]. Integrative analysis of ChIPseq, RNAseq, and ChIP-chip data was performed using the Bioconductor package Repitools [289]. Top enriched motifs in peaks were obtained using the RSAT oligo-diff tool [290].

11) Data deposition

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

E) Results

1) Identification of MBD2 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 12A) constructed from immortalized HMEC cells (HMEC-hTERT cells) transformed by expressing SV40 *T/t* antigen and *H-RAS*^{V12} [23], [275]. 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 12B). These data were compared with ChIP on 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 on chip experiments performed with recombinant proteins containing 4 MBD domains from MBD1 [176], [278] (Figure 19 A and B). Similarly, MBD2 peaks identified from ChIPseq were enriched in MBD2 ChIP on chip (Figure 19 C and D). Furthermore, a group of genomic regions sharing the same characteristics (MBD2 binding and DNA methylation) in both cell lines was analyzed by ChIP-qPCR (Figure 13A). Data obtained indicated a good concordance between the two methods, qPCR (Figure 13A) and determination of the distribution of MBD2 reads by ChIPseq (Figure 13B-H). We also validated 14 cell-specific MBD2 binding sites (Figure 20). For many of these, DNA methylation changes did not seem to be associated with the gain of MBD2 binding sites in HMLER cells (Figure S2 regions 14q11.2, 12q11.22, 8q22.2, and 16p13.3). On these regions analyzed by qPCR, we confirmed that depletion of MBD2 by siRNA strongly reduced ChIP efficiency (Figure 21), confirming the specificity of the antibody.

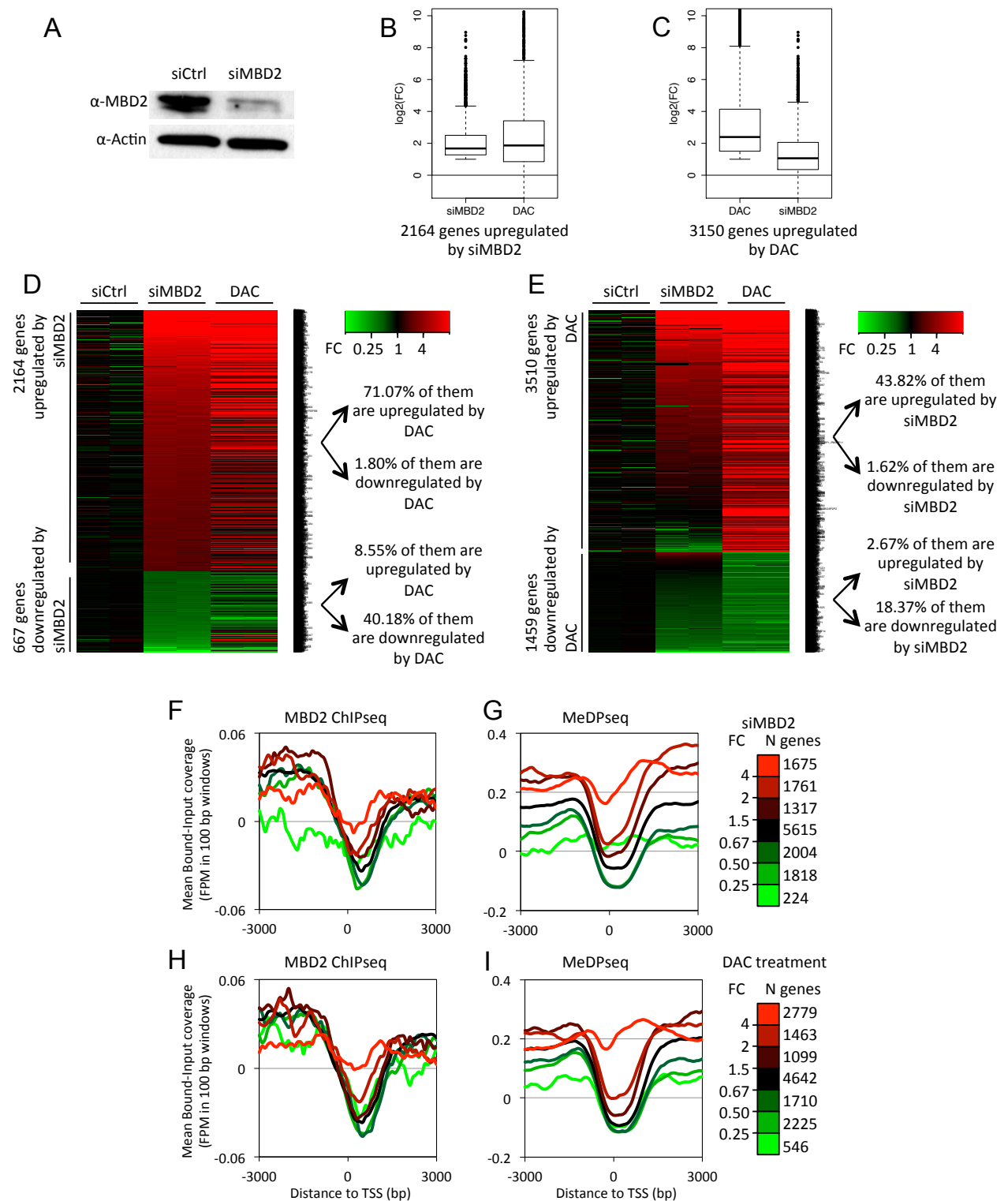


Figure 14 : MBD2 is a methylation-dependent transcriptional repressor in HMLER cells.

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 of the 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 7 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 (+/- 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.

2) Endogenous MBD2 binding sites are methylated

Read densities at 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 (Figure 12C-H). As expected, strong signal intensities were observed when MBD2-reads were plotted against MBD2 peaks (Figure 12 C, HMLER cells and F, HMEC-hTERT cells). The centers of MBD2 peaks were also enriched in MeDP-reads (Figure 12 C 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 12 C and F). Conversely, DNA methylation peaks identified by MeDPseq were enriched in MeDP-reads (Figure 12 D 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 12 D 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 [160], [177], [178]. The relationship between DNA methylation and MBD2 binding was also observed at Alu sequences (Figure 22 B and C). Alu sequenced are classified into 3 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 (Figure 22C). The distribution of MBD2 read densities on these Alu sequences was parallel to the DNA methylation profiles (Figure 22B).

When unique 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 12 E and H). These short CGIs were also enriched in MBD2 reads (Figure 12 E and H), showing that MBD2 proteins targeted CpG-rich sequences when methylated. Identification of enriched K-mer in MBD2 peaks using RSAT tool failed to identify any sequence specificity except the presence of CpG sites (Tableau 6). Altogether, these data indicated that DNA methylation is the main parameter driving MBD2 deposition.

3) 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 (Figure 23). Similarly, the transcriptional level of genes with MBD2 peaks within ± 1 kb of their TSS was low (Figure 23). 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. RNAseqs were performed with RNA extracted from HMLER cells treated with either siMBD2 (siRNA targeting *MBD2* transcripts [276], [291]) or 5-aza-deoxycytidine (DAC). Non-specific siRNA was used as a control. The analysis of the data was performed from duplicate RNAseq experiments. RNAseq analysis indicated a reduction of $89.5 \pm 0.33\%$ of MBD2 mRNA in siMBD2-treated HMLER cells, while the levels of MeCP2 and MBD1 transcripts were not affected. This downregulation was also observed at protein level as shown by western blot analysis (Figure 14A). Digestion of genomic DNA with HpaII, a restriction enzyme inhibited by CpG methylation, indicated that 5-aza-deoxycytidine induced DNA hypomethylation of HMLER cells (Figure 24).

A relatively large number of genes (2164) 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 12), a large proportion ($\sim 70\%$) of these upregulated genes were also found upregulated in HMLER cells treated with 5-aza-deoxycytidine (Figure 14 B and D). Conversely, a subset of genes ($\sim 40\%$) upregulated in 5-aza-deoxycytidine-treated HMLER cells were also upregulated upon MBD2 depletion (Figure 14 C 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 7 clusters according to their responses to either MBD2 depletion or DNA methylation inhibition. These data are summarized in Figure 14 F-I and indicated that the upregulated genes upon MBD2 depletion (red curves) were enriched in MBD2-reads near their TSS in untreated cells (Figure 14F). 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 14G, red curve). Conversely, the genes upregulated upon hypomethylation of HMLER cells were enriched in MBD2-reads and MeDP-reads (Figure 14 H and I, red curves).

A similar effect of MBD2 depletion or inhibition of DNA methylation was also observed at repeated elements. Depletion of MBD2 or 5-aza-deoxycytidine 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 (Figure 22A).

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 2 epigenetics events, MBD2 deposition and DNA methylation, on the downregulation associated with the transformation of immortalized HMEC-hTERT cells.

4) 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 [286] identified by ChIPseq analyses. A high number (17899) of MBD2 peaks was not affected by the transformation process (Figure 15A). However, 5326 regions (22.9%) associated by MBD2 in HMEC-hTERT cells lost MBD2 in HMLER, while 7419 (29.3%) regions gained MBD2 binding sites in HMLER cells when compared with MBD2 profiles in HMEC-hTERT (Figure 15A).

DNA methylation changes were more limited in proportion as HMEC-hTERT and HMLER cells shared 393631 DNA methylation peaks while 49995 regions (11.2%) were HMEC-hTERT specific and 65115 regions (14.1%) were HMLER specific (Figure 15B).

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 15C). 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 (Figure 20A).

Thus, for a subset of DNA regions, that MBD2 deposition is a dynamic process that can be independent of DNA methylation changes.

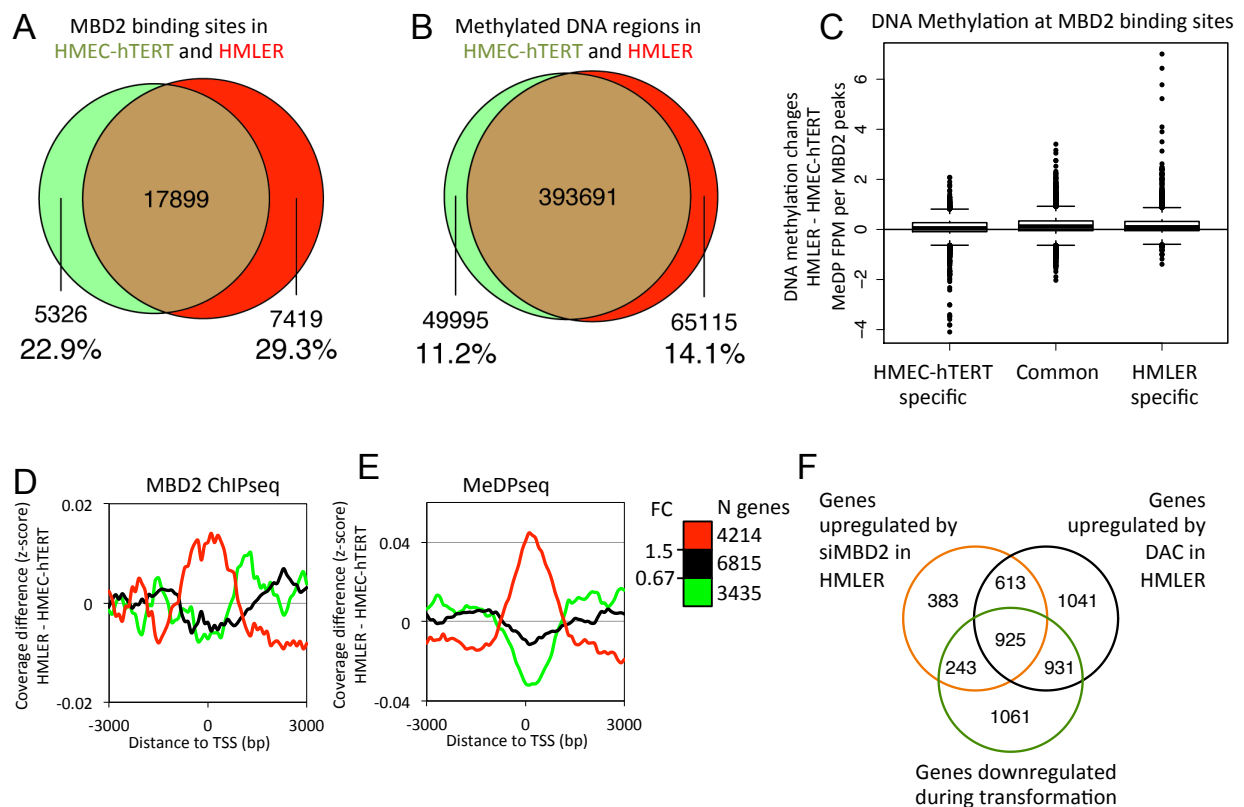


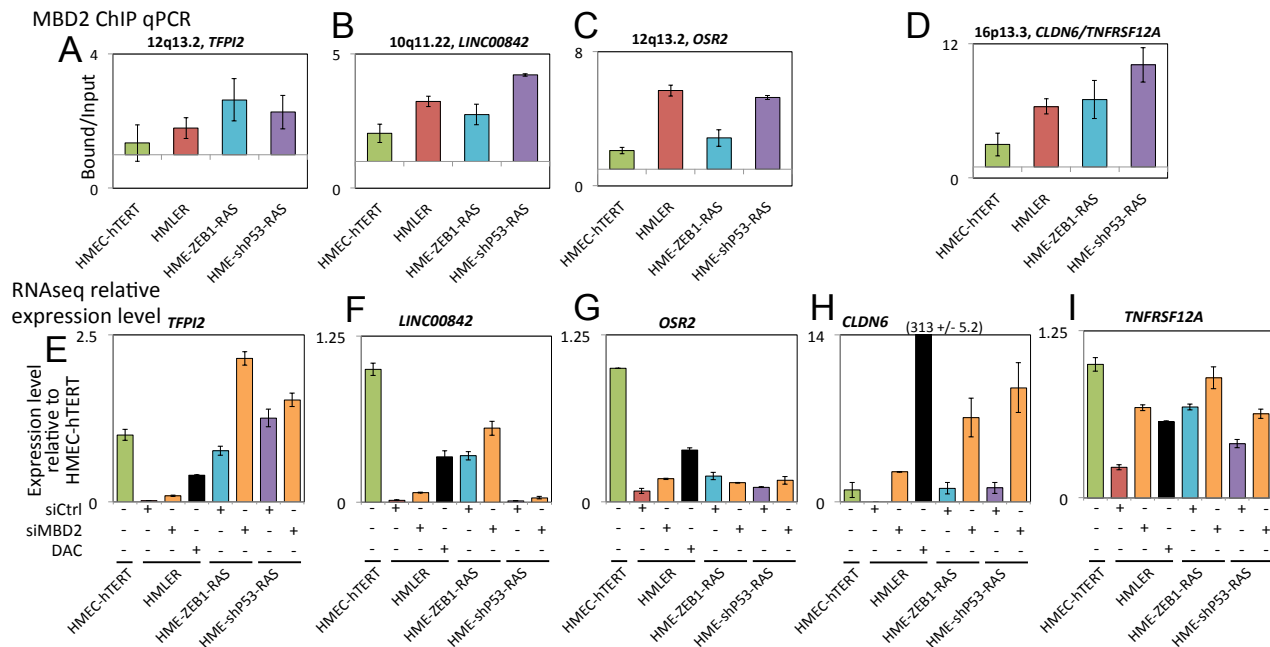
Figure 15 : Dynamics of MBD2 distribution during oncogenic transformation.

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.

5) MBD2 is involved in the repression of genes downregulated in oncogenic HMER cells

Interestingly, genes downregulated during the transformation of HMEC-hTERT gained MBD2-reads and MeDP-reads at TSS regions (Figure 15 D and E, red curves). Furthermore, more than 50% (1168 out of 2164) of genes upregulated upon MBD2 depletion in HMLER cells that are downregulated during the transformation process (Figure 15F). Data obtained for *TFPI2*, *LINC00842*, *OSR2*, *CLDN6* and *TNFRSF12A* genes illustrate this analysis (Figure 16E-I and Figure 20). MBD2 deposition near the

TSS of these genes was increased during oncogenic transformation (Figure 20 and Figure 16A-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 16E-I). These data indicated that MBD2 participated in the establishment of transcriptomic changes induced by oncogenic transformation.



6) 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 [292], 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 [293], [294]. Thus, the involvement of MBD2 in the control of gene expression was investigated in two cellular models (Figure 17A) 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) [24], [275].

When induced, both cell lines exhibited, as the HMLER cells, a mesenchymal phenotype and malignant properties [23], [24], [275].

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 17A). 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, and a large decrease in MBD2 proteins was also observed from western blot analyses (Figure 17B).

We identified 584 genes upregulated by MBD2 depletion in at least 2 cell lines (Figure 17C, fold change $\geq$ 2, p value $\leq$ 0.01). A large subset of these genes were genes downregulated during oncogenic transformation (Figure 17D).

MBD2 ChIP-qPCR assays performed at genomic locations previously analyzed (Figure 13 and Figure 20) indicated that MBD2 binding profiles identified in HMLER cells were frequently similar in HME-ZEB1-RAS and HME-shP53-RAS cells (Figure 18). 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 2 models (Figure 18B).

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.

7) 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 (Tableau 7). Enriched KEGG pathways included KEGG_CELL_ADHESION_MOLECULES_CAMS, KEGG_FOCAL_ADHESION (Tableau 7). 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.

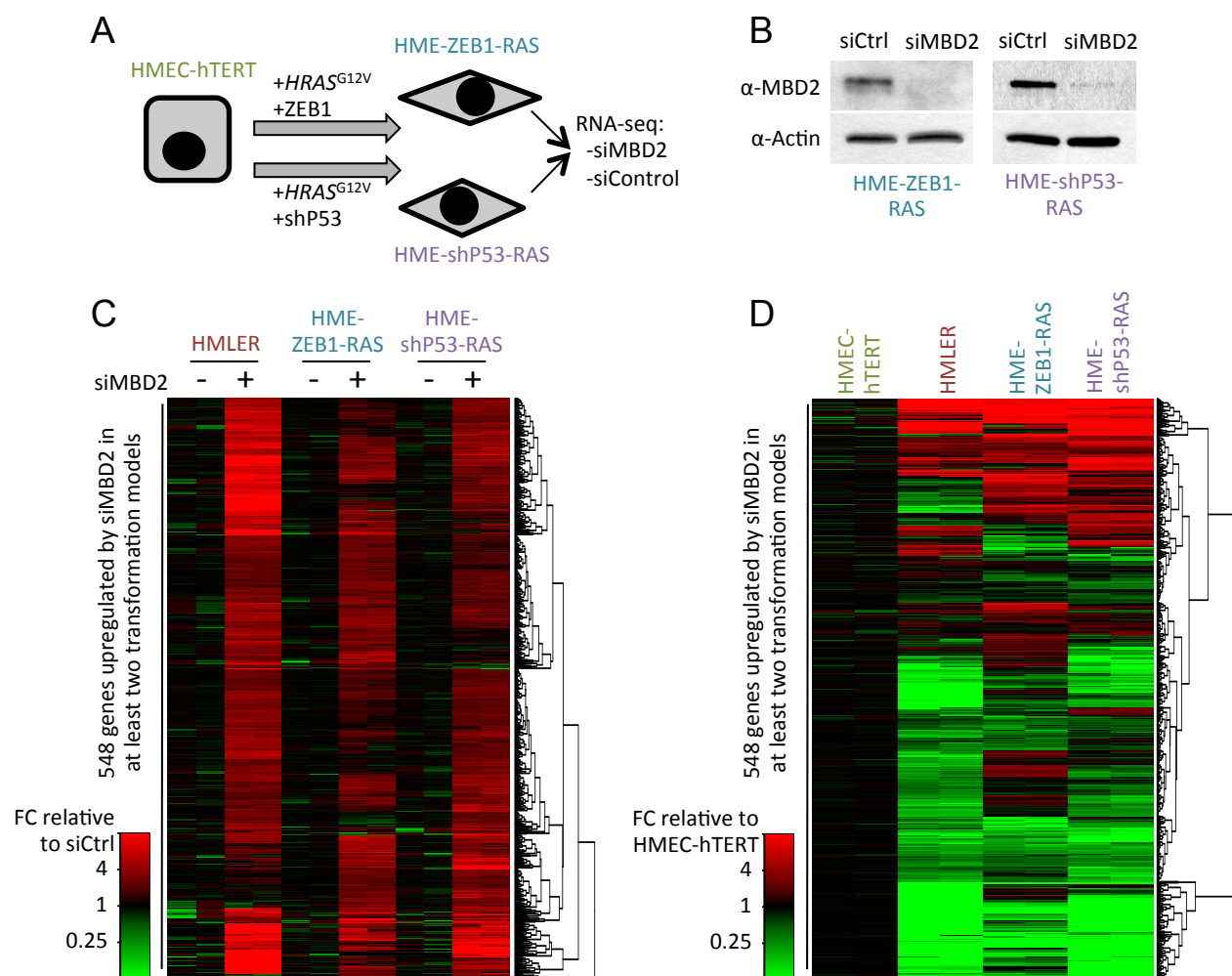


Figure 17 : MBD2 repressed a common set of genes during oncogenic transformation.

A. Experimental scheme of generation of 2 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-RASV12, and HME-shP53-RAS cells were obtained by the expression of a shRNA targeting P53 and H-RASV12 genes. **B.** Immunoblot analysis of MBD2 protein level in HME-ZEB1-RAS and HME-shP53-RAS upon siRNA against 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.

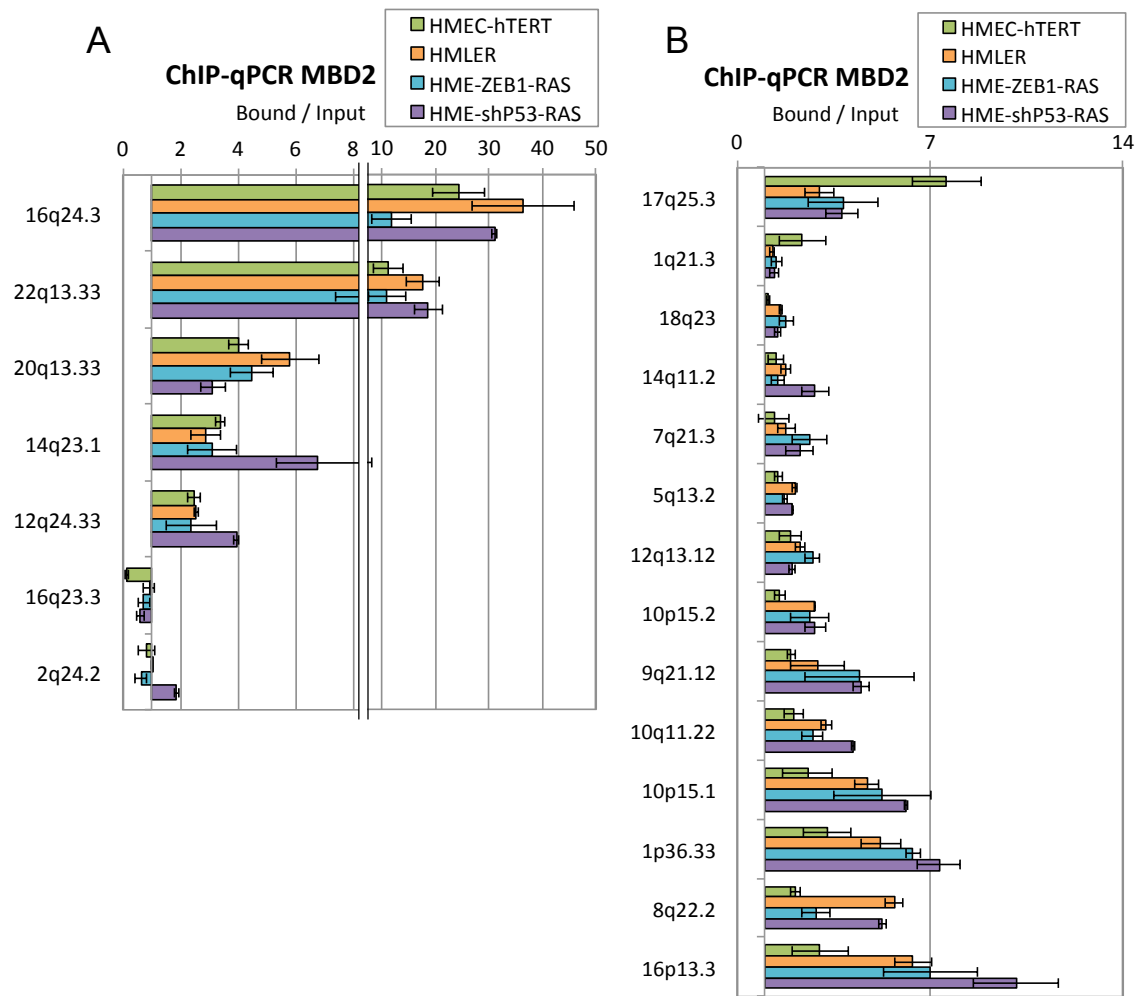


Figure 18 : MBD2 ChIP-qPCR experiments from HMEC-HTERT, HMLER, HME-ZB1-RAS, and HME-shP53 cell lines.

Error bars represent SEM from 2 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.

F) Discussion

It has long been known that DNA methylation patterns are altered in cancer cells [110], [295], these modifications include global loss of 5-methylcytosines and local hypermethylations [296], [297]. 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 silencing [258], [298]. Although the expression level of genes in their tissue of origin may influence their methylation status in the corresponding cancer cells [299], genome-wide studies have shown that hundreds of genes exhibiting hypermethylated CpG island at their 5' end were never methylated from embryonic development onwards [258].

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 [79], [300]. In cell lines, inhibition of DNA methylation by cytosine

analog [266] or DNMT1 knockdown [301], [302] 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 [303].

Histone deacetylation, histone methylation, and chromatin compaction are major events involved in gene repression and DNA methylation is associated with these chromatin modifications [304], [305]. 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 [78], while methylated vectors are not transcribed in living cell [300], [306]. 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 [133], [184] and many studies have indicated that the MBD proteins are good candidates for interpreting the methylation signals [262], [263]. 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 TGmeCGCA sites [157], while MeCP2 preferentially associates methylated CpG followed by a run of 4 or more A/T bases [148]. 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 [148], [157]. Biochemical studies of MBD2 have also indicated a preference for a short sequence CmeCGA [163]. In line with this finding, CCG sequences are preferentially found in many MBD2 genomic targets [163]. However, this observation might be biased by over-representation of methylated CpG-rich sequences among the genomic targets of MBD2 [245], [276], [307]–[310].

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 [142]. 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, over-expression of a vector coding for MeCP2 induces its binding at this site [276]. In mice, knockdown of the individual MBD proteins, MeCP2, MBD1, or MBD2 [145], [167], [311] 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 [263], 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 [160], [177], [178], we have performed ChIPseq against endogenous MBD2 proteins in 2 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 [163] 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 [177]. It should be noted that, for a minority of MBD2 binding sites, additional events may 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 [177]. 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 [245], 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 2000 genes and 70% of these genes were also upregulated by a 5-aza-deoxycytidine 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 5-aza-deoxycytidine 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 5-aza-deoxycytidine 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. These data also confirm that MBD2 plays an important role in the interpretation of DNA methylation signal in HMLER cells.

In the isogenetic 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 proteins, 5326 MBD2-positive regions in HMEC-hTERT lost MBD2 binding in HMLER, while 7419 regions in HMEC-hTERT gained MBD2 in HMLER cells. Such redistribution may be in part explained by local DNA methylation changes. Nevertheless, the great majority of the regions gaining or losing MBD2 in HMLER exhibited comparable MeDPseq-read densities in both cell lines. Thus, the redistribution of MBD2 proteins occurring in HMLER cells seemed, at least for a subset of genes, independent of DNA methylation changes.

HMLER cells were obtained by sequential introduction of hTERT, SV40 large *T*/small *t* antigens, oncogenic *H-RAS*^{V12} genes [23], [275] in primary cultures of human mammary epithelial cells. The expression of SV40 sequences affects multiple pathways in human mammary cells [292], 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 [24]. 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 ectopic expression of siRNA targeting MBD2. Thus, the dynamics of MBD2 deposition do seem to be independent of the strategy used for overcoming the oncosuppressive 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 [312], and that alterations of P53-pathways play a crucial role in human cancers [313].

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 [171]. 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 [314]. None of these genes was targeted by MBD2 during transformation in the cellular models studied here. 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 [25]. 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 reprogramming of cancer cells may be due to a redistribution of methyl-DNA binding proteins in addition to DNA methylation alterations.

G) Acknowledgements

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, Montpellier GenomiX, and Beijing Genomics Institute for library preparations and high-throughput sequencing experiments.

H) Funding

GD and PM were supported by a fellowship grant from Ligue Contre le Cancer. MG was supported by a fellowship grant from LabEx DEVweCAN and Fondation ARC pour la Recherche sur le Cancer. This work was supported by institutional grants from Centre national de la recherche scientifique; University of Lyon; Centre Léon Bérard; and from the Ligue Contre le Cancer; Institut National Du Cancer; Agence Nationale de la Recherche; European Research Council; and Fondation Bettencourt.

I) Supplementary material

1) Supplementary figures

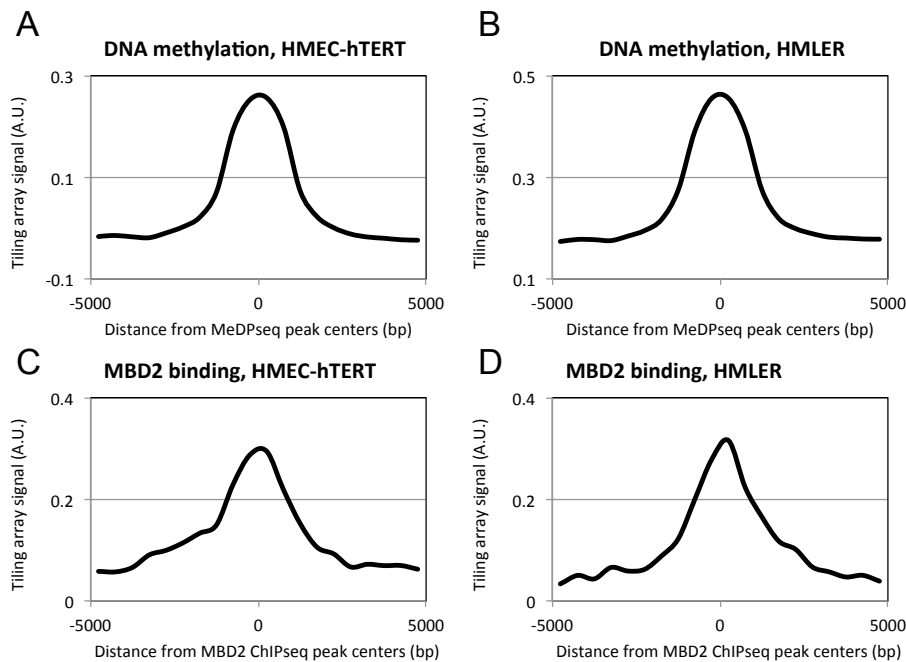


Figure 19 : Comparison between high-throughput sequencing and tiling array technologies.

Mean signals from Affymetrix Human Promoter 1.0R tiling arrays were computed at peaks identified from MeDP or MBD2 ChIP sequencing experiments. **A-B.** MeDP on chip signals, obtained from a recombinant protein containing 4 MBD domains from MBD1, were compared with MeDP sequencing, performed from Invitrogen MethylMiner, in HMEC-hTERT (**A**) and HMLER (**B**). **C-D.** MBD2 ChIP on chips were compared with MBD2 ChIPseq in HMEC-hTERT (**C**) and HMLER (**D**). A.U., Arbitrary Unit.

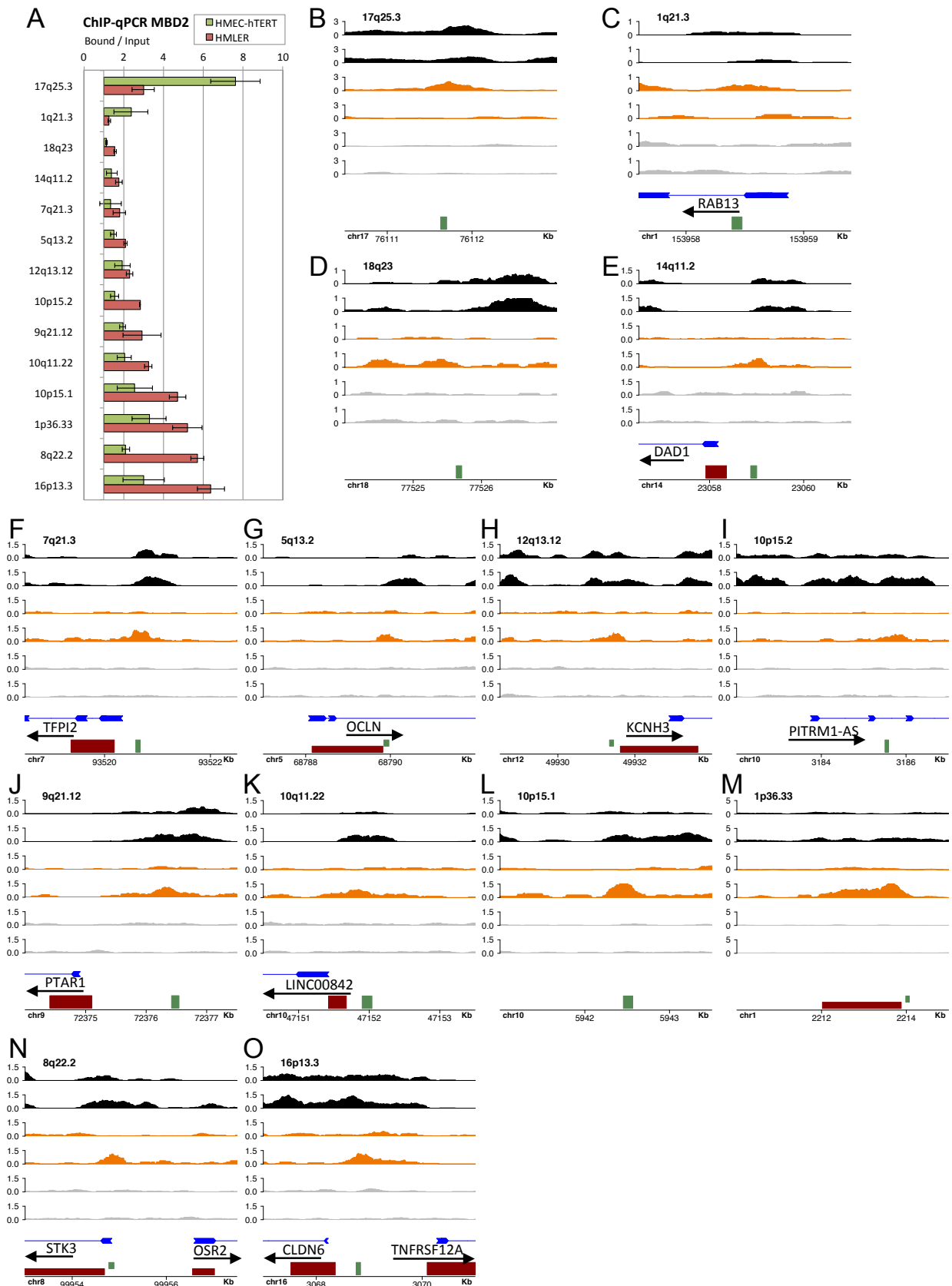


Figure 20 : Examples of MBD2 redistribution during oncogenic transformation.

A. ChIP-qPCR experiments performed with anti-MBD2 antibodies in HMEC-hTERT cells (green) and HMLER cells (red). Each experiment was performed 2 times. **B to O.** Genome coverage for MeDP-seq (black), CHIP-MBD2-seq (orange) and Input-seq (gray) in HMEC-hTERT (upper tracks) and HMLER (bottom tracks) at 14 genomic locations tested in **A**. Scale is in Fragments Per Million (FPM). Blue: Gene. Red: CpG island. Green: qPCR amplicon localization.

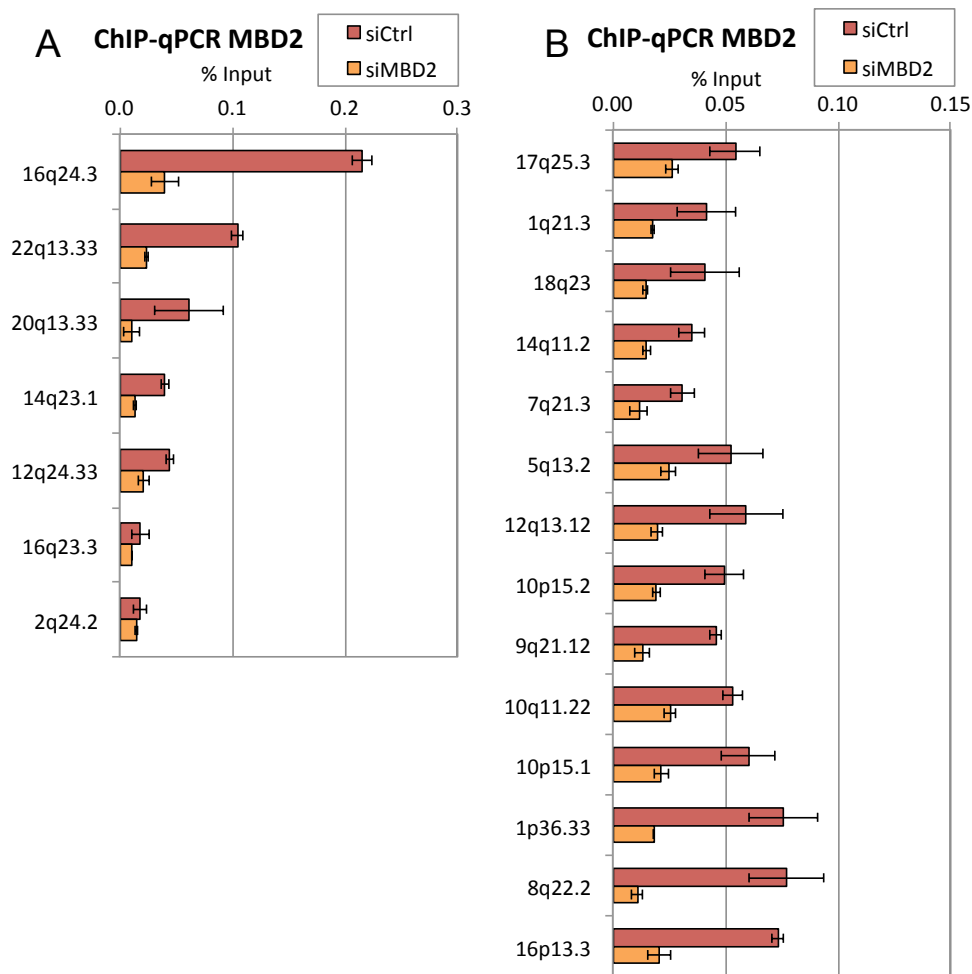


Figure 21 : Depletion of MBD2 by siRNA strongly decreased MBD2 ChIP efficiency.

ChIP-qPCR experiments were performed in HMLER cells treated with a siRNA control (siCtrl) or a siRNA targeting MBD2 (siMBD2). Each experiment was performed 2 times. **A.** Shown regions correspond to the regions analyzed in Figure 13. **B.** Shown regions correspond to the regions analyzed in Figure 20.

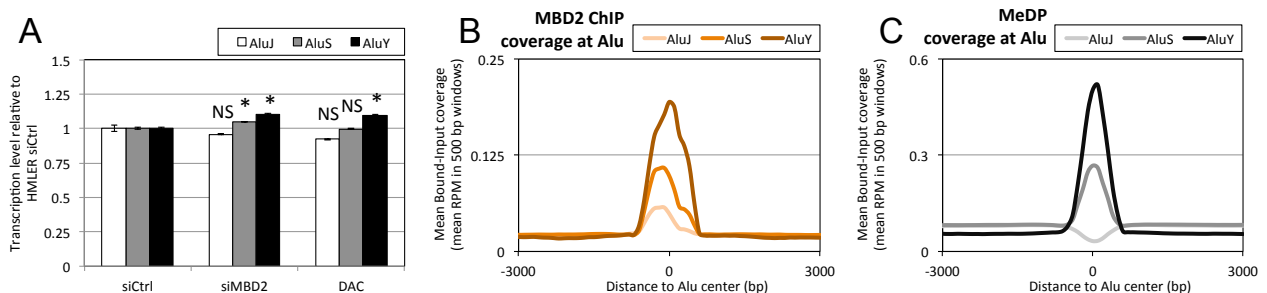


Figure 22 : Transcription at AluY element sites is repressed by MBD2 and DNA methylation.

A. Relative transcription level at AluJ, AluS and AluY element sites in HMLER, as detected by RNA sequencing. HMLER cells were treated with control siRNA (siCtrl), siRNA targeting MBD2 (siMBD2) or 5-aza-deoxycytidine (DAC). Student t-test relative to siCtrl conditions. * p-value ≤ 0.01 . N.S. Non significant. **B.** MB2 ChIPseq mean coverage at AluJ, AluS and AluY elements. **C.** MeDPseq mean coverage at AluJ, AluS and AluY elements.

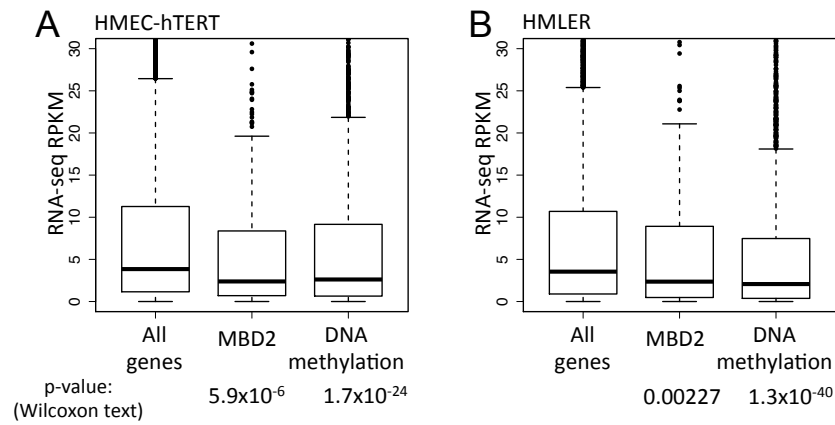


Figure 23 : Genes exhibiting MBD2 binding sites or with DNA methylation at their TSS regions have low transcriptional activity.

Box-plots showing gene expression levels, determined from RNA-seq, of the total number of genes, genes with MBD2 peaks within +/- 1kb of their TSS, or genes with MeDP peaks within +/- 1kb of their TSS in **(A)** HMEC-hTERT cells and **(B)** HMLER cells.

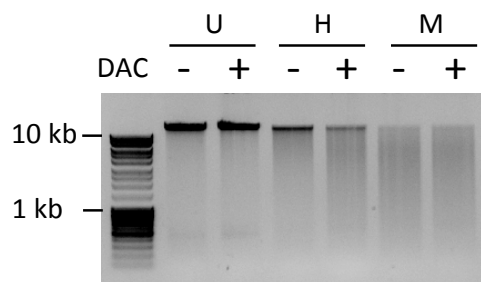


Figure 24 : 5-aza-deoxycytidine treatment induce a DNA demethylation.

Digested and undigested genomic DNA was analyzed on 1% agarose gel. DAC: 5-aza-deoxycytidine. U: undigested. H: digested with the methylation sensitive enzyme HpaII. M: digested with the methylation insensitive enzyme MspI.

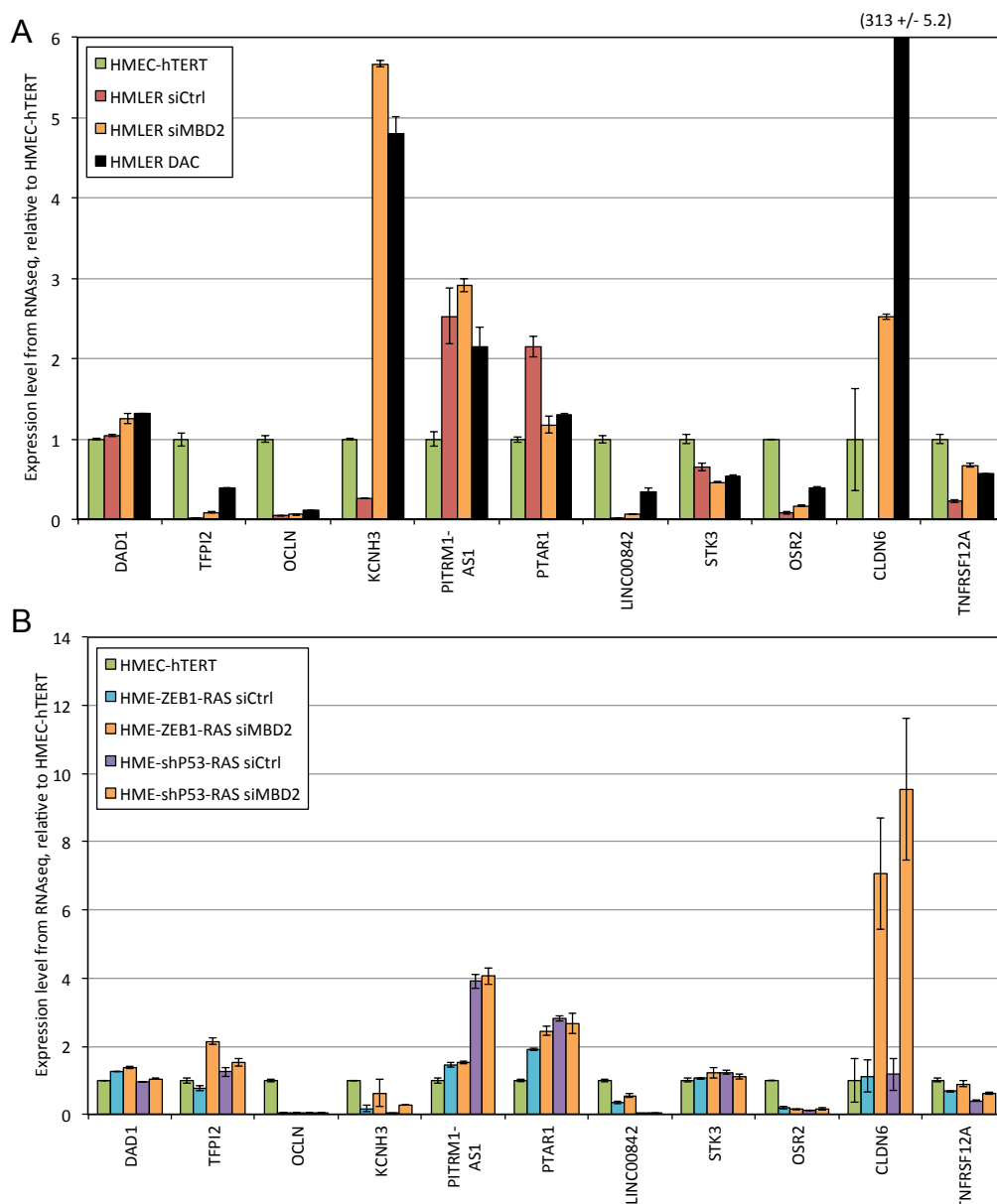


Figure 25 : Expression levels of genes gaining MBD2 at their TSS regions in HMLER, HME-ZEB1-RAS, and HME-shP53-RAS cells compared with HMEC-hTERT cells.

For each gene, relative values were determined using 1 for the expression level in HMEC-hTERT cells. **(A)** Green: Expression level in HMEC-hTERT. Red: Expression level in HMLER treated with a control siRNA. Orange: Expression level in HMLER treated with siRNA against MBD2. Black: Expression level in HMLER treated with DAC (5-aza-deoxycytidine). Error bars from duplicate RNAseq experiments. **(B)** Green: Expression level in HMEC-hTERT. Blue: Expression level in HME-ZEB1-RAS treated with a control siRNA. Purple: Expression level in HME-shP53-RAS treated with a control siRNA. Orange: Expression level in HME-ZEB1-RAS or HME-shP53-RAS treated with a siRNA against MBD2. Error bars from duplicate RNAseq experiments.

2) Supplementary tables

Region name	Forward primer	Reverse primer	Tm (°C)
16q24.3	CATTTCTCATCCTGCGCACC	CGTGTGTGTCTCCTCTGCTT	60
22q13.33	GCTGCAGGAGATCGACAACT	CTCGATGATCTCGCGCTTCT	60
20q13.33	CTCATCCCCAACAGCAGTG	CAGCTCATCACCCCAGTGAA	60
14q23.1	TGGGCCTGACTGCTATATTCT	TGACGTAAGAGCAGGGAATTT	60
12q24.33	CGGGTGACTATGAGTGATGTGT	TCACCTGTTACACCAGACCA	60
16q23.3	GAAGGCTGCATGGAATGAT	GGATCTGGATCGGAAGGAA	61.5
2q24.2	TCTGTGCTTAAGGGTCACAGG	GCTGCTAATGAAGGTCTTTGC	60
17q25.3	GGGAAAGTGCCTTGTCTCCA	CGCTCCTCTCTGCCCAGG	60
1q21.3	TGAAGGCCTCAGAGAGGTGA	TCTAGTCCCTCAACCCCTGG	60
18q23	AGGAAACCCATTTCAGCCC	AAGAAGCAGTCTTGCCATC	60
14q11.2	GCTGTGCAATGTCTGTGCAAA	GAACCAGGCATGCTCTTTTCG	60
7q21.3	TGACAACTGTGTAGCCACCAA	CTCCCAAAGTGTGGGATTA	65
5q13.2	GCCCTTAGGCAACAGGTGTA	CACTTGGGAACGCCTAGTTT	60
12q13.12	TGGAGAGGAAGCCTTGAACG	TGACCCTAAGGAGTCGGGAG	60
10p15.2	CCTGTGAACTCGAACAGCCT	ATCATGCCAGGTAGGAGGGT	60
9q21.12	TGCGGAGCGTTTGAAGTAGT	ACAGGAAATACTGGCCACTGAG	60
10q11.22	GAAGACCTGGTTACCCCAGC	TTGACTGAAGTGCTTGCCCC	60
10p15.1	GCGCATCTGTGATTGCTGAG	AAAGCAGTTCTGAGAGCCCC	60
1p36.33	CAGAGTTCCATAGTGGGCGG	AGCAAGGCTTTCCATGGGTT	60
8q22.2	AAAACCAAACGGTTCTGCAC	TACGCTTCGCACTTCCTTTT	60
16p13.3	CTTGTTATATTGCCCAGGCGTC	CCGTAATCCCAGCGCAGT	60

Tableau 5 : Sequences and hybridization temperatures of primers used in qPCR experiments.

HMEC-hTERT										
Kmer	2		3		4		5		6	
rank	seq	-Log(P)	seq	-Log(P)	sequence	-Log(P)	sequence	-Log(P)	sequence	-Log(P)
1	cg cg	Inf	cg gcg	Inf	cgca tgcg	279.0	agcgc gcgct	158.8	agcgca tgcgct	90.7
2			acg cgt	273.0	cacg cgtg	213.0	cagcg cgctg	139.6	cagcgc gcgctg	86.8
3			gcc ggc	181.4	agcg cgct	179.8	cgcac gtgcg	127.7	cgctgc gcagcg	66.5
4					acgc gcgt	156.1	gcgca tgcgc	120.3	agcgcc ggcgct	58.4
5					gcgc gcgc	146.0	cgcag ctgcg	105.9	gcgcac gtgcgc	49.9

HMLER										
Kmer	2		3		4		5		6	
rank	seq	-Log(P)	seq	-Log(P)	sequence	-Log(P)	sequence	-Log(P)	sequence	-Log(P)
1	cg cg	157.2	acg cgt	177.2	cgca tgcg	158.0	agcgc gcgct	74.3	agcgca tgcgct	54.3
2			cg gcg	109.7	cacg cgtg	131.5	cgcac gtgcg	70.1	cagcgc gcgctg	38.0
3			cac gtg	87.7	acgc gcgt	88.9	cagcg cgctg	64.9	acgcac gtgcgt	28.9
4					agcg cgct	78.4	ccgca tgcgg	64.9	agcgcc ggcgct	27.9
5					cgct gacg	61.5	gcgca tgcgc	63.9	cacacg cgtgtg	27.8

Tableau 6 : Analysis of enriched K-mers sequences in MBD2 peaks in HMEC-hTERT and HMLER. Genomic sequences of MBD2 peaks were analyzed using RSAT oligo-diff tools [290].

HMLER

Set	Rank	Name	NES	P value	FDR q-val
Gene Ontology	1	EXTRACELLULAR_REGION	4.50	0.000	0.000
	2	EXTRACELLULAR_REGION_PART	4.14	0.000	0.000
	3	PROTEINACEOUS_EXTRACELLULAR_MATRIX	3.51	0.000	0.000
	4	EXTRACELLULAR_MATRIX	3.39	0.000	0.000
	5	COLLAGEN	2.79	0.000	0.000
	6	EXTRACELLULAR_MATRIX_PART	2.75	0.000	0.000
	7	EXTRACELLULAR_SPACE	2.71	0.000	0.000
	8	VOLTAGE_GATED_POTASSIUM_CHANNEL_COMPLEX	2.52	0.000	0.001
	9	MEMBRANE_FRACTION	2.07	0.002	0.013
	10	INTEGRIN_COMPLEX	1.72	0.016	0.088
	11	CELL_SURFACE	1.59	0.051	0.154
	12	CELL_FRACTION	1.51	0.070	0.205
	13	BASEMENT_MEMBRANE	1.48	0.067	0.217
	14	INTRINSIC_TO_ENDOPLASMIC_RETICULUM_MEMBRANE	1.45	0.083	0.236
	15	INTEGRAL_TO_ENDOPLASMIC_RETICULUM_MEMBRANE	1.42	0.101	0.248

HMLER

Set	Rank	Name	NES	P value	FDR q-val
KEGG pathways	1	KEGG_NEUROACTIVE_LIGAND_RECEPTOR_INTERACTION	3.57	0.000	0.000
	2	KEGG_ECM_RECEPTOR_INTERACTION	3.49	0.000	0.000
	3	KEGG_SYSTEMIC_LUPUS_ERYTHEMATOSUS	3.15	0.000	0.000
	4	KEGG_INTESTINAL_IMMUNE_NETWORK_FOR_IGA_PRODUCTION	3.02	0.000	0.000
	5	KEGG_CELL_ADHESION_MOLECULES_CAMS	2.90	0.000	0.000
	6	KEGG_GRAFT_VERSUS_HOST_DISEASE	2.73	0.000	0.001
	7	KEGG_AUTOIMMUNE_THYROID_DISEASE	2.69	0.000	0.001
	8	KEGG_GLYCOSAMINOGLYCAN_BIOSYNTHESIS_CHONDROITIN_SULFATE	2.62	0.000	0.001
	9	KEGG_ALLOGRAFT_REJECTION	2.55	0.000	0.001
	10	KEGG_FOCAL_ADHESION	2.42	0.000	0.003
	11	KEGG_CYTOKINE_CYTOKINE_RECEPTOR_INTERACTION	2.31	0.000	0.006
	12	KEGG_TYPE_I_DIABETES_MELLITUS	2.30	0.000	0.005
	13	KEGG_BASAL_CELL_CARCINOMA	2.22	0.000	0.008
	14	KEGG_CALCIIUM_SIGNALING_PATHWAY	2.16	0.002	0.011
	15	KEGG_COMPLEMENT_AND_COAGULATION_CASCADES	2.14	0.000	0.012

HME-ZEB1-RAS

Set	Rank	Name	NES	P value	FDR q-val
Gene Ontology	1	TRANSMEMBRANE_RECEPTOR_ACTIVITY	2.77	0.000	0.005
	2	G_PROTEIN_COUPLED_RECEPTOR_PROTEIN_SIGNALING_PATHWAY	2.47	0.000	0.038
	3	EXTRACELLULAR_REGION	2.35	0.000	0.060
	4	CATION_TRANSPORT	2.30	0.004	0.064
	5	PROTEASE_INHIBITOR_ACTIVITY	2.30	0.000	0.052
	6	RECEPTOR_ACTIVITY	2.27	0.000	0.052
	7	NERVOUS_SYSTEM_DEVELOPMENT	2.27	0.002	0.045
	8	CYTOKINE_BINDING	2.24	0.000	0.048
	9	DI__TRI_VALENT_INORGANIC_CATION_TRANSPORT	2.21	0.004	0.054
	10	CELL_SURFACE_RECEPTOR_LINKED_SIGNAL_TRANSDUCTION_GO_0007166	2.20	0.000	0.050
	11	LIGAND_GATED_CHANNEL_ACTIVITY	2.19	0.002	0.050
	12	CELLULAR_DEFENSE_RESPONSE	2.18	0.002	0.049
	13	VESICLE_MEDIATED_TRANSPORT	2.17	0.006	0.049
	14	G_PROTEIN_COUPLED_RECEPTOR_ACTIVITY	2.12	0.004	0.065
	15	CALCIUM_CHANNEL_ACTIVITY	2.12	0.004	0.062

HME-ZEB1-RAS

Set	Rank	Name	NES	P value	FDR q-val
KEGG pathways	1	KEGG_NEUROACTIVE_LIGAND_RECEPTOR_INTERACTION	3.33	0.000	0.000
	2	KEGG_MAPK_SIGNALING_PATHWAY	2.78	0.000	0.001
	3	KEGG_CELL_ADHESION_MOLECULES_CAMS	2.69	0.000	0.001
	4	KEGG_GRAFT_VERSUS_HOST_DISEASE	2.26	0.002	0.016
	5	KEGG_ALLOGRAFT_REJECTION	2.19	0.000	0.023
	6	KEGG_CYTOKINE_CYTOKINE_RECEPTOR_INTERACTION	2.14	0.000	0.027

7	KEGG_CALCIIUM_SIGNALING_PATHWAY	2.07	0.000	0.035
8	KEGG_ENDOCYTOSIS	2.07	0.004	0.031
9	KEGG_VIRAL_MYOCARDITIS	2.06	0.000	0.030
10	KEGG_ANTIGEN_PROCESSING_AND_PRESENTATION	2.04	0.006	0.031
11	KEGG_B_CELL_RECEPTOR_SIGNALING_PATHWAY	2.04	0.000	0.029
12	KEGG_RIG_I_LIKE_RECEPTOR_SIGNALING_PATHWAY	2.02	0.002	0.030
13	KEGG_VEGF_SIGNALING_PATHWAY	2.01	0.002	0.029
14	KEGG_AUTOIMMUNE_THYROID_DISEASE	2.01	0.008	0.027
15	KEGG_TYPE_I_DIABETES_MELLITUS	1.98	0.012	0.031

HME-shP53-RAS

Set	Rank	Name	NES	P value	FDR q-val
Gene Ontology	1	TRANSMEMBRANE_RECEPTOR_ACTIVITY	3.34	0.000	0.000
	2	RECEPTOR_ACTIVITY	3.11	0.000	0.000
	3	ORGAN_DEVELOPMENT	2.96	0.000	0.000
	4	EXTRACELLULAR_REGION	2.90	0.000	0.001
	5	EXTRACELLULAR_REGION_PART	2.78	0.000	0.001
	6	TISSUE_DEVELOPMENT	2.51	0.000	0.010
	7	G_PROTEIN_COUPLED_RECEPTOR_PROTEIN_SIGNALING_PATHWAY	2.45	0.000	0.014
	8	G_PROTEIN_COUPLED_RECEPTOR_ACTIVITY	2.43	0.002	0.013
	9	SYSTEM_PROCESS	2.30	0.000	0.028
	10	CYTOKINE_BINDING	2.28	0.002	0.030
	11	CELL_SURFACE_RECEPTOR_LINKED_SIGNAL_TRANSDUCTION_GO_0007166	2.27	0.000	0.028
	12	POSITIVE_REGULATION_OF_HYDROLASE_ACTIVITY	2.27	0.000	0.026
	13	ECTODERM_DEVELOPMENT	2.21	0.002	0.035
	14	EXTRACELLULAR_SPACE	2.11	0.002	0.059
	15	PROTEASE_INHIBITOR_ACTIVITY	2.11	0.000	0.057

HME-shP53-RAS

Set	Rank	Name	NES	P value	FDR q-val
KEGG pathways	1	KEGG_NEUROACTIVE_LIGAND_RECEPTOR_INTERACTION	2.63	0.000	0.005
	2	KEGG_CELL_ADHESION_MOLECULES_CAMS	2.38	0.000	0.017
	3	KEGG_AUTOIMMUNE_THYROID_DISEASE	2.14	0.006	0.064
	4	KEGG_VIRAL_MYOCARDITIS	2.07	0.002	0.069
	5	KEGG_ALLOGRAFT_REJECTION	1.90	0.008	0.153
	6	KEGG_ECM_RECEPTOR_INTERACTION	1.87	0.004	0.144
	7	KEGG_MAPK_SIGNALING_PATHWAY	1.85	0.013	0.136
	8	KEGG_GRAFT_VERSUS_HOST_DISEASE	1.84	0.017	0.131
	9	KEGG_LYSOSOME	1.80	0.012	0.142
	10	KEGG_RIG_I_LIKE_RECEPTOR_SIGNALING_PATHWAY	1.79	0.016	0.132
	11	KEGG_CYTOKINE_CYTOKINE_RECEPTOR_INTERACTION	1.75	0.018	0.150
	12	KEGG_LEUKOCYTE_TRANSENDOTHELIAL_MIGRATION	1.70	0.026	0.177
	13	KEGG_TYPE_I_DIABETES_MELLITUS	1.68	0.031	0.181
	14	KEGG_ANTIGEN_PROCESSING_AND_PRESENTATION	1.62	0.043	0.227
	15	KEGG_FOCAL_ADHESION	1.61	0.049	0.221

Tableau 7 : Top 15 GO terms or KEGG pathway enriched in genes up regulated by MBD2 depletion in HMLER, HME-ZEB1-RAS or HME-shP53-RAS (GSEA analysis).

NES: Normalized Enrichment Scores. FDR: False Discovery Rate.

II) Etude du rôle de ZBTB4 dans la répression transcriptionnelle dépendante de la méthylation de l'ADN

Guillaume Devailly, Mélodie Grandin, Pauline Mathot, Anne-Pierre Morel, Pierre-Antoine Defossez et Robert Dante ont participé à ce travail.

A) Résumé

La répression transcriptionnelle de l'ADN méthylé fait intervenir des protéines capables d'interagir spécifiquement avec l'ADN méthylé et recrutant des complexes répresseurs sur ces régions. Il a été proposé que KAISO/ZBTB33, ZBTB4 et ZBTB38 pouvaient jouer un tel rôle. Si les données *in vitro* disponibles jusqu'à présent sont convaincantes, il n'a pas encore été clairement démontré que la protéine ZBTB4 endogène pouvait se lier et réprimer l'ADN méthylé *in vivo*.

Nous avons analysés par RNAseq les modifications de transcriptome induites par une déplétion de ZBTB4 par siRNA. Les gènes surexprimés après déplétion de ZBTB4 le sont aussi après traitement à l'agent déméthylant 5-aza-deoxycytidine ou après déplétion de MBD2. Ils sont de plus globalement méthylés au niveau de leur promoteur. De plus, nous avons réalisé des immuno-précipitations de chromatine contre la protéine ZBTB4 endogène, qui semblent montrer qu'une partie des zones de fixation de cette protéine correspond à des régions méthylées de l'ADN. Ces données semblent donc confirmer que ZBTB4 endogène soit capable de réprimer la transcription de gènes méthylés *in vivo*.

B) Introduction

Chez les mammifères, la méthylation des sites CpG localisés sur un promoteur de gène est associé à une répression transcriptionnelle [256]. Cette répression transcriptionnelle liée à la méthylation de l'ADN est induite par la combinaison de plusieurs mécanismes [315] : i) des facteurs de transcriptions activateurs ne reconnaissent plus leurs sites de fixations lorsqu'ils sont méthylés. Cela peut induire une baisse de la transcription de leurs cibles méthylés par absence d'activation. ii) des protéines interagissant spécifiquement à l'ADN méthylé sont capables d'induire une répression transcriptionnelle en recrutant des complexes répresseurs sur les régions méthylés.

Filion *et al.* [203] ont proposé que trois protéines à doigt de zinc homologues faisaient partie des protéines interagissant spécifiquement à l'ADN méthylé et induisaient une répression transcriptionnelle de cet ADN : KAISO (ZBTB33), ZBTB4 et ZBTB38. Ces protéines sont capables *in vitro* de lier des sites méthylés et non méthylés d'ADN de façon dépendante de la séquence [130]. ZBTB4 est capable de réprimer la transcription de *CDKN1A* (p21CIP1) [208] et *SP1*, *SP3* et *SP4* [209]. L'expression de *ZBTB4* est fréquemment diminuée dans les cancers du sein [209] et son expression est corrélée à une meilleure survie des patients atteints de cancers de la prostate [316].

Cependant son rôle de répresseur transcriptionnel dépendant de l'ADN méthylé est très largement issu d'observations *in vitro*. De plus, un ChIPseq (immuno-précipitation de chromatine suivie de séquençage haut débit des fragments d'ADN précipités) de la protéine KAISO endogène n'a pas permis de mettre en évidence une fixation préférentielle sur l'ADN méthylé [132]. La réalité et l'importance *in vivo* d'une activité de répresseur transcriptionnel lié à la méthylation de l'ADN de ZBTB4 reste donc une source d'interrogations.

Nous avons analysés par RNAseq les modifications de transcriptome induites par une déplétion de ZBTB4 par siRNA. Les gènes surexprimés après déplétion de ZBTB4 sont aussi surexprimés après traitement à l'agent déméthylant 5-aza-deoxycytidine ou après déplétion de MBD2. Ils sont globalement méthylés au niveau de leur promoteur, et présentent une densité plus élevée de séquences de types Z4BS. De plus, nous avons réalisé un ChIPseq de ZBTB4 endogène dans deux lignées cellulaires. Les enrichissements observés sont faibles mais semblent indiquer qu'une partie des sites de fixation de cette protéine correspondent à des régions d'ADN méthylés. Ces résultats sont donc compatibles avec un rôle de répresseur transcriptionnelle dépendant de la méthylation de l'ADN de ZBTB4.

C) Matériels et méthodes

Nom de région	Amorce sens	Amorce anti-sens	Tm (°C)
14q32.11	TCACTCTGTTGGTAGGGGGT	GGCCTGCTATGTGGTAGCAT	60
17q25.3	GGGAAAGTGCCTTGCTCTCCA	CGCTCCTCTCTGCCCAGG	60
18q23	AGGAAACCCATTTCCAGCCC	AAGAAGCAGTCCTGGCCATC	60
20q13.12	CCTGTCTCTGTGTCACCACC	ACCAGCCACGATAAATGGCA	60
9q21.12	TGCGGAGCGTTTGAAGTAGT	ACAGGAAATACTGGCCACTGAG	60
14q11.2	GCTGTCTGAATGTCGTGCAAA	GAACCAGGCATGCTCTTTTCG	60

Tableau 8 : Séquences des amorces de qPCR utilisés dans cette étude.

1) Cultures cellulaires, traitements et microscopie confocale

Les lignées cellulaires HMEC-hTERT et HMLER ont été généreusement fournies par Anne-Pierre Morel (CRCL, Lyon, France). Elles ont été cultivées selon les instructions précédemment données [23], [275].

Les différents traitements ont été réalisés en plaques 6 puits. Environ 1.10^5 cellules ont été mises en culture dans chaque puits la veille des traitements. Le traitement déméthylant fut réalisé en traitant les cellules tout les jours pendant trois jours avec 10 μ M de 5-aza-deoxycytidine (Sigma-Aldrich). Les transfections de siRNA ont été réalisées en utilisant 100 pMol de siRNA témoins (*Mission siRNA Universal Controls #1*, Sigma-Aldrich), de siRNA ciblant ZBTB4 (5'-GCUCAAUACACUCAAGCUCdTdT-3', Eurofins Genomics), ou de siRNA ciblant MBD2 (5'-GGAGGAAGUGAUCCGAAAdTdT-3', Eurofins Genomics), transfectés à l'aide de la Lipofectamine-2000 (Life Technologies) selon les instructions du fabricant. Les cellules ont été collectées 72h après transfection. Les transfections de plasmides codant pour des protéines fusion MBD2-RFP et ZBTB4-GFP, généreusement fournis par Pierre-Antoine Defossez (Paris-Diderot, Paris, France), ont été réalisées avec 4 μ g de chaque plasmides à l'aide de la Lipofectamine-2000. Les cellules ont été cultivées directement sur lamelles, traitées au paraformaldéhyde 4% pendant 20 minutes, et montées sur une lame dans du milieu de montage contenant du DAPI. Les cellules ont été observées en microscopie confocale à la plateforme CCQ (Lyon, France).

2) Immuno-blots

Environ 1.10^6 cellules furent lysées dans du *NuPage LDS Sample Buffer* contenant le *Reducing Agent* (Life Technologies). Les lysats furent soumis à une sonication modérée et chauffés à 95°C durant 10 minutes. Après migration et transfert, les membranes furent incubées avec soit l'anticorps ciblant ZBTB4 fourni par Pierre-Antoine Defossez, soit un anticorps ciblant l'Actine (Sigma-Aldrich, A5441).

3) Extractions d'ARN

Des ARN totaux ont été extraits avec le *NucleoSpin RNA Kit* (Macherey-Nagel) en suivant les instructions du fabricant. La pureté et l'intégrité des ARN furent analysées sur gel d'agarose, et les ARN ont été quantifiés à l'aide d'un NanoDrop 1000 (Thermo Scientific). Des mélanges de cinq expériences ont été envoyés à Montpellier GenomiX (Montpellier, France) pour séquençage haut débit (RNAseq).

4) Précipitation d'ADN méthylé et séquençage haut débit

De l'ADN génomique a été purifié en utilisant le QIAmp DNA Mini Kit (Qiagen). Il fut fragmenté à une taille moyenne comprise entre 300 et 500 paires de bases par sonication. Les précipitations d'ADN méthylés (MeDP) ont été réalisées en utilisant le MethylMiner Methylated DNA Enrichment Kit (Life Technologies) à l'aide d'1 μ g d'ADN fragmenté. Des mélanges de cinq expériences indépendantes furent envoyés pour séquençage haut débit (MeDPseq) au Beijing Genomics Institutes (Hong-Kong, Chine).

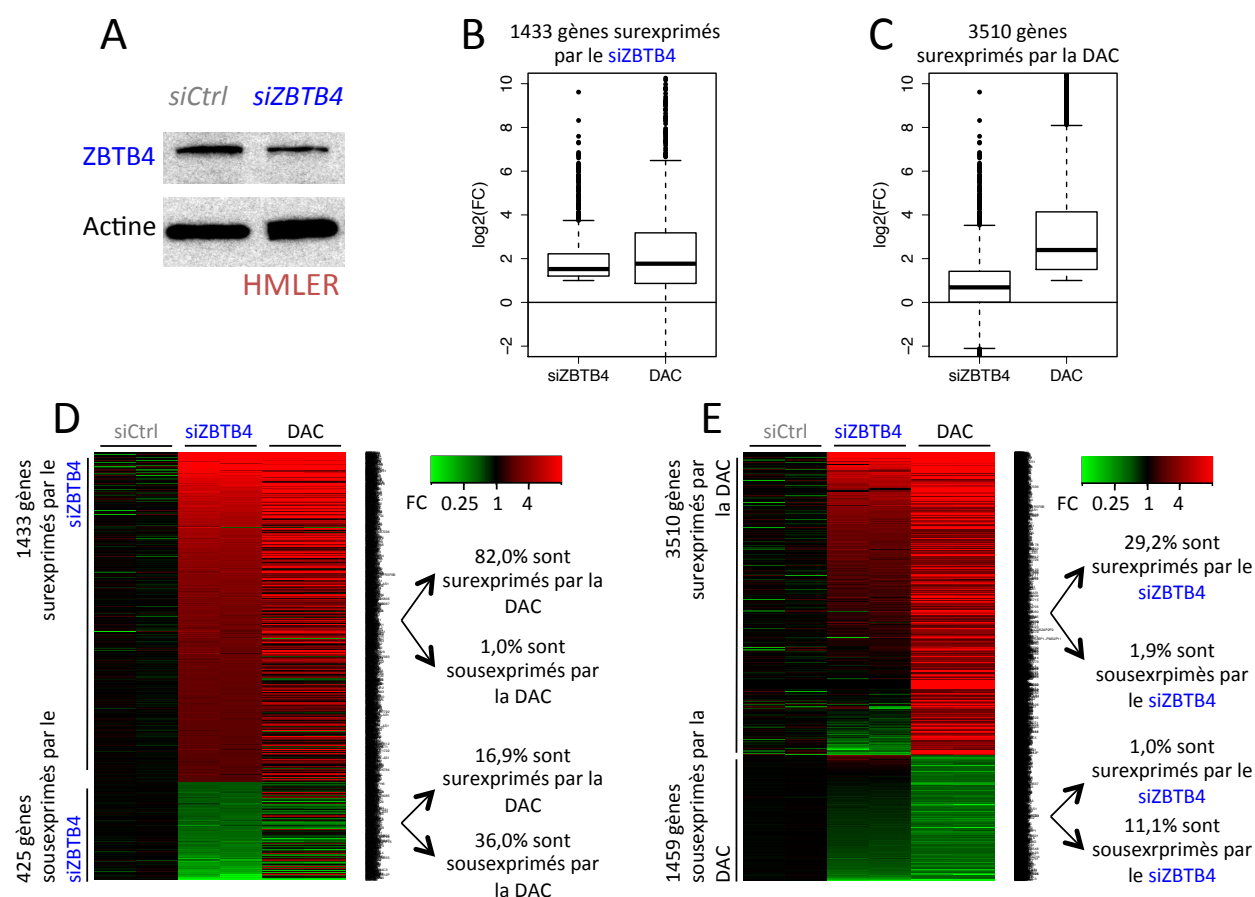


Figure 26 : Les gènes surexprimés par une déplétion de ZBTB4 le sont aussi après traitement à la 5-aza-déoxycytidine.

A. Le siRNA dirigé contre ZBTB4 entraîne une baisse du niveau de la protéine ZBTB4. **B.** Les 1433 gènes surexprimés plus d'une fois ($fold\ change \geq 1$ et $p\ value \leq 0.01$) sont globalement surexprimés par un traitement à la 5-aza-deoxycytidine. FC : *Fold change*. DAC : 5-aza-deoxycytidine. **C.** Une partie des 3510 gènes surexprimés après traitement à la 5-aza-déoxycytidine l'est aussi après déplétion de ZBTB4. **D et E.** Visualisation des changements d'expressions induits après déplétion de ZBTB4 par siRNA ou traitement à la 5-aza-deoxycytidine pour les gènes dérégulés par une déplétion de ZBTB4 (**D**) ou ceux dérégulés par un traitement à la 5-aza-deoxycytidine (**E**).

5) Immuno-précipitations de chromatine, qPCR et séquençage haut débit

Les immuno-précipitations de chromatines (ChIP) dirigées contre ZBTB4 ont été réalisées comme décrit précédemment [276]. En résumé, de la chromatine fragmentée (avec une taille moyenne de fragment compris entre 300 et 500 paires de base) fut obtenue par sonication de noyaux de cellules préalablement traités au formaldéhyde 1,2%. Le ChIP fut réalisé à l'aide d'un anticorps polyclonal ciblant ZBTB4 généreusement fournis par Pierre-Antoine Defossez (ChIPseq) ou de l'anticorps polyclonal ciblant ZBTB4 CS-142-100 (Diagenode, ChIP-qPCR), et avec le ChIP Assay Kit (Merck Millipore) selon les instructions du fabricant. L'ADN précipité fut ensuite purifié à l'aide du *NucleoSpin Gel and PCR Clean-up kit* (Machery-Nagel) en suivant les instructions du protocole *DNA clean-up of samples containing SDS* du fabricant. Les fractions *Bound* et *Input* ont été dosées par fluorimétrie (Qubit 2.0, Life Technologies). Des mélanges de cinq expériences indépendantes furent envoyés à la plateforme

PorfilXpert (Lyon, France) pour séquençage haut débit (ChIPseq). Alternativement, des enrichissements des fractions *Bound* relatifs aux fractions *Input* furent détectés pour plusieurs régions par qPCR (iQ SYBR Green supermix, Biorad) en utilisant des amorces dont la séquence peut être trouvée dans le Tableau 8.

6) Analyses bioinformatiques

Les *reads* issus des RNAseq furent alignés sur le génome UCSC *Homo sapiens* hg19 en utilisant TopHat2 [279]. L'analyse d'expression différentielle fut réalisée comme décrit dans la référence [280], en utilisant notamment edgeR [281]. Seuls les gènes ayant une valeur RPM (*reads per million*) supérieure à 1 dans au moins un des échantillons furent intégrés à la suite de l'analyse. L'analyse des catégories *Gene Ontology* et *KEGG pathway* corrélés avec les changements de transcriptome observés après déplétion de ZBTB4 a été réalisée en utilisant *Gene Set Enrichment Analysis* [282].

Les *reads* issus du MeDPseq et du ChIPseq furent alignés sur le génome UCSC *Homo sapiens* hg19 en utilisant Bowtie [283]. Les *reads* présents à plusieurs reprises ont été filtrés avec SAMTools [284] pour limiter les biais induits par les PCR. Une détection de *peaks* préliminaire a été faite avec MACS [285]. Des régions sur-séquencées ont été définies comme des régions de 500 paires de bases contenant plus de trois fois le nombre médian de *reads* par 500 paires de bases dans au moins un des Input-seq. Les *peaks* chevauchant ces régions sur-séquencées furent filtrés, car elles représentent des zones probables de faux positifs. Les *peaks* identifiés dans les cellules HMEC-hTERT et HMLER furent comparés avec MANorm [286] et les listes finales de *peaks* construites comme le regroupement des *peaks* communs aux deux lignées cellulaires avec les *peaks* spécifiques d'une des deux lignées ($p \text{ value} \leq 0.01$). La densité en *reads* en diverses régions du génome fut visualisée à l'aide de Sushi.R [287]. Les regroupements de *peaks* par clusterisation K-mean et la visualisation de ces clusters fut réalisée avec seqMINER [288].

Les motifs Z4BS ont été cartographiés sur le génome en utilisant Cisgenome [317]. L'analyse intégrative des RNAseq, MeDPseq et localisation des Z4BS a été réalisée à l'aide de R/Bioconductor et de Repitools [289].

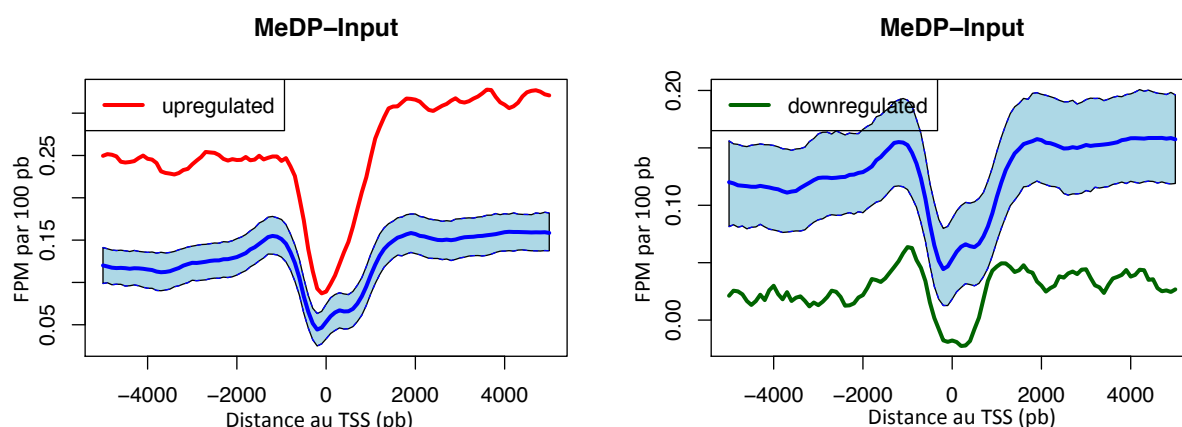


Figure 27 : Niveaux de méthylations moyens du promoteurs des gènes dérégulés par une déplétion de ZBTB4.

La méthylation moyenne du promoteur des gènes a été estimée par MeDPseq. En bleu : profil de méthylation moyen de tout les gènes. En rouge : profil de méthylation du promoteur des gènes surexprimés après déplétion de ZBTB4. En vert : profil de méthylation du promoteur des gènes sous-exprimés après déplétion de ZBTB4. Aire bleu clair : intervalle de confiance à 97,5 %. FPM : Fragments par millions.

D) Résultats

1) Les gènes surexprimés après une déplétion de ZBTB4 sont des gènes méthylés

Afin de savoir si ZBTB4 participe à la répression transcriptionnelle des gènes méthylés sur leur promoteur, nous avons analysé en parallèle les modifications de transcriptome induites par une déplétion de ZBTB4 par siRNA (Figure 26A) et par un traitement à la 5-aza-deoxycytidine (DAC) dans les cellules HMLER. La déplétion de ZBTB4 induit une surexpression de 1433 gènes d’au moins deux fois en moyenne dans les deux répliques, et une sous-expression de 425 gènes (Figure 26B). Les gènes surexprimés après déplétions de ZBTB4 sont très largement aussi surexprimés après traitement à la 5-aza-deoxycytidine (Figure 26B et D), ce qui suggère qu’il s’agit principalement de gènes réprimés par la méthylation de l’ADN. Réciproquement, une fraction (de l’ordre de 30% en fonctions des seuils choisis) des gènes surexprimés après traitement à la 5-aza-deoxycytidine l’est aussi après déplétion de ZBTB4. Les gènes sous-exprimés après déplétion de ZBTB4 ne sont qu’assez peu corrélés avec les gènes dérégulés par traitement à la 5-aza-deoxycytidine (Figure 26D et E), suggérant des mécanismes de régulations plutôt indépendants.

L’analyse de la méthylation par MeDPseq du promoteur des gènes surexprimés après déplétion de ZBTB4 montre que ces derniers sont globalement plus méthylés que l’ensemble des gènes (Figure 27A). Ce n’est pas le cas du promoteur des gènes sous-exprimés par une déplétion de ZBTB4 (Figure 27B). Ainsi la répression de gènes par ZBTB4 est associée à une méthylation du promoteur, et l’activation de gènes par ZBTB4 ne l’est pas.

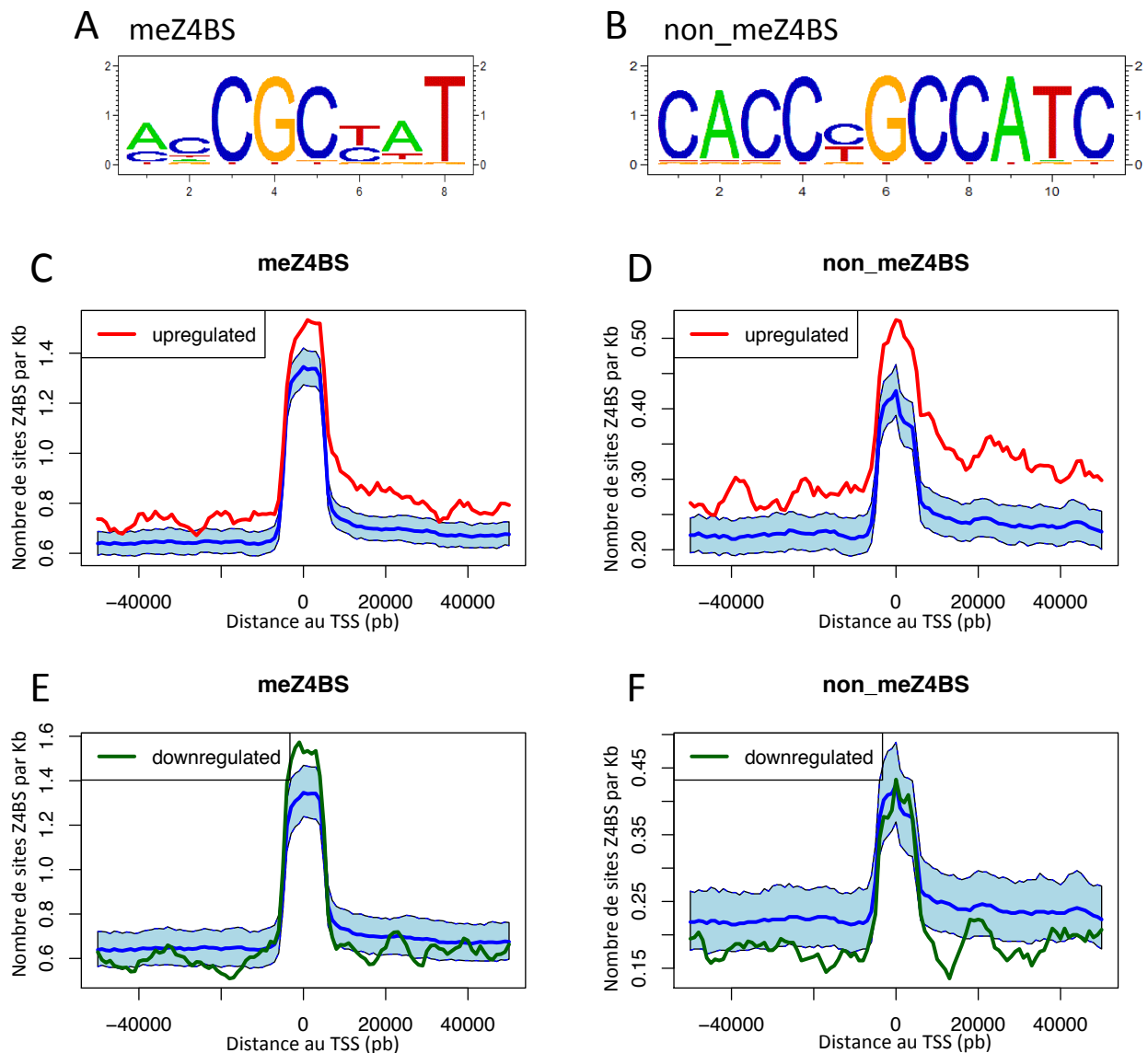


Figure 28 : Densité en sites Z4BS autour des promoteurs des gènes dérégulés par déplétion de ZBTB4.

A et B. Motifs meZ4BS et non_meZ4BS reproduits d'après ceux identifiés par Sasai *et al.* [130] et cartographiés sur le génome. **C-F.** Densité moyenne en sites meZ4BS (**C et E**) et non_meZ4BS (**D et F**) autour du promoteur de tout les gènes (bleu), des gènes surexprimés après déplétion de ZBTB4 (rouge, **C et D**) et des gènes sous-exprimés après déplétion de ZBTB4 (vert, **E et F**). Pour des raisons de lisibilité, le comptage est effectué dans une fenêtre glissante de 10 Kb. Aire bleu clair : intervalle de confiance à 97,5 %.

2) Fonctions des gènes réprimés par ZBTB4

Les gènes surexprimés après déplétions de ZBTB4 ont été analysés par *Gene Set Enrichment Analysis* [282] avec des sets de gènes de types *Gene Ontology* (Tableau 9) ou *KEGG pathways* (Tableau 10). Les sets de gènes identifiés ont des fonctions diverses mais sont fréquemment en lien avec régions extracellulaires ou membranaires.

3) Les gènes surexprimés après déplétions de ZBTB4 ont légèrement plus de sites Z4BS sur leur promoteur

Sasai *et al.* [130] ont identifié par SELEX des motifs de fixation de ZBTB4 sur l'ADN méthylé (meZ4BS, Figure 28A) ou non méthylé (non_meZ4BS, Figure 28B). Afin de savoir si les gènes dérégulés après déplétions de ZBTB4 possédaient ces séquences sur leur promoteur, nous avons cartographié ces consensus sur le génome humain. Les 1433 gènes surexprimés après déplétion de ZBTB4 présentent une densité en site meZ4BS (Figure 28C) et non_meZ4BS (Figure 28D) légèrement plus importante que l'ensemble des gènes analysés. Les 425 gènes sous-exprimés après déplétion de ZBTB4 présentent un taux de meZ4BS localement plus élevé autour du TSS que l'ensemble des gènes analysés (Figure 28E). Aucun enrichissement en sites non_meZ4BS n'a été observé concernant ces gènes sous-exprimés (Figure 28F).

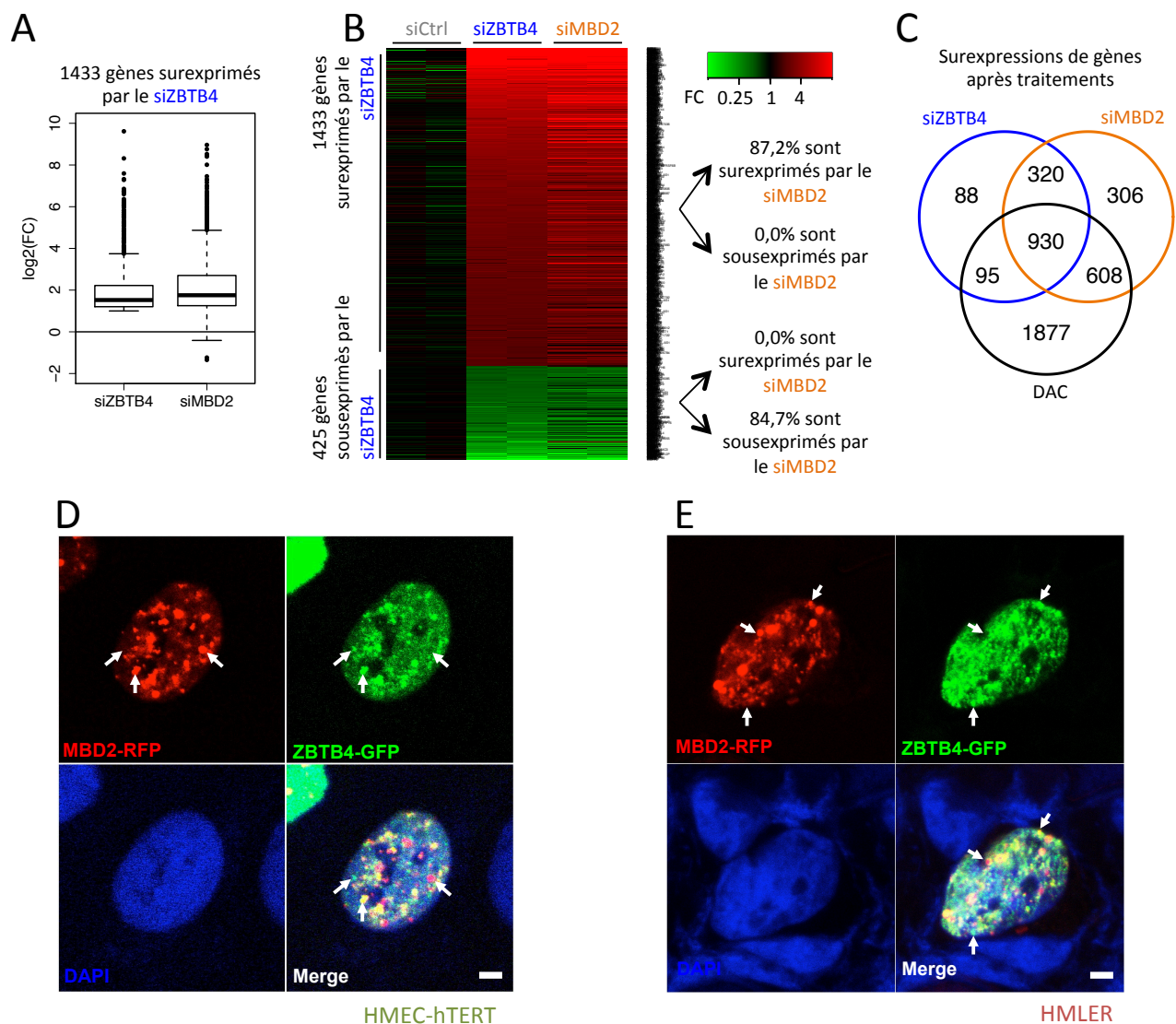


Figure 29 : Un ensemble de gènes réprimés conjointement par ZBTB4 et MBD2.

A. Les 1433 gènes surexprimés après déplétion de ZBTB4 sont globalement aussi surexprimés après déplétion de MBD2. FC : Fold change. **B.** Visualisation de l'impact de la déplétion de ZBTB4 ou de MBD2 sur la transcription des gènes dérégulés après déplétion de ZBTB4. **C.** Diagramme de Venn des gènes

surexprimés ($FC \geq 1$, $p \text{ value} \leq 0.01$) après déplétion de ZBTB4 (bleu), déplétion de MBD2 (orange) et traitement à la 5-aza-deoxycytidine (DAC, noir). **D et E.** Images de microscopie confocale de noyaux de cellules HMEC-hTERT (**D**) et HMLER (**E**) transfectées avec des plasmides codant pour les protéines fusions MBD2-RFP et ZBTB4-GFP. La barre blanche est longue d'1 μm .

4) Un ensemble de gènes réprimés conjointement par ZBTB4 et MBD2

ZBTB4 semble donc impliqué dans la répression transcriptionnelle de nombreux gènes méthylés. Nous avons comparé nos données de modification du transcriptome après déplétion de ZBTB4 avec celles précédemment obtenues après déplétion de MBD2¹. Les gènes surexprimés par déplétion de ZBTB4 sont très largement aussi surexprimés après déplétion de MBD2 (Figure 29A-C). En revanche, une moitié des gènes surexprimés après déplétion de MBD2 ne sont pas touchés par la déplétion de ZBTB4 (Figure 29C). Ces résultats suggèrent que de nombreux gènes méthylés seraient réprimés à la fois par MBD2 et ZBTB4.

Afin de savoir si MBD2 et ZBTB4 pouvaient colocaliser sur un certain nombre de régions du génome, des cellules HMEC-hTERT et HMLER ont été transfectées avec des gènes de protéines fusions *MBD2-RFP* et *ZBTB4-GFP* (Figure 29D et E). Les deux transgènes codent pour des protéines fusions entièrement localisées dans le noyau. Ces protéines semblent éviter les nucléoles, et sont retrouvées dans le reste du noyau soit de façon diffuse, soit sous forme de *foci*. Trois types de *foci* peuvent être observés : des *foci* uniquement marqués par la RFP, des *foci* uniquement marqués par la GFP et des *foci* où les marquages RFP et GFP sont conjointement observés. MBD2-RFP et ZBTB4-GFP sont donc colocalisées en de nombreux endroits du noyau. Cela suggère que ces deux protéines peuvent être capables de se fixer sur des régions proches de l'ADN.

L'ensemble de ces résultats suggère qu'un certain nombre de gènes sont réprimés conjointement par MBD2 et ZBTB4.

¹ Cf supra p 58.

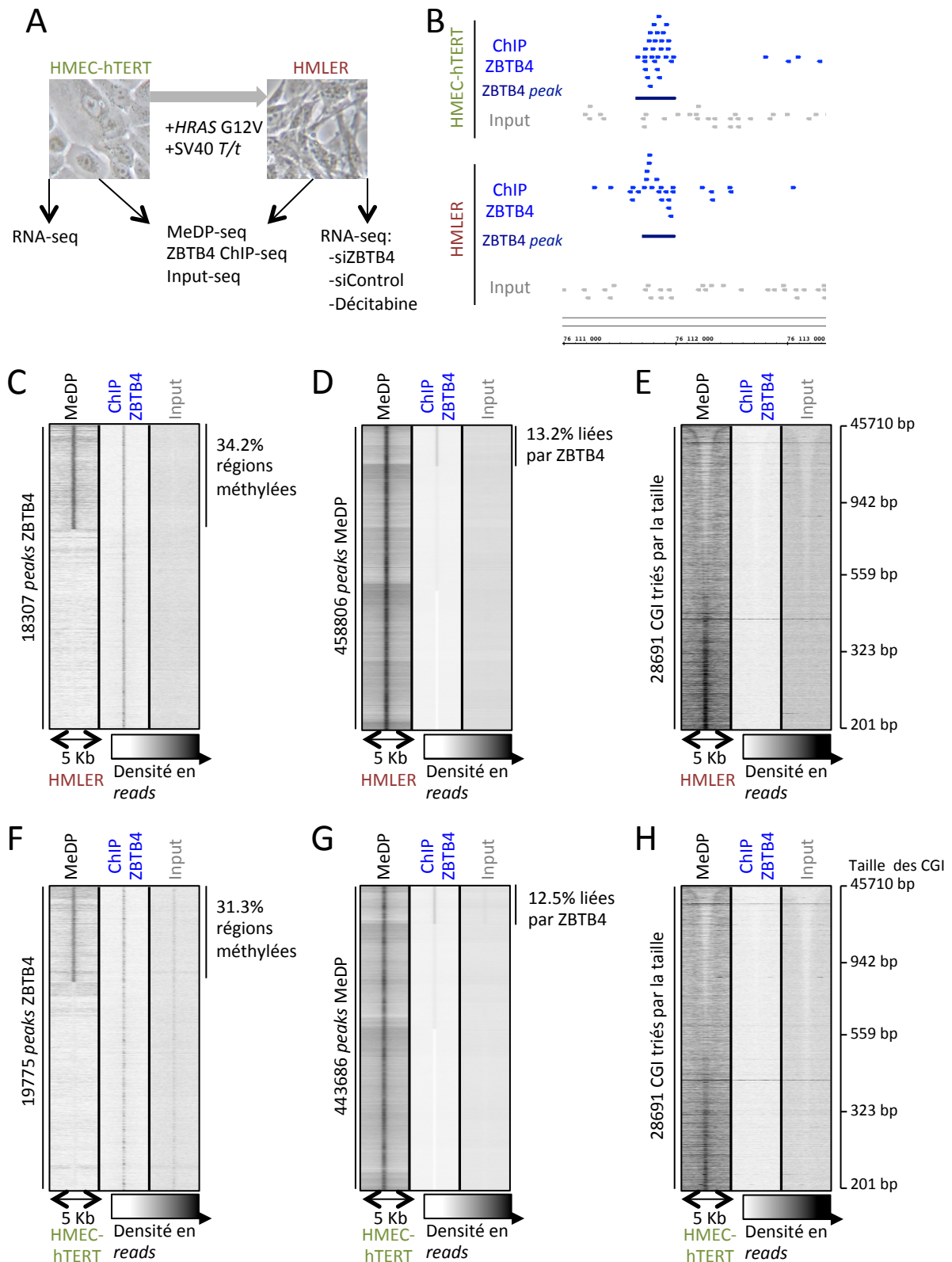


Figure 30 : Des régions méthylées sont enrichies par un ChIPseq ZBTB4.

A. Schéma expérimental. La lignée cellulaire transformée HMLER dérive de la lignée HMEC-hTERT par transformation oncogénique induite par les oncogènes *T/t* du virus SV40 et une forme mutée de *HRAS*. Tous les séquençages réalisés l'ont été sur des ensembles de cinq expériences indépendantes. **B.** Visualisation des *reads* sur un *peak* ZBTB4 présent dans les deux lignées cellulaires. Bleu : *reads* issus du ChIPseq ZBTB4. Bleu foncé : *peak* ZBTB4. Gris : *reads* issus de l'Input-seq. **C-F.** Densité en *reads* du MeDPseq, ChIPseq ZBTB4 et de l'Input-seq, au niveau des *peaks* ZBTB4 (**C,F**), des régions méthylées (**D,G**), et des îlots CpG (**E, H**). **C-E.** Lignée HMLER. **F-H.** Lignée HMEC-hTERT.

5) Certains sites de fixations de ZBTB4 sont méthylés

Nous avons essayé de déterminer les sites de fixations de ZBTB4 par ChIPseq dans un modèle cellulaire syngénique de transformation tumoral. Des cellules épithéliales mammaires humaines ont été immortalisées avec le gène de l'unité catalytique de la télomérase (lignée HMEC-hTERT). Ces dernières ont été transformées à l'aide des oncogènes *T/t* du virus SV40 et de *HRAS^{v12}* (lignée HMLER, Figure 30A). Contrairement à la lignée HMEC-hTERT, la lignée HMLER est capable de former des tumeurs lorsqu'elle est xénotransplantée chez une souris immunodéprimée [23], [275].

Le ChIPseq dans ces lignées a permis l'identification de zones de fixations potentielles de ZBTB4 (par exemple, Figure 30B). En parallèle, nous avons estimé le méthylome de ces cellules par précipitation d'ADN méthylé suivi de séquençage haut débit des fragments précipités (MeDPseq). Environ 30% des zones enrichies dans le ChIPseq ZBTB4 correspondent à des régions méthylées (Figure 30C et F). Cela suggère que ZBTB4 endogène serait capable de se lier *in vivo* sur des régions du génome méthylées ou non méthylées, mais que quantitativement les sites de fixations non méthylés prédominent. Un peu plus de 10% des régions méthylées identifiées en MeDPseq sont enrichies dans le ChIPseq ZBTB4 (Figure 30D et G). En revanche, aucun enrichissement préférentiel de ZBTB4 sur des îlots CpG n'a été mis en évidence (Figure 30E et H), laissant suggérer que les sites de fixations de ZBTB4 sont principalement situés hors îlots CpG.

Les enrichissements observés dans le ChIP ZBTB4 sont très faibles. Nous avons essayé d'en valider certains dans les cellules HMLER par ChIP-qPCR en utilisant un anticorps anti-ZBTB4 différent de celui utilisé pour le ChIPseq (CS-142-100, Diagenode). Parmi les 4 régions positives testées, un enrichissement en ChIP-qPCR fut retrouvé sur 3 régions (14q32.11, 17q25.3 et 18q23, Figure 31A-D), mais pas sur la région 20q13.12 (Figure 31A et E). Deux régions négatives servent ici de témoins négatifs (Figure 31A, F et G). Le ChIPseq ZBTB4 semble donc présenter un taux non négligeable de faux positifs. Nous avons cependant confirmé la présence de ZBTB4 sur une région méthylée (17q25.3) et sur une région non méthylée (18q23).

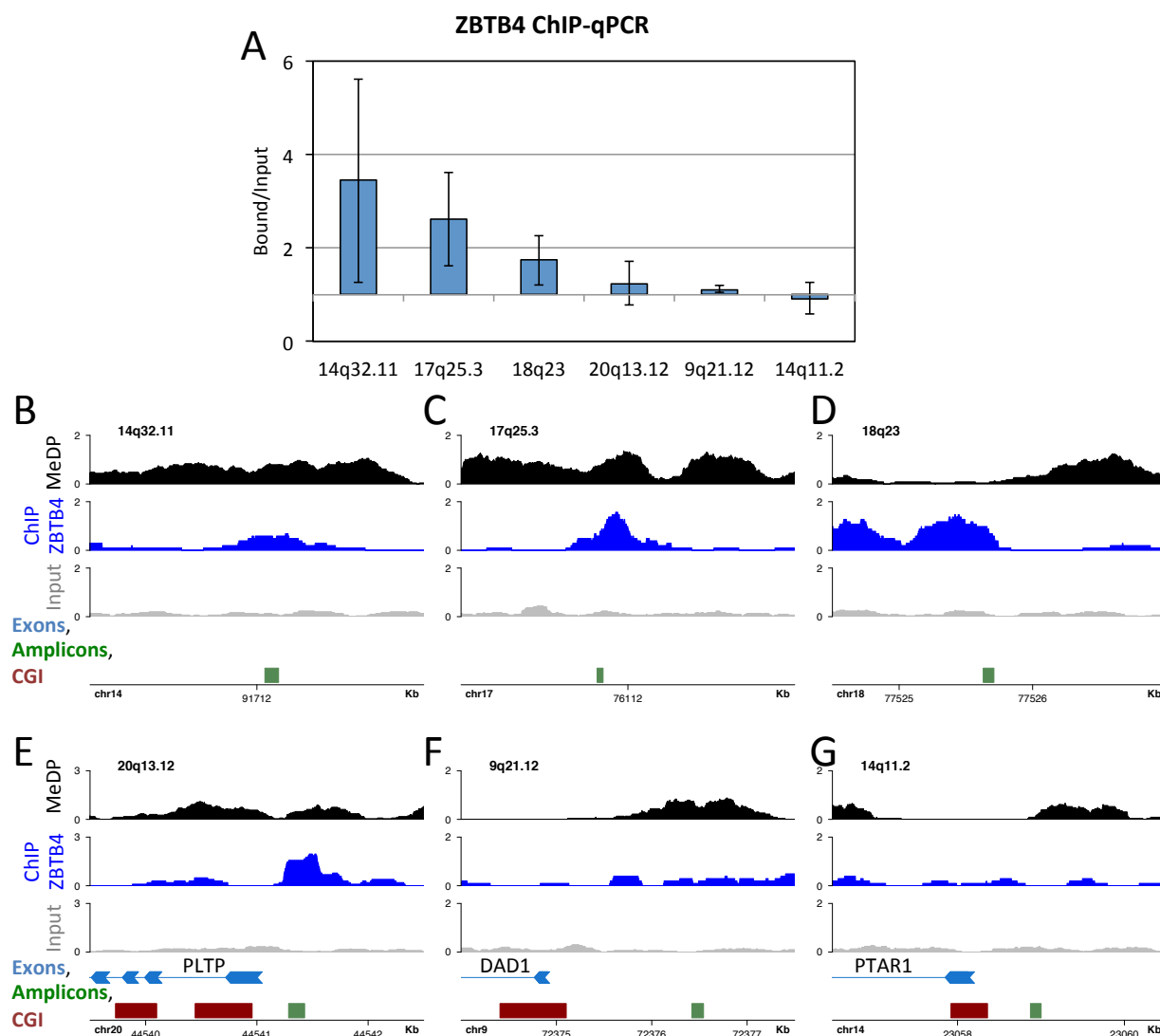


Figure 31 : Validation par ChIP-qPCR de quelques régions identifiées par ChIPseq.

A. Enrichissements observés dans la fraction *Bound* par ChIP-qPCR contre ZBTB4 au niveau de 6 régions génomiques. **B-G.** Visualisation de la densité en *reads* du MeDPseq (noir), du ChIPseq ZBTB4 (bleu) et de l'Input-seq (gris) autour des six régions génomiques étudiées en A. La localisation de l'amplicon est indiquée en vert. Celle des îlots CpG et des gènes en rouge et bleu respectivement. L'unité de couverture est en Fragments par Millions (FPM). L'ensemble de ces résultats a été obtenu dans la lignée HMLER.

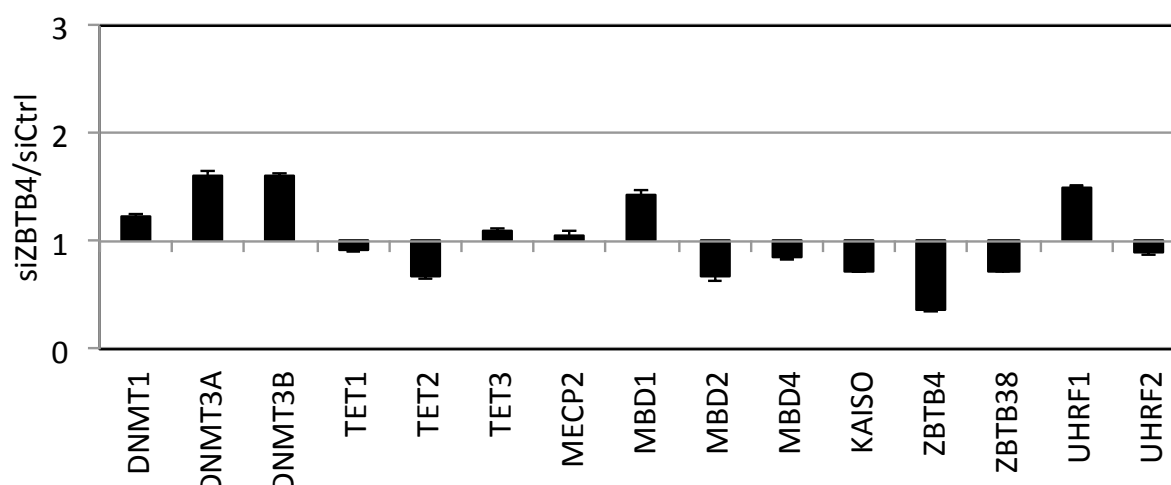


Figure 32 : L'expression des gènes de protéines impliqués dans la méthylation de l'ADN n'est que faiblement modifiée par le traitement au siRNA ciblant ZBTB4.

Les valeurs présentées ici sont issues de l'analyse des RNAseq. Les barres d'erreurs correspondent aux variations observées lors d'un duplicat de séquençage. *DNMT3L* n'était pas assez exprimé / séquençé pour pouvoir estimer son expression de façon fiable d'après nos RNAseq.

E) Discussion

Rang	Nom	NES	P value	FDR q-val
1	EXTRACELLULAR_REGION	4.04	0	0
2	EXTRACELLULAR_REGION_PART	3.89	0	0
3	RECEPTOR_ACTIVITY	3.44	0	0
4	PROTEINACEOUS_EXTRACELLULAR_MATRIX	3.32	0	0
5	CELL_SURFACE_RECEPTOR_LINKED_SIGNAL_TRANSDUCTION_GO_0007166	3.30	0	0
6	TRANSMEMBRANE_RECEPTOR_ACTIVITY	3.27	0	0
7	EXTRACELLULAR_MATRIX	3.14	0	0
8	CELL_CELL_SIGNALING	2.92	0	2.54E-04
9	COLLAGEN	2.90	0	2.26E-04
10	G_PROTEIN_COUPLED_RECEPTOR_PROTEIN_SIGNALING_PATHWAY	2.89	0	2.03E-04
11	EXTRACELLULAR_MATRIX_PART	2.77	0	4.45E-04
12	NERVOUS_SYSTEM_DEVELOPMENT	2.71	0	6.57E-04
13	METAL_ION_TRANSPORT	2.69	0	6.84E-04
14	ION_CHANNEL_ACTIVITY	2.69	0	6.35E-04
15	SYSTEM_PROCESS	2.68	0	6.57E-04

Tableau 9 : 15 premiers termes *Gene Ontology* enrichis dans les gènes surexprimés après déplétion de ZBTB4.

NES : Normalized Enrichment Score. FDR : False Discovery Rate.

Une déplétion de ZBTB4 par siRNA induit plus de surexpression de gènes que de sous-expressions. Même si par RNAseq est observé un mélange d'effets directs et indirects de ZBTB4 sur la transcription, cela semble indiquer une fonction de répresseur transcriptionnel de ZBTB4. Une telle fonction a déjà été proposée par d'autres études [203], [208], [209]. ZBTB4 est notamment capable de recruter le complexe répresseur Sin3/HDAC [208].

Les gènes surexprimés après déplétion de ZBTB4 sont globalement plus méthylés au niveau de leur promoteur, et sont aussi majoritairement surexprimés après traitement à l'agent déméthylant 5-azadéoxycytidine. Cela suggère que les gènes réprimés par ZBTB4 le sont aussi par méthylation de l'ADN, et est consistant avec un rôle de répresseur transcriptionnel dépendant de la méthylation de ZBTB4. Il est cependant essentiel de reproduire ces résultats en utilisant un deuxième siRNA ciblant ZBTB4, d'une part car celui utilisé ici n'est que moyennement efficace, d'autre part pour exclure un peu plus l'hypothèse d'un effet dû à des cibles non voulues réprimées par ce siRNA. Notons que les niveaux de transcription des autres gènes impliqués dans la méthylation de l'ADN sont assez peu affectés par le siRNA ciblant ZBTB4 (Figure 32).

Les gènes surexprimés après déplétions de ZBTB4 présentent un nombre de sites meZ4BS et non_meZ4BS au niveau de leur promoteur supérieur à celui de l'ensemble des gènes. Ces séquences ont été identifiées *in vitro* comme des sites de fixations de ZBTB4 [130]. Cela suggère qu'une partie des effets que nous observons au niveau transcriptomique sont bien dû à des effets directs de ZBTB4.

La grande majorité des gènes surexprimés après déplétion de ZBTB4 l'est aussi après déplétion de MBD2. Ces deux protéines pourraient réprimer la transcription des mêmes gènes et pourraient jouer des rôles partiellement redondants. Ces deux protéines colocalisent dans le noyau lorsqu'elles sont surexprimées sous forme de protéines fusions, mais n'interagissent pas directement à notre connaissance. Leur interaction se fait peut-être via le complexe Sin3A auquel peuvent appartenir ces deux protéines [166], [208].

Rang	Nom	NES	P value	FDR q-val
1	KEGG_ECM_RECEPTOR_INTERACTION	2.94	0	0
2	KEGG_GLYCOSAMINOGLYCAN_BIOSYNTHESIS_CHONDROITIN_SULFATE	2.61	0	2.60E-03
3	KEGG_FOCAL_ADHESION	2.45	0	7.45E-03
4	KEGG_NEUROACTIVE_LIGAND_RECEPTOR_INTERACTION	2.45	0	5.59E-03
5	KEGG_CELL_ADHESION_MOLECULES_CAMS	2.40	0	5.30E-03
6	KEGG_CALCIIUM_SIGNALING_PATHWAY	2.33	0	8.58E-03
7	KEGG_VASCULAR_SMOOTH_MUSCLE_CONTRACTION	2.30	2.11E-03	9.31E-03
8	KEGG_NOTCH_SIGNALING_PATHWAY	2.15	2.00E-03	2.35E-02
9	KEGG_GLYCOSAMINOGLYCAN_DEGRADATION	2.10	4.10E-03	2.73E-02
10	KEGG_AXON_GUIDANCE	2.01	0	4.23E-02
11	KEGG_ARACHIDONIC_ACID_METABOLISM	1.93	8.16E-03	5.98E-02
12	KEGG_GLYCEROPHOSPHOLIPID_METABOLISM	1.92	2.18E-03	5.83E-02
13	KEGG_BASAL_CELL_CARCINOMA	1.90	1.18E-02	6.02E-02
14	KEGG_GLYCOSAMINOGLYCAN_BIOSYNTHESIS_HEPARAN_SULFATE	1.84	1.03E-02	7.81E-02
15	KEGG_DILATED_CARDIOMYOPATHY	1.82	1.61E-02	7.99E-02

Tableau 10 : 15 premier KEGG pathways enrichis dans les gènes surexprimés après déplétion de ZBTB4.

NES : Normalized Enrichment Score. FDR : False Discovery Rate.

Les ChIPseq réalisés ici contre la protéine endogène ZBTB4 semblent indiquer qu'une partie des sites de fixation de cette protéine correspondent à des régions méthylées. Cependant, les enrichissements

observés en ChIPseq ou en ChIP-qPCR sont faibles, ce qui rend difficile à la fois l'interprétation des résultats du ChIPseq et sa validation par ChIP-qPCR. En attendant la mise au point d'un protocole de ChIP plus efficace ou le développement d'un anticorps anti-ZBTB4 plus performant, il est sans doute nécessaire de changer de stratégie. On pourrait par exemple s'inspirer de l'étude de Baubec *et al.* [177] et travailler sur des lignées stables exprimant des versions taguées de ZBTB4, KAISO ou ZBTB38. Les niveaux d'expressions de ces protéines taguées ne seront certes pas nécessairement similaires à celui des protéines endogènes, et ces dernières seront toujours exprimées ce qui peut modifier les sites de fixations de ces protéines taguées par rapport à leurs homologues endogènes, mais cela permettra au moins d'obtenir des enrichissements décentes en ChIPseq, de comparer les sites des fixations de ces trois protéines entre elles à niveau d'expression équivalent, et de savoir si certains de ces sites correspondent à des régions méthylées.

Même si les résultats du ChIPseq doivent être interprétés avec précaution, et si les résultats du RNAseq après déplétion de ZBTB4 demandent à être reproduits à l'aide d'un nouvel siRNA, nos données vont dans le sens d'une confirmation de l'existence d'une fonction de répression transcriptionnelle liée à la méthylation de l'ADN pour ZBTB4.

Ces travaux sont en cours de finalisation. Nous attendons le résultat d'un RNAseq après un deuxième siRNA ciblant ZBTB4 qui permettra, nous l'espérons, de confirmer les résultats obtenus avec le premier. Nous espérons pouvoir les publier par la suite en collaboration avec l'équipe de Pierre-Antoine Defossez.

Discussion et conclusion générale

Par quels mécanismes la méthylation de l'ADN induit-elle une répression transcriptionnelle ?

Malgré l'absence de létalité des *knock out Mecp2* [145], *Mbd1* [159] ou *Mbd2* [167], les résultats obtenus par nous et par d'autres montrent clairement qu'elles jouent un rôle dans cette répression. Elles sont capables de lier l'ADN méthylé *in vitro* [184], et sont retrouvées liées à des régions méthylées de l'ADN *in vivo* (voir par exemple [142], [176], [177] et p 46). Leur déplétion par siRNA est capable d'induire des réexpressions de gènes méthylés sur leur promoteur (voir par exemple [248] et p 46).

Cependant, ces protéines seules n'expliquent pas la totalité de la répression transcriptionnelle liée à la méthylation de l'ADN. D'autres protéines répressives de liaisons à l'ADN méthylés jouent probablement ce rôle. KAISO, ZBTB4, ZBTB38, ZFP57, MBD4, UHRF1, UHRF2, DNMT1, DNMT3A et DNMT3B font partie de la liste des candidats les plus prometteurs. Obtenir une idée précise du rôle de ces protéines de liaison à l'ADN méthylé dans la répression transcriptionnelle de ces régions passera soit par la mise au point de nouveaux outils, tel que des anticorps efficaces en ChIPseq sur les protéines endogènes ou la générations de souris *knock-out* pour de nouvelles combinaisons de protéines de liaisons à l'ADN méthylé, soit sera rendu difficile devant les rôles pléiotropes jouées par centaines de ces protéines dans la synthèse ou la maintenance de la méthylation de l'ADN (sont concernées en particulier les protéines DNMT1, DNMT3A, DNMT3B, UHRF1, UHRF2, ZFP57 et MBD4).

Cette étude c'est focalisée sur MBD2 et ZBTB4. MBD2 est travaillé depuis longtemps dans le laboratoire, et a fait l'objet de précédentes publications [276], [277], [291]. Un anticorps fonctionnant en ChIP contre la protéine MBD2 endogène a été mis au point par le laboratoire. Un tel anticorps était une chose rare au début de ma thèse. Outre ces aspects purement techniques, le choix de travailler sur la protéine MBD2 a aussi été dictée par son grand intérêt scientifique : il s'agit de la protéine liant l'ADN méthylé du complexe MeCP1 (le premier complexe répresseur de l'ADN méthylé identifié historiquement¹), MBD2 réprime de nombreux gènes répresseurs de tumeurs dans de nombreux cancers², et il s'agit, au moins au niveau transcriptionnel, de la MBP répressive la plus abondante dans les modèles cellulaires utilisés (HMEC-hTERT, HMLER, *etc.*). Nous voulions explorer les possibles redondances pouvant exister entre protéines de liaisons à l'ADN méthylé de la famille MBD et de la famille de protéines à doigt de Zinc. Des études préliminaires de ChIP dirigés contre MBD2, KAISO et ZBTB4 sur quelques régions ont montré que ZBTB4 semblait plus souvent lié sur les régions fixées par MBD2 que

¹ Cf supra p 46.

² Cf supra p 46 et p 57.

KAISO. De plus, tout comme MBD2, ZBTB4 est impliqué dans le cancer du sein¹. Il semblait donc intéressant d'étudier ZBTB4 en parallèle de MBD2 dans ce modèle cellulaire syngénique de progression tumorale.

D'autres protéines capables de lier l'ADN méthylé *in vitro* ont été² et seront certainement identifiées en nombre par des méthodes de criblage haut débit. Parmi celles-ci se cachent peut-être des nouveaux répresseurs dépendants de la méthylation de l'ADN. Il reste à valider leur interaction avec l'ADN méthylé *in vivo*, à quantifier l'importance et la spécificité de ces interactions, et à étudier l'impact de ces interactions sur la transcription. Certaines seront peut-être des activateurs transcriptionnels dépendants de la méthylation de l'ADN !

De nombreux facteurs de transcriptions, dont la liste est grandissante, sont chassés de leurs sites de fixations par la méthylation de l'ADN³. Cela peut induire une baisse de la transcription de gènes par défaut de signaux activateurs.

La multiplicité des acteurs recrutés ou chassés par la méthylation de l'ADN, leurs spécificités de séquences, et leurs niveaux d'expressions variables d'un tissu à l'autre fait que l'interprétation des signaux de méthylation de l'ADN passe probablement par des mécanismes complexes et souvent spécifiques d'un promoteur donné (voir par exemple la régulation de l'expression de *TERT* [291]). Cela n'empêche pas bien sûr la formulation de principes généraux, mais limite leur portée.

Les niveaux de transcription des gènes sont extrêmement variables et sont distribués tout le long d'un *continuum*. Quelques gènes ne sont pas du tout exprimés (moins de 0,1 copies par cellules, par exemple). De nombreux gènes sont peu exprimés (entre 0,1 et 100 transcrits par cellules, par exemple). Pour certains d'entre eux, un traitement déméthylant ou une déplétion de MBP répressives induit une hausse de leur niveau de transcription. Le rôle de la méthylation de l'ADN et des MBP répressives est alors de moduler négativement la transcription de ces gènes. Ainsi, nos données⁴ suggèrent que MBD2 induit une basse modérée de la transcription de ses gènes cibles, mais pas une extinction totale de leur niveau de transcription. Sa force de répression transcriptionnelle semble d'autant plus forte que son site de fixation est situé proche du site d'initiation de la transcription [176]. On peut aussi imaginer une force répressive dépendant de la conformation locale de la zone régulatrice, analysable par exemple par des techniques de *chromosome conformation capture* (3C). Le signal de méthylation de l'ADN et son interprétation font donc partie d'un ensemble de mécanismes permettant une modulation fine et

¹ Cf supra p 50 et p 57.

² Cf supra p 52.

³ Cf supra p 33.

⁴ Cf supra p 58.

spécifique du niveau de transcription des gènes, qui ne peut se résumer entièrement en une distinction dichotomique de gènes exprimés ou non exprimés.

Les protéines de liaison à l'ADN méthylé sont-elles impliquées dans la régulation de l'épissage des gènes ? Les exons sont en effet plus méthylés [63] et plus liés par MECP2 [89] que les introns. En cas d'épissage alternatif, les exons inclus sont plus méthylés et plus liés à MECP2 que les exons exclus [89]. Un traitement à la 5-aza-deoxycytidine ou une déplétion de MECP2 induisent des sauts d'exon optionnel plus fréquents [89]. Une des hypothèses expliquant ces observations serait que la présence de MECP2 sur ces exons participe au ralentissement de l'ARN polymérase II, ce qui faciliterait le travail de la machinerie d'épissage. Ce rôle est-il extensible à d'autres protéines de liaisons à l'ADN méthylé ? Nous n'avons pas réussi à le mettre en évidence pour MBD2, principalement par manque de profondeur des séquençages RNAseq, ce qui rend difficile l'identification et la quantification des événements d'épissages. Savoir si les protéines de liaisons à l'ADN méthylé sont capables de moduler l'activité transcriptionnelle des ARN polymérases I, III et IV est une autre question pour l'instant sans réponse.

Lors de la mitose, la chromatine est extrêmement compactée en chromosomes métaphasiques. Quel est le devenir des protéines de liaisons à l'ADN méthylé pendant cette phase ? Sont-elles détachées de leurs sites de fixations pendant la prophase et reviennent-elles pendant la télophase, ce qui impliquerait un certain dynamisme et des possibilités de redistributions, ou bien restent-elles solidement attachés à leurs sites de fixation pendant toute la durée de la durée de la mitose ? Des expériences d'imageries sur cellules vivantes exprimant des protéines fusions fluorescentes pourraient apporter une réponse à cette question. De même, comment les sites d'interactions des protéines de liaisons à l'ADN méthylés avec l'ADN sont-ils répliqués lors de la phase S ? MECP2 et MBD2 sont capables de s'homodimériser et de s'hétérodimériser [152]. Cette dimérisation joue peut-être un rôle dans la répllication des sites de fixations de ces protéines lors de la phase S.

L'hyperméthylation du promoteur de certains gènes suppresseurs de tumeurs participe à leur répression transcriptionnelle dans des cancers¹. Abolir la cette répression transcriptionnelle dépendante de la méthylation de l'ADN constitue une stratégie thérapeutique prometteuse. Ainsi 5-aza-deoxycytidine et 5-azacytidine sont utilisés dans le traitement de syndromes myélodysplasique et de certains lymphomes [116]. Les protéines de liaison à l'ADN méthylé possédant une activité de répresseur transcriptionnel sont-elles des cibles thérapeutiques pertinentes ? Des données précliniques le suggèrent. Par exemple, une déplétion de MBD2 réduit la tumorigénicité des lignées cancéreuses mammaires, et induit une résistance à la tumorigénèse induite dans le modèle murin *Apc*^{Min/+}. Deux domaines de MBD2 ou des protéines MBD pourraient être ciblés par des petites molécules disruptives : le domaine d'interaction avec l'ADN méthylé (*Methyl DNA Binding Domain*, MBD), et le domaine d'interaction des MBD avec différents complexes répresseurs (*Transcription Repression Domain*, TRD). Pour MBD2, la structure de ces deux

¹ Cf supra p 37.

domaines a été caractérisée [163], [165], ce qui devrait faciliter la mise au point de ces molécules disruptives, dans notre laboratoire et dans d'autres.

Annexes

I) Collaborations

A) Articles publiés

1) Combiner agent chimiothérapeutique et interférence à la Nétrine-1 potentialise la mort des cellules cancéreuses

a) Préambule

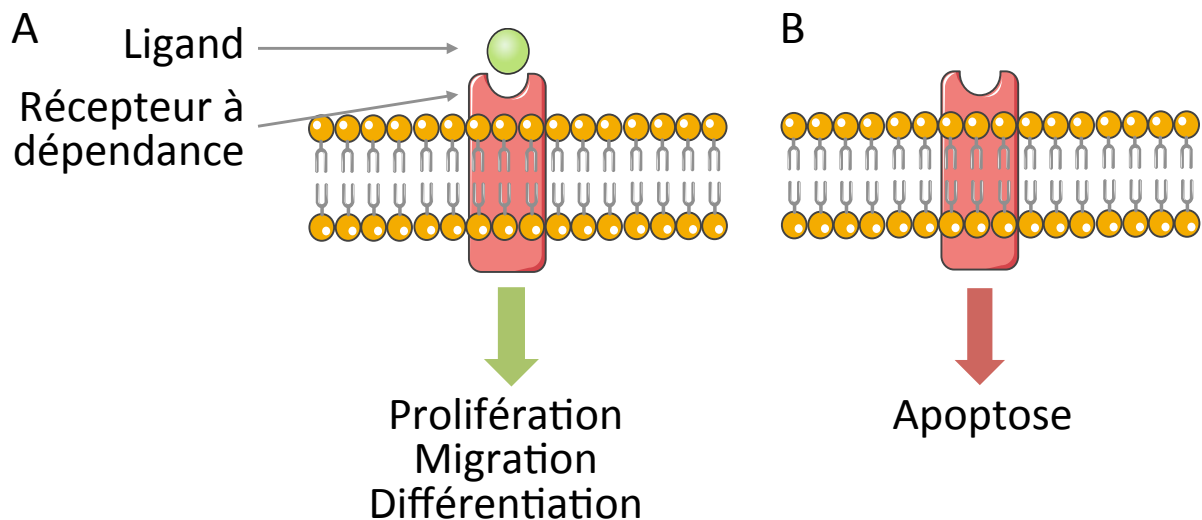


Figure 33 : Le concept des récepteurs à dépendance.

A. En présence de son ligand, le récepteur transmembranaire transmet un signal positif de prolifération, migration et/ou différenciation cellulaire. **B.** En absence de son ligand, le récepteur à dépendance induit une mort cellulaire par apoptose. Iconographie : Servier.

Notre équipe est spécialisée dans les récepteurs à dépendance. Cette famille fonctionnelle de récepteurs transmembranaires a pour caractéristique d'avoir des effets antagonistes en présence ou en absence de leur ligand : en présence du ligand, ils sont capables d'induire une signalisation positive de prolifération, de migration ou de différenciation. En absence du ligand ils induisent une mort cellulaire par apoptose. Cette famille de récepteur regroupe des protéines non homologues, les signaux positifs transduits et les mécanismes d'induction de l'apoptose sont différents d'un récepteur à l'autre. La survie de cellules exprimant ce genre de récepteur est donc dépendante de la quantité de ligands disponibles dans le milieu. Ces récepteurs sont impliqués dans divers cancers, mais de façon complexe. En effet, en présence abondante de ligand, ils peuvent faciliter la prolifération cellulaire et ont donc un effet pro-

oncogénique. Si le ligand n'est présent qu'en quantité limitant, ils limitent la prolifération cellulaire et ont donc un rôle suppresseur de tumeurs. On dit que ce sont des suppresseurs de tumeurs conditionnels, car ce rôle est conditionné à l'absence de ligand [318].

L'étude ci-dessous [319] se concentre sur le ligand Nértrine-1 et ces récepteurs DCC, UNC5A, UNC5B, UNC5C et UNC5D. Ces récepteurs ont été décrits comme des récepteurs à dépendance [320], ils pourraient induire l'apoptose en activant DAPK1 [321]. Ils se trouvent que plusieurs chimiothérapies, dont la Doxorubicine, la Cisplatine et la 5-Fluorouracile sont capables d'induire une surexpression de Nértrine-1 dans différentes lignées cellulaires et chez des patients (figure 1 et 2 de l'article). Cette réexpression de Nértrine-1 permettra une meilleure survie des cellules cancéreuses. Combiner chimiothérapie et agent antagoniste de la Nértrine-1 (bloquant son interaction avec ses récepteurs) permet de potentialiser la mort cellulaire en lignée (figure 4) et de ralentir la croissance tumorale en xénogreffe (figure 5).

Comment les chimiothérapies induisent-elles une surexpression de Nértrine-1 ? Les résultats de la figure 6 suggèrent que cela passe par une activation de p53, qui viendrait se fixer sur le promoteur de la Nértrine-1 (en particulier sur un site de fixation situé dans le 1^{er} intron) et activer sa transcription.

J'ai réalisé les expériences conduisant au résultat de la figure 6H de l'article. Il s'agit d'immuno-précipitations de chromatine réalisées à l'aide d'un anticorps dirigé contre p53, suivies de détection par qPCR des régions immuno-précipitées. Dans les cellules A549R traitées à la Doxorubicine, on observe une hausse de la fixation de p53 sur le promoteur de p21 (*CDKN1A*, témoin positif) et sur des régions situées dans l'intron 1 de la Nértrine-1, mais aucun enrichissement n'est observé au niveau d'une région de l'exon 2 de la Nértrine-1 (témoin négatif).

b) Article

Reproduit en accord avec la licence CC BY 3.0.

Combining chemotherapeutic agents and netrin-1 interference potentiates cancer cell death

Andrea Paradisi¹, Marion Creveaux¹, Benjamin Gibert¹, Guillaume Devailly¹, Emeline Redoulez¹, David Neves², Elsa Cleyssac², Isabelle Treilleux³, Christian Klein⁴, Gerhard Niederfellner⁴, Philippe A. Cassier¹, Agnès Bernet^{1,2}, Patrick Mehlen^{1*}

Keywords: cancer therapy; DCC; dependence receptor; netrin-1, p53

DOI 10.1002/emmm.201302654

Received February 19, 2013
Revised September 04, 2013
Accepted September 06, 2013

The secreted factor netrin-1 is upregulated in a fraction of human cancers as a mechanism to block apoptosis induced by netrin-1 dependence receptors DCC and UNC5H. Targeted therapies aiming to trigger tumour cell death via netrin-1/receptors interaction interference are under preclinical evaluation. We show here that Doxorubicin, 5-Fluorouracil, Paclitaxel and Cisplatin treatments trigger, in various human cancer cell lines, an increase of netrin-1 expression which is accompanied by netrin-1 receptors increase. This netrin-1 upregulation which appears to be p53-dependent is a survival mechanism as netrin-1 silencing by siRNA is associated with a potentiation of cancer cell death upon Doxorubicin treatment. We show that candidate drugs interfering with netrin-1/netrin-1 receptors interactions potentiate Doxorubicin, Cisplatin or 5-Fluorouracil-induced cancer cell death *in vitro*. Moreover, in a model of xenografted nude mice, we show that systemic Doxorubicin treatment triggers netrin-1 upregulation in the tumour but not in normal organs, enhancing and prolonging tumour growth inhibiting effect of a netrin-1 interfering drug. Together these data suggest that combining conventional chemotherapies with netrin-1 interference could be a promising therapeutic approach.

INTRODUCTION

Netrin-1, a soluble protein initially discovered as an axon navigation cue (Serafini et al, 1994), was recently proposed to play a crucial role in cancer progression by regulating apoptosis (Mazelin et al, 2004; Mehlen et al, 2011). Indeed, netrin-1 receptors DCC and UNC5H, —*i.e.*, UNC5H1, UNC5H2, UNC5H3 and UNC5H4 also called UNC5A, UNC5B, UNC5C or UNC5D— belong to the so-called dependence receptor family (Llambi

et al, 2001; Mehlen et al, 1998; Tanikawa et al, 2003). These dependence receptors, because of their ability to induce cell death when disengaged from their ligands, create cellular states of dependence on their respective ligands (Bredesen et al, 2005) and, consequently, may behave as tumour suppressors as they eliminate tumour cells that would develop in settings of ligand unavailability (Mazelin et al, 2004; Mehlen & Puisieux, 2006). Along these lines, mice bearing a DCC receptor inactivated for its pro-apoptotic activity developed spontaneous colorectal cancers and were more prone to intestinal tumour progression (Castets et al, 2012). Similarly, inactivation of UNC5H3/C in mice in the gastro-intestinal tract is associated with intestinal tumour progression (Bernet et al, 2007).

Thus, according to the dependence receptor paradigm, progression of aggressive human tumours should require inactivation of this death pathway. There are at least three means to achieve this survival advantage: loss of netrin-1 receptors expression, as extensively described in human

(1) Apoptosis, Cancer and Development Laboratory – Equipe labellisée ‘La Ligue’, LabEx DEVweCAN, Centre de Cancérologie de Lyon, INSERM U1052-CNRS UMR5286, Université de Lyon, Centre Léon Bérard, Lyon, France

(2) Netris Pharma, Lyon, France

(3) Biopathology Department, Centre Léon Bérard, Lyon, France

(4) Discovery Oncology Roche Diagnostics GmbH, Penzberg, Germany

*Corresponding author: Tel: +33 478782870; Fax: +33 478782887;

E-mail: patrick.mehlen@lyon.unicancer.fr

colorectal cancer for DCC or/and UNC5H (Bernet et al, 2007; Fearon et al, 1990; Shin et al, 2007; Thiebault et al, 2003); loss of downstream death signalling induced by DCC or UNC5H; or gain of autocrine or paracrine expression of the ligand. Interestingly, netrin-1 has been shown to be upregulated in a sizeable fraction of metastatic breast, lung, ovary and pancreatic cancer, in inflammatory-associated colorectal cancer and in neuroblastoma (Delloye-Bourgeois et al, 2009a; Delloye-Bourgeois et al, 2009b; Dumartin et al, 2010; Fitamant et al, 2008; Papanastasiou et al, 2011; Paradisi et al, 2009). Proof-of concept studies, *in vitro* and in mice or chicken models, have shown that the silencing of netrin-1 by netrin-1 siRNA or interference with netrin-1-receptors interaction are associated with tumour cell death and with the inhibition of tumour growth and metastases (Delloye-Bourgeois et al, 2009a; Delloye-Bourgeois et al, 2009b; Dumartin et al, 2010; Fitamant et al, 2008; Paradisi et al, 2009). These later studies proposed that disrupting the netrin-1 binding to its receptors could represent an efficient anti-cancer strategy in the large fraction of cancers where netrin-1 is expressed in an autocrine or paracrine fashion. Early drug developments have focused on biological agents—biologics—that mimic receptors interaction with netrin-1 (Mille et al, 2009).

The search for the fraction of cancer patients who could be eligible for netrin-1 interference-based treatment during early clinical evaluation led us to examine the effects of conventional chemotherapeutic treatments on netrin-1 and netrin-1 receptors expression. Doxorubicin, 5-Fluorouracil (5FU), paclitaxel (Taxol) and Cisplatin are 'classic' chemotherapies that are still broadly used in the management of patients with breast, lung, colorectal, as well as other types of solid tumours; both in patients with localized and advanced tumours. However, despite their efficacy, the use of conventional agents is limited by their toxicity and the emergence of resistance. We show here that these chemotherapeutic treatments, even though they act via different cellular mechanisms, trigger a significant increase of netrin-1 and its receptors. We show that this upregulation is associated with an increased cell death induction upon inhibition of netrin-1 *in vitro*. As a consequence, we show that combination of Doxorubicin with a netrin-1 interfering drug candidate potentiates tumour growth inhibiting effect in an animal model.

RESULTS

Netrin-1 and its receptors are upregulated in tumour cells upon treatment with conventional chemotherapies

Based on the screen for netrin-1 expression in human tumour cell lines, we noticed that while a fraction of cell lines express netrin-1 and undergo apoptosis upon netrin-1 silencing [Fig 1A and (Delloye-Bourgeois et al, 2009a)], other cell lines failed to show netrin-1 expression and are resistant to netrin-1 interference (Fig 1A). Of interest, we observed that Doxorubicin treatment, while having no effect on netrin-1 expressing H358 cells, is associated with netrin-1 over-expression in a Doxorubicin resistant lung cancer cell line A549R (Fig 1B). This increase of

mRNA was associated with a robust increase of netrin-1 protein expression (Fig 1C and D).

Next, we analysed the level of the netrin-1 receptors DCC and UNC5H—UNC5A, UNC5B, UNC5C and UNC5D—in response to Doxorubicin. As shown in Fig 1E, levels of DCC, UNC5A, UNC5B and UNC5D increase concomitantly to netrin-1 levels, in A549R cells treated with Doxorubicin. This increase reached 44-folds for the UNC5B receptor. To monitor whether this upregulation of netrin-1 and its receptors is related to increased gene transcription, A549R cells were treated with Doxorubicin in the presence of the RNA polymerase inhibitor Actinomycin D. As shown in Fig 1F, Actinomycin D fully prevents Doxorubicin-mediated netrin-1 upregulation, thus supporting the view that conventional therapeutic drugs triggers increase of netrin-1 and its receptors via enhanced gene transcription. This increased gene transcription is associated with increased receptor presence at the plasma membrane as shown with the receptor DCC by flow cytometry analysis (Supporting Information Fig S1A).

To investigate whether upregulation of netrin-1 and its receptors is restricted to Doxorubicin or is a general response to chemotherapeutic agents, netrin-1 levels were analysed by quantitative RT-PCR in a panel of 15 cancer cell lines in response to various conventional chemotherapeutic drugs, such as Doxorubicin, 5-Fluorouracil (5FU), paclitaxel (Taxol) and Cisplatin. Analysis of netrin-1 level was performed upon treatment with 3 concentrations corresponding to the determined IC_{10} , IC_{30} or IC_{50} of each drug for each cell lines (Supporting Information Table S1). In cell lines which appeared to be resistant to specific drugs (Supporting Information Table S1), a concentration corresponding to maximal effective concentration (IC_{MAX}) was used to monitor netrin-1 level. As shown in Fig 2A, Doxorubicin and 5FU both triggered a significant (*i.e.* >2-fold over control) increase of netrin-1 respectively in 53 and 47% of cancer cell lines. Treatment with Taxol and Cisplatin was associated with netrin-1 upregulation, respectively, only in 13 and 20% of cell lines. Netrin-1 upregulation upon chemotherapeutic drugs treatment is not tumour type specific as netrin-1 upregulation was seen in at least one cell line of breast, lung, colon, pancreatic and ovarian cancers, as well as in neuroblastoma and glioblastoma cell lines. We could not detect any correlation between netrin-1 upregulation and chemoresistance, as netrin-1 upregulation was detected in both resistant and sensitive cell lines, and as some resistant cell lines did not show netrin-1 upregulation (Fig 2A).

The expression of netrin-1 dependence receptors in response to these cytotoxic agents was also investigated in the 15 cancer cell lines (Fig 2A). Similarly to netrin-1 response, Doxorubicin seemed to have the largest effect, as it is associated with the upregulation of DCC, UNC5B and UNC5D, respectively, in 80, 60 and 60% of the cell lines screened. DCC, which displays an overall low expression in the screened cancer cell lines, is the netrin-1 receptor showing the largest spectrum of upregulation as DCC expression was strongly increased in 40, 40 and 53% of cell lines in response to, respectively, Cisplatin, 5FU and Taxol. Levels of the netrin-1 receptors UNC5A and UNC5C remained largely unaffected by the treatment with cytotoxic drugs in

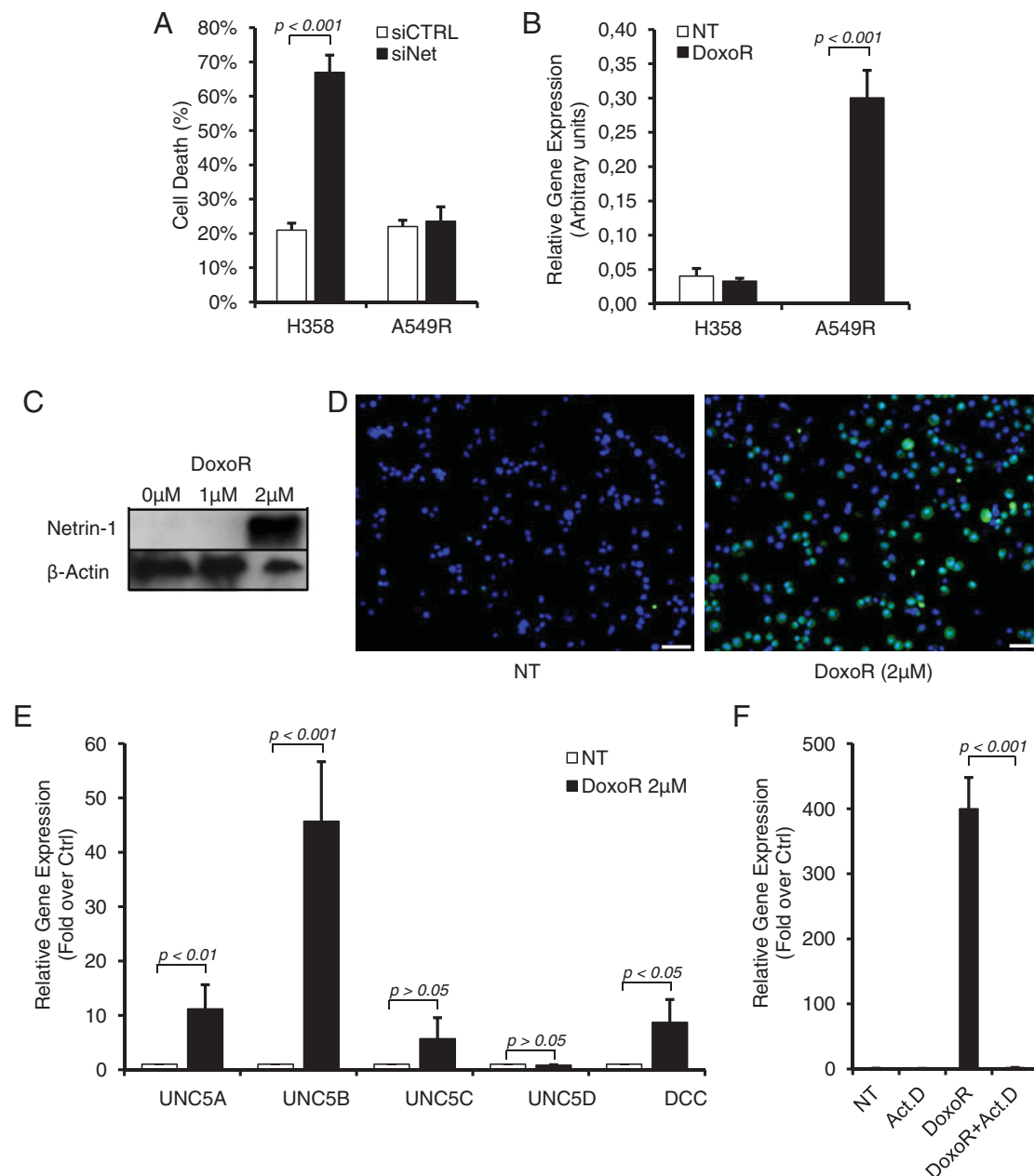


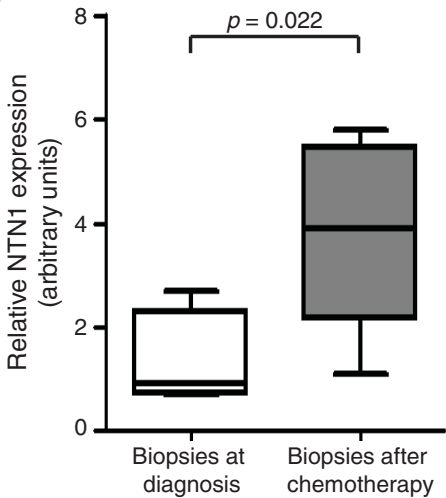
Figure 1. Netrin-1 and its dependence receptors are upregulated upon Doxorubicin treatment. Source data is available for this figure in the [Supporting Information](#).

- A.** Lung cancer cell lines H358 and A549R were transfected with a scramble siRNA (siCTRL) or a netrin-1 targeting siRNA (siNet). 48 h after transfection, cell death percentage ($n = 3$) was evaluated by means of 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) exclusion.
- B.** Netrin-1 gene expression, normalized by Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) and expressed as arbitrary units, was evaluated in H358 and A549R cell lines, treated with 2 μ M Doxorubicin for 24 h (DoxoR) or not treated (NT). Results represent mean values of five independent experiments.
- C.** A549R cells were treated with 1 and 2 μ M Doxorubicin for 48 h and netrin-1 protein levels were evaluated by western blotting. Netrin-1 protein, normalized to β -actin, was strongly accumulated following Doxorubicin treatment.
- D.** Netrin-1 (in green) upregulation was confirmed by immunofluorescence staining, following treatment with 2 μ M Doxorubicin for 48 h. Nuclei were counterstained with Hoescht staining (in blue). White scale bar: 40 μ m.
- E.** Netrin-1 receptors gene expression was measured in A549R cells following Doxorubicin treatment. UNC5A, UNC5B and DCC gene expression was significantly upregulated by Doxorubicin, while UNC5C and UNC5D showed non-significant variations.
- F.** Doxorubicin-induced netrin-1 upregulation is directly dependent by gene transcription. A549R cells were treated with 2 μ M Doxorubicin and with the potent RNA polymerases inhibitor Actinomycin D (100 μ g/ml) for 24 h. Actinomycin D strongly inhibited netrin-1 upregulation following Doxorubicin treatment. In (A), (B), (E) and (F), Mann-Whitney tests were performed, and p -value is indicated. DoxoR, Doxorubicin; Act.D, Actinomycin D; NT, not treated.

A

Table with 4 main sections: NTN1, DCC, UNC5B, and UNC5D. Each section contains a table of cell lines, p53 status, and expression levels of the respective gene after treatment with Cisplatin, 5-Fluorouracil, Doxorubicin, and Taxol. Summary statistics for positive cells (%) are provided at the bottom of each section.

B



C

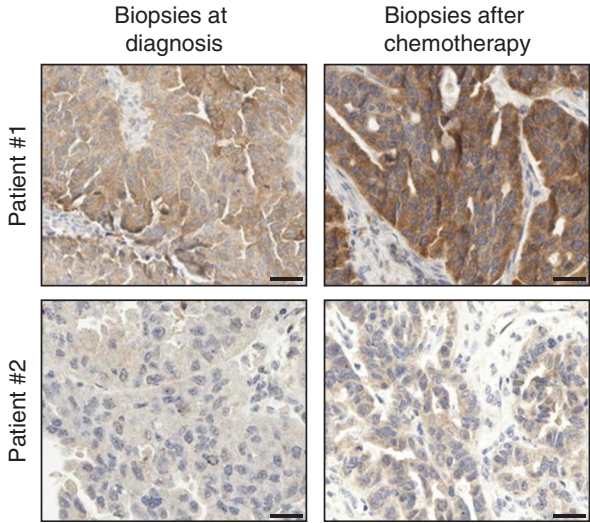


Figure 2. Netrin-1 and its receptors expression is increased in several cancer cell lines and in ovarian tumours upon treatment with cytotoxic drugs.
A. Expression levels of netrin-1 (NTN1), DCC, UNC5B and UNC5D were measured by quantitative RT-PCR. Breast cancer (HBL100), lung cancer (A549R, H322, H358), colon cancer (HCT116, HCT8), pancreatic cancer (MiaPacA-2, Panc-1), neuroblastoma (SH-Sy5y, IMR32), glioblastoma (SF767, U87MG) and ovarian cancer (PA-1, TOV-112D, NIH-OVCAR3) cell lines were treated with classical chemotherapeutic drugs (Doxorubicin, Cisplatin, 5-Fluorouracil and Taxol), at different drugs concentration dependent on IC50 values calculated for each cell line and drug treatment for 24 h. Netrin-1 and its receptors gene expression was compared to control, not-treated cells, values indicate fold over control changes. Standard deviation and statistical analysis are also indicated. -, no changes or downregulation; n.e., not expressed. Positive cell lines were determined for gene expression variations more than twofold over control. Grey boxes represent resistant (i.e. more than 50% cell survival after treatment with maximal drugs concentrations) cancer cell lines. p53 status is indicated for each cell line (WT, wild-type p53; MUT, mutated p53; NULL, deleted p53).
B. Netrin-1 is over-expressed in ovarian tumour patients after chemotherapeutic treatment. Netrin-1 level, normalized with glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) gene, used as housekeeping gene, was analysed in RNA extracted from ovarian biopsies of tumours from patients obtained before and after a chemotherapeutic cycle of carboplatin/taxol treatment (n = 5 for each group). The median level of netrin-1 was calculated for each group. Mann-Whitney test was performed, and p-value is indicated.
C. Immunohistochemistry staining of two representative ovarian cancer biopsies, obtained before and after the conventional treatment. Original magnification, x20. Scale bar: 50 µm. After chemotherapy, a high (patient 1) or intermediate (patient 2) intensity of the cytoplasmic staining indicated higher levels of netrin-1 as compared to staining obtained before treatment.

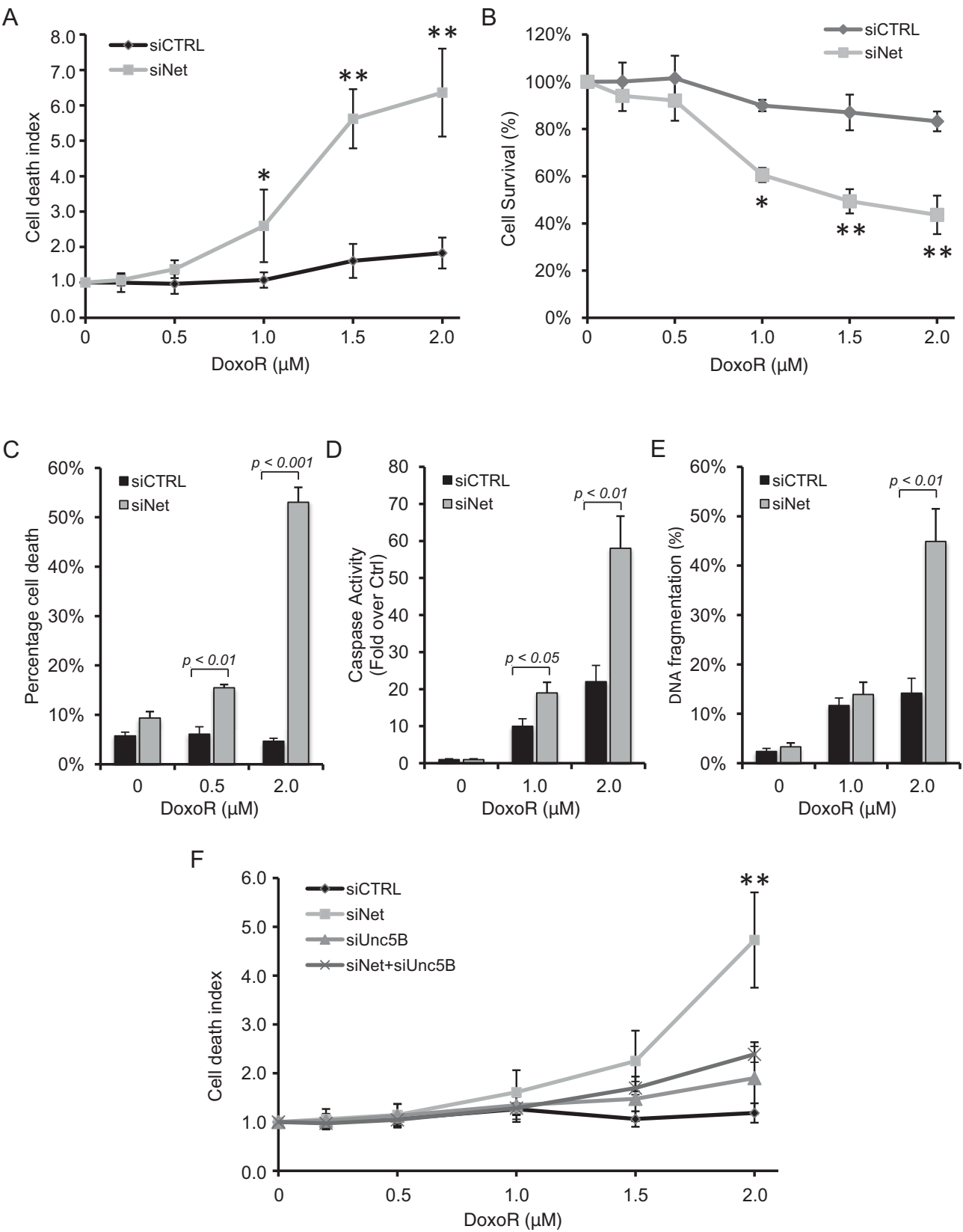


Figure 3.

most of the cell lines that were screened (Supporting Information Fig S1B). Collectively, these data support the view that upregulation of netrin-1 and its receptors frequently occurs in response to conventional drug treatment.

To further analyse whether conventional drug treatments trigger tumour-specific increased netrin-1 level in human patients, we looked for pathologies where human tumours are sampled from the same patient before and after conventional treatments. We were then able to analyse netrin-1 and receptors level in ovarian cancer specimens from patients before and after being treated with carboplatin/taxol. As shown in Fig 2B, netrin-1 mRNA was significantly upregulated after chemotherapy. Moreover, DCC, UNC5B, UNC5C and UNC5D levels were also affected by the carboplatin/taxol treatment (Supporting Information Fig S1C–F). Netrin-1 upregulation was also confirmed at the protein level; by netrin-1 immunohistochemistry in tissue sections derived these biopsies (Fig 2C). Increased netrin-1 intensity was detected in 3 out of 4 analysed biopsies after chemotherapy.

Netrin-1 interference potentiates cytotoxic drugs induced cell death and tumour growth inhibition

The fact that both netrin-1 and its receptors are upregulated upon conventional drug treatments suggests that the dependence for survival on netrin-1 is amplified in chemotherapy-treated cancer cells. Thus, we analysed the effect of silencing netrin-1 by siRNA on Doxorubicin-induced cell death. A549R cells were transfected with a netrin-1 siRNA and treated with increasing concentration of Doxorubicin. Silencing of netrin-1 (Supporting Information Fig S2AB) was associated with a marked potentiation of Doxorubicin-induced cell death as shown by the measurement of loss of cell permeability (Fig 3A), cell survival (Fig 3B), DAPI exclusion (Fig 3C), caspase activation (Fig 3D) or DNA fragmentation (Fig 3E). To determine whether the increased sensitivity was due to the pro-apoptotic engagement of unbound netrin-1 dependence receptors, a similar experiment was performed in settings of silencing of UNC5B (Supporting Information Fig S2AB), the main netrin-1 receptor expressed upon Doxorubicin treatment in A549R cells. As shown in Fig 3F, silencing of UNC5B is associated with the

inhibition of the potentiation of cell death induced by netrin-1 silencing and Doxorubicin treatment.

We thus investigated a possible similar potentiating effect using a more therapeutically relevant way for interfering with netrin-1. Two drug candidates, TRAP-netrin^{DCC} and TRAP-netrin^{UNC5A}, which are Fc-fused and stabilized ectodomains of respectively DCC or UNC5A, have been shown to trigger death of netrin-1 expressing tumour cells *in vitro* and tumour growth inhibition in engrafted mice models (not shown). As shown in Fig 4AB, these two candidate drugs strongly potentiate Doxorubicin-induced cell death in A549R cells. Moreover, we confirmed that co-treatment with TRAP-netrin^{UNC5A} and Doxorubicin induced DAPK dephosphorylation (Supporting Information Fig S2C), an event associated with cell death induced by unbound UNC5B receptor (Llambi et al, 2005).

As netrin-1 and receptors were also upregulated upon 5FU and Cisplatin treatment (Fig 2A), we performed similar combination of TRAP-netrin^{UNC5A} with 5FU and Cisplatin. A comparable potentiating effect on cell death was observed upon co-treatment with 5FU or Cisplatin and TRAP-netrin^{UNC5A} (Fig 4CD). Similarly, in pancreatic cancer cell line MiaPacA, where 5FU and Doxorubicin have been shown to upregulate netrin-1 and its receptors, co-treatment of 5FU or Doxorubicin and TRAP-netrin^{UNC5A} potentiated cell death (Fig 4EF).

We then assessed whether the *in vitro* effect seen above could be translated *in vivo* in a therapeutic setting. A549R cells were engrafted in *nude* mice and animals with established palpable tumours were treated twice a week by i.p. injection of vehicle or TRAP-netrin^{UNC5A} at 20 mg/kg alone, or in combination with 2 mg/kg of Doxorubicin. Single agent treatment (TRAP-netrin^{UNC5A} or Doxorubicin) according to this administration scheme and doses were associated with detectable but weak tumour growth inhibiting effect, which was resolved during the time of the treatment (Fig 5A). However, co-treatment of Doxorubicin and TRAP-netrin^{UNC5A} was associated with a stronger and prolonged inhibition of tumour growth. The stronger and prolonged effect is associated with increased tumour apoptosis. Indeed, we assessed apoptosis level in the xenografts tumours after 48 h of treatment with either

Figure 3. Netrin-1 silencing sensitizes A549R cells to Doxorubicin and induces apoptotic cell death via UNC5B receptor.

- A–C.** Netrin-1 silencing sensitizes tumour cells to Doxorubicin. A549R cells were transfected with either a scramble siRNA (siCTRL) or with a specific siRNA targeting netrin-1 (siNet). 24 h after transfection, cells were treated with increasing concentrations of Doxorubicin. Cell death rate (A), measured by toxilight kit as described in materials and methods section, and cell survival (B), was evaluated 48 h after treatment. Results were normalized to control, untreated cells. While scramble siRNA-transfected cells showed a general resistance to Doxorubicin treatment, netrin-1 silencing strongly induced cell death and decreased cell survival in presence of Doxorubicin. Evaluation of cell death percentage (C), measured by 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) exclusion as described in the materials and methods section, confirmed that netrin-1 siRNA sensitized A549R cells to 0.5 and 2 μ M Doxorubicin treatment.
- D,E.** Netrin-1 silencing triggers apoptosis in combination with Doxorubicin treatment. A549R cells were transfected as in (A–C), and treated with the indicated Doxorubicin concentrations for 24 h. Active caspase-3 (D), normalized to untreated cells, and DNA fragmentation (E) were evaluated as described in the materials and methods section. While Doxorubicin failed to induce apoptosis in A549R cells transfected with a scramble siRNA (siCTRL), cells silenced for netrin-1 showed a strong increase in the apoptotic rate.
- F.** Combination of netrin-1 silencing and Doxorubicin treatment induces cell death through netrin-1 receptor UNC5B. A549R cells were transfected with scramble siRNA (siCTRL), netrin-1-specific siRNA (siNet), UNC5B-specific siRNA (siUnc5B) and with a combination of netrin-1 and UNC5B-targeting siRNA. 24 h after transfection, cells were treated with the indicated Doxorubicin concentrations for 48 h, and cell death rate was measured by toxilight and normalized to control, untreated cells. While netrin-1 silencing (siNet) sensitized A549R cells to Doxorubicin treatment, as compared to siCTRL-transfected cells, the simultaneously silencing of netrin-1 and UNC5B (siNet + siUnc5B) rescued cell death induction by siNet and Doxorubicin treatment. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$. DoxoR, Doxorubicin.

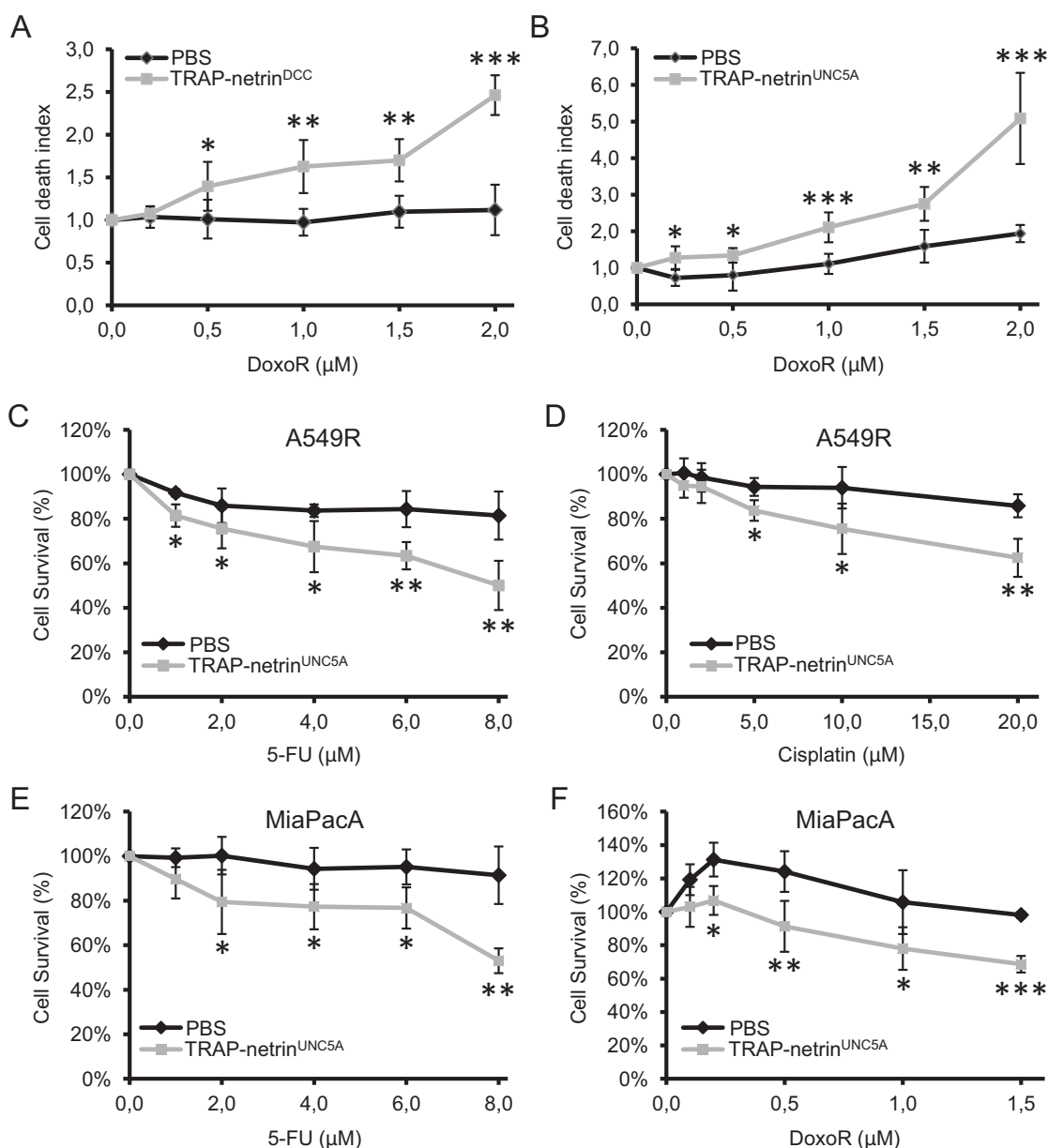


Figure 4. Interference to netrin-1 and its receptors interaction sensitizes tumour cells to cytotoxic drugs.

A,B. A549R cells were treated for 48 h with the indicated Doxorubicin concentrations in presence or not of 2 μg/ml TRAP-netrin^{DCC} (A) and TRAP-netrin^{UNC5A} (B). The co-treatment with Doxorubicin and the two recombinant fusion proteins increased cell death rate, measured by toxilight, as compared to Doxorubicin- and PBS-treated cells. Results were normalized to untreated cells.

C,D. A549R cells were treated with PBS or 2 μg/ml TRAP-netrin^{UNC5A}, in presence of the indicated concentrations of 5-Fluorouracil (5-FU, C) or Cisplatin (D). 48 h after co-treatment, cell survival was measured by MTS and normalized to untreated cells.

E,F. MiaPacA cells were treated with PBS or 2 μg/ml TRAP-netrin^{UNC5A}, in presence of the indicated concentrations of 5-FU (E) or Doxorubicin (F). 48 h after co-treatment, cell survival was measured by MTS and normalized to untreated cells.

Doxorubicin, TRAP-netrin^{UNC5A} or the combination of both agents. As shown in Fig 5B, while Doxorubicin or TRAP-netrin^{UNC5A} alone failed to significantly induce caspase-3 activity in the tumours, the combination triggers a strongly significant caspase-3 activation. Of interest, Doxorubicin treatment (i.p.) is associated with upregulation of netrin-1 in the xenografted

tumours (Fig 5C) but not in tissues such as the heart, lung, intestine or kidney (Fig 5D). Together, these data support the view that Doxorubicin triggers netrin-1 upregulation specifically in tumours and not in normal tissues; an effect that can be used to potentiate the anti-tumour effect of netrin-1 interfering agents.

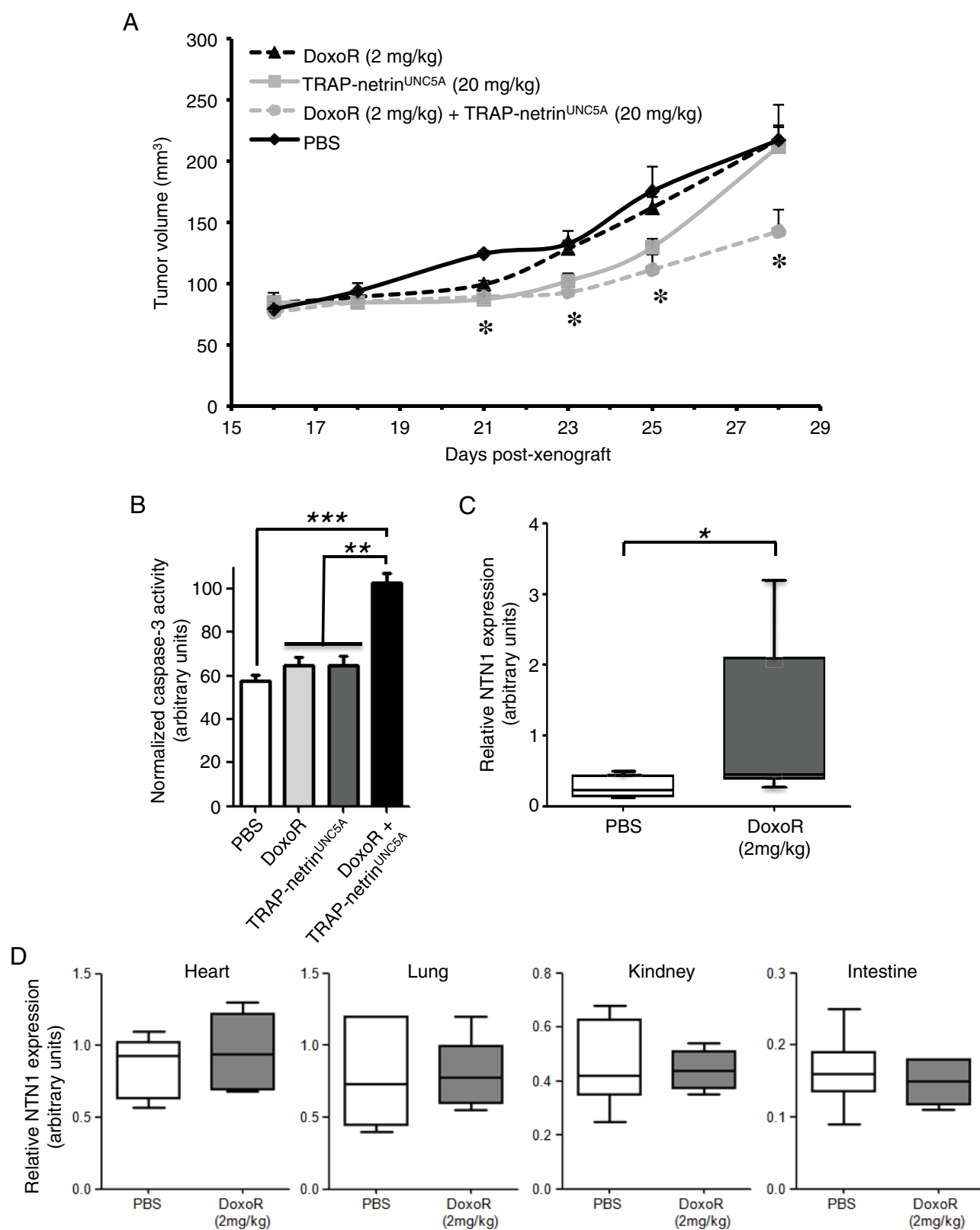


Figure 5.

Netrin-1 upregulation upon cytotoxic drugs is mediated by p53

The netrin-1 upregulation, observed in various cell lines and tumours with different cytotoxic drugs, suggests that this upregulation is rather related to a general survival stress response than to a specific alteration of a specific pathway. Since cytotoxic drugs often activates the tumour suppressor p53 (Vousden & Lane, 2007) and because it was shown that UNC5A, UNCB and UNC5D are transcriptional target of p53 (Miyamoto et al, 2010; Tanikawa et al, 2003; Wang et al, 2008), we investigated whether p53 could be implicated in Doxorubicin-induced netrin-1 over-expression. A549R cells treated with Doxorubicin showed accumulation and activation of p53 (Supporting Information Fig S3ABCD). Interestingly, while netrin-1 mRNA and protein were upregulated upon Doxorubicin treatment, this upregulation was strongly inhibited when p53 was silenced by a siRNA strategy (Fig 6AB). Analysis of the netrin-1 promoter revealed the presence of a putative p53 binding site in the internal netrin-1 promoter [Fig 6C; netrin-1 promoter B (Delloye-Bourgeois et al, 2012)]. As shown in Fig 6DE, Doxorubicin treatment or p53 over-expression similarly trigger transcription of a luciferase reporter gene placed under the control of the complete netrin-1 promoter region or of the netrin-1 promoter B but not of netrin-1 promoter A region (Paradisi et al, 2008). Mutation of the p53 binding site in promoter B fully abrogates p53 or Doxorubicin-induced promoter activation (Fig 6FG). Moreover, by using chromatin-immunoprecipitation assay, we demonstrated that upon Doxorubicin treatment, p53 specifically interacts with netrin-1 promoter B (Fig 6H). Of interest, and although it remains to be further demonstrated on a larger panel of human tumours, we found a significant correlation between netrin-1 level before and after chemotherapy and p53 status (monitored by measuring p53 targets) in the human specimen described in Fig 2B (Supporting Information Fig S3EFG). The direct contribution of p53 in Doxorubicin-dependent-netrin-1 upregulation was further analysed in colorectal cancer cell line HCT116 either expressing wild-type p53 (p53^{+/+}) or without p53 (p53^{-/-}) (Bunz et al, 1998). While HCT116 p53^{+/+} cells showed a strong induction of netrin-1 and p21 gene expression following Doxorubicin treatment, we failed to observe netrin-1 upregulation in HCT116 p53^{-/-} cells (Supporting Information Fig S4AB). As expected, p53^{+/+} cells were sensitive to co-treatment

with Doxorubicin and TRAP-netrin^{UNC5A}, while p53^{-/-} cells were not (Supporting Information Fig S4C).

Some of the p53 mutations are not loss of wild-type p53 function, but they contribute to creating mutant p53 isoforms that possess protumoural activities. These p53 mutations are known as 'gain-of-functions' (GOF) mutations and they are selected by cancer cells to overcome p53 anti-apoptotic activity. To test the effect of GOF mutant p53 proteins on netrin-1 expression, we transfected HCT116 p53^{-/-} cells with such mutant isoforms. As shown in Supporting Information Fig S4D, only wild-type p53 is able to activate netrin-1 promoter, while the large majority of GOF mutants showed no effect on netrin-1 promoter activation. As p53 is not only activated by conventional chemotherapeutic treatment, we finally investigated whether other p53 inducer may also induce netrin-1 expression. As shown in Supporting Information Fig S4EF, treatment of A549R cells with hydrogen peroxide (H₂O₂), known to induce oxidative stress and p53 activation, is sufficient to stimulate netrin-1 expression. All together, these data suggest that in p53 non-mutated cancer cells, netrin-1 is upregulated via p53 activation and p53-mediated netrin-1 promoter activation.

DISCUSSION

Previous works have shown that a sizeable fraction of human cancer showed upregulation of netrin-1 as a selective mechanism to block tumour cell death (Delloye-Bourgeois et al, 2009a; Delloye-Bourgeois et al, 2009b; Fitamant et al, 2008; Paradisi et al, 2009). This acquired selective advantage is in a sense very similar to the mechanism of oncogene addiction. Of interest, we describe here that the fraction of cancer that could show dependence receptor dependent apoptosis inhibition, may even be larger as many tumours treated with conventional chemotherapies may potentially upregulate netrin-1. The cytotoxic drugs tested here, which included Doxorubicin, Cisplatin, 5FU and paclitaxel (Taxol) are commonly used in the management of patients with non-small cell lung, breast, colorectal and ovarian cancers; both in the adjuvant and advanced setting. Moreover, we have shown using a panel of human samples that primary ovarian tumours from patients treated with Carboplatin/Taxol displays an increase in netrin-1 level compared to the same tumours before treatment. Although,

Figure 5. Tumour growth inhibiting effect of combining netrin-1 interference and Doxorubicin.

- TRAP-netrin^{UNC5A} potentiates Doxorubicin anti-cancer effect in a preclinical animal model. A549R cells were engrafted in 7-weeks old female athymic nude mice. Once tumours reached a 100 mm³-volume, mice were treated intraperitoneally with TRAP-netrin^{UNC5A} (20 mg/kg), Doxorubicin (2 mg/kg) or with a combination of both drugs, twice a week for two weeks. As a control, mice were injected with PBS. Histogram represents tumour volume growth for each group as a function of days post-xenografts. While both drugs alone were not able to reduce tumour growth, combination of TRAP-netrin^{UNC5A} and Doxorubicin treatment significantly reduced tumour growth.
- Quantification of apoptosis by caspase-3 activity assay on xenografts lysates analysed after 2 days of treatment. Data are means of caspase-3 activities in four xenograft tumour lysates for each condition.
- Quantification of netrin-1 expression on engrafted A549R cells from nude mice treated with PBS or Doxorubicin for 48 h. Netrin-1 expression was normalized using hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HPRT) and TATA binding protein (TBP) genes, used as housekeeping genes. Data are means of total RNA extracted from seven animals for each group. Median, min and max values, as well as the upper and lower quartiles, are indicated.
- Quantification of netrin-1 expression in non-tumoural tissues from nude mice treated as above. The indicated tissues were taken 48 h after treatment and total RNA was extracted. Netrin-1 expression was normalized using 60S acidic ribosomal protein P2 (RPLP2) gene, used as housekeeping gene. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$; DoxoR, Doxorubicin.

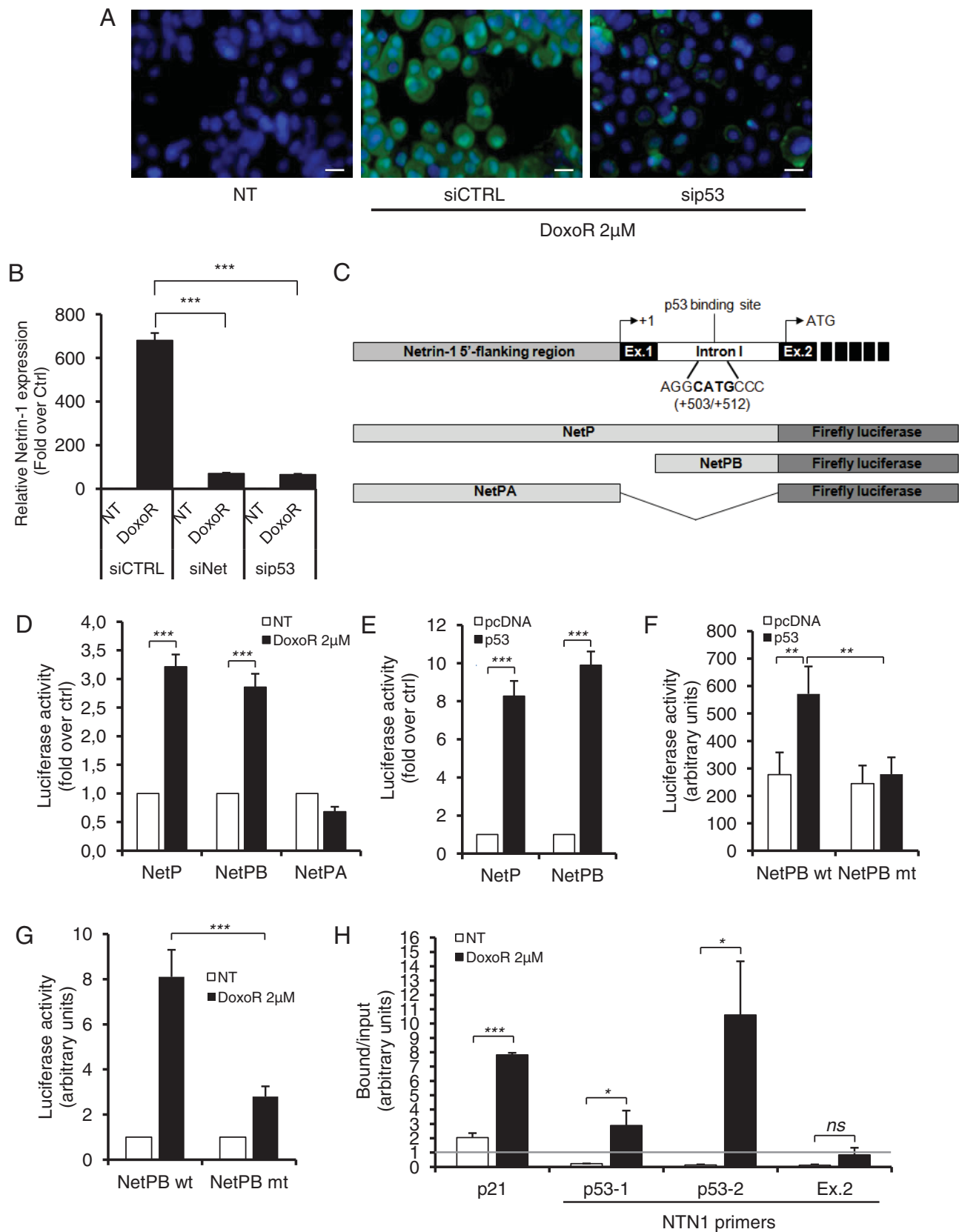


Figure 6.

netrin-1 upregulation in cell culture differs in kinetics and amplitude, depending on the drug used and the cancer cell type (Fig 2A), the fact that these drugs are known to affect different cellular mechanisms supports the view that netrin-1 upregulation is rather a general survival stress response than a specific alteration of a specific pathway affected by a specific chemotherapeutic drug. It is therefore interesting to speculate that the netrin-1 upregulation may be a survival mechanism employed by cancer cells in response to these drugs.

Although the mechanisms for this upregulation of netrin-1 remain to be further investigated, we propose here that, at least in cancer cells in which p53 is not affected, this upregulation may be due to p53-mediated activation of netrin-1 promoter. It is however fair to say that probably other mechanisms may be implicated in netrin-1/receptors upregulation. With respect to this, NF- κ B also regulates netrin-1 transcription (Paradisi et al, 2008; Paradisi et al, 2009) and it has been shown that Doxorubicin chemoresistance could be linked to NF- κ B activation (Mi et al, 2008). However, inhibition of NF- κ B is not sufficient to inhibit Doxorubicin-dependent netrin-1 upregulation, at least in A549R cell line (data not shown). If the mechanisms for netrin-1 upregulation are probably more complex, it may have significant therapeutic consequences. Indeed, netrin-1 interfering drugs are currently under preclinical development; combination of these compounds with conventional cytotoxic agents may prove synergistic. We and others have shown that netrin-1 expression is upregulated in samples from breast, ovarian, pancreatic and non-small cell lung cancer patients and that interfering with the netrin-1 autocrine/paracrine loop triggers apoptosis of cancer cells in several models. Furthermore, the data presented here suggests that large subset of patients may benefit from netrin-1 targeting agents, either alone or in combination with cytotoxic agents. Based on our *in vivo* observation on tumour bearing mice, the combina-

tion mediates superior anti-tumoural efficacy, but does not appear to increase toxicity compared to cytotoxic agents alone. The pre-clinical data shown here support the view that combining conventional drugs with netrin-1 interference could lead to superior efficacy as well as a reduction of chemotherapy doses at increased efficacy. Together, these data support the rationale of testing netrin-1 interference based therapy in early clinical trials in combination with conventional chemotherapies.

MATERIALS AND METHODS

Quantitative RT-PCR

Total RNAs from cancer cell lines were extracted using NucleoSpin® RNA II Kit (Macherey Nagel, Düren, Germany) according to manufacturer's protocol. Total RNAs from mouse non-tumoural tissues, xenograft tumours and human ovarian tumours were extracted by disrupting tissues with MagNA Lyser instrument (Roche Applied Science). RT-PCR reactions were performed with iScript® cDNA Synthesis Kit (Biorad). One microgram total RNA was reverse-transcribed using the following program: 25°C for 5 min, 42°C for 30 min and 85°C for 5 min. For expression studies, the target transcripts were amplified in LightCycler® 2.0 apparatus (Roche Applied Science), using the LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I Kit (Roche Applied Science). Expression of target genes was normalized to glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HPRT), TATA binding protein (TBP) and phosphoglycerate kinase (PGK) genes, used as housekeeping genes. The amount of target transcripts, normalized to the housekeeping gene, was calculated using the comparative C_T method. A validation experiment was performed, in order to demonstrate that efficiencies of target and housekeeping genes were approximately equal. The sequences of the primers are available upon request.

Figure 6. Netrin-1 upregulation is p53-dependent.

- A. A549R cells were transfected with p53 siRNA (sip53) or control siRNA (siCTRL) and treated with 2 μ M Doxorubicin for 48 h. Endogenous netrin-1 protein (green) was detected by immunofluorescence staining. Nuclei were counterstained with Hoechst staining (in blue). While Doxorubicin strongly increased netrin-1 protein, p53 silencing was able to revert this upregulation. White scale bar: 20 μ m.
- B. Netrin-1 expression levels in p53- and netrin-1-silenced A549R cells, treated with 2 μ M Doxorubicin for 24 h, were evaluated by quantitative RT-PCR.
- C. Schematic representation of the 5'-flanking netrin-1 genomic region. The 5'-flanking region, containing the netrin-1 promoter A (grey box) (Paradisi et al, 2008), the first two exons (solid box), the first intron (open box), containing the alternative promoter B, described in (Delloye-Bourgeois et al, 2012), the transcription start site +1, and the putative p53 binding site, are indicated. The different netrin-1 promoter A (NetPA) and B (NetPB) region, and the full promoter region (NetP) were cloned upstream the firefly luciferase gene.
- D. A549R cells were transfected with the indicated netrin-1 promoter constructs and treated with 2 μ M Doxorubicin for 24 h. Netrin-1 promoter activity was then evaluated by measuring luciferase activity, as indicated in the materials and methods section.
- E. A549R cells were co-transfected with the netrin-1 promoter constructs NetP and NetPB and p53, and luciferase activity was measured 48 h later. Over-expression of p53 was able to trans-activate both the promoter constructs.
- F,G. Mutation of the putative p53 binding site abolished netrin-1 promoter trans-activation by Doxorubicin or p53 over-expression. A549R cells were transfected with NetPB promoter construct wild-type (NetPB wt) or mutated for the p53 binding site (NetPB mut). While treatment with Doxorubicin (F) or p53 over-expression (G) was able to trans-activate the wild-type netrin-1 promoter, abolishing p53 binding was sufficient to decrease netrin-1 promoter activation.
- H. Chromatin Immunoprecipitation (ChIP) assay was performed in A549R cells treated with 2 μ M Doxorubicin for 24 h, as described in the material and methods section. p53-co-precipitated DNA was analysed by quantitative PCR. Two different couples of primers, surrounding the p53 binding site, were used for netrin-1 (p53-1 and p53-2). A couple of primers, able to amplify a DNA fragments corresponding to netrin-1 exon 2 (Ex.2), were used as negative control. p21 primers, surrounding the p53 binding site -1354 contained in the p21 promoter (Macleod et al, 1995), were used as positive control for p53 activation and binding. While in control, not treated cells p53 was not able to bind netrin-1 genomic DNA, in Doxorubicin-treated cells we observed a strong enrichment of netrin-1 DNA surrounding the p53 binding site, but not in the netrin-1 DNA corresponding to exon 2, in the p53 co-immunoprecipitate. Grey lane represents the threshold of enriched DNA region that co-immunoprecipitate with p53. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$; ns, not significant; NT, not treated; DoxoR, Doxorubicin.

The paper explained

PROBLEM:

Conventional chemotherapeutic agents such as Doxorubicin, 5-Fluorouracil, Paclitaxel (Taxol) and Cisplatin, represent the front line of cancer treatment in most cancers. However, their use are often associated with resistance and with toxicity. Netrin-1, a secreted factor upregulated in different cancer has become an interesting focus for targeted therapies. Biologics aiming to interfere with netrin-1/receptors interaction to trigger tumour cell death are under preclinical evaluation. Because clinical evaluation often assays the combination of a conventional treatment with a novel therapeutic strategy, we assessed the rationale of combining conventional treatment with biologics interfering with netrin-1/receptors interaction.

RESULTS:

We have observed that conventional treatments such as Doxorubicin, 5-Fluorouracil, Paclitaxel (Taxol) and Cisplatin treatments increased massively both netrin-1 and its receptors in various cancer cell lines and cancer specimen. Accordingly, we show that combining conventional treatments with biologics interfering with netrin-1/netrin-1 receptors interaction potentiates the effect of these conventional treatments both in cell culture and in mice model.

IMPACT:

This manuscript supports the view that combining conventional chemotherapies with netrin-1 interference could be a promising therapeutic approach.

Netrin-1, DCC, p53 and p21 protein quantification in human cancer cells

For immunoblotting analysis, cells were lysed by sonication in modified RIPA buffer (50 mM Tris-HCl, pH7.5, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 1 mM EDTA, protease inhibitor cocktail and 5 mM DTT) and incubated 1 h at 4°C. Cellular debris were pelleted by centrifugation (10.000 g 15' at 4°C) and protein extracts (200 µg per lane) were loaded onto 10% SDS-polyacrylamide gels and blotted onto PVDF sheets (Millipore Corporation, Billerica, MA, USA). Filters were blocked with 10% non-fat dried milk and 5% BSA in PBS/0.1% Tween 20 (PBS-T) over-night and then incubated for 2 h with rabbit polyclonal α -netrin-1 (dilution 1:500, clone H104, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), mouse monoclonal α -p53 (1:1000, clone DO-1, Santa Cruz Biotechnologies), rabbit polyclonal α -p21 (1:1000, clone C-19, Santa Cruz Biotechnologies) and mouse monoclonal α -actin (1:1000, Santa Cruz Biotechnologies) antibodies. After three washes with PBS-T, filters were incubated with the appropriate HRP-conjugated secondary antibody (1:10000, Jackson ImmunoResearch, Suffolk, UK) for 1 h. Detection was performed using West Dura Chemiluminescence System (Pierce, Rockford, IL, USA).

For immunofluorescence study, cells were detached, centrifuged on cover slips with a cytospinner (Shandon Cytospin 3, Thermo Scientific) and fixed for 30 min with 4% v/v paraformaldehyde. Cells were then permeabilized for 30 min in 0.2% Triton X-100/PBS and blocked in PBS containing 2% BSA and 2% normal donkey serum. Endogenous netrin-1 was stained using rat monoclonal α -netrin-1 antibody (R&D systems) and Alexa-488 Donkey anti-rat IgG (Molecular probes). p53 protein was stained using the mouse monoclonal α -p53-DO-1 antibody. Nuclei were counterstained using Hoescht staining (Sigma-Aldrich).

For DCC flow cytometry analysis, A549R cells were treated for 48 h with 2 µM Doxorubicin and after detachment cells were stained with α -DCC antibody (AF5, Abcam, Cambridge, MA, USA) diluted at 1/500 for 2 h at 4°C, following incubation for 1 h with phycoerythrin-conjugated anti-mouse antibody, diluted at 1/1000.

Cell death assay and conventional drug treatments

Cell death was evaluated by means of different methods. For total cell death assays, 5×10^3 cells per well were grown in 96-well plate in serum-poor medium and treated with Doxorubicin. 48 h later, cell death was evaluated using the bioluminescent cytotoxicity assay ToxiLight (Lonza, Basel, Switzerland), according to manufacturer's instruction. Alternatively, cell death percentage was measured by acridine orange and DAPI staining, using the NucleoCounter NC-3000 system (ChemoMetec A/S, Allerød, Denmark). Briefly, 5×10^4 cells were plated in 12-well plate and treated with Doxorubicin. 48 h after treatment, floating and adherent cells were collected, suspended in PBS and mixed with two different dyes, acridine orange, staining the entire population of cells, and 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI), staining the non-viable cells. Cell death rate, measured as DAPI-positive cells in total cell population, was then determined by NucleoCounter NC-3000, following the manufacture's application note. Cell survival was measured by MTS assay (CellTiter 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay, Promega) in 96-well plates. MTS assay was performed according to the manufacturer's procedures on 3×10^3 cells grown in serum-poor medium for 16 h and then treated for 48 h with the indicated Doxorubicin concentrations in serum-free medium. Caspase-3 activity assay was performed as previously described (Paradisi et al, 2008) using the Caspase 3/CPP32 Fluorimetric Assay Kit (Gentaur Biovision, Brussel, Belgium), according to the manufacturer's instructions. Caspase activity (activity/min/microgramme of protein) was calculated from a 1 h kinetic cycle reading on a spectrofluorimeter (405 nm/510 nm, Infinite F500, Tecan, Männedorf, Switzerland).

Candidate drugs

TRAP-netrin^{DCC} and TRAP-netrin^{UNC5A} are, respectively, the fifth fibronectin domain of DCC ectodomain and the Ig1-Ig2 domains of the UNC5A ectodomain fused to IgG1 Fc portion. These two recombinant proteins, described in, respectively, patent applications PCT/EP2011/064733 and EU/12306099.8 were produced, respectively, in 293-free-style and CHO-free-style and were provided, respectively, by Roche and Netris Pharma.

Animal model

Seven-week-old (20–22 g body weight) female athymic nu/nu mice were obtained from Charles River animal facility. The mice were housed in sterilized filter-topped cages and maintained in a pathogen-free animal facility. A549R cells were implanted by s.c. injection of 10^7 cells in 200 μ l of PBS into the right flank of the mice. Once tumours were established ($V \approx 100 \text{ mm}^3$), mice were treated with netrin-1 interfering drugs and/or cytotoxic drugs for 2 weeks. Tumour sizes were measured with a caliper. The tumour volume was calculated with the formula $v = 0.5 \times (\text{length} \times \text{width}^2)$. Four animals for each group were sacrificed 48 h after initial treatment, in order to evaluate caspase-3 activation in tumoural tissue and to quantify netrin-1 expression in engrafted tumoural cells and in non-tumoural tissues.

Ethics statement

Mice were maintained in a specific pathogen-free animal facility, AniCan, with technical help of the Laboratoire des Modèles Tumoraux (LMT) and handled in accordance with the institutional guidelines and protocols approved by the animal care and use committee (Comité d'Evaluation Commun au Centre Léon Bérard, à l'Animalerie de transit de l'ENS, au PBES et au laboratoire P4; CECCAP).

Chromatin immunoprecipitation assay

Doxorubicin-treated A549R cells were collected by enzymatic detachment. Cells were harvested in cold RBS (10 mM Tris pH 7.4, 10 mM NaCl, 5 mM MgCl₂) added with protease inhibitors cocktail (PIC, Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, USA) and cross-linked with 1.2% formaldehyde (CH₂O, Sigma–Aldrich). After 10 min, cross-linking reaction was blocked by adding glycine to a final concentration of 125 mM, cells were incubated for 5 min on ice and washed three times with cold RBS plus PIC. Chromatin was sheared by sonication (Sonifier 450, Branson, 3 mm microtip), centrifuged to pellet debris, and diluted 10 times in dilution buffer (50 mM Tris, pH 8.0, 0.5% NP-40, 0.2 M NaCl, 0.5 mM EDTA). Extracts (corresponding to about 2×10^6 cells per condition) were precleared for 1 h with 80 μ l of a 50% suspension of salmon sperm-saturated protein A (ss protein A). Immunoprecipitations were carried out at 4°C overnight using 2 μ g p53 antibody (clone DO-1, SantaCruz Biotechnology). Immune complexes were collected with ss protein A (45 min) and washed three times (5 min each) with high salt buffer (washing buffer: 20 mM Tris, pH 8.0, 0.1% SDS, 1% NP-40, 2 mM EDTA, 500 mM NaCl) and three times with low salt buffer (1× Tris/EDTA [TE]). Immune complexes were extracted in 1× TE containing 1% SDS, and protein–DNA cross-links were reverted by heating at 65°C overnight. DNA was purified using QIAquick PCR Purification kit (Qiagen, Crawley, UK), according to the manufacturer's protocol. Quantitative real-time PCR analysis of regulatory sequences in input samples and immunoprecipitates was performed using the LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I Kit in LightCycler® 2.0 apparatus (Roche Applied Science).

Netrin-1 gene reporter analysis

Cells (10^5) were plated in 12-well plates and transfected with the different firefly luciferase reporters containing netrin-1 promoter constructs, described before (Delloye-Bourgeois et al, 2012; Paradisi et al, 2008), in presence or not of p53 expression vector. 24 h after transfection, cells were treated or not with 2 μ M Doxorubicin and

further incubated for 24 h. All transfections were performed in duplicate and the Dual-Luciferase Reporter Assay system (Promega, Charbonnières, France) was carried out 48 h after transfection according to the manufacturer's protocol, using the Luminoskan Ascent apparatus (Thermolab System, Dreieich, Germany). As an internal control of transfection efficiency, the renilla luciferase encoding plasmid (pRL-CMV, Promega) was co-transfected and for each sample firefly luciferase activity was normalized to the renilla luciferase activity. Site-specific mutation of p53 binding site in netrin-1 promoter was performed using the QuickChange Site-directed Mutagenesis Kit (Stratagene) with mutagenic primers (GGACGGGA-GACGGGCTCTGCGATCCCCCTCGGGCGGC, sense and anti-sense), according to the manufacturer's protocol.

Immunohistochemical staining

Immunohistochemistry was performed on 4 ovarian carcinomas specimen obtained at initial diagnosis and after chemotherapy. The blocks containing formalin-fixed paraffin embedded tumours were sectioned at a thickness of 4 μ m. After deparaffinization and rehydration, endogenous peroxidases were blocked by incubating the slides in 5% hydrogen peroxide in sterile water. Heat-induced treatment was performed with 10 mM high pH buffer (Dako, Trappes, France) in a PTlink for 30 min. The slides were then incubated with the goat polyclonal Netrin1 antibody (R&D Systems Lille, France) in the autostainer Dako (Trappes, France) for 60 min. The antibody was diluted using an antibody diluent solution (Chemmate, Dako) at 1/100. After rinsing in Phosphate Buffer Saline, the slides were incubated polyclonal rabbit anti-goat antibody (Dako) at 1/200 for 20 min and then with the Flex kit (Dako). Bound antibody was revealed by adding the substrate 3,3'-diamino-benzidine. Sections were counterstained with haematoxylin.

Statistical analysis

The data reported are the mean $\pm$ SD of at least three independent determinations, each performed in triplicate. Statistical analysis was performed by the nonparametric Mann–Whitney *U* test unless indicated.

Author contributions

AP, MC, BG, GD, ER, DN, EC, IT, AB and PM designed the experiments. AP, MC, BG, GD, ER, DN and EC performed most of the experiments. IT performed immunostaining analysis. PC provided materials, CK, GN and PC provided useful insights. AP and PM wrote the manuscript.

Acknowledgements

This work was supported by institutional grants from CNRS, Centre Léon Bérard and from the Ligue Contre le Cancer, INCA, ERC, LABEX DEVweCAN (ANR-10-LABX-0061) of Université de Lyon, within the program ANR-11-IDEX-0007, ANR blanche and Biotecs and the Canceropole.

Supporting Information is available at EMBO Molecular Medicine online.

Conflict of interest statement: PM and AB declare to have a conflict of interest as founders and shareholders of Netris Pharma. CK and GN declare to have a conflict of interest as employees of Roche.

References

- 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
- Bunz F, Dutriaux A, Lengauer C, Waldman T, Zhou S, Brown JP, Sedivy JM, Kinzler KW, Vogelstein B (1998) Requirement for p53 and p21 to sustain G2 arrest after DNA damage. *Science* 282: 1497-1501
- Bredesen DE, Mehlen P, Rabizadeh S (2005) Receptors that mediate cellular dependence. *Cell Death Differ* 12: 1031-1043
- 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
- Delloye-Bourgeois C, Brambilla E, Coissieux MM, Guenebeaud C, Pedoux 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
- Delloye-Bourgeois C, Goldschneider D, Paradisi A, Therizols G, Belin S, Hacot S, Rosa-Calatrava M, Scoazec JY, Diaz JJ, Bernet A *et al* (2012) Nucleolar localization of a netrin-1 isoform enhances tumor cell proliferation. *Sci Signal* 5: ra57
- Dumartin L, Quemener C, Laklai H, Herbert J, Bicknell R, Bousquet C, Pyronnet S, Castronovo V, Schilling MK, Bikfalvi A *et al* (2010) Netrin-1 mediates early events in pancreatic adenocarcinoma progression, acting on tumor and endothelial cells. *Gastroenterology* 138: 1595-1606, 1606 e1591-1598
- Fearon ER, Cho KR, Nigro JM, Kern SE, Simons JW, Ruppert JM, Hamilton SR, Preisinger AC, Thomas G, Kinzler KW *et al* (1990) Identification of a chromosome 18q gene that is altered in colorectal cancers. *Science* 247: 49-56
- 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
- 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
- Macleod KF, Sherry N, Hannon G, Beach D, Tokino T, Kinzler K, Vogelstein B, Jacks T (1995) p53-dependent and independent expression of p21 during cell growth, differentiation, and DNA damage. *Genes Dev* 9: 935-944
- Mazelin L, Bernet A, Bonod-Bidaud C, Pays L, Arnaud S, Gespach C, Bredesen DE, Scoazec JY, Mehlen P (2004) Netrin-1 controls colorectal tumorigenesis by regulating apoptosis. *Nature* 431: 80-84
- Mehlen P, Delloye-Bourgeois C, Chedotal A (2011) Novel roles for Slits and netrins: Axon guidance cues as anticancer targets? *Nat Rev Cancer* 11: 188-197
- Mehlen P, Puisieux A (2006) Metastasis: A question of life or death. *Nat Rev Cancer* 6: 449-458
- 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
- Mi J, Zhang X, Rabbani ZN, Liu Y, Reddy SK, Su Z, Salahuddin FK, Viles K, Giangrande PH, Dewhirst MW *et al* (2008) RNA aptamer-targeted inhibition of NF-kappa B suppresses non-small cell lung cancer resistance to doxorubicin. *Mol Ther: J Am Soc Gene Ther* 16: 66-73
- Mille F, Llambi F, Guix C, Delloye-Bourgeois C, Guenebeaud C, Castro-Obregon S, Bredesen DE, Thibert C, Mehlen P (2009) Interfering with multimerization of netrin-1 receptors triggers tumor cell death. *Cell Death Differ* 16: 1344-1351
- Miyamoto Y, Futamura M, Kitamura N, Baba H, Arakawa H (2010) Identification of UNC5A as a novel transcriptional target of tumor suppressor p53 and a regulator of apoptosis. *Int J Oncol* 36: 1253-1260
- Papanastasiou AD, Pampalakis G, Katsaros D, Sotiropoulou G (2011) Netrin-1 overexpression is predictive of ovarian malignancies. *Oncotarget* 2: 363-367
- Paradisi A, Maisse C, Bernet A, Coissieux MM, Maccarrone M, Scoazec JY, Mehlen P (2008) NF-kappaB regulates netrin-1 expression and affects the conditional tumor suppressive activity of the netrin-1 receptors. *Gastroenterology* 135: 1248-1257
- Paradisi A, Maisse C, Coissieux MM, Gadot N, Lepinasse F, Delloye-Bourgeois C, Delcros JG, Svrcek M, Neufert C, Flejou JF *et al* (2009) Netrin-1 up-regulation in inflammatory bowel diseases is required for colorectal cancer progression. *Proc Natl Acad Sci USA* 106: 17146-17151
- Serafini T, Kennedy TE, Galko MJ, Mirzayan C, Jessell TM, Tessier-Lavigne M (1994) The netrins define a family of axon outgrowth-promoting proteins homologous to *C. elegans* UNC-6. *Cell* 78: 409-424
- 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
- Tanikawa C, Matsuda K, Fukuda S, Nakamura Y, Arakawa H (2003) p53RDL1 regulates p53-dependent apoptosis. *Nat Cell Biol* 5: 216-223
- Thiebaut K, Mazelin L, Pays L, Llambi F, Joly MO, Saurin JC, Scoazec JY, Romeo G, Mehlen P (2003) The netrin-1 receptors UNC5H are putative tumor suppressors controlling cell death commitment. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 4173-4178
- Vousden KH, Lane DP (2007) p53 in health and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8: 275-283
- Wang H, Ozaki T, Shamim Hossain M, Nakamura Y, Kamijo T, Xue X, Nakagawara A (2008) A newly identified dependence receptor UNC5H4 is induced during DNA damage-mediated apoptosis and transcriptional target of tumor suppressor p53. *Biochem Biophys Res Commun* 370: 594-598

2) La répression de PLA2R1 par c-MYC et HIF2 α favorise la croissance cancéreuse

a) Préambule

La protéine PLA2R1 (*secreted phospholipase A2 receptor*) est un récepteur membranaire de la famille des récepteurs au mannose. Il reconnaît divers phospholipases A2 sécrétés, divers collagènes, et divers carbohydrates. Il est fréquemment l'antigène d'anticorps auto-immuns impliqués dans des néphropathies. Des précédentes études du laboratoire de David Bernard ont démontré que PLA2R1 pouvait jouer un rôle suppresseur de tumeur dans divers types tumoraux [322], [323], notamment en induisant un sénescence cellulaire.

Dans l'étude ci-dessous [324], il est montré que l'expression de PLA2R1 est fréquemment diminué dans les carcinomes du rein à cellules claires (figure 1 de l'article). Cette perte favorise la tumorigénicité des cellules de carcinomes rénaux ACHL, *in vitro* et en xénogreffe (figure 2 de l'article). Au contraire, une réexpression de PLA2R1 entraîne une diminution de cette tumorigénicité (figure 3). Les figures 4 et 5 présentent un des mécanismes possible de la perte transcriptionnelle de PLA2R1 dans ces cellules. VHL, un gène suppresseur de tumeur fréquemment perdu dans ces cancers, est capable d'induire la transcription de PLA2R1 (figure 4 B et C). VHL agit principalement en diminuant la transcription des facteurs de transcriptions HIF1 α et de HIF2 α et en entraînant une dégradation de HIF2 α . Ces deux protéines, en particulier HIF2 α , sont capables d'induire une perte de la transcription de *PLA2R1* (figure 4 D, E et F). Comme HIF2 α semble incapable de se fixer directement sur le promoteur de *PLA2R1* (figure 5 B), cette régulation semble être indirecte. c-MYC est en revanche activé par HIF2 α , et est capable d'induire une répression de *PLA2R1* (figure 5 D). De plus il est capable de se lier sur le promoteur de *PLA2R1* (figure 5C). Le modèle proposé ici est donc que dans les cellules de certains carcinomes du rein à cellule claire, la perte de VHL entraîne une activation du facteur de transcription HIF2 α , qui a son tour activera c-MYC, qui réprimera PLA2R1. Cette perte de PLA2R1 participe à la tumorigénicité de ces cellules cancéreuses.

Mon implication dans cette étude concerne la réalisation des expériences d'immuno-précipitations de chromatine de la figure 5, dirigés contre les protéines HIF2 α et c-MYC.

b) Article

Reproduit en accord avec la licence CC BY 3.0.

Repression of PLA2R1 by c-MYC and HIF-2alpha promotes cancer growth

David Vindrieux^{1,2,3,4}, Guillaume Devailly^{1,2,3,4}, Arnaud Augert^{1,2,3,4}, Benjamin Le Calvé^{1,2,3,4}, Mylène Ferrand^{1,2,3,4}, Pascal Pigny^{5,6}, Léa Payen^{1,2,3,4}, Gérard Lambeau⁷, Michael Perrais⁵, Sébastien Aubert^{5,8}, Hélène Simonnet^{1,2,3,4}, Robert Dante^{1,2,3,4} and David Bernard^{1,2,3,4}

¹ Inserm U1052, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, Lyon, France;

² CNRS UMR5286, Lyon France;

³ Centre Léon Bérard, Lyon, France;

⁴ Université de Lyon, Lyon, France;

⁵ INSERM U837, Jean-Pierre Aubert Research Center, Lille, France;

⁶ Institut de Biochimie et Biologie Moléculaire Centre de Biologie Pathologie CHRU Lille, Lille, France;

⁷ Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire, UMR6097, CNRS and Université de Nice-Sophia Antipolis, Valbonne, France;

⁸ Institut de Pathologie, CHRU, Faculté de Médecine, Université de Lille, Lille, France.

Correspondence to: David Bernard, email: david.bernard@lyon.unicancer.fr

Keywords: VHL; MYC; HIF; PLA2R1; tumor suppressor

Received: December 11, 2013

Accepted: January 16, 2014

Published: January 16, 2014

This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

ABSTRACT:

Loss of secreted phospholipase A2 receptor (PLA2R1) has recently been found to render human primary cells more resistant to senescence whereas increased PLA2R1 expression is able to induce cell cycle arrest, cancer cell death or blockage of cancer cell transformation in vitro, suggesting that PLA2R1 displays tumor suppressive activities. Here we report that PLA2R1 expression strongly decreases in samples of human renal cell carcinoma (RCC). Knockdown of PLA2R1 increases renal cancer cell tumorigenicity supporting a role of PLA2R1 loss to promote in vivo RCC growth. Most RCC result from Von Hippel-Lindau (VHL) tumor suppressor loss-of-function and subsequent gain-of-function of the oncogenic HIF-2alpha/c-MYC pathway. Here, by genetically manipulating VHL, HIF-2alpha and c-MYC, we demonstrate that loss of VHL, stabilization of HIF-2alpha and subsequent increased c-MYC activity, binding and transcriptional repression, through induction of PLA2R1 DNA methylation closed to PLA2R1 transcriptional start site, results in decreased PLA2R1 transcription. Our results describe for the first time an oncogenic pathway leading to PLA2R1 transcriptional repression and the importance of this repression for tumor growth.

INTRODUCTION

The secreted phospholipase A2 receptor (PLA2R1) belongs to the mannose receptor family. It binds several secreted phospholipases A2 (sPLA2s) and various collagens and carbohydrates [1-5]. We have previously discovered that in normal human cells, loss of the phospholipase A2 receptor (PLA2R1) delays senescence or favors senescence escape, depending on the stress [6, 7], senescence being a tumor suppressive pathway [8-13]. In addition, PLA2R1 knockout mice are more prone to form tumors induced by RAS [7]. These tumor suppressive effects of PLA2R1 are at least in part mediated by increased JAK2 activity and increased ROS production [6, 7, 14]. Together these results strongly support a tumor-suppressive activity of PLA2R1. Nevertheless, the mechanisms regulating PLA2R1 expression are currently unknown.

Analysis in the Oncomine database, a cancer microarray database allowing to perform differential expression analyses comparing most major types of cancer with respective normal tissues, shows that numerous cancers display an unusually low PLA2R1 mRNA level [7]. Amongst these cancers, kidney cancers are the one displaying the strongest decrease. In addition, PLA2R1 has recently been described as an important protein in kidney physiopathology [15], we have then decided to investigate whether it might play a tumor-suppressive

role in kidney cancer. The most frequent and aggressive renal cancer is conventional renal cancer or clear cell Renal Cell Carcinoma (RCC). These highly vascularized tumors, either sporadic or familial, are strongly associated with biallelic inactivation of the Von Hippel-Lindau gene (*VHL*), by point mutation, loss of heterozygosity, and/or promoter methylation [16]. The VHL tumor suppressor is an E3-ubiquitin ligase recognizing regulatory proteins such as the alpha subunits of the Hypoxia Inducible Factors (HIFs), the interaction being followed, generally, by ubiquitination and proteasomal degradation of the partner. Loss of VHL in RCC thus results in increased HIF α stability. This stabilization of HIF α proteins, particularly HIF2 α , is thought to be a driving force of RCC initiation and progression [17, 18].

We have thus investigated the possibility that PLA2R1 might play a role in regulating kidney cell transformation and RCC growth and have examined how its expression might be related to the VHL pathway.

RESULTS

PLA2R1 expression is lost in clear cell renal cell carcinoma

To examine whether PLA2R1 might exert tumor-suppressive activity in RCC, we first analyzed transcript-

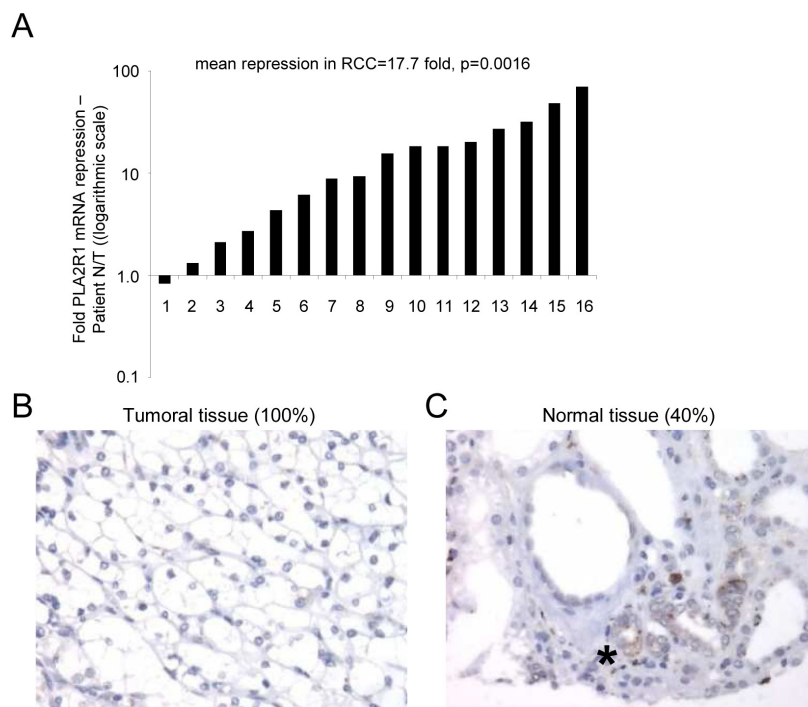


Figure 1: PLA2R1 expression decreases in clear cell renal cell carcinoma. (A) RNAs were extracted from both normal and cancer tissues from the same patients (n=16) and PLA2R1 transcript levels were assayed by qRT-PCR and normalized against PPIA. (B) Photograph representative of 100% of the analyzed samples (n=27), PLA2R1 immunostaining of RCC. (C) Photograph representative of 40% of the analyzed samples (n=27), PLA2R1 immunostaining of normal renal tubules. The asterisk shows the PLA2R1 staining in some normal renal tubules.

level PLA2R1 expression in normal and RCC tissue samples. Strikingly, the PLA2R1 mRNA level was markedly lower in RCC tissue samples than in their normal counterparts (Figure 1A). This transcript-level down regulation led us to look at the protein level. Using a tissue microarray comprising twenty-seven pT3 RCC tumor tissue samples as described in [21], we found PLA2R1 to be undetectable in all the RCC tumor tissues (Figure 1B). In contrast, the protein was detected in the normal tissue in 40% of the examined samples, in the cells from which RCC originates: cortical tubular epithelial renal cells (Figure 1C) [25].

A PLA2R1 decrease accelerates RCC growth in mice

As PLA2R1 levels strongly decreased in RCC, we next examined whether PLA2R1 down regulation might influence RCC tumor growth. To this end we

generated stable PLA2R1-knockdown ACHN cells, using two different PLA2R1-targeting shRNAs (Figure 2A). PLA2R1-knockdown ACHN cells displayed increased transformation ability, as demonstrated by their capacity to form more and bigger colonies than control ACHN cells in soft agar (Figure 2B). Next, control or PLA2R1 knockdown ACHN cells were injected subcutaneously into nude mice and tumor growth was monitored for 47 days after grafting. PLA2R1 knockdown was found to increase tumor growth significantly, the average tumor volume reaching about three times that of control tumors (Figure 2C-D and Supplementary Figure S1).

We next investigated the mechanism of this tumor growth acceleration by analyzing proliferation and cell death in the xenograft tumors. Ki-67 staining revealed a significant increase in proliferation in response to PLA2R1 depletion (Figure 2E-F), whereas TUNEL assays revealed no impact of PLA2R1 depletion on cell death (Figure 2G).

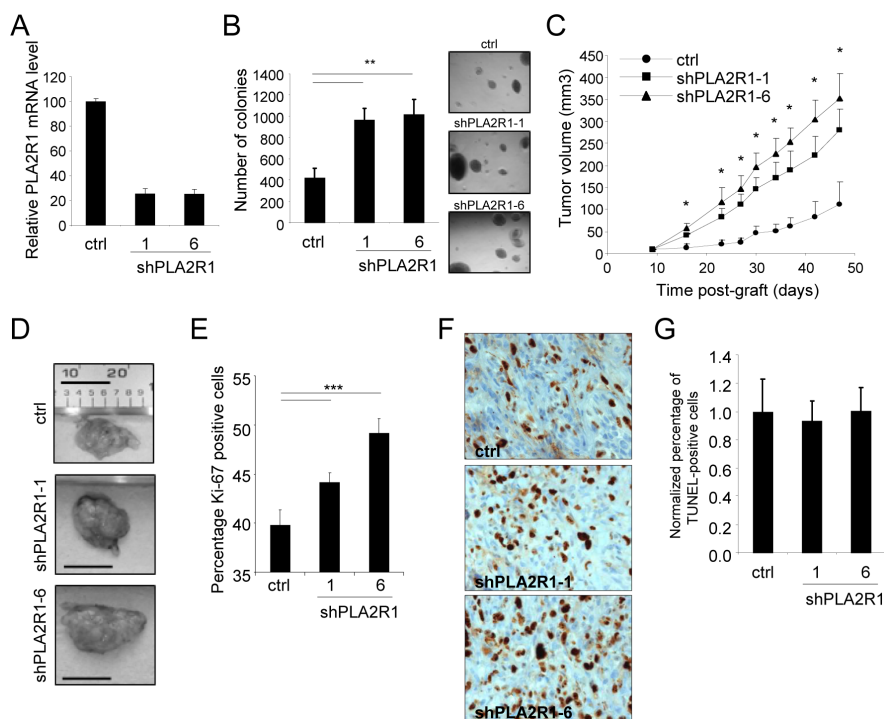


Figure 2: PLA2R1 knockdown favors RCC-derived cell tumorigenicity. The ACHN cell line was infected with a control or PLA2R1-targeting shRNA and infected cells were puromycin selected. (A) RNAs were prepared and reverse-transcribed. Quantitative PCR was performed to measure the relative PLA2R1 mRNA level, normalized with respect to the ACTB level, in each indicated condition. (B) Twenty-five thousand ACHN cancer cells were seeded into agar and allowed to grow for 2 weeks. After 2 weeks, colonies were counted for each indicated condition and representative photographs are displayed (mean±SD, 3 independent experiments). (C) Five million ACHN cells infected with a control or PLA2R1-targeting shRNA vector were grafted into the right flanks of 7-week-old nude mice. Tumor growth was monitored with a caliper. Tumor volume was calculated as $V = L \times l \times H / 2$. Statistical analysis was performed with a T-test and the results are shown in Supplementary Figure 1. (D) Photographs show for each condition a representative picture of a tumor at necropsy. Scale bar represents 1 cm. (E-G), Control and PLA2R1-knockdown ACHN-derived tumors were collected, fixed, and embedded. Tumor tissue sections were used to analyze proliferation and cell death for each experimental condition. (E) Immunohistochemical detection of the Ki-67 proliferation marker. Nuclei were counterstained with hematoxylin. Ki-67-positive cells were counted in at least four independent fields per tumor in at least three independent tumors. (F) Representative photographs are shown. (G) TUNEL assays were performed to label dying cells. After Hoechst staining of the nuclei, the percentage of TUNEL-positive cells was calculated for each condition and normalized with respect to the control value (at least 3 independent tumors and at least 4 independent fields/tumor were analyzed).

Constitutive PLA2R1 expression inhibits RCC growth in mice

The above observation that decreasing PLA2R1 improves growth of RCC tumors led us to examine the effect of constitutively expressing PLA2R1 in RCC cell lines (ACHN and 786-O). We first infected these cells with a control (ctrl) or a PLA2R1 encoding retroviral vector and checked for constitutive PLA2R1 expression (Figure 3A and Supplementary Figure S2A). Constitutive PLA2R1 expression was found to strongly inhibit the ability of ACHN and 786-O cells to form clones in soft agar (Figure 3B and Supplementary Figure S2B). 786-O-derived tumors grew rapidly in mice, but this tumor growth was slowed down when PLA2R1 was constitutively expressed (Supplementary Figure S2C-E). Importantly, the slow growing ACHN derived tumors responded strongly to constitutive PLA2R1 expression: after reaching a mean size of 161 mm³, they were found to regress (Figure 3C-D and Supplementary Figure S3). We conclude that constitutive PLA2R1 expression delays or blocks RCC xenograft growth, depending on the implanted cells.

In 786-O and ACHN derived tumors, constitutive expression of PLA2R1 was found to affect tumor growth

both by decreasing cell proliferation (as estimated by Ki-67 staining, Figure 3E-F and Supplementary Figure S4A-B) and increasing cell death (as estimated in TUNEL assays, Figure 3G-H and Supplementary Figure S4C-D). Together, these data provide the first evidence that increasing the PLA2R1 level causes tumor-suppressive effects in RCC.

VHL loss of function decreases PLA2R1 levels in RCC

Having observed that PLA2R1 is lost in human RCC samples and that PLA2R1 deregulation strongly impacts RCC tumor growth, we next investigated the mechanism regulating PLA2R1 expression in RCC. The development of most RCCs involves inactivation of the VHL tumor suppressor gene by one or more of the following mechanisms: genetic mutation in the coding region, loss of heterozygosity, promoter hypermethylation [16]. As the twenty-seven RCC samples examined in the TMA showed no detectable PLA2R1 protein, we next investigated whether PLA2R1 might be a downstream target of VHL. First we measured PLA2R1 mRNA levels in five characterized RCC cell lines. ACHN cancer cells

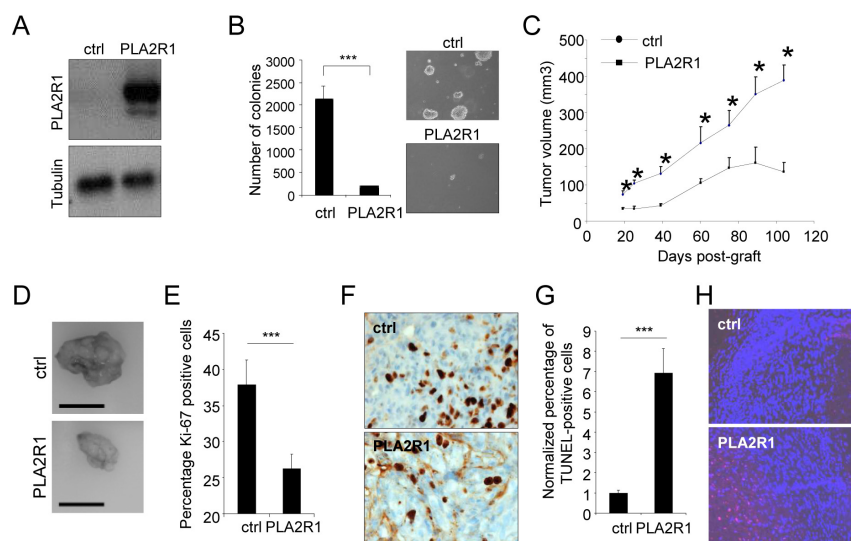


Figure 3: PLA2R1 expression inhibits transformation and decreases tumor growth. ACHN cells were infected with a control or PLA2R1-encoding vector. Infected cells were next puromycin selected. (A) Ectopic expression of PLA2R1 was analyzed by western blotting. Tubulin was used as a loading control. (B) Twenty-five thousand ACHN cells were seeded in agar and allowed to grow. After 2 weeks, colonies were counted for each indicated condition and representative photographs are displayed (mean±SD, 3 independent experiments). Histograms show an experiment representative of 3 independent experiments. Statistics were performed with the T-test. *** represents a p value< 0.005. (C) Five million ACHN cells were grafted into the right flanks of 7-week-old nude mice. Tumor growth was monitored with a caliper. Tumor volume was calculated as $V = L \times l \times H/2$. Statistical analysis was performed with a T-test and the results are shown in Supplementary Figure 3. (D) Photographs show a picture of tumors at necropsy for each condition. Scale bar represents 1cm. (E-H) Control and PLA2R1-expressing ACHN-derived tumors were collected, fixed, and embedded. Tissue sections from tumors were then used to analyze proliferation and cell death. (E-F) Immunohistochemistry against Ki-67 proliferation marker was performed. Nuclei were counterstained by an hematoxylin solution. (E) Histogram representing the percentage of Ki-67 positive cells was displayed. Positive cells were counted on at least 4 independent fields per tumor and at least 3 independent tumors. (F) Representative photographs are shown. (G-H) TUNEL assays were performed to label dying cells. After nuclear staining with Hoechst dye, the percentage of TUNEL positive cells was calculated (at least 3 independent tumors and at least 4 independent fields/tumor analyzed). (G) TUNEL-positive cell percentages are presented relatively to control cells. (H) Images are shown.

are known to express a functional VHL, whereas Caki-2, 786-O, RCC4, and RCC10 cells express a mutated nonfunctional VHL protein. Interestingly, a higher PLA2R1 mRNA level was found in VHL functional ACHN cells than in any of the VHL nonfunctional cancer cell lines (Figure 4A).

Functional confirmation that PLA2R1 is positively regulated by VHL was obtained by engineering VHL negative RCC10 and 786-O cells to express the VHL gene constitutively (the resulting cells are respectively named RCC10+VHL and 786-O+VHL cells): both engineered RCC cell lines showed an increased PLA2R1 transcript level (Figure 4B-C).

VHL exerts its tumor-suppressive activity by inducing degradation of HIF α proteins, but it might also exert HIF-independent activities [17, 18, 26]. To determine whether HIF α protein degradation is involved in VHL-induced PLA2R1 transcription, we examined PLA2R1 transcript levels in ACHN (Figure 4D), RCC10+VHL (Figure 4E), and 786-O+VHL cells (Figure 4F) constitutively synthesizing a non-degradable form of either HIF1 α or HIF2 α [20]. Constitutive expression of

HIF2 α strongly reduced PLA2R1 mRNA level in all three cases. Forced HIF1 α showed less marked effects (Figure 4D-F).

Together these data demonstrate that PLA2R1 expression is regulated by VHL, and that VHL loss of function in RCC results in PLA2R1 loss of expression, mainly through an HIF2 α dependent mechanism.

An HIF2 α -MYC repressive pathway, downstream of VHL loss of function, mediates PLA2R1 repression in RCC

Even if HIF2 α is generally described as a transcriptional activator, it has also been reported to repress transcription [27]. Chromatin immunoprecipitation (ChIP) experiments performed on 4 independent PLA2R1 genomic regions (Figure 5A) revealed no direct binding of

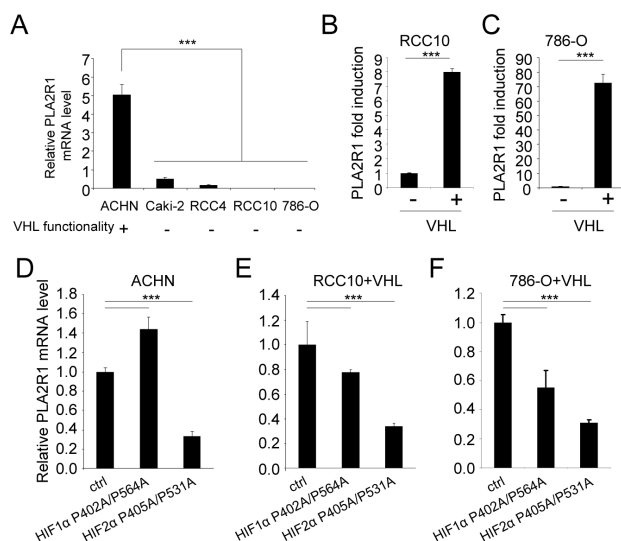


Figure 4: VHL regulates PLA2R1 expression in RCC-derived cells. (A) PLA2R1 transcript levels were assayed by qRT-PCR and normalized against ACTB in five RCC cell lines: ACHN, Caki-2, RCC4, RCC10, and 786-O. VHL function is indicated for each cell line. (B) PLA2R1 transcript levels were assayed by qRT-PCR and normalized against ACTB in 786-O and (C) RCC10 control or constitutively expressing VHL. Histograms show an experiment representative of three independent experiments. (D-F) Cells were infected with a control retroviral vector or one encoding a VHL-resistant HIF1 α mutant or a VHL-resistant HIF2 α mutant. Infected cells were puromycin-selected. RNAs were prepared and reverse transcribed. Quantitative PCR was performed against PLA2R1 and normalized with respect to the ACTB mRNA level in (D) ACHN cells, (E) in RCC10+VHL cells and (F) in 786-O+VHL cells as indicated.

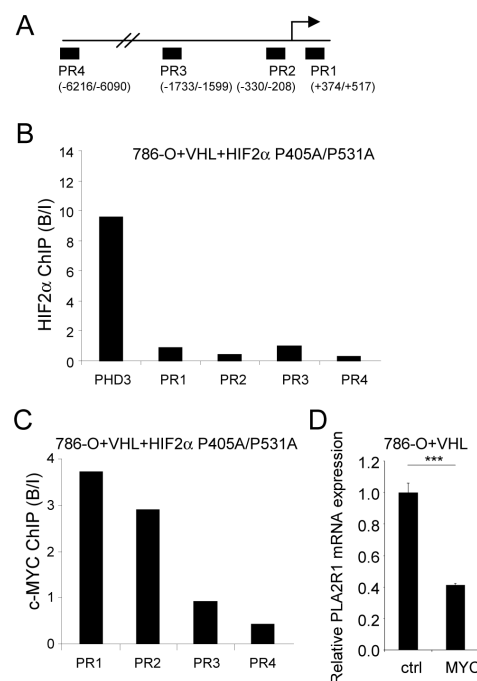


Figure 5: An HIF2 α -MYC pathway represses PLA2R1 expression. (A) Schematic representation of the PLA2R1 genomic regions tested for HIF2 α binding. (B) Binding of HIF2 α on PLA2R1 genomic regions was assayed by chromatin immunoprecipitation. ChIP was performed on 786-O+VHL+HIF2 α cells and PCR performed on the input and bound fractions. PHD3 was used as positive control for HIF2 α binding and 4 genomic regions of PLA2R1 were assayed. (C) Binding of c-MYC on PLA2R1 genomic regions was assayed by chromatin immunoprecipitation. ChIP was performed on 786-O+VHL+HIF2 α cells and PCR performed on the input and bound fractions. Four genomic regions of PLA2R1 (PR1 to PR4) were assayed. (D) 786-O+VHL cells were infected with a control or a c-MYC encoding retroviral vector and puromycin selected. Five days later, RNA were prepared and retro transcribed. Quantitative PCR was performed against PLA2R1 and normalized with respect to the ACTB mRNA level.

HIF2 α , whereas and as expected it was found to bind PHD3 [23], a direct HIF2 α target (Figure 5B).

HIF2 α exerts its oncogenic activity by increasing c-MYC transcriptional activities, the activating as well as the repressing ones [28, 29]. To check whether c-MYC might be a downstream effector of HIF2 α to repress PLA2R1 expression, we immunoprecipitated c-MYC DNA-bound regions in HIF2 α -overexpressing cells, cells in which PLA2R1 expression is repressed (Figure 4F). Interestingly, c-MYC was bound to PLA2R1 genomic regions closed to the transcriptional start site (PR1 and PR2) and not to distal PLA2R1 genomic regions (PR3 and PR4) (Figure 5C). Further supporting a repressive role of c-MYC on PLA2R1 expression, its constitutive expression was found to inhibit PLA2R1 expression in 786-O+VHL cells, cells in which PLA2R1 is induced (Figure 5D). These data demonstrate a pathway involving loss of VHL, increased HIF2 α and c-MYC activity leading to PLA2R1 repression in RCC.

The VHL-HIF-MYC pathway regulate PLA2R1 expression through DNA methylation

C-MYC represses transcription by various mechanisms including DNA methylation [30, 31]. Interestingly, PLA2R1 has recently been shown to be repressed by DNA methylation in leukemic cells [32] pointed out a potential mechanism by which the VHL-HIF2 α -MYC pathway might regulate PLA2R1 expression in RCC.

To know whether the expression of PLA2R1 might be regulated by DNA methylation, we treated VHL-positive (ACHN) and -negative (RCC10 and 786-O) derived RCC cell lines with the 5-azadeoxycytidine (5-aza-dC) DNA methyl transferase (DNMT) inhibitor. Both VHL-negative cell lines displayed a strong PLA2R1 induction upon DNMT inhibition by contrast to the VHL-positive cell line (Fig. 6A). This suggests that the

repressive VHL-HIF2 α -MYC pathway regulates PLA2R1 expression through DNA methylation.

We next carried out bisulphite genomic sequencing to compare PLA2R1 methylation in ACHN cells (VHL-positive, PLA2R1-positive), 786-O cells (VHL-negative, PLA2R1-negative) and 786-O+VHL cells (PLA2R1 positive). CpG methylation were examined in a PLA2R1 region spending from -378 to +497, a region overlapping the c-MYC binding regions as seen in the figure 5C. CpG island hypermethylation was observed in PLA2R1-negative 786-O cells. By contrast, this island was not methylated after forced VHL expression in these cells or in VHL-positive ACHN cells further suggesting that this repressive pathway is acting by controlling DNA methylation on PLA2R1 promoter.

DISCUSSION

Clear cell renal cell carcinoma represents 80% of all renal cancers and is the most aggressive and deadly one. We show here that PLA2R1 is lost in RCC and that this loss might be an important event increasing RCC growth as its decrease accelerates tumor growth in nude mice. We have also examined the effect of using cells constitutively expressing PLA2R1 in nude-mouse xenograft RCC models, using two different RCC-derived cell lines (ACHN or 786-O) to generate the tumors. In both cases the implanted cells show a reduced tumor-promoting potential, due both to induce cell death and slower proliferation. Most interestingly, the slow-growing ACHN-derived tumors, after some initial tumor growth, are regressing. This suggests that restoring this pathway might be an effective way to trigger RCC regression.

A major step in the initiation of the RCC is the VHL tumor-suppressor gene inactivation. PLA2R1 expression correlates with loss of VHL tumor-suppressor function, and restoring VHL expression is sufficient to restore PLA2R1 expression in RCC-derived cell lines. Our observation support the view that this effect of VHL

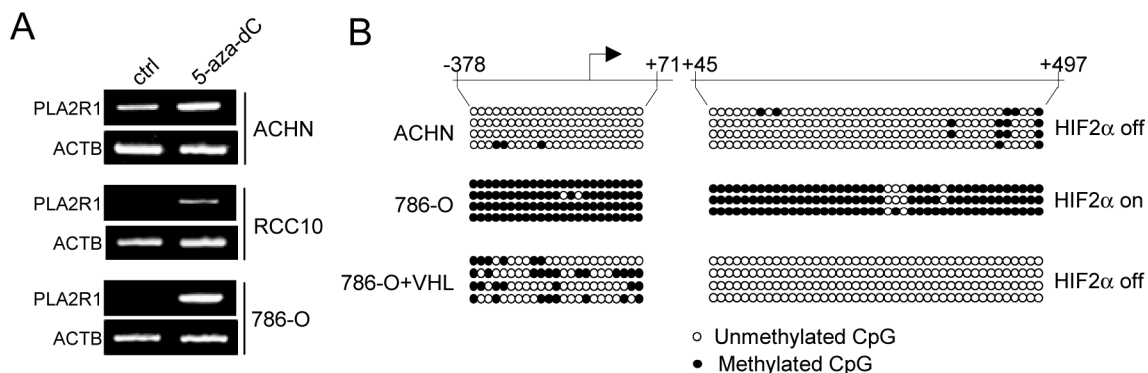


Figure 6: The VHL-HIF2 α -MYC regulates PLA2R1 expression through its DNA methylation. (A) Indicated RCC-derived cell lines were treated with or without 5-aza-dC at 5 μ M during 24 hrs. RNA were prepared, retro-transcribed and PCR performed against PLA2R1 or ACTB as loading control using the primers described in [7]. (B) Genomic DNA of the indicated cells were prepared and subjected to sodium bisulphate modification. PCR was performed to amplify the indicated regions. The amplified regions were subcloned and subcloned fragments were sequenced to determine whether or not the CpG were methylated.

depends mainly on its ability to degrade its HIF2 α target and not HIF1 α . HIF2 α and HIF1 α are both down regulated by VHL. Although it was initially thought that the two proteins share common pro-tumor functions, recent data suggest some specificity for each protein, in terms of transcriptional targets and interacting proteins [33]. Importantly HIF2 α , unlike HIF1 α , is now viewed as a key oncogenic actor in RCC, particularly through its ability to increase c-MYC activity [28, 29].

HIF2 α is unable to bind PLA2R1 genomic regions suggesting that HIF2 α indirectly represses PLA2R1. Transcriptional repression by c-MYC of genes blocking tumor growth such as p21 and p27 CKIs is part of its pro tumoral program [28]. c-MYC, which is known to mediate HIF2 α oncogenic effect, is thus a good candidate to mediate HIF2 α -induced PLA2R1 repression. Confirming this hypothesis, c-MYC binds PLA2R1 genomic regions closed to PLA2R1 transcription start site and its forced expression represses PLA2R1 expression. C-MYC is known to repress transcription by recruiting various repressive complexes including the DNA methyl transferases (DNMT), the enzymes that methylate the CpG [30, 31] and PLA2R1 has recently been found to be methylated,[32] suggesting that c-MYC might exert its repressive activity through induction of PLA2R1 DNA methylation. Indeed, inhibiting the DNMT in cells expressing low levels of PLA2R1 is sufficient to restore PLA2R1 expression. In addition, PLA2R1 promoter methylation is observed when VHL is not functional; then when the HIF2 α -MYC pathway exerts its repressive activity. By contrast, PLA2R1 CpG island methylation is lost when VHL is functional; then when the HIF2 α -MYC pathway is off and unable to exert its repressive activity on PLA2R1.

In conclusion, our study report novel findings showing that PLA2R1 is repressed in RCC by the loss of VHL tumor suppressor and the activation of the oncogenic HIF2 α -c-MYC pathway and that repression favors RCC tumorigenecity.

MATERIALS AND METHODS

Cell Culture

The human kidney cancer cell lines ACHN, Caki-2, RCC4, RCC10, and 786-O were obtained from ATCC and virus-producing GP293 cells from Clontech. VHL-expressing RCC4, RCC10, and 786-O cells have been described in [19]. Cell lines were cultured in DMEM (Invitrogen) containing Glutamax and supplemented with 10% FBS (Lonza) and 1% penicillin/streptomycin (Invitrogen). Upon receipt, cells were thawed, amplified and aliquots frozen. Experiments were performed from these aliquots within a 4 months period without further

authentication of the cell lines.

Vectors

Human wild-type membrane-bound PLA2R1 (GenBank NM 007366) was generated by PCR from the PLA2R1-encoding pSupF vector and ligated into the pGEMTeasy vector (Promega), fully sequenced, and subsequently subcloned in the pLPCX retroviral vector (Clontech) between XhoI/NotI restriction sites. PLA2R1-shRNA-encoding retroviral vectors have been described in [6]. The following vectors were supplied by Addgene: pBabe-VHL [19] (# 19234), pBabe-HIF-1 α P402A/P564A (#19005), pBabe-HIF2 α P405A/P531A (#19006) [20].

Immunohistochemistry

The RCC study was performed on 4- μ m-thick sections from a tissue microarray comprising 27 formalin- and paraffin-embedded RCC tumor tissue samples, each with the surrounding morphologically benign-appearing renal parenchyma.[21] Heat antigen retrieval was done in citrate buffer pH 6 in a pressure cooker. Endogenous peroxidase was blocked by addition of H₂O₂. Incubation with PLA2R1 antibody was carried out overnight at 4°C. In the negative control, the primary antibody was omitted [15]. In the xenograft experiments, fresh tumors were fixed for 48 h in 10% neutral buffered formalin (Sigma). Paraffin-embedded sections were treated with unmasking solution (VectorLABS) and exposed to H₂O₂ to block endogenous peroxidase activity. For Ki-67 staining, tumor sections were incubated with an antibody directed against Ki-67 antigen (Dako), a biotinylated secondary antibody (Dako), and streptavidin-HRP solution (Dako). Nuclei were counterstained with hematoxylin solution (Sigma) and analyzed by light microscopy. For TUNEL assays, tumor sections were treated with 4% PFA and 0.2% PBS-Triton and then incubated with TdT enzyme and biotinylated dUTP (Roche) according to the manufacturer's instructions. Biotinylated DNA was detected with Cy-3-coupled streptavidin (Interchim). Nuclei were stained with Hoechst dye (Sigma). Samples were analyzed by fluorescence microscopy.

Soft-agar and xenograft experiments

To measure anchorage-independent growth, cells were detached with trypsin and suspended in growth medium. Base agar was prepared with 0.75% low-melting agarose (Lonza) in growth medium. The top agar contained the cells suspended in 0.45% low-melting agarose (1.25-2.5x10⁴ cells/well in 6-well plates, for 786-O and ACHN respectively). Plates were incubated for 1 (786-O) or 2 weeks (ACHN) and colonies were counted

under a bright light microscope.

For the xenograft experiments, 5×10^6 control or modified cells in 200 μ l PBS/Matrigel (BD Biosciences) (3/1, v/v) were injected subcutaneously into the right flanks of 6-week-old female athymic nude mice (nu/nu). Tumor size was measured with an electronic caliper, weekly or at sacrifice. Tumor volume (V) was calculated using the following formula: $V = a \times b \times c / 2$, where “a” is the longest diameter, “b” is the shortest one, and c the depth. Numbers of mice with size details and statistics are indicated in Supplementary Figures. The mice were housed and bred in the specific pathogen-free animal facility AniCan at the CRCL, Lyon, France. The experiments were performed in accordance with the animal care guidelines of the European Union and with French legislation and were approved by the local Animal Ethics Evaluation Committee (CECCAPP).

Transfection and infection

To transfect GP293 cells, PEI reagent was used according to the manufacturer's recommendations (Euromedex). Two days after transfection, the viral supernatant mixed with fresh medium (1/2) and polybrene (final concentration: 8 μ g/mL) was used to infect target cells. The cells were infected for 12–24 h depending on the cell type. Importantly, the infection protocols were designed so that practically all the cells were infected, as judged by the results of infection with a GFP control. One day post-infection, cells of each cell line used were selected with the appropriate antibiotic at the final concentration of 500 ng/ml.

Immunoblots

Cell lysates were prepared in Laemmli buffer (50mM Tris-HCl, pH 7.4, 250mM NaCl, 0.2% Triton X-100, 5mM EDTA) supplemented with protease and phosphatase inhibitors (Roche). Lysates were clarified by centrifugation at 14,000 rpm for 30 min at 4°C. Protein concentrations were measured by means of the Bradford protein assay (Biorad #500-0006). Cell extracts were resolved by SDS-PAGE under non-reducing conditions for PLA2R1 detection or reducing conditions for detection of other proteins and transferred onto nitrocellulose membranes. For detection, the following primary antibodies were used: anti-PLA2R1 [15], anti-tubulin (T6199, Sigma). After overnight incubation at 4°C with primary antibodies, the blots were washed with PBS containing 0.05% Tween, incubated with a peroxidase-coupled secondary antibody, and washed again in PBS containing 0.05% Tween. Antigen-antibody complexes were detected by ECL (Amersham).

RNA extraction, reverse transcription, and PCR

Normal and tumoral human kidney tissues were provided by the biobank of the CHU of Lille. Phenol-chloroform total RNA extraction was performed with TriReagent (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA). PhaseLockGel tubes (Eppendorf, Hamburg, Germany) were used for phase separation. cDNA was synthesized from 3 μ g total RNA with the First-Strand cDNA Synthesis Kit (GE Healthcare, Chalfont St Giles, UK). The RT reaction mixture was diluted 1/60 and used as cDNA template for qPCR analysis. TaqMan quantitative PCR analysis was carried out on a LightCycler 2.0 System (Roche Applied Science). PCR mixtures contained LightCycler TaqMan mix, 200 nM primers, and 1.67 μ l cDNA template in a 6.67- μ l reaction volume. The PPIA or ACTB housekeeping gene, as indicated, was used in kidney samples for normalization of PLA2R1 mRNA expression in each sample type. Intron-spanning real-time PCR assays were designed with the ProbeFinder software (Roche Applied Science). All real-time PCR primers are listed in Supplementary Table 1.

Chromatin Immunoprecipitation (ChIP) experiments

ChIP experiments were performed as described in [22] using about 30 millions of 786-0+VHL+HIF2 α growing cells. HIF2 α [23] or c-MYC (sc-764 X, Santa Cruz Biotechnology) specific antibodies were used for the immunoprecipitation. PCR primers for quantitative PCR are listed in Supplementary Table 2.

Bisulphite genomic sequencing

Sodium bisulphite reactions were carried out as previously described in [24]. Two regions (nt positions –378 to +71, and nt positions +45 to +497 from the *PLA2R1* transcription start site) were analyzed. PCR amplifications were performed in 100 μ l using the HotStart *Taq* DNA polymerase Kit (Qiagen) and 0.25 μ M of the primers (Supplementary Table S3), after 15 min at 95°C for *Taq* polymerase activation and 35 cycles (0.5 min denaturation at 94°C, 1 min annealing at 52°C, and 1.5 min extension at 72°C). To determine accurately the proportion of methylated CpG, PCR products were cloned into a pGEM-T vector (Promega) and random clones were analyzed by automatic sequencing (Genomics, Beckman Coulter).

Statistics

Graphs are presented with SD as error bars, and Student's t test was used to determine the p value (* p <

0.05; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$) unless indicated otherwise in the figure legends.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank the laboratory members for helpful discussions. This work was carried out with the support of the Association for International Cancer Research, the Institut National du Cancer, and the RTRS Fondation Synergie Lyon Cancer.

REFERENCES

- Lambeau G, Ancian P, Barhanin J and Lazdunski M. Cloning and expression of a membrane receptor for secretory phospholipases A2. *J Biol Chem*. 1994; 269(3):1575-8.
- Llorca O. Extended and bent conformations of the mannose receptor family. *Cell Mol Life Sci*. 2008; 65(9):1302-10.
- Rouault M, Le Calvez C, Boilard E, Surrel F, Singer A, Ghomashchi F, Bezzine S, Scarzello S, Bollinger J, Gelb MH and Lambeau G. Recombinant production and properties of binding of the full set of mouse secreted phospholipases A2 to the mouse M-type receptor. *Biochemistry*. 2007; 46(6):1647-62.
- Murakami M, Taketomi Y, Girard C, Yamamoto K and Lambeau G. Emerging roles of secreted phospholipase A2 enzymes: Lessons from transgenic and knockout mice. *Biochimie*. 2010; 92(6):561-82.
- Ancian P, Lambeau G and Lazdunski M. Multifunctional activity of the extracellular domain of the M-type (180 kDa) membrane receptor for secretory phospholipases A2. *Biochemistry*. 1995; 34(40):13146-51.
- Augert A, Payre C, de Launoit Y, Gil J, Lambeau G and Bernard D. The M-type receptor PLA2R regulates senescence through the p53 pathway. *EMBO Rep*. 2009; 10(3):271-7.
- Vindrieux D, Augert A, Girard CA, Gitenay D, Lallet-Daher H, Wiel C, Le Calvé B, Gras B, Ferrand M, Verbeke S, de Launoit Y, Leroy X, Puisieux A, et al. PLA2R1 mediates tumor suppression by activating JAK2. *Cancer Res*. 2013; 73(20):6334-45.
- Bodnar AG, Ouellette M, Frolkis M, Holt SE, Chiu CP, Morin GB, Harley CB, Shay JW, Lichtsteiner S and Wright WE. Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science*. 1998; 279(5349):349-52.
- Vaziri H and Benchimol S. Reconstitution of telomerase activity in normal human cells leads to elongation of telomeres and extended replicative life span. *Curr Biol*. 1998; 8(5):279-82.
- Adams PD. Healing and hurting: molecular mechanisms, functions, and pathologies of cellular senescence. *Mol Cell*. 2009; 36(1):2-14.
- Collado M and Serrano M. Senescence in tumours: evidence from mice and humans. *Nat Rev Cancer*. 2010; 10(1):51-7.
- Ewald JA, Desotelle JA, Wilding G, Jarrard DF. Therapy-induced senescence in cancer. *J Natl Cancer Inst* 2010 Oct 20;102(20):1536-46.
- Nardella C, Clohessy JG, Alimonti A and Pandolfi PP. Pro-senescence therapy for cancer treatment. *Nat Rev Cancer*. 2011; 11(7):503-11.
- Augert A, Vindrieux D, Girard CA, Le Calvé B, Gras B, Ferrand M, Bouchet BP, Puisieux A, de Launoit Y, Simonnet H, Lambeau G and Bernard D. PLA2R1 kills cancer cells by inducing mitochondrial stress. *Free Radic Biol Med*. 2013;65C:969-77.
- Beck LH, Jr., Bonegio RG, Lambeau G, Beck DM, Powell DW, Cummins TD, Klein JB and Salant DJ. M-type phospholipase A2 receptor as target antigen in idiopathic membranous nephropathy. *N Engl J Med*. 2009; 361(1):11-21.
- Kim WY and Kaelin WG. Role of VHL gene mutation in human cancer. *J Clin Oncol*. 2004; 22(24):4991-5004.
- Maxwell PH, Wiesener MS, Chang GW, Clifford SC, Vaux EC, Cockman ME, Wykoff CC, Pugh CW, Maher ER and Ratcliffe PJ. The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature*. 1999; 399(6733):271-5.
- Shen C and Kaelin WG, Jr. The VHL/HIF axis in clear cell renal carcinoma. *Semin Cancer Biol*. 2013; 23(1):18-25.
- Li L, Zhang L, Zhang X, Yan Q, Minamishima YA, Olumi AF, Mao M, Bartz S and Kaelin WG Jr. Hypoxia-inducible factor linked to differential kidney cancer risk seen with type 2A and type 2B VHL mutations. *Mol Cell Biol*. 2007; 27(15):5381-92.
- Yan Q, Bartz S, Mao M, Li L and Kaelin WG, Jr. The hypoxia-inducible factor 2alpha N-terminal and C-terminal transactivation domains cooperate to promote renal tumorigenesis in vivo. *Mol Cell Biol*. 2007; 27(6):2092-102.
- Aubert S, Fauquette V, Hemon B, Lepoivre R, Briez N, Bernard D, Van Seuning I, Leroy X and Perrais M. MUC1, a new hypoxia inducible factor target gene, is an actor in clear renal cell carcinoma tumor progression. *Cancer Res*. 2009; 69(14):5707-15.
- Chatagnon A, Perriard L, Nazaret N, Croze S, Benhattar J, Lachuer J and Dante R. Preferential binding of the methyl-CpG binding domain protein 2 at methylated transcriptional start site regions. *Epigenetics*. 2011; 6(11):1295-307.
- Lau KW, Tian YM, Raval RR, Ratcliffe PJ and Pugh CW. Target gene selectivity of hypoxia-inducible factor- α in renal cancer cells is conveyed by post-DNA-binding mechanisms. *Br J Cancer*. 2007; 96(8):1284-92.
- Perrin D, Ballestar E, Fraga MF, Frappart L, Esteller M, Guerin JF and Dante R. Specific hypermethylation of LINE-1 elements during abnormal overgrowth and differentiation of human placenta. *Oncogene*. 2007; 26(17):2518-24.
- Pavlovich CP and Schmidt LS. Searching for the hereditary

- causes of renal-cell carcinoma. *Nat Rev Cancer*. 2004; 4(5):381-93.
26. Li M and Kim WY. Two sides to every story: the HIF-dependent and HIF-independent functions of pVHL. *J Cell Mol Med*. 2011; 15(2):187-95.
 27. Xu J, Wang B, Xu Y, Sun L, Tian W, Shukla D, Barod R, Grillari J, Grillari-Voglauer R, Maxwell PH and Esteban MA. Epigenetic regulation of HIF-1alpha in renal cancer cells involves HIF-1alpha/2alpha binding to a reverse hypoxia-response element. *Oncogene*. 2012; 31(8):1065-72.
 28. Gordan JD, Bertout JA, Hu CJ, Diehl JA and Simon MC. HIF-2alpha promotes hypoxic cell proliferation by enhancing c-myc transcriptional activity. *Cancer Cell*. 2007; 11(4):335-47.
 29. Gordan JD, Lal P, Dondeti VR, Letrero R, Parekh KN, Oquendo CE, Greenberg RA, Flaherty KT, Rathmell WK, Keith B, Simon MC and Nathanson KL. HIF-alpha effects on c-Myc distinguish two subtypes of sporadic VHL-deficient clear cell renal carcinoma. *Cancer Cell*. 2008; 14(6):435-46.
 30. Brenner C, Deplus R, Didelot C, Lorient A, Vire E, De Smet C, Gutierrez A, Danovi D, Bernard D, Boon T, Pelicci PG, Amati B, Kouzarides T, et al. Myc represses transcription through recruitment of DNA methyltransferase corepressor. *Embo J*. 2005; 24(2):336-46.
 31. Kleine-Kohlbrecher D, Adhikary S and Eilers M. Mechanisms of transcriptional repression by Myc. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2006; 302:51-62.
 32. Menschikowski M, Platzbecker U, Hagelgans A, Vogel M, Thiede C, Schonefeldt C, Lehnert R, Eisenhofer G and Siegert G. Aberrant methylation of the M-type phospholipase A(2) receptor gene in leukemic cells. *BMC Cancer*. 2012; 12:576.
 33. Keith B, Johnson RS and Simon MC. HIF1alpha and HIF2alpha: sibling rivalry in hypoxic tumour growth and progression. *Nat Rev Cancer*. 2012; 12(1):9-22.

B) Article en révision

1) L'inhibition de la méthylation de l'ADN favorise la sensibilité des tumeurs à l'interférence à la nétrine-1

a) Préambule

La voie des récepteurs à dépendance¹ est fréquemment altérée dans les cancers. J'ai participé à une étude actuellement en cours de révisions au journal *Cancer Cell*. Dans cette dernière est montrée que les gènes du ligand Netrine-1 et de l'effecteur pro-apoptotique DAPK1 sont fréquemment hyperméthylés dans les cancers du sein. Ces hyperméthylations conduisent à une répression transcriptionnelle de ces gènes. En utilisant différents modèles cellulaires, il est montré que les cellules n'exprimant pas ces gènes sont résistantes à la mort induite par un anticorps interférant avec la Nétrine-1. Un traitement de ces cellules à la 5-aza-deoxycytidine induit une baisse de la méthylation du promoteur des gènes de la Nétrine-1 et de DAPK1, induit leur réexpression, et sensibilise ces cellules à la mort induite par un anticorps interférant avec la Nétrine-1 *in vitro*. Des expériences de xénogreffes chez la souris ont confirmé ces résultats *in vivo*. Un traitement de ces souris avec une combinaison de 5-aza-deoxycytidine et d'anticorps interférant avec la Nétrine-1 aboutit à un ralentissement de la croissance tumorale, ce qui n'est pas le cas des simples traitements.

L'immense majorité des expériences de cette étude a été réalisée par Mélodie Grandin. J'ai pour ma part participé au maintien des cellules en culture cellulaire, à la mise au point de méthodes de détection de la méthylation de l'ADN et à quelques analyses bioinformatiques.

b) Abstract

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

Mélodie Grandin, Guillaume Devailly, Benjamin Gibert, Nicolas Gadot, Akram Ghantous, Isabelle Puisieux, Zdencko Herceg, Jean-Guy Delcros, Agnès Bernet, Patrick Mehlen, Robert Dante

Netrin-1 (NTN1), a secreted axon guidance cue, has recently raised interest in the cancer arena. In a substantial part of human cancers, NTN1 is up-regulated, and through an autocrine secretion, blocks apoptosis through 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 downstream pro-apoptotic effector proteins. We show here that a large fraction of human breast tumors exhibits simultaneous DNA methylation-dependent loss of expression of

¹ Cf supra p 104.

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 in netrin-1-low cancer cells restores the expression of both NTN1 and DAPK1. Consequently, the 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.

II) Participations aux congrès

A) Présentations orales

- *Genome-wide profiling of methylated DNA binding proteins deposition in a syngenic cellular model of breast tumor progression.* (Identification à l'échelle du génome des sites de fixation de protéines de liaison à l'ADN méthylé dans un modèle syngénique de progression tumoral mammaire). Journées de la plateforme de séquençage ProfileXpert. Lyon, 9 et 10 octobre 2012.

- *Genome-wide profiling of methylated DNA binding proteins deposition in a syngenic cellular model of breast tumor progression.* (Identification à l'échelle du génome des sites de fixation de protéines de liaison à l'ADN méthylé dans un modèle syngénique de progression tumoral mammaire). 5th *Bioinformatics Workshop* des centres de recherches en cancérologies CLARA – PACA – Grand-Est. Lyon, 25 septembre 2012.

B) Posters

1) Co-deposition of MBD2 and ZBTB4 on methylated DNA in human mammary cell lines

Co-deposition of MBD2 and ZBTB4 on methylated DNA in human mammary cell lines. (Fixation simultanée de MBD2 et ZBTB4 sur l'ADN méthylé dans ces lignées cellulaires mammaires humaines). *Cancer Genetics & Epigenetics. Grodon Conference.* Italie, 21-26 avril 2013.

Co-deposition of MBD2 and ZBTB4 on methylated DNA in human mammary cell lines.

Guillaume DEVALLEY¹, Mélodie GRANDIN¹, Laury PERRIAUD¹, Anne-Pierre MOREL², Patrick MEHLEN¹, Pierre-Antoine DEFOSSEZ³, and Robert DANTE¹

¹ Team 1, Cancer Research Center of Lyon (CRCL), UMR INSERM U1052 CNRS 5286, Centre Léon Bérard, Lyon, France.

² Team 2, Cancer Research Center of Lyon (CRCL), UMR INSERM U1052 CNRS 5286, Centre Léon Bérard, Lyon, France.

³ CNRS UMR7216, Université Paris-Diderot, Paris, France

Abstract

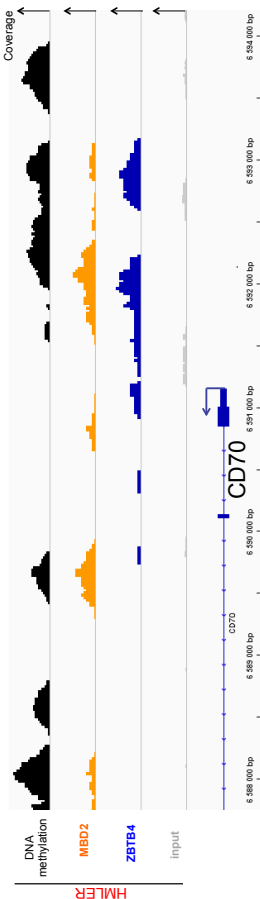
Alterations of DNA methylation pattern play crucial roles in cancer progression, leading to genomic instability, ectopic gene expression and tumor suppressor silencing. Promoter methylation mediates transcriptional repression by recruiting **Methylated DNA Binding Proteins** (MBP) with repressive activity (MeCP2, MBD1, MBD2, KAISO, ZBTB4 or ZBTB38). Several works have suggested links between MBPs and cancer progression. For example *MBD2* and *ZBTB4* expression is altered in breast cancer, *MBD2* is a transcriptional repressor of *p16* and of several important negative regulators of the *WNT* pathway and *ZBTB4* is a repressor of *p21*. In mice, although non-lethal, individual deletion of MBP leads to organ development abnormalities. Nevertheless, combined invalidations of MBPs do not result in phenotype aggravation and, therefore, raise questions about the functional redundancy suggested by transcriptomic analyses.

We have explored **MBD2** and **ZBTB4** binding sites by **ChIP-seq** in a cellular model that mimics some aspects of mammary tumoral progression. As expected, **MBD2** and **ZBTB4** binding sites are **methylated**. A global correlation between **MBD2** binding and transcriptional silencing is observed on gene with promoter containing CpG island. Interestingly, **MBD2** and **ZBTB4** frequently bind the same regions. In line with this latter point, ChIP-reChIP performed on a few candidate regions indicated a co-deposition of **MBD2** and **ZBTB4** at several sites. Knockdown experiments indicated that both proteins can cooperate in gene silencing. Furthermore, confocal microscopy analysis of tagged proteins shown a **co-localization of MBD2 and ZBTB4** in the nucleus.

Thus, **MBD2** and **ZBTB4** frequently bind the same methylated regions, suggesting that they have **redundant functions** in **methylation-dependent gene repression**.

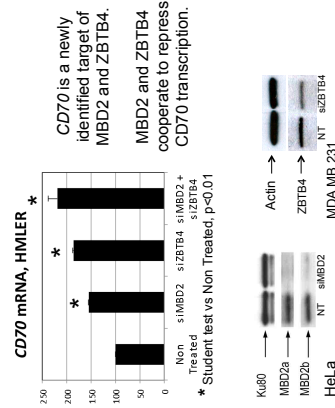
Results

Data visualization: example of the *CD70* promoter.



MBD2 and ZBTB4 often bind the same regions, and their binding sites are methylated.

1) Plots of raw signals around peaks.
Each line corresponds to a single peak.



ChIP experiments



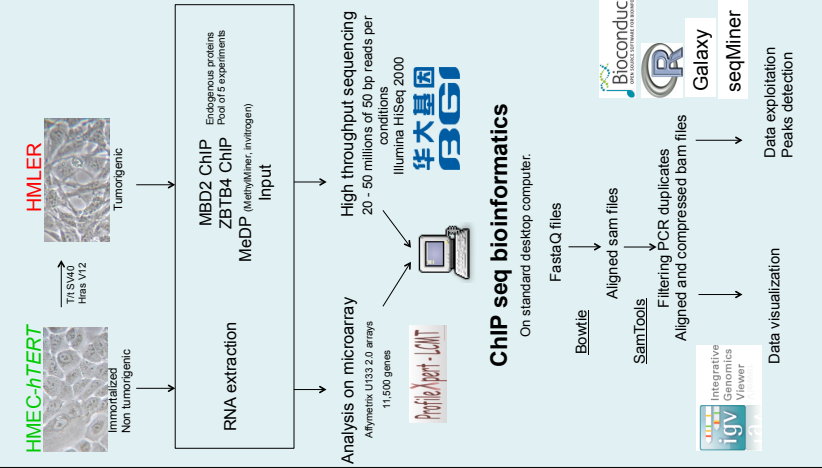
ChIP reChIP experiments show a simultaneous binding of MBD2 and ZBTB4 at some methylated regions.

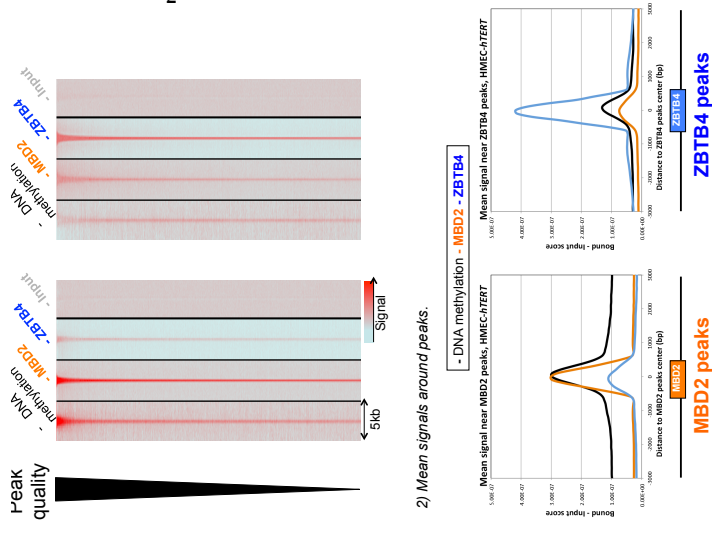
HMEC-hTERT

Regions near *BRCA1*, *HAUS5* and *TMIST1* are bound by **MBD2** and **ZBTB4** in **HMEC-hTERT**.

ChIP reChIP experiment confirmed the **simultaneous presence** of **MBD2** and **ZBTB4** on *BRCA1* and *HAUS5* 5' end.

Methods

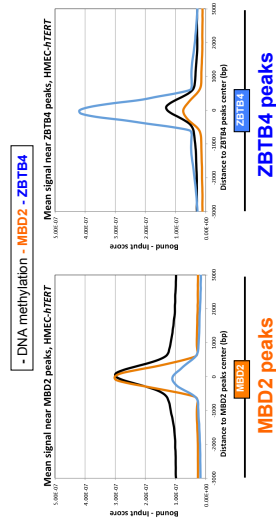




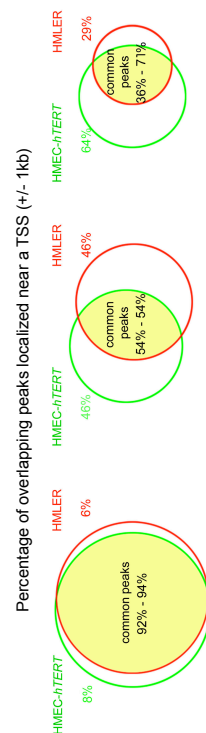
MBD2 and ZBTB4 peaks are **methyated**, confirming at genome wide scale their ability to bind methylated DNA *in vivo*.

MBD2 is frequently bound on ZBTB4 binding sites, and ZBTB4 is frequently bound on MBD2 binding sites. Thus, both proteins frequently bind the same methylated regions, and might have a **redundant** role in the methylation-dependent transcriptional repression.

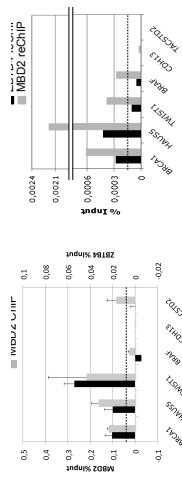
Similar results have been obtained in HMLER cells.



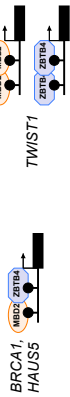
Comparison between cell lines shows an important mobility of MBD2 and ZBTB4



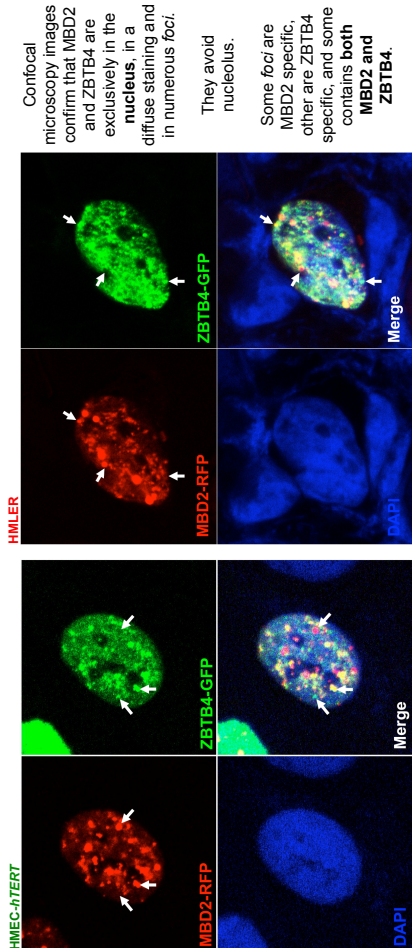
DNA methylation patterns are well conserved near Transcription Start Sites (TSS) between cell lines. In contrast, many MBD2 and ZBTB4 binding sites are cell line specific. This surprising high mobility of MBP suggest a possible **fine-tune** modulation of methylated gene expression, which can be very dynamic.



Exclusive binding of MBD2 or ZBTB4 on TWIST1 5' end. Similar results have been obtained in HMLER cells.



Colocalization of tagged MBD2 and ZBTB4 in nucleus foci.

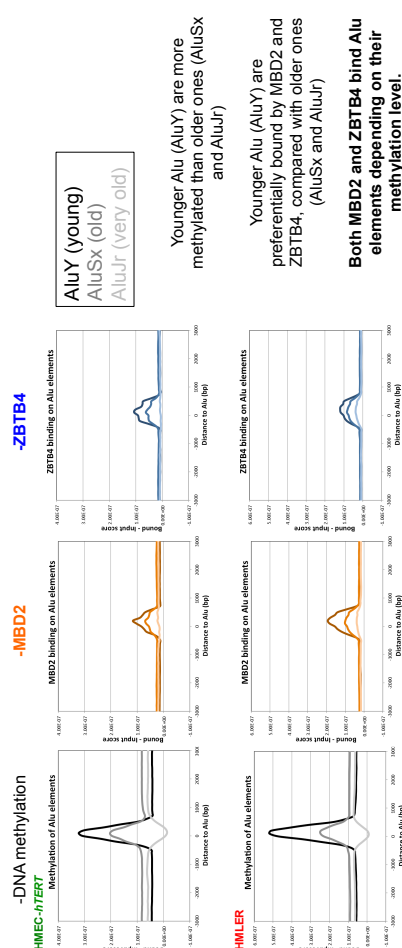


Confocal microscopy images confirm that MBD2 and ZBTB4 are exclusively in the **nucleus**, in a diffuse staining and in numerous foci.

They avoid nucleolus.

Some foci are MBD2 specific, other are ZBTB4 specific, and some contains **both MBD2 and ZBTB4**.

MBD2 and ZBTB4 binding on Alu elements depends on their age and their methylation level



Younger Alu (AluY) are preferentially bound by MBD2 and ZBTB4, compared with older ones (AluX and AluJ)

Younger Alu (AluY) are preferentially bound by MBD2 and ZBTB4, compared with older ones (AluX and AluJ)

Both MBD2 and ZBTB4 bind Alu elements depending on their methylation level.

2) MBD2 and ZBTB4, two methylated DNA binding proteins belonging to distinct families, frequently bind the same methylated regions

MBD2 and ZBTB4, two methylated DNA binding proteins belonging to distinct families, frequently bind the same methylated regions. (MBD2 et ZBTB4, deux protéines de liaisons à l'ADN méthylé appartenant à deux familles distinctes, fixent fréquemment les mêmes régions du génome). 1^{er} symposium du Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon. Lyon, 13-15 février 2013.

MBD2 and ZBTB4, two methylated DNA binding proteins belonging to distinct families, frequently bind the same methylated regions.

Guillaume DEVALLEY¹, Mélodie GRANDIN¹, Laury PERRIAUD¹, Anne-Pierre MOREL², Patrick MEHLEN¹, Pierre-Antoine DEFOSSEZ³, and Robert DANTE¹

¹ Team 1, Cancer Research Center of Lyon (CRCL), UMR INSERM U1052 CNRS 5286, Centre Léon Bérard, Lyon, France.

² Team 2, Cancer Research Center of Lyon (CRCL), UMR INSERM U1052 CNRS 5286, Centre Léon Bérard, Lyon, France.

³ CNRS UMR7216, Université Paris-Diderot, Paris, France

Abstract

DNA methylation abnormalities are a characteristic of cancer cells. These alterations play crucial roles in disease progression, leading to genomic instability, ectopic expression, and tumor suppressor silencing. Promoter methylation mediates transcriptional repression by recruiting Methylated DNA Binding Proteins (MBP) with repressive activity (MeCP2; MBD1, MBD2, KAISO, ZBTB4 or ZBTB38). These MBPs interact with repressive chromatin remodeling complexes such as Sin3 (MeCP2; MBD2, ZBTB4), NuRD (MBD2, KAISO, ZBTB4, ZBTB38), N-CoR (KAISO) or CBP (ZBTB38). Several works have suggested links between MBPs and cancer progression. For example MBD2 and ZBTB4 expressions are altered in breast cancer, MBD2 is a transcriptional repressor of *p16* and of many important negative regulators of the WNT pathway and ZBTB4 is a repressor of *p21*.

In mice, although non-lethal, individual deletion of MBP leads to organ development abnormalities. Nevertheless, combined inactivations of MBPs do not result in phenotype aggravation and, therefore, raise questions about the functional redundancy suggested by transcriptomic analyses.

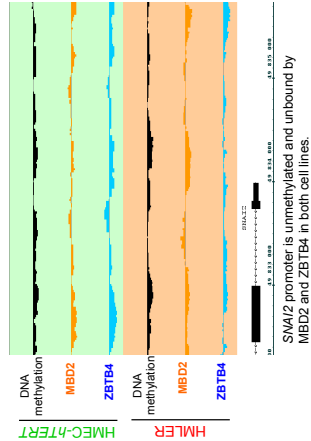
We have explored MBD2 and ZBTB4 binding sites by ChIP-seq in a cellular model that mimic some aspect of mammary tumoral progression. As expected, MBD2 and ZBTB4 binding sites are methylated. A global correlation between MBD2 binding and transcriptional silencing is observed on gene with a promoter containing a CpG island (HCP). More surprisingly, MBD2 and ZBTB4 frequently bind the same regions.

In line with this latter point, ChIP-reChIP performed on a few candidate regions indicated a co-deposition of MBD2 and ZBTB4 at several sites. Furthermore, confocal microscopy analysis of tagged proteins shown a co-localization of MBD2 and ZBTB4 in the nucleus.

Thus MBD2 and ZBTB4 frequently bind the same methylated regions, suggesting a potential high level of redundancy. To further explore this hypothesis, we plane to analyze transcriptomic variations after single or double inactivation of these proteins via siRNA treatment.

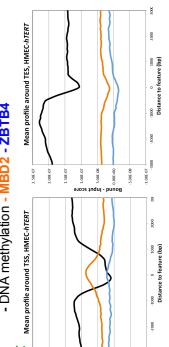
Results

Visualization of DNA methylation and MBD2 and ZBTB4 binding profiles



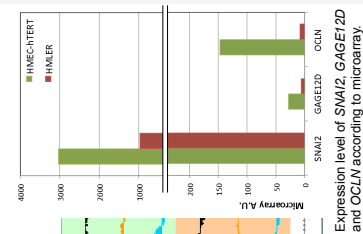
SNAI2 promoter is unmethylated and unbound by MBD2 and ZBTB4 in both cell lines.

Mean signal near Transcriptional Start Sites (TSS) and Transcriptional End Sites (TES)



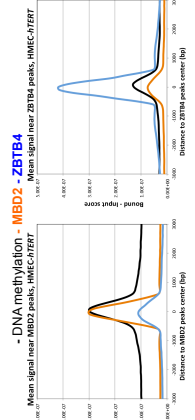
Preferential binding of MBD2 and ZBTB4 at gene TSS in HMEC-hTERT.

DNA methylation alone does not explain MBD2 and ZBTB4 global distribution.



OCN promoter gain methylation, MBD2 and ZBTB4 in HMEC-12O.

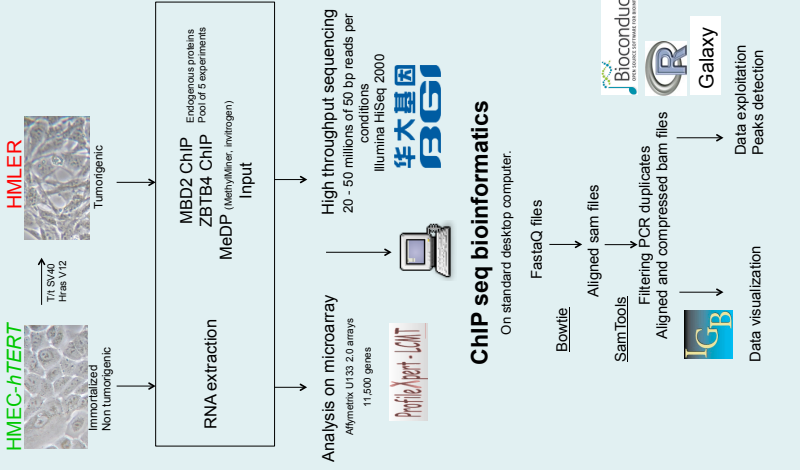
Mean signal on MBD2 and ZBTB4 peaks.



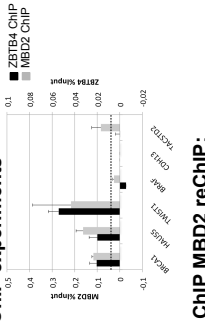
MBD2 and ZBTB4 peaks are methylated, confirming *in vivo* at genome wide scale their ability to bind methylated DNA.

MBD2 is frequently bound on ZBTB4 binding sites, and ZBTB4 is frequently bound on MBD2 binding sites. Not used: OCN, MBD2, H3K9me3.

Methods



ChIP experiments



Regions near BRCA1, HAUS5 and TWIST1 are bound by MBD2 and ZBTB4 in HMEC-hTERT.

ChIP reChIP experiment confirmed the simultaneous presence of MBD2 and ZBTB4 on BRCA1 and HAUS5 promoters.

Mutual exclusive binding of MBD2 and ZBTB4 on TWIST1 promoter.

Bibliographie

- [1] J. Wang, J. Zhuang, S. Iyer, X.-Y. Lin, M. C. Greven, B.-H. Kim, J. Moore, B. G. Pierce, X. Dong, D. Virgil, E. Birney, J.-H. Hung, and Z. Weng, "Factorbook.org: a Wiki-based database for transcription factor-binding data generated by the ENCODE consortium.," *Nucleic Acids Res.*, vol. 41, no. Database issue, pp. D171–6, Jan. 2013.
- [2] K. Pruitt, G. Brown, T. Tatusova, and D. Maglott, "The Reference Sequence (RefSeq) Database," in *NCBI Handbook*, 2002.
- [3] D. Karolchik, G. P. Barber, J. Casper, H. Clawson, M. S. Cline, M. Diekhans, T. R. Dreszer, P. A. Fujita, L. Guruvadoo, M. Haeussler, R. A. Harte, S. Heitner, A. S. Hinrichs, K. Learned, B. T. Lee, C. H. Li, B. J. Raney, B. Rhead, K. R. Rosenbloom, C. A. Sloan, M. L. Speir, A. S. Zweig, D. Haussler, R. M. Kuhn, and W. J. Kent, "The UCSC Genome Browser database: 2014 update," *Nucleic Acids Res.*, vol. 42, 2014.
- [4] P. Flicek, M. R. Amodè, D. Barrell, K. Beal, K. Billis, S. Brent, D. Carvalho-Silva, P. Clapham, G. Coates, S. Fitzgerald, L. Gil, C. G. Girón, L. Gordon, T. Hourlier, S. Hunt, N. Johnson, T. Juettemann, A. K. Kähäri, S. Keenan, E. Kulesha, F. J. Martin, T. Maurel, W. M. McLaren, D. N. Murphy, R. Nag, B. Overduin, M. Pignatelli, B. Pritchard, E. Pritchard, H. S. Riat, M. Ruffier, D. Sheppard, K. Taylor, A. Thormann, S. J. Trevanion, A. Vullo, S. P. Wilder, M. Wilson, A. Zadissa, B. L. Aken, E. Birney, F. Cunningham, J. Harrow, J. Herrero, T. J. P. Hubbard, R. Kinsella, M. Muffato, A. Parker, G. Spudich, A. Yates, D. R. Zerbino, and S. M. J. Searle, "Ensembl 2014.," *Nucleic Acids Res.*, vol. 42, no. Database issue, pp. D749–55, Jan. 2014.
- [5] A. M. Deaton and A. Bird, "CpG islands and the regulation of transcription.," *Genes Dev.*, vol. 25, no. 10, pp. 1010–22, May 2011.
- [6] C. Yang, E. Bolotin, T. Jiang, F. M. Sladek, and E. Martinez, "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*, vol. 389, no. 1, pp. 52–65, Mar. 2007.
- [7] A. Smit, R. Hubley, and P. Green, "RepeatMasker Open-3.0," 1996.
- [8] T. Strachan and A. P. Read, *Human Molecular Genetics* 4. 2011, p. 781.
- [9] J. T. Lee, "Epigenetic regulation by long noncoding RNAs.," *Science*, vol. 338, no. 6113, pp. 1435–9, Dec. 2012.
- [10] M. A. Matzke and R. A. Mosher, "RNA-directed DNA methylation: an epigenetic pathway of increasing complexity.," *Nat. Rev. Genet.*, vol. 15, no. 6, pp. 394–408, Jun. 2014.
- [11] A. Bird, "Perceptions of epigenetics.," *Nature*, vol. 447, no. 7143, pp. 396–8, May 2007.
- [12] A. Izzo and R. Schneider, "Chatting histone modifications in mammals.," *Brief. Funct. Genomics*, vol. 9, no. 5–6, pp. 429–43, Dec. 2010.
- [13] M. Yun, J. Wu, J. L. Workman, and B. Li, "Readers of histone modifications.," *Cell Res.*, vol. 21, no. 4, pp. 564–78, Apr. 2011.
- [14] C. Sawan and Z. Herceg, "Histone modifications and cancer.," *Adv. Genet.*, vol. 70, pp. 57–85, Jan. 2010.
- [15] B. M. Turner, "Histone acetylation and an epigenetic code.," *Bioessays*, vol. 22, no. 9, pp. 836–45, Sep. 2000.
- [16] T. Jenuwein and C. D. Allis, "Translating the histone code.," *Science*, vol. 293, no. 5532, pp. 1074–80, Aug. 2001.
- [17] I. M. Morison, J. P. Ramsay, and H. G. Spencer, "A census of mammalian imprinting.," *Trends Genet.*, vol. 21, no. 8, pp. 457–65, Aug. 2005.
- [18] C. Vardabasso, D. Hasson, K. Ratnakumar, C.-Y. Chung, L. F. Duarte, and E. Bernstein, "Histone variants: emerging players in cancer biology.," *Cell. Mol. Life Sci.*, vol. 71, no. 3, pp. 379–404, Feb. 2014.
- [19] T. Pollex and E. Heard, "Recent advances in X-chromosome inactivation research.," *Curr. Opin. Cell Biol.*, vol. 24, no. 6, pp. 825–32, Dec. 2012.

- [20] T. B. Nesterova, B. C. Popova, B. S. Cobb, S. Norton, C. E. Senner, Y. A. Tang, T. Spruce, T. A. Rodriguez, T. Sado, M. Merckenschlager, and N. Brockdorff, "Dicer regulates Xist promoter methylation in ES cells indirectly through transcriptional control of Dnmt3a.," *Epigenetics Chromatin*, vol. 1, no. 1, p. 2, Jan. 2008.
- [21] G. S. Stewart, B. Wang, C. R. Bignell, A. M. R. Taylor, and S. J. Elledge, "MDC1 is a mediator of the mammalian DNA damage checkpoint.," *Nature*, vol. 421, no. 6926, pp. 961–6, Feb. 2003.
- [22] D. Hanahan and R. A. Weinberg, "Hallmarks of cancer: the next generation.," *Cell*, vol. 144, no. 5, pp. 646–74, Mar. 2011.
- [23] B. Elenbaas, L. Spirio, F. Koerner, M. D. Fleming, D. B. Zimonjic, J. L. Donaher, N. C. Popescu, W. C. Hahn, and R. A. Weinberg, "Human breast cancer cells generated by oncogenic transformation of primary mammary epithelial cells.," *Genes Dev.*, vol. 15, no. 1, pp. 50–65, Jan. 2001.
- [24] A.-P. Morel, G. W. Hinkal, C. Thomas, F. Fauvet, S. Courtois-Cox, A. Wierinckx, M. Devouassoux-Shisheboran, I. Treilleux, A. Tissier, B. Gras, J. Pourchet, I. Puisieux, G. J. Browne, D. B. Spicer, J. Lachuer, S. Ansieau, and A. Puisieux, "EMT inducers catalyze malignant transformation of mammary epithelial cells and drive tumorigenesis towards claudin-low tumors in transgenic mice.," *PLoS Genet.*, vol. 8, no. 5, p. e1002723, Jan. 2012.
- [25] K. Gordon, T. Clouaire, X. X. Bao, S. E. Kemp, M. Xenophontos, J. I. de Las Heras, and I. Stancheva, "Immortality, but not oncogenic transformation, of primary human cells leads to epigenetic reprogramming of DNA methylation and gene expression.," *Nucleic Acids Res.*, vol. 42, no. 6, pp. 3529–41, Apr. 2014.
- [26] R. D. HOTCHKISS, "The quantitative separation of purines, pyrimidines, and nucleosides by paper chromatography.," *J. Biol. Chem.*, vol. 175, no. 1, pp. 315–32, Aug. 1948.
- [27] C. Mayer-Jung, D. Moras, and Y. Timsit, "Effect of cytosine methylation on DNA-DNA recognition at CpG steps.," *J. Mol. Biol.*, vol. 270, no. 3, pp. 328–35, Jul. 1997.
- [28] L. Yang, S. Wang, T. Tian, and X. Zhou, "Advancements in Z-DNA: development of inducers and stabilizers for B to Z transition.," *Curr. Med. Chem.*, vol. 19, no. 4, pp. 557–68, Jan. 2012.
- [29] S. Fujii, A. H. Wang, G. van der Marel, J. H. van Boom, and A. Rich, "Molecular structure of (m5 dC-dG)3: the role of the methyl group on 5-methyl cytosine in stabilizing Z-DNA.," *Nucleic Acids Res.*, vol. 10, no. 23, pp. 7879–92, Dec. 1982.
- [30] D. B. Tippin, B. Ramakrishnan, and M. Sundaralingam, "Methylation of the Z-DNA decamer d(GC)5 potentiates the formation of A-DNA: crystal structure of d(Gm5CGm5CGCGCGC).," *J. Mol. Biol.*, vol. 270, no. 2, pp. 247–58, Jul. 1997.
- [31] J. C. Shen, W. M. Rideout, and P. A. Jones, "The rate of hydrolytic deamination of 5-methylcytosine in double-stranded DNA.," *Nucleic Acids Res.*, vol. 22, no. 6, pp. 972–6, Mar. 1994.
- [32] R. Chahwan, S. N. Wontakal, and S. Roa, "Crosstalk between genetic and epigenetic information through cytosine deamination.," *Trends Genet.*, vol. 26, no. 10, pp. 443–8, Oct. 2010.
- [33] S. S. Smith, B. E. Kaplan, L. C. Sowers, and E. M. Newman, "Mechanism of human methyl-directed DNA methyltransferase and the fidelity of cytosine methylation.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 89, no. 10, pp. 4744–8, May 1992.
- [34] S. Klimasauskas, S. Kumar, R. J. Roberts, and X. Cheng, "HhaI methyltransferase flips its target base out of the DNA helix," *Cell*, vol. 76, no. 2, pp. 357–369, Jan. 1994.
- [35] J. Song, O. Rechtkoblit, T. H. Bestor, and D. J. Patel, "Structure of DNMT1-DNA complex reveals a role for autoinhibition in maintenance DNA methylation.," *Science*, vol. 331, no. 6020, pp. 1036–40, Feb. 2011.
- [36] S. Pradhan, A. Bacolla, R. D. Wells, and R. J. Roberts, "Recombinant human DNA (cytosine-5) methyltransferase. I. Expression, purification, and comparison of de novo and maintenance methylation.," *J. Biol. Chem.*, vol. 274, no. 46, pp. 33002–10, Nov. 1999.
- [37] T. H. Bestor and G. L. Verdine, "DNA methyltransferases," *Curr. Opin. Cell Biol.*, vol. 6, no. 3, pp. 380–389, Jun. 1994.
- [38] C. Bonfils, N. Beaulieu, E. Chan, J. Cotton-Montpetit, and A. R. MacLeod, "Characterization of the human DNA methyltransferase splice variant Dnmt1b.," *J. Biol. Chem.*, vol. 275, no. 15, pp. 10754–60, Apr. 2000.
- [39] E. Li, T. H. Bestor, and R. Jaenisch, "Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality.," *Cell*, vol. 69, no. 6, pp. 915–26, Jun. 1992.

- [40] T. Iida, I. Suetake, S. Tajima, H. Morioka, S. Ohta, C. Obuse, and T. Tsurimoto, "PCNA clamp facilitates action of DNA cytosine methyltransferase 1 on hemimethylated DNA.," *Genes Cells*, vol. 7, no. 10, pp. 997–1007, Oct. 2002.
- [41] F. Fuks, P. J. Hurd, R. Deplus, and T. Kouzarides, "The DNA methyltransferases associate with HP1 and the SUV39H1 histone methyltransferase.," *Nucleic Acids Res.*, vol. 31, no. 9, pp. 2305–12, May 2003.
- [42] O. Mortusewicz, L. Schermelleh, J. Walter, M. C. Cardoso, and H. Leonhardt, "Recruitment of DNA methyltransferase I to DNA repair sites.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 102, no. 25, pp. 8905–9, Jun. 2005.
- [43] R. Ferreira, I. Noguera, L. L. Pritchard, S. Ait-Si-Ali, and A. Harel-Bellan, "The Rb/chromatin connection and epigenetic control: opinion.," *Oncogene*, vol. 20, no. 24, pp. 3128–33, May 2001.
- [44] K. D. Robertson, "Differential mRNA expression of the human DNA methyltransferases (DNMTs) 1, 3a and 3b during the G0/G1 to S phase transition in normal and tumor cells," *Nucleic Acids Res.*, vol. 28, no. 10, pp. 2108–2113, May 2000.
- [45] P.-O. Estève, H. G. Chin, J. Benner, G. R. Feehery, M. Samaranayake, G. A. Horwitz, S. E. Jacobsen, and S. Pradhan, "Regulation of DNMT1 stability through SET7-mediated lysine methylation in mammalian cells.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 106, no. 13, pp. 5076–81, Mar. 2009.
- [46] M. Okano, D. W. Bell, D. A. Haber, and E. Li, "DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development.," *Cell*, vol. 99, no. 3, pp. 247–57, Oct. 1999.
- [47] A. Aoki, I. Suetake, J. Miyagawa, T. Fujio, T. Chijiwa, H. Sasaki, and S. Tajima, "Enzymatic properties of de novo-type mouse DNA (cytosine-5) methyltransferases.," *Nucleic Acids Res.*, vol. 29, no. 17, pp. 3506–12, Sep. 2001.
- [48] M. S. Karet, Z. M. Botello, J. J. Ennis, C. Chou, and F. Chédin, "Reconstitution and mechanism of the stimulation of de novo methylation by human DNMT3L.," *J. Biol. Chem.*, vol. 281, no. 36, pp. 25893–902, Sep. 2006.
- [49] K. Hata, M. Okano, H. Lei, and E. Li, "Dnmt3L cooperates with the Dnmt3 family of de novo DNA methyltransferases to establish maternal imprints in mice.," *Development*, vol. 129, no. 8, pp. 1983–93, Apr. 2002.
- [50] I. Suetake, F. Shinozaki, J. Miyagawa, H. Takeshima, and S. Tajima, "DNMT3L stimulates the DNA methylation activity of Dnmt3a and Dnmt3b through a direct interaction.," *J. Biol. Chem.*, vol. 279, no. 26, pp. 27816–23, Jun. 2004.
- [51] D. Bourc'his, G. L. Xu, C. S. Lin, B. Bollman, and T. H. Bestor, "Dnmt3L and the establishment of maternal genomic imprints.," *Science*, vol. 294, no. 5551, pp. 2536–9, Dec. 2001.
- [52] M. G. Goll, F. Kirpekar, K. A. Maggert, J. A. Yoder, C.-L. Hsieh, X. Zhang, K. G. Golic, S. E. Jacobsen, and T. H. Bestor, "Methylation of tRNA^{Asp} by the DNA methyltransferase homolog Dnmt2.," *Science*, vol. 311, no. 5759, pp. 395–8, Jan. 2006.
- [53] L. L. Carlson, A. W. Page, and T. H. Bestor, "Properties and localization of DNA methyltransferase in preimplantation mouse embryos: implications for genomic imprinting.," *Genes Dev.*, vol. 6, no. 12B, pp. 2536–41, Dec. 1992.
- [54] C. Popp, W. Dean, S. Feng, S. J. Cokus, S. Andrews, M. Pellegrini, S. E. Jacobsen, and W. Reik, "Genome-wide erasure of DNA methylation in mouse primordial germ cells is affected by AID deficiency.," *Nature*, vol. 463, no. 7284, pp. 1101–5, Feb. 2010.
- [55] M. Tahiliani, K. P. Koh, Y. Shen, W. A. Pastor, H. Bandukwala, Y. Brudno, S. Agarwal, L. M. Iyer, D. R. Liu, L. Aravind, and A. Rao, "Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1.," *Science*, vol. 324, no. 5929, pp. 930–5, May 2009.
- [56] J. U. Guo, Y. Su, C. Zhong, G. L. Ming, and H. Song, "Hydroxylation of 5-methylcytosine by TET1 promotes active DNA demethylation in the adult brain," *Cell*, vol. 145, no. 3, pp. 423–434, Apr. 2011.
- [57] S.-G. Jin, X. Wu, A. X. Li, and G. P. Pfeifer, "Genomic mapping of 5-hydroxymethylcytosine in the human brain.," *Nucleic Acids Res.*, vol. 39, no. 12, pp. 5015–24, Jul. 2011.
- [58] D. Globisch, M. Münzel, M. Müller, S. Michalakakis, M. Wagner, S. Koch, T. Brückl, M. Biel, and T. Carell, "Tissue distribution of 5-hydroxymethylcytosine and search for active demethylation intermediates.," *PLoS One*, vol. 5, no. 12, p. e15367, Jan. 2010.
- [59] S. Kriaucionis and N. Heintz, "The nuclear DNA base 5-hydroxymethylcytosine is present in Purkinje neurons and the brain.," *Science*, vol. 324, no. 5929, pp. 929–30, May 2009.

- [60] G. Ficiz, M. R. Branco, S. Seisenberger, F. Santos, F. Krueger, T. A. Hore, C. J. Marques, S. Andrews, and W. Reik, "Dynamic regulation of 5-hydroxymethylcytosine in mouse ES cells and during differentiation.," *Nature*, vol. 473, no. 7347, pp. 398–402, May 2011.
- [61] G. Salbert and M. Weber, "Tracking genomic hydroxymethylation by the base.," *Nat. Methods*, vol. 9, no. 1, pp. 45–6, Jan. 2012.
- [62] R. Lister, M. Pelizzola, R. H. Dowen, R. D. Hawkins, G. Hon, J. Tonti-Filippini, J. R. Nery, L. Lee, Z. Ye, Q.-M. Ngo, L. Edsall, J. Antosiewicz-Bourget, R. Stewart, V. Ruotti, A. H. Millar, J. A. Thomson, B. Ren, and J. R. Ecker, "Human DNA methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences.," *Nature*, vol. 462, no. 7271, pp. 315–22, Nov. 2009.
- [63] Y. Li, J. Zhu, G. Tian, N. Li, Q. Li, M. Ye, and H. Zheng, "The DNA Methylome of Human Peripheral Blood Mononuclear Cells," vol. 8, no. 11, 2010.
- [64] M. Gardiner-Garden and M. Frommer, "CpG islands in vertebrate genomes.," *J. Mol. Biol.*, vol. 196, no. 2, pp. 261–82, Jul. 1987.
- [65] D. Takai and P. A. Jones, "Comprehensive analysis of CpG islands in human chromosomes 21 and 22.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 99, no. 6, pp. 3740–5, Mar. 2002.
- [66] R. Illingworth, A. Kerr, D. Desousa, H. Jørgensen, P. Ellis, J. Stalker, D. Jackson, C. Clee, R. Plumb, J. Rogers, S. Humphray, T. Cox, C. Langford, and A. Bird, "A novel CpG island set identifies tissue-specific methylation at developmental gene loci.," *PLoS Biol.*, vol. 6, no. 1, p. e22, Jan. 2008.
- [67] J. R. Edwards, A. H. O'Donnell, R. a Rollins, H. E. Peckham, C. Lee, M. H. Milekic, B. Chanrion, Y. Fu, T. Su, H. Hibshoosh, J. a Gingrich, F. Haghighi, R. Nutter, and T. H. Bestor, "Chromatin and sequence features that define the fine and gross structure of genomic methylation patterns.," *Genome Res.*, vol. 20, no. 7, pp. 972–980, 2010.
- [68] P.-O. Estève, H. G. Chin, A. Smallwood, G. R. Feehery, O. Gangisetty, A. R. Karpf, M. F. Carey, and S. Pradhan, "Direct interaction between DNMT1 and G9a coordinates DNA and histone methylation during replication.," *Genes Dev.*, vol. 20, no. 22, pp. 3089–103, Nov. 2006.
- [69] R. L. Adams, E. L. McKay, J. T. Douglas, and R. H. Burdon, "Methylation of nucleosomal and nuclease sensitive DNA.," *Nucleic Acids Res.*, vol. 4, no. 9, pp. 3097–108, Sep. 1977.
- [70] M. Bostick, J. K. Kim, P.-O. Estève, A. Clark, S. Pradhan, and S. E. Jacobsen, "UHRF1 plays a role in maintaining DNA methylation in mammalian cells.," *Science*, vol. 317, no. 5845, pp. 1760–4, Sep. 2007.
- [71] I. Jimenez-Useche and C. Yuan, "The effect of DNA CpG methylation on the dynamic conformation of a nucleosome.," *Biophys. J.*, vol. 103, no. 12, pp. 2502–12, Dec. 2012.
- [72] H. Cedar, "DNA methylation and gene activity.," *Cell*, vol. 53, no. 1, pp. 3–4, Apr. 1988.
- [73] P. A. Jones and S. M. Taylor, "Cellular differentiation, cytidine analogs and DNA methylation.," *Cell*, vol. 20, no. 1, pp. 85–93, May 1980.
- [74] T. Mohandas, R. S. Sparkes, and L. J. Shapiro, "Reactivation of an inactive human X chromosome: evidence for X inactivation by DNA methylation.," *Science*, vol. 211, no. 4480, pp. 393–6, Jan. 1981.
- [75] M. Weber, I. Hellmann, M. Stadler, and L. Ramos, "Distribution, silencing potential and evolutionary impact of promoter DNA methylation in the human genome," *Nat. ...*, no. October 2006, pp. 1–10, 2007.
- [76] J. W. Gautsch and M. C. Wilson, "Delayed de novo methylation in teratocarcinoma suggests additional tissue-specific mechanisms for controlling gene expression.," *Nature*, vol. 301, no. 5895, pp. 32–7, Jan. 1983.
- [77] L. F. Lock, N. Takagi, and G. R. Martin, "Methylation of the Hprt gene on the inactive X occurs after chromosome inactivation.," *Cell*, vol. 48, no. 1, pp. 39–46, Jan. 1987.
- [78] R. Jove, D. E. Sperber, and J. L. Manley, "Transcription of methylated eukaryotic viral genes in a soluble in vitro system.," *Nucleic Acids Res.*, vol. 12, no. 11, pp. 4715–30, Jun. 1984.
- [79] P. L. Molloy, "Effects of DNA methylation on specific transcription by RNA polymerase II in vitro," *Mol. Biol. Rep.*, vol. 11, no. 1, pp. 13–17, 1986.
- [80] C. Kanduri, V. Pant, D. Loukinov, E. Pugacheva, C. F. Qi, A. Wolffe, R. Ohlsson, and V. V. Lobanenkov, "Functional association of CTCF with the insulator upstream of the H19 gene is parent of origin-specific and methylation-sensitive.," *Curr. Biol.*, vol. 10, no. 14, pp. 853–6, Jul. 2000.

- [81] A. T. Hark, C. J. Schoenherr, D. J. Katz, R. S. Ingram, J. M. Levorse, and S. M. Tilghman, "CTCF mediates methylation-sensitive enhancer-blocking activity at the H19/Igf2 locus.," *Nature*, vol. 405, no. 6785, pp. 486–9, May 2000.
- [82] A. C. Bell and G. Felsenfeld, "Methylation of a CTCF-dependent boundary controls imprinted expression of the Igf2 gene.," *Nature*, vol. 405, no. 6785, pp. 482–5, May 2000.
- [83] S. M. Iguchi-Ariga and W. Schaffner, "CpG methylation of the cAMP-responsive enhancer/promoter sequence TGACGTCA abolishes specific factor binding as well as transcriptional activation.," *Genes Dev.*, vol. 3, no. 5, pp. 612–9, May 1989.
- [84] M. R. Campanero, M. I. Armstrong, and E. K. Flemington, "CpG methylation as a mechanism for the regulation of E2F activity.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 97, no. 12, pp. 6481–6, Jun. 2000.
- [85] G. C. Prendergast and E. B. Ziff, "Methylation-sensitive sequence-specific DNA binding by the c-Myc basic region.," *Science*, vol. 251, no. 4990, pp. 186–9, Jan. 1991.
- [86] G. Perini, D. Diolaiti, A. Porro, and G. Della Valle, "In vivo transcriptional regulation of N-Myc target genes is controlled by E-box methylation.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 102, no. 34, pp. 12117–22, Aug. 2005.
- [87] B. Chen, L. He, V. H. Savell, J. J. Jenkins, and D. M. Parham, "Inhibition of the interferon-gamma/signal transducers and activators of transcription (STAT) pathway by hypermethylation at a STAT-binding site in the p21WAF1 promoter region.," *Cancer Res.*, vol. 60, no. 12, pp. 3290–8, Jun. 2000.
- [88] R. Santoro and I. Grummt, "Molecular mechanisms mediating methylation-dependent silencing of ribosomal gene transcription.," *Mol. Cell*, vol. 8, no. 3, pp. 719–25, Sep. 2001.
- [89] A. K. Maunakea, I. Chepelev, K. Cui, and K. Zhao, "Intragenic DNA methylation modulates alternative splicing by recruiting MeCP2 to promote exon recognition.," *Cell Res.*, vol. 23, no. 11, pp. 1256–69, Nov. 2013.
- [90] S. Shukla, E. Kavak, M. Gregory, M. Imashimizu, B. Shutinoski, M. Kashlev, P. Oberdoerffer, R. Sandberg, and S. Oberdoerffer, "CTCF-promoted RNA polymerase II pausing links DNA methylation to splicing.," *Nature*, vol. 479, no. 7371, pp. 74–9, Nov. 2011.
- [91] M. C. Lorincz, D. R. Dickerson, M. Schmitt, and M. Groudine, "Intragenic DNA methylation alters chromatin structure and elongation efficiency in mammalian cells.," *Nat. Struct. Mol. Biol.*, vol. 11, no. 11, pp. 1068–75, Nov. 2004.
- [92] A. K. Maunakea, R. P. Nagarajan, M. Bilenky, T. J. Ballinger, C. D'Souza, S. D. Fouse, B. E. Johnson, C. Hong, C. Nielsen, Y. Zhao, G. Turecki, A. Delaney, R. Varhol, N. Thiessen, K. Shchors, V. M. Heine, D. H. Rowitch, X. Xing, C. Fiore, M. Schillebeeckx, S. J. M. Jones, D. Haussler, M. A. Marra, M. Hirst, T. Wang, and J. F. Costello, "Conserved role of intragenic DNA methylation in regulating alternative promoters.," *Nature*, vol. 466, no. 7303, pp. 253–7, Jul. 2010.
- [93] R. E. Mills, E. A. Bennett, R. C. Iskow, and S. E. Devine, "Which transposable elements are active in the human genome?," *Trends Genet.*, vol. 23, no. 4, pp. 183–91, Apr. 2007.
- [94] C. P. Walsh, J. R. Chaillet, and T. H. Bestor, "Transcription of IAP endogenous retroviruses is constrained by cytosine methylation.," *Nat. Genet.*, vol. 20, no. 2, pp. 116–7, Oct. 1998.
- [95] H. Bouzinba-Segard, A. Guais, and C. Francastel, "Accumulation of small murine minor satellite transcripts leads to impaired centromeric architecture and function.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 103, no. 23, pp. 8709–14, Jun. 2006.
- [96] J. Espada, E. Ballestar, R. Santoro, M. F. Fraga, A. Villar-Garea, A. Németh, L. Lopez-Serra, S. Ropero, A. Aranda, H. Orozco, V. Moreno, A. Juarranz, J. C. Stockert, G. Längst, I. Grummt, W. Bickmore, and M. Esteller, "Epigenetic disruption of ribosomal RNA genes and nucleolar architecture in DNA methyltransferase 1 (Dnmt1) deficient cells.," *Nucleic Acids Res.*, vol. 35, no. 7, pp. 2191–8, Jan. 2007.
- [97] K.-M. Schmitz, C. Mayer, A. Postepska, and I. Grummt, "Interaction of noncoding RNA with the rDNA promoter mediates recruitment of DNMT3b and silencing of rRNA genes.," *Genes Dev.*, vol. 24, no. 20, pp. 2264–9, Oct. 2010.
- [98] L. Maloisel and J.-L. Rossignol, "Suppression of crossing-over by DNA methylation in *Ascomobolus*," *Genes Dev.*, vol. 12, no. 9, pp. 1381–1389, May 1998.
- [99] C. Cuzzo, A. Porcellini, T. Angrisano, A. Morano, B. Lee, A. Di Pardo, S. Messina, R. Iuliano, A. Fusco, M. R. Santillo, M. T. Muller, L. Chiariotti, M. E. Gottesman, and E. V. Avvedimento, "DNA damage, homology-directed repair, and DNA methylation.," *PLoS Genet.*, vol. 3, no. 7, p. e110, Jul. 2007.

- [100] S. Guibert and M. Weber, "Functions of DNA methylation and hydroxymethylation in mammalian development.," *Curr. Top. Dev. Biol.*, vol. 104, pp. 47–83, Jan. 2013.
- [101] J. Borgel, S. Guibert, Y. Li, H. Chiba, D. Schübeler, H. Sasaki, T. Forné, and M. Weber, "Targets and dynamics of promoter DNA methylation during early mouse development.," *Nat. Genet.*, vol. 42, no. 12, pp. 1093–100, Dec. 2010.
- [102] G. Csankovszki, A. Nagy, and R. Jaenisch, "Synergism of Xist RNA, DNA methylation, and histone hypoacetylation in maintaining X chromosome inactivation.," *J. Cell Biol.*, vol. 153, no. 4, pp. 773–84, May 2001.
- [103] H. Barr, A. Hermann, J. Berger, H.-H. Tsai, K. Adie, A. Prokhortchouk, B. Hendrich, and A. Bird, "Mbd2 contributes to DNA methylation-directed repression of the Xist gene.," *Mol. Cell. Biol.*, vol. 27, no. 10, pp. 3750–7, May 2007.
- [104] K. Willison, "Opposite imprinting of the mouse Igf2 and Igf2r genes.," *Trends Genet.*, vol. 7, no. 4, pp. 107–9, Apr. 1991.
- [105] Y. Zhang and B. Tycko, "Monoallelic expression of the human H19 gene.," *Nat. Genet.*, vol. 1, no. 1, pp. 40–4, Apr. 1992.
- [106] I. Hatada and T. Mukai, "Genomic imprinting of p57KIP2, a cyclin-dependent kinase inhibitor, in mouse.," *Nat. Genet.*, vol. 11, no. 2, pp. 204–6, Oct. 1995.
- [107] W. Reik, W. Dean, and J. Walter, "Epigenetic reprogramming in mammalian development.," *Science*, vol. 293, no. 5532, pp. 1089–93, Aug. 2001.
- [108] T. Moore and D. Haig, "Genomic imprinting in mammalian development: a parental tug-of-war.," *Trends Genet.*, vol. 7, no. 2, pp. 45–9, Feb. 1991.
- [109] H. Heyn, N. Li, H. J. Ferreira, S. Moran, D. G. Pisano, A. Gomez, J. Diez, J. V Sanchez-Mut, F. Setien, F. J. Carmona, A. A. Puca, S. Sayols, M. A. Pujana, J. Serra-Musach, I. Iglesias-Platas, F. Formiga, A. F. Fernandez, M. F. Fraga, S. C. Heath, A. Valencia, I. G. Gut, J. Wang, and M. Esteller, "Distinct DNA methylomes of newborns and centenarians.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 109, no. 26, pp. 10522–7, Jun. 2012.
- [110] A. P. Feinberg and B. Vogelstein, "Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts.," *Nature*, vol. 301, no. 5895, pp. 89–92, Jan. 1983.
- [111] S. Ribieras, X. G. Song-Wang, V. Martin, P. Lointier, L. Frappart, and R. Dante, "Human breast and colon cancers exhibit alterations of DNA methylation patterns at several DNA segments on chromosomes 11p and 17p.," *J. Cell. Biochem.*, vol. 56, no. 1, pp. 86–96, Sep. 1994.
- [112] S. E. Goelz, B. Vogelstein, S. R. Hamilton, and A. P. Feinberg, "Hypomethylation of DNA from benign and malignant human colon neoplasms.," *Science*, vol. 228, no. 4696, pp. 187–90, Apr. 1985.
- [113] P. A. Jones and S. B. Baylin, "The epigenomics of cancer.," *Cell*, vol. 128, no. 4, pp. 683–92, Feb. 2007.
- [114] P. a Jones and P. W. Laird, "Cancer epigenetics comes of age.," *Nat. Genet.*, vol. 21, no. 2, pp. 163–167, 1999.
- [115] P. a. Jones, "Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond," *Nat. Rev. Genet.*, vol. 13, no. 7, pp. 484–492, Jul. 2012.
- [116] M. Rodríguez-Paredes and M. Esteller, "Cancer epigenetics reaches mainstream oncology.," *Nat. Med.*, vol. 17, no. 3, pp. 330–9, Mar. 2011.
- [117] F. Gaudet, J. G. Hodgson, A. Eden, L. Jackson-Grusby, J. Dausman, J. W. Gray, H. Leonhardt, and R. Jaenisch, "Induction of tumors in mice by genomic hypomethylation.," *Science*, vol. 300, no. 5618, pp. 489–92, Apr. 2003.
- [118] A. V Bakin and T. Curran, "Role of DNA 5-methylcytosine transferase in cell transformation by fos.," *Science*, vol. 283, no. 5400, pp. 387–90, Jan. 1999.
- [119] K. D. Robertson, E. Uzvolgyi, G. Liang, C. Talmadge, J. Sumegi, F. A. Gonzales, and P. A. Jones, "The human DNA methyltransferases (DNMTs) 1, 3a and 3b: coordinate mRNA expression in normal tissues and overexpression in tumors.," *Nucleic Acids Res.*, vol. 27, no. 11, pp. 2291–8, Jun. 1999.
- [120] J. S. You and P. A. Jones, "Cancer genetics and epigenetics: two sides of the same coin?," *Cancer Cell*, vol. 22, no. 1, pp. 9–20, Jul. 2012.
- [121] L. Duret and N. Galtier, "Biased gene conversion and the evolution of mammalian genomic landscapes.," *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.*, vol. 10, pp. 285–311, Jan. 2009.

- [122] M. Abu and T. R. Waters, "The main role of human thymine-DNA glycosylase is removal of thymine produced by deamination of 5-methylcytosine and not removal of ethenocytosine.," *J. Biol. Chem.*, vol. 278, no. 10, pp. 8739–44, Mar. 2003.
- [123] F. Antequera, M. Tamame, J. R. Villanueva, and T. Santos, "DNA methylation in the fungi.," *J. Biol. Chem.*, vol. 259, no. 13, pp. 8033–6, Jul. 1984.
- [124] A. Zemach, I. E. McDaniel, P. Silva, and D. Zilberman, "Genome-wide evolutionary analysis of eukaryotic DNA methylation.," *Science*, vol. 328, no. 5980, pp. 916–9, May 2010.
- [125] B. a Buck-Koehntop and P.-A. Defossez, "On how mammalian transcription factors recognize methylated DNA.," *Epigenetics*, vol. 8, no. 2, pp. 131–7, 2013.
- [126] M. Joulie, B. Miotto, and P.-A. Defossez, "Mammalian methyl-binding proteins: what might they do?," *Bioessays*, vol. 32, no. 12, pp. 1025–32, Dec. 2010.
- [127] Y. Liu, Y. O. Olanrewaju, Y. Zheng, H. Hashimoto, R. M. Blumenthal, X. Zhang, and X. Cheng, "Structural basis for Klf4 recognition of methylated DNA.," *Nucleic Acids Res.*, vol. 42, no. 8, pp. 4859–67, Apr. 2014.
- [128] R. Y. Wang, X. Y. Zhang, and M. Ehrlich, "A human DNA-binding protein is methylation-specific and sequence-specific.," *Nucleic Acids Res.*, vol. 14, no. 4, pp. 1599–614, Feb. 1986.
- [129] X. Y. Zhang, N. Jabrane-Ferrat, C. K. Asiedu, S. Samac, B. M. Peterlin, and M. Ehrlich, "The major histocompatibility complex class II promoter-binding protein RFX (NF-X) is a methylated DNA-binding protein.," *Mol. Cell. Biol.*, vol. 13, no. 11, pp. 6810–8, Nov. 1993.
- [130] N. Sasai, M. Nakao, and P.-A. Defossez, "Sequence-specific recognition of methylated DNA by human zinc-finger proteins.," *Nucleic Acids Res.*, vol. 38, no. 15, pp. 5015–22, Aug. 2010.
- [131] C. G. Spruijt, F. Gnerlich, A. H. Smits, T. Pfaffeneder, P. W. T. C. Jansen, C. Bauer, M. Münzel, M. Wagner, M. Müller, F. Khan, H. C. Eberl, A. Mensinga, A. B. Brinkman, K. Lephikov, U. Müller, J. Walter, R. Boelens, H. van Ingen, H. Leonhardt, T. Carell, and M. Vermeulen, "Dynamic readers for 5-(hydroxy)methylcytosine and its oxidized derivatives.," *Cell*, vol. 152, no. 5, pp. 1146–59, Feb. 2013.
- [132] A. Blattler, L. Yao, Y. Wang, Z. Ye, V. X. Jin, and P. J. Farnham, "ZBTB33 binds unmethylated regions of the genome associated with actively expressed genes.," *Epigenetics Chromatin*, vol. 6, no. 1, p. 13, Jan. 2013.
- [133] R. R. Meehan, J. D. Lewis, S. McKay, E. L. Kleiner, and A. P. Bird, "Identification of a mammalian protein that binds specifically to DNA containing methylated CpGs.," *Cell*, vol. 58, no. 3, pp. 499–507, Aug. 1989.
- [134] J. D. Lewis, R. R. Meehan, W. J. Henzel, I. Maurer-Fogy, P. Jeppesen, F. Klein, and A. Bird, "Purification, sequence, and cellular localization of a novel chromosomal protein that binds to methylated DNA.," *Cell*, vol. 69, no. 6, pp. 905–14, Jun. 1992.
- [135] X. Nan, R. R. Meehan, and A. Bird, "Dissection of the methyl-CpG binding domain from the chromosomal protein MeCP2.," *Nucleic Acids Res.*, vol. 21, no. 21, pp. 4886–92, Oct. 1993.
- [136] K. L. Ho, I. W. McNae, L. Schmiedeberg, R. J. Klose, A. P. Bird, and M. D. Walkinshaw, "MeCP2 Binding to DNA Depends upon Hydration at Methyl-CpG," *Mol. Cell*, vol. 29, no. 4, pp. 525–531, Mar. 2008.
- [137] B. Hendrich, C. Abbott, H. McQueen, D. Chambers, S. Cross, and A. Bird, "Genomic structure and chromosomal mapping of the murine and human Mbd1, Mbd2, Mbd3, and Mbd4 genes.," *Mamm. Genome*, vol. 10, no. 9, pp. 906–12, Sep. 1999.
- [138] S. Laget, M. Joulie, F. Le Masson, and N. Sasai, "The human proteins MBD5 and MBD6 associate with heterochromatin but they do not bind methylated DNA," *PLoS One*, vol. 5, no. 8, p. e11982, Jan. 2010.
- [139] S. H. Cross, R. R. Meehan, X. Nan, and A. Bird, "A component of the transcriptional repressor MeCP1 shares a motif with DNA methyltransferase and HRX proteins.," *Nat. Genet.*, vol. 16, no. 3, pp. 256–9, Jul. 1997.
- [140] H. H. Ng, Y. Zhang, B. Hendrich, C. A. Johnson, B. M. Turner, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst, D. Reinberg, and A. Bird, "MBD2 is a transcriptional repressor belonging to the MeCP1 histone deacetylase complex.," *Nat. Genet.*, vol. 23, no. 1, pp. 58–61, Sep. 1999.
- [141] S. S. Nair, M. W. Coolen, C. Stirzaker, J. Z. Song, A. L. Statham, D. Strbenac, M. D. Robinson, and S. J. Clark, "Comparison of methyl-DNA immunoprecipitation (MeDIP) and methyl-CpG binding domain (MBD) protein capture for genome-wide DNA methylation analysis reveal CpG sequence coverage bias.," *Epigenetics*, vol. 6, no. 1, pp. 34–44, Jan. 2011.

- [142] P. J. Skene, R. S. Illingworth, S. Webb, A. R. W. Kerr, K. D. James, D. J. Turner, R. Andrews, and A. P. Bird, "Neuronal MeCP2 is expressed at near histone-octamer levels and globally alters the chromatin state.," *Mol. Cell*, vol. 37, no. 4, pp. 457–68, Feb. 2010.
- [143] X. Nan, H. H. Ng, C. A. Johnson, C. D. Laherty, B. M. Turner, R. N. Eisenman, and A. Bird, "Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex.," *Nature*, vol. 393, no. 6683, pp. 386–9, May 1998.
- [144] R. E. Amir, I. B. Van den Veyver, M. Wan, C. Q. Tran, U. Francke, and H. Y. Zoghbi, "Rett syndrome is caused by mutations in X-linked MECP2, encoding methyl-CpG-binding protein 2.," *Nat. Genet.*, vol. 23, no. 2, pp. 185–8, Oct. 1999.
- [145] J. Guy, B. Hendrich, M. Holmes, J. E. Martin, and A. Bird, "A mouse Mecp2-null mutation causes neurological symptoms that mimic Rett syndrome.," *Nat. Genet.*, vol. 27, no. 3, pp. 322–6, Mar. 2001.
- [146] H. Van Esch, "MECP2 Duplication Syndrome.," *Mol. Syndromol.*, vol. 2, no. 3–5, pp. 128–136, Apr. 2012.
- [147] S. Shimada, N. Okamoto, M. Ito, Y. Arai, K. Momosaki, M. Togawa, Y. Maegaki, M. Sugawara, K. Shimojima, M. Osawa, and T. Yamamoto, "MECP2 duplication syndrome in both genders.," *Brain Dev.*, vol. 35, no. 5, pp. 411–9, May 2013.
- [148] R. J. Klose, S. A. Sarraf, L. Schmiedeberg, S. M. McDermott, I. Stancheva, and A. P. Bird, "DNA binding selectivity of MeCP2 due to a requirement for A/T sequences adjacent to methyl-CpG.," *Mol. Cell*, vol. 19, no. 5, pp. 667–78, Sep. 2005.
- [149] R. P. Ghosh, R. A. Horowitz-Scherer, T. Nikitina, L. S. Shlyakhtenko, and C. L. Woodcock, "MeCP2 binds cooperatively to its substrate and competes with histone H1 for chromatin binding sites.," *Mol. Cell. Biol.*, vol. 30, no. 19, pp. 4656–70, Oct. 2010.
- [150] T. Nikitina, X. Shi, R. P. Ghosh, R. A. Horowitz-Scherer, J. C. Hansen, and C. L. Woodcock, "Multiple modes of interaction between the methylated DNA binding protein MeCP2 and chromatin.," *Mol. Cell. Biol.*, vol. 27, no. 3, pp. 864–77, Feb. 2007.
- [151] R. El-Khoury, N. Panayotis, V. Matagne, A. Ghata, L. Villard, and J.-C. Roux, "GABA and glutamate pathways are spatially and developmentally affected in the brain of Mecp2-deficient mice.," *PLoS One*, vol. 9, no. 3, p. e92169, Jan. 2014.
- [152] A. Becker, L. Allmann, M. Hofstätter, V. Casà, P. Weber, A. Lehmkuhl, H. D. Herce, and M. C. Cardoso, "Direct homo- and hetero-interactions of MeCP2 and MBD2.," *PLoS One*, vol. 8, no. 1, p. e53730, Jan. 2013.
- [153] K. N. McFarland, M. N. Huizenga, S. B. Darnell, G. R. Sangrey, O. Berezovska, J.-H. J. Cha, T. F. Outeiro, and G. Sadri-Vakili, "MeCP2: a novel Huntingtin interactor.," *Hum. Mol. Genet.*, vol. 23, no. 4, pp. 1036–44, Feb. 2014.
- [154] N. Fujita, S. Watanabe, T. Ichimura, S. Tsuruzoe, Y. Shinkai, M. Tachibana, T. Chiba, and M. Nakao, "Methyl-CpG binding domain 1 (MBD1) interacts with the Suv39h1-HP1 heterochromatic complex for DNA methylation-based transcriptional repression.," *J. Biol. Chem.*, vol. 278, no. 26, pp. 24132–8, Jun. 2003.
- [155] S. A. Sarraf and I. Stancheva, "Methyl-CpG binding protein MBD1 couples histone H3 methylation at lysine 9 by SETDB1 to DNA replication and chromatin assembly.," *Mol. Cell*, vol. 15, no. 4, pp. 595–605, Aug. 2004.
- [156] H. F. Jørgensen, I. Ben-Porath, and A. P. Bird, "Mbd1 is recruited to both methylated and nonmethylated CpGs via distinct DNA binding domains.," *Mol. Cell. Biol.*, vol. 24, no. 8, pp. 3387–95, Apr. 2004.
- [157] T. Clouaire, J. I. de Las Heras, C. Merusi, and I. Stancheva, "Recruitment of MBD1 to target genes requires sequence-specific interaction of the MBD domain with methylated DNA.," *Nucleic Acids Res.*, vol. 38, no. 14, pp. 4620–34, Aug. 2010.
- [158] A. M. Allan, X. Liang, Y. Luo, C. Pak, X. Li, K. E. Szulwach, D. Chen, P. Jin, and X. Zhao, "The loss of methyl-CpG binding protein 1 leads to autism-like behavioral deficits.," *Hum. Mol. Genet.*, vol. 17, no. 13, pp. 2047–57, Jul. 2008.
- [159] X. Zhao, T. Ueba, B. R. Christie, B. Barkho, M. J. McConnell, K. Nakashima, E. S. Lein, B. D. Eadie, A. R. Willhoite, A. R. Muotri, R. G. Summers, J. Chun, K.-F. Lee, and F. H. Gage, "Mice lacking methyl-CpG binding protein 1 have deficits in adult neurogenesis and hippocampal function.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 100, no. 11, pp. 6777–82, May 2003.

- [160] K. Günther, M. Rust, J. Leers, T. Boettger, M. Scharfe, M. Jarek, M. Bartkuhn, and R. Renkawitz, "Differential roles for MBD2 and MBD3 at methylated CpG islands, active promoters and binding to exon sequences.," *Nucleic Acids Res.*, vol. 41, no. 5, pp. 3010–21, Mar. 2013.
- [161] H. Fujita, R. Fujii, S. Aratani, T. Amano, A. Fukamizu, and T. Nakajima, "Antithetic effects of MBD2a on gene regulation.," *Mol. Cell. Biol.*, vol. 23, no. 8, pp. 2645–57, Apr. 2003.
- [162] Y. Lu, Y.-H. Loh, H. Li, M. Cesana, S. B. Ficarro, J. R. Parikh, N. Salomonis, C.-X. D. Toh, S. T. Andreadis, C. J. Luckey, J. J. Collins, G. Q. Daley, and J. A. Marto, "Alternative Splicing of MBD2 Supports Self-Renewal in Human Pluripotent Stem Cells.," *Cell Stem Cell*, vol. 15, no. 1, pp. 92–101, Jul. 2014.
- [163] J. N. Scarsdale, H. D. Webb, G. D. Ginder, and D. C. Williams, "Solution structure and dynamic analysis of chicken MBD2 methyl binding domain bound to a target-methylated DNA sequence.," *Nucleic Acids Res.*, vol. 39, no. 15, pp. 6741–6752, Aug. 2011.
- [164] Q. Feng and Y. Zhang, "The MeCP1 complex represses transcription through preferential binding, remodeling, and deacetylating methylated nucleosomes.," *Genes Dev.*, vol. 15, no. 7, pp. 827–32, Apr. 2001.
- [165] N. M. Walavalkar, N. Gordon, and D. C. Williams, "Unique features of the anti-parallel, heterodimeric coiled-coil interaction between methyl-cytosine binding domain 2 (MBD2) homologues and GATA zinc finger domain containing 2A (GATAD2A/p66α).," *J. Biol. Chem.*, vol. 288, no. 5, pp. 3419–27, Feb. 2013.
- [166] J. Boeke, O. Ammerpohl, S. Kegel, U. Moehren, and R. Renkawitz, "The minimal repression domain of MBD2b overlaps with the methyl-CpG-binding domain and binds directly to Sin3A.," *J. Biol. Chem.*, vol. 275, no. 45, pp. 34963–7, Nov. 2000.
- [167] B. Hendrich, J. Guy, B. Ramsahoye, V. A. Wilson, and A. Bird, "Closely related proteins MBD2 and MBD3 play distinctive but interacting roles in mouse development.," *Genes Dev.*, vol. 15, no. 6, pp. 710–23, Mar. 2001.
- [168] E. N. Kersh, "Impaired memory CD8 T cell development in the absence of methyl-CpG-binding domain protein 2.," *J. Immunol.*, vol. 177, no. 6, pp. 3821–6, Sep. 2006.
- [169] A. S. Hutchins, D. Artis, B. D. Hendrich, A. P. Bird, P. Scott, and S. L. Reiner, "Cutting edge: a critical role for gene silencing in preventing excessive type 1 immunity.," *J. Immunol.*, vol. 175, no. 9, pp. 5606–10, Nov. 2005.
- [170] O. J. Sansom, J. Berger, S. M. Bishop, B. Hendrich, A. Bird, and A. R. Clarke, "Deficiency of Mbd2 suppresses intestinal tumorigenesis.," *Nat. Genet.*, vol. 34, no. 2, pp. 145–147, 2003.
- [171] T. J. Phesse, L. Parry, K. R. Reed, K. B. Ewan, T. C. Dale, O. J. Sansom, and A. R. Clarke, "Deficiency of Mbd2 attenuates Wnt signaling.," *Mol. Cell. Biol.*, vol. 28, no. 19, pp. 6094–103, Oct. 2008.
- [172] O. Y. Mian, S. Z. Wang, S. Z. Zhu, M. N. Gnanapragasam, L. Graham, H. D. Bear, and G. D. Ginder, "Methyl-Binding Domain Protein 2-Dependent Proliferation and Survival of Breast Cancer Cells," *Mol. Cancer Res.*, vol. 9, no. 8, pp. 1152–1162, Aug. 2011.
- [173] J. Berger, O. Sansom, A. Clarke, and A. Bird, "MBD2 is required for correct spatial gene expression in the gut.," *Mol. Cell. Biol.*, vol. 27, no. 11, pp. 4049–57, Jun. 2007.
- [174] J. W. Rupon, S. Z. Wang, M. Gnanapragasam, S. Labropoulos, and G. D. Ginder, "MBD2 contributes to developmental silencing of the human ε-globin gene.," *Blood Cells. Mol. Dis.*, vol. 46, no. 3, pp. 212–9, Mar. 2011.
- [175] J. Zhong, Q. Yu, P. Yang, X. Rao, L. He, J. Fang, Y. Tu, Z. Zhang, Q. Lai, S. Zhang, M. Kuczma, P. Kraj, J.-F. Xu, F. Gong, J. Zhou, L. Wen, D. L. Eizirik, J. Du, W. Wang, and C.-Y. Wang, "MBD2 regulates TH17 differentiation and experimental autoimmune encephalomyelitis by controlling the homeostasis of T-bet/Hlx axis.," *J. Autoimmun.*, Jun. 2014.
- [176] A. Chatagnon, L. Perriaud, N. Nazaret, S. Croze, J. Benhattar, J. Lachuer, and R. Dante, "Preferential binding of the methyl-CpG binding domain protein 2 at methylated transcriptional start site regions," *Epigenetics*, vol. 6, no. 11, pp. 1295–1307, Nov. 2011.
- [177] T. Baubec, R. Ivánek, F. Lienert, and D. Schübeler, "Methylation-dependent and -independent genomic targeting principles of the MBD protein family.," *Cell*, vol. 153, no. 2, pp. 480–92, Apr. 2013.
- [178] R. Menafrá, A. B. Brinkman, F. Matarese, G. Franci, S. J. J. Bartels, L. Nguyen, T. Shimbo, P. A. Wade, N. C. Hubner, and H. G. Stunnenberg, "Genome-wide binding of MBD2 reveals strong preference for highly methylated loci.," *PLoS One*, vol. 9, no. 6, p. e99603, Jan. 2014.

- [179] E. Kondo, Z. Gu, A. Horii, and S. Fukushima, "The thymine DNA glycosylase MBD4 represses transcription and is associated with methylated p16(INK4a) and hMLH1 genes.," *Mol. Cell. Biol.*, vol. 25, no. 11, pp. 4388–96, Jun. 2005.
- [180] S. Laget, B. Miotto, H. G. Chin, P.-O. Estève, R. J. Roberts, S. Pradhan, P.-A. Defossez, and P. O. Esteve, "MBD4 cooperates with DNMT1 to mediate methyl-DNA repression and protects mammalian cells from oxidative stress.," *Epigenetics*, vol. 9, no. 4, pp. 546–56, Apr. 2014.
- [181] B. Hendrich, U. Hardeland, H. H. Ng, J. Jiricny, and A. Bird, "The thymine glycosylase MBD4 can bind to the product of deamination at methylated CpG sites.," *Nature*, vol. 401, no. 6750, pp. 301–4, Sep. 1999.
- [182] C. B. Millar, J. Guy, O. J. Sansom, J. Selfridge, E. MacDougall, B. Hendrich, P. D. Keightley, S. M. Bishop, A. R. Clarke, and A. Bird, "Enhanced CpG mutability and tumorigenesis in MBD4-deficient mice.," *Science*, vol. 297, no. 5580, pp. 403–5, Jul. 2002.
- [183] R. A. Screaton, S. Kiessling, O. J. Sansom, C. B. Millar, K. Maddison, A. Bird, A. R. Clarke, and S. M. Frisch, "Fas-associated death domain protein interacts with methyl-CpG binding domain protein 4: a potential link between genome surveillance and apoptosis.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 100, no. 9, pp. 5211–6, Apr. 2003.
- [184] B. Hendrich and A. Bird, "Identification and characterization of a family of mammalian methyl-CpG binding proteins.," *Mol. Cell. Biol.*, vol. 18, no. 11, pp. 6538–47, Nov. 1998.
- [185] Y. Zhang, H. H. Ng, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst, A. Bird, and D. Reinberg, "Analysis of the NuRD subunits reveals a histone deacetylase core complex and a connection with DNA methylation.," *Genes Dev.*, vol. 13, no. 15, pp. 1924–35, Aug. 1999.
- [186] X. Le Guezennec, M. Vermeulen, A. B. Brinkman, W. A. M. Hoeijmakers, A. Cohen, E. Lasonder, and H. G. Stunnenberg, "MBD2/NuRD and MBD3/NuRD, two distinct complexes with different biochemical and functional properties.," *Mol. Cell. Biol.*, vol. 26, no. 3, pp. 843–51, Feb. 2006.
- [187] Y. Rais, A. Zviran, S. Geula, O. Gafni, E. Chomsky, S. Viukov, A. A. Mansour, I. Caspi, V. Krupalnik, M. Zerbib, I. Maza, N. Mor, D. Baran, L. Weinberger, D. A. Jaitin, D. Lara-Astiaso, R. Blecher-Gonen, Z. Shipony, Z. Mukamel, T. Hagai, S. Gilad, D. Amann-Zalcenstein, A. Tanay, I. Amit, N. Novershtern, and J. H. Hanna, "Deterministic direct reprogramming of somatic cells to pluripotency.," *Nature*, vol. 502, no. 7469, pp. 65–70, Oct. 2013.
- [188] R. L. Dos Santos, L. Tosti, A. Radziszewska, I. M. Caballero, K. Kaji, B. Hendrich, and J. C. R. Silva, "MBD3/NuRD Facilitates Induction of Pluripotency in a Context-Dependent Manner.," *Cell Stem Cell*, vol. 15, no. 1, pp. 102–10, Jul. 2014.
- [189] O. Yildirim, R. Li, J. H. Hung, P. B. Chen, X. Dong, L. S. Ee, Z. Weng, O. J. Rando, and T. G. Fazzio, "Mbd3/NuRD complex regulates expression of 5-hydroxymethylcytosine marked genes in embryonic stem cells," *Cell*, vol. 147, no. 7, pp. 1498–1510, Dec. 2011.
- [190] H. Hashimoto, Y. Liu, A. K. Upadhyay, Y. Chang, S. B. Howerton, P. M. Vertino, X. Zhang, and X. Cheng, "Recognition and potential mechanisms for replication and erasure of cytosine hydroxymethylation," *Nucleic Acids Res.*, vol. 40, no. 11, pp. 4841–4849, Jun. 2012.
- [191] J. M. Cramer, J. N. Scarsdale, N. M. Walavalkar, W. A. Buchwald, G. D. Ginder, and D. C. Williams, "Probing the dynamic distribution of bound states for methylcytosine-binding domains on DNA.," *J. Biol. Chem.*, vol. 289, no. 3, pp. 1294–302, Jan. 2014.
- [192] H. I. Baymaz, A. Fournier, S. Laget, Z. Ji, P. W. T. C. Jansen, A. H. Smits, L. Ferry, A. Mensinga, I. Poser, A. Sharrocks, P.-A. Defossez, and M. Vermeulen, "MBD5 and MBD6 interact with the human PR-DUB complex through their methyl-CpG-binding domain.," *Proteomics*, Mar. 2014.
- [193] V. Camarena, L. Cao, C. Abad, A. Abrams, Y. Toledo, K. Araki, M. Araki, K. Walz, and J. I. Young, "Disruption of Mbd5 in mice causes neuronal functional deficits and neurobehavioral abnormalities consistent with 2q23.1 microdeletion syndrome.," *EMBO Mol. Med.*, vol. 6, no. 8, pp. 1003–15, Jan. 2014.
- [194] T. C. Roloff, H. H. Ropers, and U. A. Nuber, "Comparative study of methyl-CpG-binding domain proteins.," *BMC Genomics*, vol. 4, no. 1, p. 1, Jan. 2003.
- [195] C. L. Jiang, S. G. Jin, D. H. Lee, Z. J. Lan, X. Xu, T. R. O'Connor, P. E. Szabó, J. R. Mann, A. J. Cooney, and G. P. Pfeifer, "MBD3L1 and MBD3L2, two new proteins homologous to the methyl-CpG-binding proteins MBD2 and MBD3: characterization of MBD3L1 as a testis-specific transcriptional repressor.," *Genomics*, vol. 80, no. 6, pp. 621–9, Dec. 2002.

- [196] C.-L. Jiang, S.-G. Jin, and G. P. Pfeifer, "MBD3L1 is a transcriptional repressor that interacts with methyl-CpG-binding protein 2 (MBD2) and components of the NuRD complex.," *J. Biol. Chem.*, vol. 279, no. 50, pp. 52456–64, Dec. 2004.
- [197] S.-G. Jin, C.-L. Jiang, T. Rauch, H. Li, and G. P. Pfeifer, "MBD3L2 interacts with MBD3 and components of the NuRD complex and can oppose MBD2-MeCP1-mediated methylation silencing.," *J. Biol. Chem.*, vol. 280, no. 13, pp. 12700–9, Apr. 2005.
- [198] J. M. Daniel, C. M. Spring, H. C. Crawford, A. B. Reynolds, and A. Baig, "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.*, vol. 30, no. 13, pp. 2911–9, Jul. 2002.
- [199] C. M. Spring, K. F. Kelly, I. O'Kelly, M. Graham, H. C. Crawford, and J. M. Daniel, "The catenin p120ctn inhibits Kaiso-mediated transcriptional repression of the beta-catenin/TCF target gene matrilysin.," *Exp. Cell Res.*, vol. 305, no. 2, pp. 253–65, May 2005.
- [200] B. Del Valle-Pérez, D. Casagolda, E. Lugalde, G. Valls, M. Codina, N. Dave, A. G. de Herreros, and M. Duñach, "Wnt controls the transcriptional activity of Kaiso through CK1 ϵ -dependent phosphorylation of p120-catenin.," *J. Cell Sci.*, vol. 124, no. Pt 13, pp. 2298–309, Jul. 2011.
- [201] A. Prokhortchouk, B. Hendrich, H. Jørgensen, A. Ruzov, M. Wilm, G. Georgiev, A. Bird, and E. Prokhortchouk, "The p120 catenin partner Kaiso is a DNA methylation-dependent transcriptional repressor.," *Genes Dev.*, vol. 15, no. 13, pp. 1613–8, Jul. 2001.
- [202] B. A. Buck-Koehntop, R. L. Stanfield, D. C. Ekiert, M. A. Martinez-Yamout, H. J. Dyson, I. A. Wilson, and P. E. Wright, "Molecular basis for recognition of methylated and specific DNA sequences by the zinc finger protein Kaiso.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 109, no. 38, pp. 15229–34, Oct. 2012.
- [203] G. J. P. Filion, S. Zhenilo, S. Salozhin, D. Yamada, E. Prokhortchouk, and P. Defossez, "A Family of Human Zinc Finger Proteins That Bind Methylated DNA and Repress Transcription," vol. 26, no. 1, pp. 169–181, 2006.
- [204] H.-G. Yoon, D. W. Chan, A. B. Reynolds, J. Qin, and J. Wong, "N-CoR mediates DNA methylation-dependent repression through a methyl CpG binding protein Kaiso.," *Mol. Cell*, vol. 12, no. 3, pp. 723–34, Sep. 2003.
- [205] A. Prokhortchouk, O. Sansom, J. Selfridge, I. M. Caballero, S. Salozhin, D. Aithozhina, L. Cerchietti, F. G. Meng, L. H. Augenlicht, J. M. Mariadason, B. Hendrich, A. Melnick, E. Prokhortchouk, A. Clarke, and A. Bird, "Kaiso-deficient mice show resistance to intestinal cancer.," *Mol. Cell. Biol.*, vol. 26, no. 1, pp. 199–208, Jan. 2006.
- [206] D.-I. Koh, J.-H. Yoon, M.-K. Kim, H. An, M.-Y. Kim, and M.-W. Hur, "Kaiso is a key regulator of spleen germinal center formation by repressing Bcl6 expression in splenocytes.," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 442, no. 3–4, pp. 177–82, Dec. 2013.
- [207] A. Ruzov, D. S. Dunican, A. Prokhortchouk, S. Pennings, I. Stancheva, E. Prokhortchouk, and R. R. Meehan, "Kaiso is a genome-wide repressor of transcription that is essential for amphibian development.," *Development*, vol. 131, no. 24, pp. 6185–94, Dec. 2004.
- [208] A. Weber, J. Marquardt, D. Elzi, N. Forster, S. Starke, A. Glaum, D. Yamada, P.-A. Defossez, J. Delrow, R. N. Eisenman, H. Christiansen, and M. Eilers, "Zbtb4 represses transcription of P21CIP1 and controls the cellular response to p53 activation.," *EMBO J.*, vol. 27, no. 11, pp. 1563–74, Jun. 2008.
- [209] K. Kim, G. Chadalapaka, S.-O. Lee, D. Yamada, X. Sastre-Garau, P. Defossez, Y.-Y. Park, J.-S. Lee, and S. Safe, "Identification of oncogenic microRNA-17-92/ZBTB4/specificity protein axis in breast cancer.," *Oncogene*, vol. 31, no. 8, pp. 1034–44, Feb. 2012.
- [210] D. F. Gudbjartsson, G. B. Walters, G. Thorleifsson, H. Stefansson, B. V. Halldorsson, P. Zusmanovich, P. Sulem, S. Thorlacius, A. Gylfason, S. Steinberg, A. Helgadóttir, A. Ingason, V. Steinthorsdóttir, E. J. Ólafsdóttir, G. H. Ólafsdóttir, T. Jonsson, K. Borch-Johnsen, T. Hansen, G. Andersen, T. Jørgensen, O. Pedersen, K. K. Aben, J. A. Witjes, D. W. Swinkels, M. den Heijer, B. Franke, A. L. M. Verbeek, D. M. Becker, L. R. Yanek, L. C. Becker, L. Tryggvadóttir, T. Rafnar, J. Gulcher, L. A. Kiemeny, A. Kong, U. Thorsteinsdóttir, and K. Stefansson, "Many sequence variants affecting diversity of adult human height.," *Nat. Genet.*, vol. 40, no. 5, pp. 609–15, May 2008.
- [211] Y. Liu, L. Zan, S. Zhao, Y. Xin, L. Li, W. Cui, Z. Tang, and K. Li, "Molecular characterization, polymorphism of bovine ZBTB38 gene and association with body measurement traits in native Chinese cattle breeds.," *Mol. Biol. Rep.*, vol. 37, no. 8, pp. 4041–9, Dec. 2010.

- [212] N. Sasai, E. Matsuda, E. Sarashina, Y. Ishida, and M. Kawaichi, "Identification of a novel BTB-zinc finger transcriptional repressor, CIBZ, that interacts with CtBP corepressor.," *Genes Cells*, vol. 10, no. 9, pp. 871–85, Sep. 2005.
- [213] B. Miotto, M. Chibi, P. Xie, S. Koundrioukoff, H. Moolman-Smook, D. Pugh, M. Debatisse, F. He, L. Zhang, and P.-A. Defossez, "The RBBP6/ZBTB38/MCM10 axis regulates DNA replication and common fragile site stability.," *Cell Rep.*, vol. 7, no. 2, pp. 575–87, Apr. 2014.
- [214] Y. Oikawa, R. Omori, T. Nishii, Y. Ishida, M. Kawaichi, and E. Matsuda, "The methyl-CpG-binding protein CIBZ suppresses myogenic differentiation by directly inhibiting myogenin expression.," *Cell Res.*, vol. 21, no. 11, pp. 1578–90, Nov. 2011.
- [215] S. Quenneville, G. Verde, A. Corsinotti, A. Kapopoulou, J. Jakobsson, S. Offner, I. Baglivo, P. V Pedone, G. Grimaldi, A. Riccio, and D. Trono, "In embryonic stem cells, ZFP57/KAP1 recognize a methylated hexanucleotide to affect chromatin and DNA methylation of imprinting control regions.," *Mol. Cell*, vol. 44, no. 3, pp. 361–72, Nov. 2011.
- [216] Y. Liu, H. Toh, H. Sasaki, X. Zhang, and X. Cheng, "An atomic model of Zfp57 recognition of CpG methylation within a specific DNA sequence.," *Genes Dev.*, vol. 26, no. 21, pp. 2374–9, Nov. 2012.
- [217] X. Li, M. Ito, F. Zhou, N. Youngson, X. Zuo, P. Leder, and A. C. Ferguson-Smith, "A maternal-zygotic effect gene, Zfp57, maintains both maternal and paternal imprints.," *Dev. Cell*, vol. 15, no. 4, pp. 547–57, Oct. 2008.
- [218] X. Zuo, J. Sheng, H.-T. Lau, C. M. McDonald, M. Andrade, D. E. Cullen, F. T. Bell, M. Iacovino, M. Kyba, G. Xu, and X. Li, "Zinc finger protein ZFP57 requires its co-factor to recruit DNA methyltransferases and maintains DNA methylation imprint in embryonic stem cells via its transcriptional repression domain.," *J. Biol. Chem.*, vol. 287, no. 3, pp. 2107–18, Jan. 2012.
- [219] S. E. Boonen, D. J. G. Mackay, J. M. D. Hahneemann, L. Docherty, K. Grønskov, A. Lehmann, L. G. Larsen, A. P. Haemers, Y. Kockaerts, L. Doms, D. C. Vu, C. T. B. Ngoc, P. B. Nguyen, O. Kordonouri, F. Sundberg, P. Dayanikli, V. Puthi, C. Acerini, A. F. Massoud, Z. Tümer, and I. K. Temple, "Transient neonatal diabetes, ZFP57, and hypomethylation of multiple imprinted loci: a detailed follow-up.," *Diabetes Care*, vol. 36, no. 3, pp. 505–12, Mar. 2013.
- [220] S. Hu, J. Wan, Y. Su, Q. Song, Y. Zeng, H. N. Nguyen, J. Shin, E. Cox, H. S. Rho, C. Woodard, S. Xia, S. Liu, H. Lyu, G.-L. Ming, H. Wade, H. Song, J. Qian, and H. Zhu, "DNA methylation presents distinct binding sites for human transcription factors.," *Elife*, vol. 2, p. e00726, Jan. 2013.
- [221] K. Takahashi and S. Yamanaka, "Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors.," *Cell*, vol. 126, no. 4, pp. 663–76, Aug. 2006.
- [222] G. V Avvakumov, J. R. Walker, S. Xue, Y. Li, S. Duan, C. Bronner, C. H. Arrowsmith, and S. Dhe-Paganon, "Structural basis for recognition of hemi-methylated DNA by the SRA domain of human UHRF1.," *Nature*, vol. 455, no. 7214, pp. 822–5, Oct. 2008.
- [223] J. Sharif, M. Muto, S. Takebayashi, I. Suetake, A. Iwamatsu, T. A. Endo, J. Shinga, Y. Mizutani-Koseki, T. Toyoda, K. Okamura, S. Tajima, K. Mitsuya, M. Okano, and H. Koseki, "The SRA protein Np95 mediates epigenetic inheritance by recruiting Dnmt1 to methylated DNA.," *Nature*, vol. 450, no. 7171, pp. 908–12, Dec. 2007.
- [224] M. Jeanblanc, M. Mousli, R. Hopfner, K. Bathami, N. Martinet, A.-Q. Abbady, J.-C. Siffert, E. Mathieu, C. D. Muller, and C. Bronner, "The retinoblastoma gene and its product are targeted by ICBP90: a key mechanism in the G1/S transition during the cell cycle.," *Oncogene*, vol. 24, no. 49, pp. 7337–45, Nov. 2005.
- [225] M. Unoki, T. Nishidate, and Y. Nakamura, "ICBP90, an E2F-1 target, recruits HDAC1 and binds to methyl-CpG through its SRA domain.," *Oncogene*, vol. 23, no. 46, pp. 7601–10, Oct. 2004.
- [226] J. K. Kim, P.-O. Estève, S. E. Jacobsen, and S. Pradhan, "UHRF1 binds G9a and participates in p21 transcriptional regulation in mammalian cells.," *Nucleic Acids Res.*, vol. 37, no. 2, pp. 493–505, Feb. 2009.
- [227] W. Jin, L. Chen, Y. Chen, S. G. Xu, G. H. Di, W. J. Yin, J. Wu, and Z. M. Shao, "UHRF1 is associated with epigenetic silencing of BRCA1 in sporadic breast cancer," *Breast Cancer Res. Treat.*, vol. 123, no. 2, pp. 359–373, Sep. 2010.
- [228] P. Karagianni, L. Amazit, J. Qin, and J. Wong, "ICBP90, a novel methyl K9 H3 binding protein linking protein ubiquitination with heterochromatin formation.," *Mol. Cell. Biol.*, vol. 28, no. 2, pp. 705–17, Jan. 2008.

- [229] A. Rottach, C. Frauer, G. Pichler, I. M. Bonapace, F. Spada, and H. Leonhardt, "The multi-domain protein Np95 connects DNA methylation and histone modification.," *Nucleic Acids Res.*, vol. 38, no. 6, pp. 1796–804, Apr. 2010.
- [230] D. Meilinger, K. Fellinger, S. Bultmann, U. Rothbauer, I. M. Bonapace, W. E. F. Klinkert, F. Spada, and H. Leonhardt, "Np95 interacts with de novo DNA methyltransferases, Dnmt3a and Dnmt3b, and mediates epigenetic silencing of the viral CMV promoter in embryonic stem cells.," *EMBO Rep.*, vol. 10, no. 11, pp. 1259–64, Nov. 2009.
- [231] G. Pichler, P. Wolf, C. S. Schmidt, D. Meilinger, K. Schneider, C. Frauer, K. Fellinger, A. Rottach, and H. Leonhardt, "Cooperative DNA and histone binding by Uhrf2 links the two major repressive epigenetic pathways.," *J. Cell. Biochem.*, vol. 112, no. 9, pp. 2585–93, Sep. 2011.
- [232] J. Zhang, Q. Gao, P. Li, X. Liu, Y. Jia, W. Wu, J. Li, S. Dong, H. Koseki, and J. Wong, "S phase-dependent interaction with DNMT1 dictates the role of UHRF1 but not UHRF2 in DNA methylation maintenance.," *Cell Res.*, vol. 21, no. 12, pp. 1723–39, Dec. 2011.
- [233] T. Zhou, J. Xiong, M. Wang, N. Yang, J. Wong, B. Zhu, and R.-M. Xu, "Structural basis for hydroxymethylcytosine recognition by the SRA domain of UHRF2.," *Mol. Cell.*, vol. 54, no. 5, pp. 879–86, Jun. 2014.
- [234] T. Luo, S. Cui, C. Bian, and X. Yu, "Uhrf2 is important for DNA damage response in vascular smooth muscle cells.," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 441, no. 1, pp. 65–70, Nov. 2013.
- [235] C. Liang, X. Zhang, S. Song, C. Tian, Y. Yin, G. Xing, F. He, and L. Zhang, "Identification of UHRF1/2 as new N-methylpurine DNA glycosylase-interacting proteins.," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 433, no. 4, pp. 415–9, Apr. 2013.
- [236] L. Bai, X. Wang, F. Jin, Y. Yang, G. Qian, and C. Duan, "UHRF2, another E3 ubiquitin ligase for p53.," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 425, no. 4, pp. 908–11, Sep. 2012.
- [237] T. Mori, D. D. Ikeda, Y. Yamaguchi, and M. Unoki, "NIRF/UHRF2 occupies a central position in the cell cycle network and allows coupling with the epigenetic landscape.," *FEBS Lett.*, vol. 586, no. 11, pp. 1570–83, Jun. 2012.
- [238] C. Bronner, M. Achour, Y. Arima, T. Chataigneau, H. Saya, and V. B. Schini-Kerth, "The UHRF family: oncogenes that are drugable targets for cancer therapy in the near future?," *Pharmacol. Ther.*, vol. 115, no. 3, pp. 419–34, Sep. 2007.
- [239] S. J. J. Bartels, C. G. Spruijt, A. B. Brinkman, P. W. T. C. Jansen, M. Vermeulen, and H. G. Stunnenberg, "A SILAC-based screen for methyl-CPG binding proteins identifies RBP-J as a DNA methylation and sequence-specific binding protein," *PLoS One*, vol. 6, no. 10, p. e25884, Jan. 2011.
- [240] E. Auriol, L. M. Billard, F. Magdinier, and R. Dante, "Specific binding of the methyl binding domain protein 2 at the BRCA1-NBR2 locus," *Nucleic Acids Res.*, vol. 33, no. 13, pp. 4243–4254, Jan. 2005.
- [241] A. Minkovsky, A. Sahakyan, E. Rankin-Gee, G. Bonora, S. Patel, and K. Plath, "The Mbd1-Atf7ip-Setdb1 pathway contributes to the maintenance of X chromosome inactivation.," *Epigenetics Chromatin*, vol. 7, p. 12, Jan. 2014.
- [242] J. Son, N. Y. Min, J.-H. Choi, Y. J. Ko, W. Liang, S. Rhee, and K.-H. Lee, "Direct evidence of allele-specific binding of CTCF and MeCP2 to Tsix in a HPRT-deficient female F₁ hybrid mouse cell line.," *Cytogenet. Genome Res.*, vol. 138, no. 1, pp. 11–8, Jan. 2012.
- [243] L. M. Billard, F. Magdinier, G. M. Lenoir, L. Frappart, and R. Dante, "MeCP2 and MBD2 expression during normal and pathological growth of the human mammary gland," *Oncogene*, vol. 21, no. 17, pp. 2704–2712, Apr. 2002.
- [244] I. Martin Caballero, J. Hansen, D. Leaford, S. Pollard, and B. D. Hendrich, "The methyl-CpG binding proteins Mecp2, Mbd2 and Kaiso are dispensable for mouse embryogenesis, but play a redundant function in neural differentiation," *PLoS One*, vol. 4, no. 1, p. e4315, Jan. 2009.
- [245] L. Lopez-Serra, E. Ballestar, M. F. Fraga, M. Alaminos, F. Setien, and M. Esteller, "A profile of methyl-CpG binding domain protein occupancy of hypermethylated promoter CpG islands of tumor suppressor genes in human cancer.," *Cancer Res.*, vol. 66, no. 17, pp. 8342–8346, Sep. 2006.
- [246] J. Guy, B. Hendrich, M. Holmes, J. E. Martin, and A. Bird, "A mouse Mecp2 -null mutation causes neurological symptoms that mimic Rett syndrome," vol. 27, no. march, pp. 322–326, 2001.
- [247] O. J. Sansom, K. Maddison, and A. R. Clarke, "Mechanisms of disease: methyl-binding domain proteins as potential therapeutic targets in cancer.," *Nat. Clin. Pract. Oncol.*, vol. 4, no. 5, pp. 305–15, May 2007.

- [248] L. Lopez-Serra, E. Ballestar, S. Ropero, F. Setien, L.-M. Billard, M. F. Fraga, P. Lopez-Nieva, M. Alaminos, D. Guerrero, R. Dante, and M. Esteller, "Unmasking of epigenetically silenced candidate tumor suppressor genes by removal of methyl-CpG-binding domain proteins.," *Oncogene*, vol. 27, no. 25, pp. 3556–3566, Jun. 2008.
- [249] L. Lopez-Serra and M. Esteller, "Proteins that bind methylated DNA and human cancer: reading the wrong words.," *Br. J. Cancer*, vol. 98, no. 12, pp. 1881–1885, Jun. 2008.
- [250] G. Grafi, A. Zemach, and L. Pitto, "Methyl-CpG-binding domain (MBD) proteins in plants.," *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1769, no. 5–6, pp. 287–94.
- [251] F. Scebba, G. Bernacchia, M. De Bastiani, M. Evangelista, R. M. Cantoni, R. Cella, M. T. Locci, and L. Pitto, "Arabidopsis MBD proteins show different binding specificities and nuclear localization.," *Plant Mol. Biol.*, vol. 53, no. 5, pp. 715–31, Nov. 2003.
- [252] L. M. Johnson, M. Bostick, X. Zhang, E. Kraft, I. Henderson, J. Callis, and S. E. Jacobsen, "The SRA methyl-cytosine-binding domain links DNA and histone methylation.," *Curr. Biol.*, vol. 17, no. 4, pp. 379–84, Feb. 2007.
- [253] L. M. Johnson, J. A. Law, A. Khattar, I. R. Henderson, and S. E. Jacobsen, "SRA-domain proteins required for DRM2-mediated de novo DNA methylation.," *PLoS Genet.*, vol. 4, no. 11, p. e1000280, Nov. 2008.
- [254] H. R. Woo, T. A. Dittmer, and E. J. Richards, "Three SRA-domain methylcytosine-binding proteins cooperate to maintain global CpG methylation and epigenetic silencing in Arabidopsis.," *PLoS Genet.*, vol. 4, no. 8, p. e1000156, Jan. 2008.
- [255] P. Defossez and I. Stancheva, "Biological functions of methyl-CpG-binding proteins.," *Prog. Mol. Biol. ...*, vol. 101, pp. 377–98, Jan. 2010.
- [256] A. Deaton and A. Bird, "CpG islands and the regulation of transcription," *Genes Dev.*, pp. 1010–1022, 2011.
- [257] M. Esteller, "Epigenetics in cancer.," *N. Engl. J. Med.*, vol. 358, no. 11, pp. 1148–59, Mar. 2008.
- [258] S. B. Baylin and P. a Jones, "A decade of exploring the cancer epigenome - biological and translational implications.," *Nat. Rev. Cancer*, vol. 11, no. 10, pp. 726–34, Oct. 2011.
- [259] M. Ehrlich and M. Lacey, "DNA methylation and differentiation: silencing, upregulation and modulation of gene expression.," *Epigenomics*, vol. 5, no. 5, pp. 553–68, Oct. 2013.
- [260] J. Kim, "Methylation-sensitive binding of transcription factor YY1 to an insulator sequence within the paternally expressed imprinted gene, Peg3," *Hum. Mol. Genet.*, vol. 12, no. 3, pp. 233–245, Feb. 2003.
- [261] F. Watt and P. L. Molloy, "Cytosine methylation prevents binding to DNA of a HeLa cell transcription factor required for optimal expression of the adenovirus major late promoter.," *Genes Dev.*, vol. 2, no. 9, pp. 1136–1143, Sep. 1988.
- [262] A. Bird, "DNA methylation patterns and epigenetic memory.," *Genes Dev.*, vol. 16, no. 1, pp. 6–21, Jan. 2002.
- [263] P.-A. Defossez and I. Stancheva, *Biological functions of methyl-CpG-binding proteins.*, 1st ed., vol. 101. Elsevier Inc., 2011, pp. 377–98.
- [264] T. Baubec and D. Schübeler, "Genomic patterns and context specific interpretation of DNA methylation.," *Curr. Opin. Genet. Dev.*, vol. 25, pp. 85–92, Apr. 2014.
- [265] N. Sasai and P.-A. Defossez, "Many paths to one goal? The proteins that recognize methylated DNA in eukaryotes.," *Int. J. Dev. Biol.*, vol. 53, no. 2–3, pp. 323–334, Jan. 2009.
- [266] P. L. Jones, G. J. Veenstra, P. A. Wade, D. Vermaak, S. U. Kass, N. Landsberger, J. Strouboulis, and A. P. Wolffe, "Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription.," *Nat. Genet.*, vol. 19, no. 2, pp. 187–91, Jun. 1998.
- [267] F. Wischnewski, O. Friese, K. Pantel, and H. Schwarzenbach, "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.*, vol. 5, no. 7, pp. 749–59, Jul. 2007.
- [268] D. H. Yasui, S. Peddada, M. C. Bieda, R. O. Vallero, A. Hogart, R. P. Nagarajan, K. N. Thatcher, P. J. Farnham, and J. M. Lasalle, "Integrated epigenomic analyses of neuronal MeCP2 reveal a role for long-range interaction with active genes.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 104, no. 49, pp. 19416–21, Dec. 2007.

- [269] A. Dhasarathy and P. a Wade, "The MBD protein family-reading an epigenetic mark?," *Mutat. Res.*, vol. 647, no. 1–2, pp. 39–43, Dec. 2008.
- [270] M. R. Lee, N. Prasain, H.-D. Chae, Y.-J. Kim, C. Mantel, M. C. Yoder, and H. E. Broxmeyer, "Epigenetic regulation of NANOG by miR-302 cluster-MBD2 completes induced pluripotent stem cell reprogramming," *Stem Cells*, vol. 31, no. 4, pp. 666–81, Apr. 2013.
- [271] A. S. Hutchins, A. C. Mullen, H. W. Lee, K. J. Sykes, F. a. High, B. D. Hendrich, A. P. Bird, and S. L. Reiner, "Gene silencing quantitatively controls the function of a developmental trans-activator," *Mol. Cell*, vol. 10, no. 1, pp. 81–91, 2002.
- [272] X. Rao, J. Zhong, S. Zhang, Y. Zhang, Q. Yu, P. Yang, M.-H. H. Wang, D. J. Fulton, H. Shi, Z. Dong, D. Wang, and C.-Y. Y. Wang, "Loss of methyl-CpG-binding domain protein 2 enhances endothelial angiogenesis and protects mice against hind-limb ischemic injury," *Circulation*, vol. 123, no. 25, pp. 2964–74, Jun. 2011.
- [273] P. W. Laird, L. Jackson-Grusby, A. Fazeli, S. L. Dickinson, W. E. Jung, E. Li, R. A. Weinberg, and R. Jaenisch, "Suppression of intestinal neoplasia by DNA hypomethylation," *Cell*, vol. 81, no. 2, pp. 197–205, Apr. 1995.
- [274] C. A. Eads, A. E. Nickel, and P. W. Laird, "Complete genetic suppression of polyp formation and reduction of CpG-island hypermethylation in Apc(Min/+) Dnmt1-hypomorphic Mice," *Cancer Res.*, vol. 62, no. 5, pp. 1296–9, Mar. 2002.
- [275] A.-P. Morel, M. Lièvre, C. Thomas, G. Hinkal, S. Ansieau, and A. Puisieux, "Generation of breast cancer stem cells through epithelial-mesenchymal transition," *PLoS One*, vol. 3, no. 8, p. e2888, Jan. 2008.
- [276] E. Auriol, L.-M. Billard, F. Magdinier, and R. Dante, "Specific binding of the methyl binding domain protein 2 at the BRCA1-NBR2 locus," *Nucleic Acids Res.*, vol. 33, no. 13, pp. 4243–54, Jan. 2005.
- [277] L. Perriaud, J. Lachuer, and R. Dante, "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.*, vol. 5, pp. 1–6, 2013.
- [278] H. F. Jørgensen, K. Adie, P. Chaubert, and A. P. Bird, "Engineering a high-affinity methyl-CpG-binding protein," *Nucleic Acids Res.*, vol. 34, no. 13, p. e96, Jan. 2006.
- [279] D. Kim, G. Pertea, C. Trapnell, H. Pimentel, R. Kelley, and S. L. Salzberg, "TopHat2: accurate alignment of transcriptomes in the presence of insertions, deletions and gene fusions," *Genome Biol.*, vol. 14, no. 4, p. R36, Apr. 2013.
- [280] S. Anders, D. McCarthy, Y. Chen, M. Okoniewski, G. Smyth, W. Huber, and M. Robinson, "Count-based differential expression analysis of RNA sequencing data using R and Bioconductor," *Nat. Protoc.*, vol. 8, no. 9, pp. 1765–1786, Sep. 2013.
- [281] M. D. Robinson, D. J. McCarthy, and G. K. Smyth, "edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data," *Bioinformatics*, vol. 26, no. 1, pp. 139–40, Jan. 2010.
- [282] A. Subramanian, P. Tamayo, V. K. Mootha, S. Mukherjee, B. L. Ebert, M. A. Gillette, A. Paulovich, S. L. Pomeroy, T. R. Golub, E. S. Lander, and J. P. Mesirov, "Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 102, no. 43, pp. 15545–50, Oct. 2005.
- [283] B. Langmead, C. Trapnell, M. Pop, and S. L. Salzberg, "Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome," *Genome Biol.*, vol. 10, no. 3, p. R25, Jan. 2009.
- [284] H. Li, B. Handsaker, A. Wysoker, T. Fennell, J. Ruan, N. Homer, G. Marth, G. Abecasis, and R. Durbin, "The Sequence Alignment/Map format and SAMtools," *Bioinformatics*, vol. 25, no. 16, pp. 2078–9, Aug. 2009.
- [285] Y. Zhang, T. Liu, C. a Meyer, J. Eeckhoute, D. S. Johnson, B. E. Bernstein, C. Nusbaum, R. M. Myers, M. Brown, W. Li, and X. S. Liu, "Model-based analysis of ChIP-Seq (MACS)," *Genome Biol.*, vol. 9, no. 9, p. R137, Jan. 2008.
- [286] Z. Shao, Y. Zhang, G.-C. Yuan, S. H. Orkin, and D. J. Waxman, "MANorm: a robust model for quantitative comparison of ChIP-Seq data sets," *Genome Biol.*, vol. 13, no. 3, p. R16, Jan. 2012.
- [287] D. H. Phanstiel, A. P. Boyle, C. L. Araya, and M. P. Snyder, "Sushi.R: flexible, quantitative and integrative genomic visualizations for publication-quality multi-panel figures," *Bioinformatics*, Jun. 2014.
- [288] T. Ye, A. R. Krebs, M.-A. Choukrallah, C. Keime, F. Plewniak, I. Davidson, and L. Tora, "seqMINER: an integrated ChIP-seq data interpretation platform," *Nucleic Acids Res.*, vol. 39, no. 6, p. e35, Mar. 2011.

- [289] A. L. Statham, D. Strbenac, M. W. Coolen, C. Stirzaker, S. J. Clark, and M. D. Robinson, "Repitools: An R package for the analysis of enrichment-based epigenomic data," *Bioinformatics*, vol. 26, no. 13, pp. 1662–1663, Jul. 2010.
- [290] M. Thomas-Chollier, M. Defrance, A. Medina-Rivera, O. Sand, C. Herrmann, D. Thieffry, and J. van Helden, "RSAT 2011: regulatory sequence analysis tools.," *Nucleic Acids Res.*, vol. 39, no. Web Server issue, pp. W86–91, Jul. 2011.
- [291] A. Chatagnon, S. Bougel, L. Perriaud, J. Lachuer, J. Benhattar, and R. Dante, "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*, vol. 30, no. 1, pp. 28–34, Jan. 2009.
- [292] W. C. Hahn, S. K. Dessain, M. W. Brooks, J. E. King, B. Elenbaas, D. M. Sabatini, J. A. DeCaprio, and R. A. Weinberg, "Enumeration of the simian virus 40 early region elements necessary for human cell transformation.," *Mol. Cell. Biol.*, vol. 22, no. 7, pp. 2111–23, Apr. 2002.
- [293] C. L. Chaffer, N. D. Marjanovic, T. Lee, G. Bell, C. G. Kleer, F. Reinhardt, A. C. D'Alessio, R. A. Young, and R. A. Weinberg, "Poised chromatin at the ZEB1 promoter enables breast cancer cell plasticity and enhances tumorigenicity.," *Cell*, vol. 154, no. 1, pp. 61–74, Jul. 2013.
- [294] A. Puisieux, T. Brabletz, and J. Caramel, "Oncogenic roles of EMT-inducing transcription factors.," *Nat. Cell Biol.*, vol. 16, no. 6, pp. 488–94, May 2014.
- [295] M. A. Gama-Sosa, V. A. Slagel, R. W. Trewyn, R. Oxenhandler, K. C. Kuo, C. W. Gehrke, and M. Ehrlich, "The 5-methylcytosine content of DNA from human tumors.," *Nucleic Acids Res.*, vol. 11, no. 19, pp. 6883–94, Oct. 1983.
- [296] S. B. Baylin, J. G. Herman, J. R. Graff, P. M. Vertino, and J. P. Issa, "Alterations in DNA methylation: a fundamental aspect of neoplasia.," *Adv. Cancer Res.*, vol. 72, pp. 141–96, Jan. 1998.
- [297] M. Ehrlich, "DNA methylation in cancer: too much, but also too little.," *Oncogene*, vol. 21, no. 35, pp. 5400–13, Aug. 2002.
- [298] M. Kulis and M. Esteller, "DNA methylation and cancer.," *Adv. Genet.*, vol. 70, pp. 27–56, Jan. 2010.
- [299] D. Sproul, R. R. Kitchen, C. E. Nestor, J. M. Dixon, A. H. Sims, D. J. Harrison, B. H. Ramsahoye, and R. R. Meehan, "Tissue of origin determines cancer-associated CpG island promoter hypermethylation patterns.," *Genome Biol.*, vol. 13, no. 10, p. R84, Jan. 2012.
- [300] L. Vardimon, A. Kressmann, H. Cedar, M. Maechler, and W. Doerfler, "Expression of a cloned adenovirus gene is inhibited by in vitro methylation.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 79, no. 4, pp. 1073–7, Feb. 1982.
- [301] Q. Zhang, H. Y. Wang, M. Marzec, P. N. Raghunath, T. Nagasawa, and M. A. Wasik, "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.*, vol. 102, no. 19, pp. 6948–53, May 2005.
- [302] R. J. Wozniak, W. T. Klimecki, S. S. Lau, Y. Feinstein, and B. W. Futscher, "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*, vol. 26, no. 1, pp. 77–90, Jan. 2007.
- [303] L. Jackson-Grusby, C. Beard, R. Possemato, M. Tudor, D. Fambrough, G. Csankovszki, J. Dausman, P. Lee, C. Wilson, E. Lander, and R. Jaenisch, "Loss of genomic methylation causes p53-dependent apoptosis and epigenetic deregulation.," *Nat. Genet.*, vol. 27, no. 1, pp. 31–9, Jan. 2001.
- [304] T. I. Lee and R. A. Young, "Transcriptional regulation and its misregulation in disease.," *Cell*, vol. 152, no. 6, pp. 1237–51, Mar. 2013.
- [305] E. Apostolou and K. Hochedlinger, "Chromatin dynamics during cellular reprogramming.," *Nature*, vol. 502, no. 7472, pp. 462–71, Oct. 2013.
- [306] R. Stein, A. Razin, and H. Cedar, "In vitro methylation of the hamster adenine phosphoribosyltransferase gene inhibits its expression in mouse L cells.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 79, no. 11, pp. 3418–22, Jun. 1982.
- [307] F. Magdinier and A. P. Wolffe, "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.*, vol. 98, no. 9, pp. 4990–5, Apr. 2001.
- [308] R. Singal, J. van Wert, and M. Bashambu, "Cytosine methylation represses glutathione S-transferase P1 (GSTP1) gene expression in human prostate cancer cells.," *Cancer Res.*, vol. 61, no. 12, pp. 4820–6, Jun. 2001.

- [309] J. Bakker, X. Lin, and W. G. Nelson, "Methyl-CpG binding domain protein 2 represses transcription from hypermethylated pi-class glutathione S-transferase gene promoters in hepatocellular carcinoma cells.," *J. Biol. Chem.*, vol. 277, no. 25, pp. 22573–80, Jun. 2002.
- [310] X. Lin and W. G. Nelson, "Methyl-CpG-binding domain protein-2 mediates transcriptional repression associated with hypermethylated GSTP1 CpG islands in MCF-7 breast cancer cells.," *Cancer Res.*, vol. 63, no. 2, pp. 498–504, Jan. 2003.
- [311] R. Z. Chen, S. Akbarian, M. Tudor, and R. Jaenisch, "Deficiency of methyl-CpG binding protein-2 in CNS neurons results in a Rett-like phenotype in mice.," *Nat. Genet.*, vol. 27, no. 3, pp. 327–31, Mar. 2001.
- [312] A. Prat, J. S. Parker, O. Karginova, C. Fan, C. Livasy, J. I. Herschkowitz, X. He, and C. M. Perou, "Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer.," *Breast Cancer Res.*, vol. 12, no. 5, p. R68, Jan. 2010.
- [313] B. Vogelstein and K. W. Kinzler, "Cancer genes and the pathways they control.," *Nat. Med.*, vol. 10, no. 8, pp. 789–99, Aug. 2004.
- [314] O. Y. Mian, S. Z. Wang, S. Z. Zhu, M. N. Gnanapragasam, L. Graham, H. D. Bear, and G. D. Ginder, "Methyl-binding domain protein 2-dependent proliferation and survival of breast cancer cells.," *Mol. Cancer Res.*, vol. 9, no. 8, pp. 1152–62, Aug. 2011.
- [315] R. Klose and A. Bird, "Genomic DNA methylation: the mark and its mediators," *Trends Biochem. Sci.*, vol. 31, no. 2, pp. 89–97, Feb. 2006.
- [316] K. Kim, G. Chadalapaka, S. S. Pathi, U.-H. Jin, J.-S. Lee, Y.-Y. Park, S.-G. Cho, S. Chintharlapalli, and S. Safe, "Induction of the transcriptional repressor ZBTB4 in prostate cancer cells by drug-induced targeting of microRNA-17-92/106b-25 clusters.," *Mol. Cancer Ther.*, vol. 11, no. 9, pp. 1852–62, Sep. 2012.
- [317] H. Ji, H. Jiang, W. Ma, D. S. Johnson, R. M. Myers, and W. H. Wong, "An integrated software system for analyzing ChIP-chip and ChIP-seq data.," *Nat. Biotechnol.*, vol. 26, no. 11, pp. 1293–300, Nov. 2008.
- [318] D. Goldschneider and P. Mehlen, "Dependence receptors: a new paradigm in cell signaling and cancer therapy.," *Oncogene*, vol. 29, no. 13, pp. 1865–82, Apr. 2010.
- [319] A. Paradisi, M. Creveaux, B. Gibert, G. Devailly, E. Redoulez, D. Neves, E. Cleyssac, I. Treilleux, C. Klein, G. Niederfellner, P. A. Cassier, A. Bernet, and P. Mehlen, "Combining chemotherapeutic agents and netrin-1 interference potentiates cancer cell death.," *EMBO Mol. Med.*, vol. 5, no. 12, pp. 1821–1834, 2013.
- [320] F. Llambi, F. Causeret, E. Bloch-Gallego, and P. Mehlen, "Netrin-1 acts as a survival factor via its receptors UNC5H and DCC.," *EMBO J.*, vol. 20, no. 11, pp. 2715–22, Jun. 2001.
- [321] F. Llambi, F. C. Lourenço, D. Gozuacik, C. Guix, L. Pays, G. Del Rio, A. Kimchi, and P. Mehlen, "The dependence receptor UNC5H2 mediates apoptosis through DAP-kinase.," *EMBO J.*, vol. 24, no. 6, pp. 1192–201, Mar. 2005.
- [322] A. Augert, D. Vindrieux, C. A. Girard, B. Le Calvé, B. Gras, M. Ferrand, B. P. Bouchet, A. Puisieux, Y. de Launoit, H. Simonnet, G. Lambeau, and D. Bernard, "PLA2R1 kills cancer cells by inducing mitochondrial stress.," *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 65, pp. 969–77, Dec. 2013.
- [323] D. Bernard and D. Vindrieux, "PLA2R1: Expression and function in cancer.," *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1846, no. 1, pp. 40–44, Mar. 2014.
- [324] D. Vindrieux, G. Devailly, A. Augert, B. Le Calvé, M. Ferrand, P. Pigny, L. Payen, G. Lambeau, M. Perrais, S. Aubert, H. Simonnet, R. Dante, and D. Bernard, "Repression of PLA2R1 by c-MYC and HIF-2alpha promotes cancer growth.," *Oncotarget*, vol. 5, no. 4, pp. 1004–1013, 2014.
- [325] P. Carninci, A. Sandelin, B. Lenhard, S. Katayama, K. Shimokawa, J. Ponjavic, C. A. M. Semple, M. S. Taylor, P. G. Engström, M. C. Frith, A. R. R. Forrest, W. B. Alkema, S. L. Tan, C. Plessy, R. Kodzius, T. Ravasi, T. Kasukawa, S. Fukuda, M. Kanamori-Katayama, Y. Kitazume, H. Kawaji, C. Kai, M. Nakamura, H. Konno, K. Nakano, S. Mottagui-Tabar, P. Arner, A. Chesi, S. Gustincich, F. Persichetti, H. Suzuki, S. M. Grimmond, C. A. Wells, V. Orlando, C. Wahlestedt, E. T. Liu, M. Harbers, J. Kawai, V. B. Bajic, D. A. Hume, and Y. Hayashizaki, "Genome-wide analysis of mammalian promoter architecture and evolution.," *Nat. Genet.*, vol. 38, no. 6, pp. 626–35, Jun. 2006.