



Université
de Toulouse

THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par l'Université Toulouse III - Paul Sabatier
Discipline ou spécialité : *Physiopathologie*

Présentée et soutenue par *Yannick DELPU*
Le 4 octobre 2013

Titre : *Méthylation de l'ADN et expression des microARNs dans la carcinogénèse
pancréatique*

JURY

Pr Claude Knauf - Président (I2MC - Université de Toulouse)
Pr Gilles Salbert - Rapporteur (Université de Rennes)
Dr Pierre-François Cartron - Rapporteur (Université de Nantes)
Dr Paola Arimondo - Examinatrice invitée (ETAC CNRS-Pierre Fabres)
Dr Jérôme Torrisani - Co-Directeur de thèse
Pr Louis Buscail - Directeur de thèse

Ecole doctorale : *Biologie Santé Biotechnologies*
Unité de recherche : *CRCT, UMR 1037 INSERM-UPS*
Directeur(s) de Thèse : *Pr Louis Buscail / Dr Jérôme Torrisani*
Rapporteurs : *Pr Gilles Salbert, Dr Pierre-François Cartron*

Résumé

Le cancer du pancréas est la quatrième cause de décès par cancer dans les pays occidentaux. Son pronostic sombre est principalement dû à un diagnostic tardif et un manque de traitements efficaces. À ce jour, l'amélioration de la détection et le développement de nouvelles thérapies constituent les principales pistes pour une meilleure prise en charge du cancer du pancréas. Le développement de ce cancer implique des changements dans les profils de méthylation de l'ADN. Ces changements conduisent à la réactivation de séquences normalement réprimées et à la répression de gènes suppresseurs de tumeurs. Dans différents cancers, il a été décrit la surexpression précoce des enzymes responsables de la méthylation de l'ADN : les méthyltransférases de l'ADN. Cependant, le rôle exact joué par ces protéines et les conséquences exactes de la méthylation de l'ADN dans la carcinogénèse restent à être prouvés.

Lors de nos travaux, nous avons d'abord cherché à déterminer l'évolution des profils de méthylation de l'ADN à travers l'étude de l'expression d'un microARN particulier: miR-148a. Ce microARN est réprimé dans plusieurs cancers, ce qui suggère un rôle suppresseur de tumeur. Nous avons confirmé la répression de miR-148a par la méthylation de l'ADN dans plusieurs lignées cellulaires dérivées de cancer du pancréas ainsi que dans des échantillons de tumeurs humaines, et nous avons montré l'utilité de cette marque pour le diagnostic différentiel entre cancer du pancréas et pancréatite chronique. De plus, la répression précoce de miR-148a suggère très fortement le rôle suppresseur de tumeur de ce microARN, au moins dans un contexte pancréatique. Nous avons alors évalué le potentiel thérapeutique de miR-148a en rétablissant son expression dans des lignées cellulaires dérivées de cancer du pancréas ainsi que dans un modèle de tumeurs préétablies chez la souris, par transfert de gènes *in vivo*. Nous n'avons observé aucun changement significatif dans le comportement des cellules/tumeurs surexprimant miR-148a. Ceci indique que sa répression est une altération mineure accompagnant la cancérogenèse plutôt qu'un phénomène crucial du développement tumoral. Comme la surexpression des méthyltransférases de l'ADN et la méthylation de l'ADN sont deux événements précoces de la carcinogénèse pancréatique, nous avons élargi notre étude pour déterminer si la seule surexpression de méthyltransférases de l'ADN est capable de transformer des cellules pancréatiques normales. Nous avons observé que la surexpression stable de ces protéines affecte considérablement le comportement des cellules en ce qui concerne la prolifération cellulaire et la clonogénicité *in vitro*, ainsi que leur profil de méthylation et d'expression génique. De manière intéressante, ces lignées cellulaires ne sont pas capables d'induire la formation de tumeurs *in vivo*. Ainsi, malgré la nécessité de valider ces résultats, ceux-ci suggèrent fortement que la méthylation de l'ADN facilite la carcinogénèse, mais n'est pas suffisante pour déclencher la formation de tumeurs.

Ces travaux contribuent à une meilleure compréhension de la carcinogénèse pancréatique, et plus précisément, du rôle joué par la méthylation de l'ADN. De plus, nos résultats récents sur les profils de méthylation de l'ADN et l'expression des gènes en réponse à la surexpression des méthyltransférases de l'ADN ouvrent de nouveaux horizons pour la recherche des cibles spécifiques de ces enzymes et le rôle potentiellement oncogène de la méthylation de l'ADN.

« Si vous pensez avoir des problèmes en mathématiques, sachez que les miens sont bien pires »

Albert Einstein (1879-1955), Prix Nobel de physique

Remerciements

Je remercie Pierre Cordelier, Jérôme Torrisani et Louis Buscail de m'avoir accueilli dans leur équipe durant ces années. Leur investissement, leur patience (grande patience ...) et leur encadrement m'ont permis de me construire et de savoir comment chercher mon chemin. Durant leur formation, ils m'ont poussé à acquérir une certaine autonomie et à me confronter au mieux au monde scientifique qui m'attend, que ce soit au niveau de la paillasse que de l'écriture. J'ai beaucoup apprécié de pouvoir solliciter à la fois Jérôme et Pierre, deux faces d'une même pièce qui dans leurs deux visions de la recherche, m'ont appris plus que ce que je ne pouvais espérer. Pour tout cela, merci.

J'ai pu durant toutes ces années côtoyer les autres membres de l'équipe, Naïma, Hubert, Marlène, Aline, Janick et Marion dont l'entrain, la bonne humeur et les encouragements ont été d'une grande aide. Merci à vous aussi.

Merci aussi à tous mes compagnons de recherche, bien que l'expression des sentiments que je vous porte n'aurait pas sa place en ce début de manuscrit. Je vous renvoie donc, aux dernières pages de ces travaux.

Je tiens enfin à remercier mes deux rapporteurs, Gilles Salbert et Pierre-François Cartron qui ont accepté d'évaluer ces travaux et dont l'analyse critique sera très précieuse pour moi. J'espère être à la hauteur de vos attentes.

Je finirai en remerciant le Pr Claude Knauf qui a accepté, en dépit d'un délai très court, de présider ce jury de thèse.

Table des matières

I.	La régulation épigénétique de l'expression génique : de la physiologie ...	9
1)	Les différents processus épigénétiques	9
2)	La méthylation de l'ADN	15
a)	Principe général	15
b)	Les méthyltransférases de l'ADN	18
c)	La méthylation de l'ADN : de la mise en place ...	19
d)	La méthylation de l'ADN : au maintien des marques de méthylation dans le génome 23	
e)	Un modèle à décompartmenter ?	25
f)	Les enzymes reconnaissant les marques de méthylation	26
g)	La méthylation de l'ADN dans les processus physiologiques	34
h)	La méthylation de l'ADN : un mécanisme de répression uniquement ?	40
3)	Les microARNs.....	42
i)	La biogénèse et le mécanisme d'action des microARNs	42
j)	Régulation de l'expression des microARNs par méthylation de l'ADN.....	47
k)	Régulation de la méthylation de l'ADN par les microARNs	48
II.	La régulation épigénétique de l'expression génique : la physiopathologie	50
1)	Bouleversement des patrons de méthylation dans le cancer.....	54
2)	Altération de l'expression des DNMTs dans le cancer	56
3)	La méthylation de l'ADN, une marque associée au cancer	57
a)	Les gènes hyperméthylés dans le cancer.....	58
b)	Les gènes hypométhylés dans le cancer.....	59
c)	La méthylation de l'ADN pour le diagnostic du cancer	60
4)	Les microARNs, acteurs de la carcinogénèse.....	62
III.	La carcinogénèse pancréatique	64
1)	Les lésions préneoplasiques du pancréas	64
2)	Altérations épigénétiques des lésions préneoplasiques du pancréas.....	69
3)	Altérations de l'expression des microARNs dans le cancer du pancréas	71
IV.	Résultats expérimentaux	74
	Article 1 - « La répression de l'expression de miR-148a par hyperméthylation de l'ADN est un évènement précoce de la carcinogénèse pancréatique ».....	74

Article 2 - « Absence d'effet thérapeutique suite à la restauration de l'expression de miR-148a dans le cancer du pancréas »	91
Article 3 - « Rôle de la méthylation de l'ADN dans les processus de carcinogénèse pancréatique »	109
V. Conclusion et perspectives.....	127
VI. Annexes.....	132
Annexe 1 - <i>Revue 1</i>	132
Annexe 2 - <i>Revue 2</i>	143
Annexe 3 - <i>Article 4</i>	178
VII. Références bibliographiques.....	212
VIII. Remerciements personnels et prix spécial du public.....	240

Avant-propos

Le développement de l'organisme humain, depuis l'embryogénèse jusqu'à l'âge adulte, ainsi que la régulation des fonctions physiologiques nécessitent une véritable orchestration de l'expression génique. Depuis les travaux fondateurs de Mendel jusqu'à nos jours, il est devenu de plus en plus clair que le simple héritage du matériel génétique parental ne pouvait pas répondre à toutes les questions que posent l'embryogénèse, la différenciation cellulaire ainsi que la carcinogénèse.

En effet comment des cellules qui ont toutes le même génome peuvent avoir des patrons d'expression génique différents ? Comment ces patrons peuvent-ils être héréditaires sur plusieurs dizaines ou centaines de divisions cellulaires puis se mettre en silence ?

Le développement de l'embryon met donc en jeu des régulations qui vont au-delà de la génétique, conditionnées par l'environnement des cellules (contacts, gradients chimiques dans le milieu extra-cellulaire etc...).

Historiquement, au XIX^{ème} siècle, les pionniers de la biologie du développement utilisaient des techniques d'étude qui mettaient de côté tous les phénomènes d'expression génique et d'hérédité génétique mis en évidence par Mendel [1]. La nécessité d'associer développement et génétique en une « nouvelle discipline » poussa Conrad Waddington à fonder un nouveau concept, un « renouveau de la biologie développementale » et à le nommer *épigénétique* [1].

Le terme épigénétique vient de l'épigénèse (du préfixe *epi-*, « sur », et du suffixe *-genesis*, « création ») qui est la théorie selon laquelle l'embryon se développe par multiplication et différenciation cellulaire progressive, et non à partir d'éléments préformés dans l'œuf (théorie de l'homonculus). L'épigénétique au sens premier du terme s'intéresse donc à tous les événements cellulaires résultant en la complexification graduelle des tissus, par étapes successives, pour aboutir à un organisme entier. Au fil des décennies, parce que les mécanismes qu'il comprend sont retrouvés dans d'autres contextes que le développement, comme le vieillissement et la carcinogénèse, le concept d'épigénétique fut élargi. Dans les années '90, de nouvelles définitions du terme épigénétique furent proposées pour aboutir à la définition qui va nous intéresser dans ces travaux et dont la synthèse donne « l'étude des patrons d'expression génique, héréditaires à travers les divisions cellulaires, et qui n'impliquent pas de changements de la séquence d'ADN ».

Nous allons dans ce chapitre d'introduction replacer les acteurs intervenant dans ces phénomènes de régulation, par soucis de compréhension, afin de mieux appréhender les mécanismes abordés au cours de cette thèse.

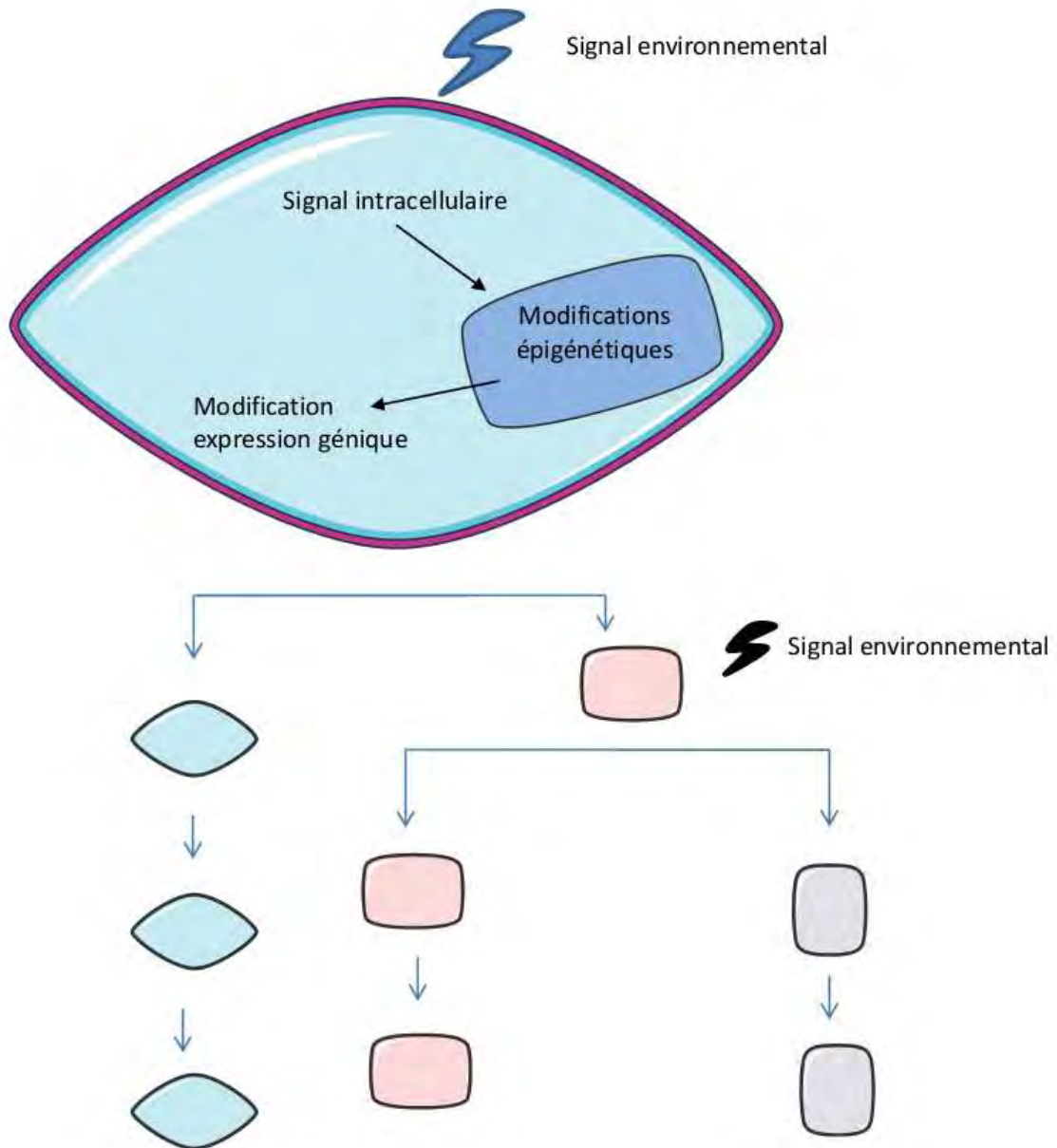


Figure 1 : Les mécanismes épigénétiques : de l'environnement à la différenciation cellulaire. Cette illustration schématise la détermination de plusieurs lignages cellulaires en réponse à un signal environnemental par une modification du profil épigénétique.

I. La régulation épigénétique de l'expression génique : de la physiologie ...

1) Les différents processus épigénétiques

Epigénétique : « *Etude des patrons d'expression génique, héritables à travers les divisions cellulaires, et qui n'impliquent pas de changements de la séquence d'ADN* ».

Les mécanismes de régulation épigénétique de l'expression génique sont variés, mais après plus d'un siècle d'étude, il est intéressant de constater qu'il suffit de comparer différents articles pour remarquer que toutes les équipes ne vont pas considérer les mêmes mécanismes comme répondant à cette définition. Les deux mécanismes les plus illustrés dans la bibliographie sont sans nul doute les modifications covalentes des histones et la méthylation de l'ADN. De plus, il est intéressant de constater que certains mécanismes pourtant très décrits tels que la modification des histones ne répondent pas parfaitement à la définition actuelle d'épigénétique, leur héritabilité n'étant pas clairement établie. Il y a donc une certaine permissivité dans cette définition.

Le but de cette partie est d'illustrer trois points :

- la régulation épigénétique de l'expression génique n'est pas un phénomène uniquement nucléaire.
- des mécanismes décrits depuis des décennies sont des mécanismes épigénétiques.
- comme souvent en biologie, ces mécanismes peuvent communiquer entre eux.

i. Modification des histones

L'ADN, compartimenté dans le noyau, ne flotte pas librement dans le nucléoplasme, celui-ci est associé à des complexes protéiques pour former la chromatine. On distingue deux types, ou états, de la chromatine dans le noyau : l'euchromatine et l'hétérochromatine. Alors que l'hétérochromatine est transcriptionnellement inactive et compactée, elle correspond en général aux télomères, aux régions péri-centromériques et aux régions enrichies en séquences répétées qui ne s'expriment pas. L'euchromatine, elle, correspond à la fraction transcriptionnellement active et décompactée du génome, riche en gènes codant notamment pour des protéines.

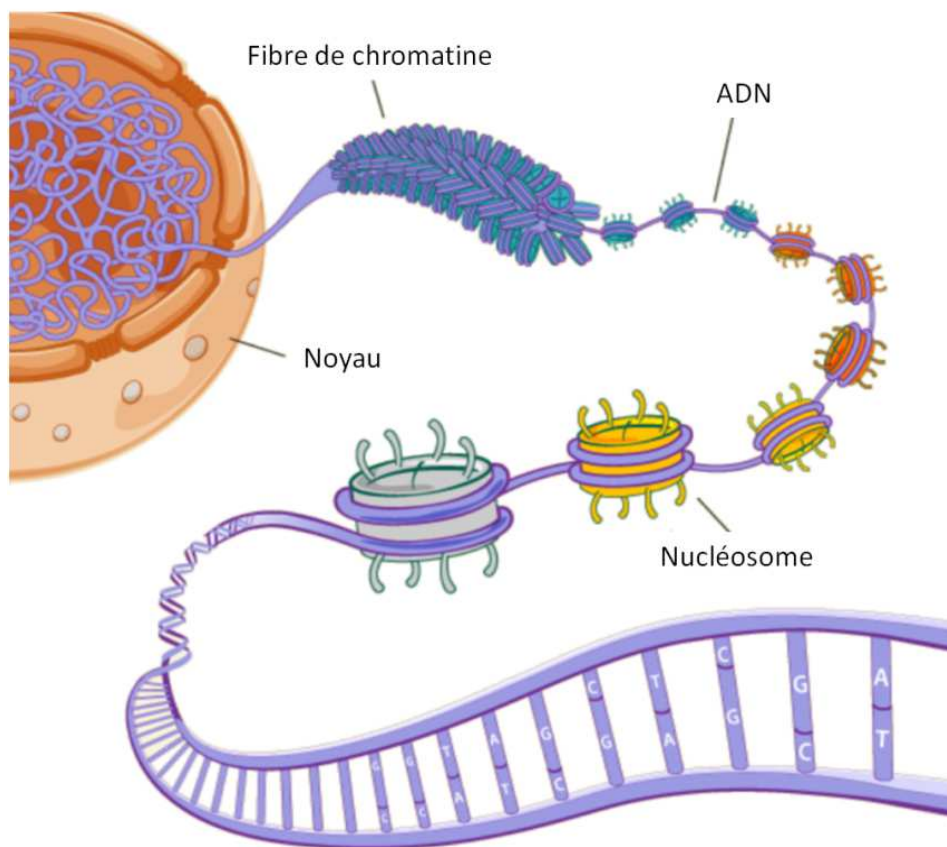


Figure 2 : Organisation générale de la chromatine nucléaire (Adapté de Ernst et Kellis [2]).

L'unité de base de la chromatine est le nucléosome, qui correspond à 147 paires de bases d'ADN enroulées autour d'un octamère d'histones [3,4]. Les histones H2A, H2B, H3 et H4 sont les protéines composant cet octamère et sont associées par paires. Les histones possèdent un domaine C-terminal globulaire et un domaine N-terminal non structuré (appelé queue d'histone). La stabilité de l'octamère est due aux interactions protéine-protéine au sein même du complexe, alors que la queue N-terminale des histones à l'extérieur du nucléosome va elle influencer sur les interactions entre deux nucléosomes voisins, ainsi que sur la reconnaissance par les facteurs protéiques. Ces queues d'histones sont sujettes à des phénomènes de méthylation, d'acétylation, d'ubiquitination, de sumoylation ou de phosphorylation selon les acides aminés qui servent de substrats. Définir une relation binaire entre une modification post-traductionnelle et un état activé/réprimé de la transcription n'est pas aisé. En effet, une queue d'histone porte fréquemment un ensemble de marques sur différents acides aminés, et c'est la combinaison de ces marques portées par un nucléosome et les nucléosomes environnants qui définira l'état d'accessibilité et la liaison de facteurs de transcription à une région de chromatine. Le terme de « **code histone** » est d'ailleurs couramment utilisé pour illustrer la complexité des combinaisons des marques de modification des histones [5]. Néanmoins il ressort

que l'acétylation des lysines est généralement corrélée avec une chromatine « ouverte » et transcriptionnellement active alors que la méthylation des lysines va montrer un effet inverse, en fonction de la position et du nombre de résidus méthylés. Deux principales fonctions sont avancées pour la modification covalente des histones :

- modifier l'équilibre électrostatique entre les histones et ainsi moduler l'état de condensation de la chromatine, permettant l'accès à des facteurs protéiques.
- être la cible de facteurs nucléaires reconnaissant spécifiquement ces modifications.

Un exemple des enzymes responsables de la modification des histones et des facteurs reconnaissant ces modifications sont reportés dans les tableaux ci-dessous (adaptés de Kim *et al.* [3]):

Enzymes de modification des histones	
Acétyltransférases	Deacétylases
HAT1	HDAC 1 à 11
GCN5, PCAF	Sirtuins
CBP, P300	Lysine déméthylases
TIP60/PLIP	LSD1/BHC110
HBO1	JHDM1a-b
Lysine méthyltransférases	JHDM2a-b
SUV39H1-C2	JMJD2A/JHDM3A, JMJD2BC
G9a	JMJD2D
EuHMTase/GLP	JARID1A-D
ESET/SETDB1	UTX
CLL8	JMJD3
MLL1-C5	Serine/thréonine kinases
SET1A-B	Haspin
ASH1	MSK1-C2
SET2	CKII
NSD1	Mst1
SYMD2	Rsk2
DOT1	Ubiquine ligases
Pr-SET7/8	Bmi/Ring1a
SUV4 20H1-C2	RNF20/RNF40
EZH2	Arginine méthyltransférases
SET7/9	CARM1
RIZ1	PRMT4
	PRMT5

Tableau 1 : Protéines de modification des histones classées selon leur activité enzymatique.

Modification	Domaine d'interaction	Protéines effectrices
Méthylation	Chromodomaine	HP1, PC, CHD1
	Tudor	JMJD2A
	MBT	L3MBTL1
	PHD	BPTF, ING2
	SRA	UHRF1
Acétylation	Bromodomaine	Rsc4, bdf1, taf1
Phosphorylation	14-3-3	14-3-3 protein

Tableau 2 : Protéines effectrices reconnaissant les modifications des histones.

Sur ce dernier point, la théorie du code histone prend tout son sens. En effet, comment un ensemble de modifications va-t-il influencer sur l'état transcriptionnel d'un gène et pas seulement une modification unique ?

Ce point est débattu dans la revue de Rando *et al.* [6]. Nous pouvons d'abord observer le cas où la modification d'un résidu va inhiber la fixation d'un facteur sur un résidu adjacent. Ce cas est illustré par la liaison de HP1 (*Heterochromatin protein 1*) sur un résidu histone tri-méthylé sur la lysine 9 (H3K9me3), pouvant être inhibée par la phosphorylation de la serine 10 de l'histone à proximité (H3S10). Par ailleurs, ces protéines reconnaissant les modifications d'histones pourront s'associer en complexes pour cibler d'autres motifs. Enfin, le dernier cas est illustré par la protéine CHD1 qui porte deux chromodomaines en tandem, se liant avec une plus forte affinité à des résidus H3R2me2K4me3 qu'à H3K4me3 seuls. Il ressort donc que la modification covalente des histones va influencer de différentes manières sur l'état transcriptionnel d'un gène. Mais il est intéressant de noter que, malgré le fait que ce mécanisme soit un des mécanismes épigénétiques les plus décrits et commentés, il n'est pas encore pleinement compris comment ces modifications sont héritées à travers les divisions cellulaires. De plus en plus d'observations semblent indiquer que d'autres mécanismes (tels que la méthylation de l'ADN et le système polycomb/trithorax) entrent en jeu pour assurer l'héritabilité de ces marques au fil des divisions cellulaires.

ii. Le système Polycomb/Trithorax

Le système Polycomb/Trithorax est un mécanisme conservé à travers les espèces permettant la répression de séquences génomiques par l'interaction de protéines (de

la famille Polycomb) avec des séquences de reconnaissance dispersées dans le génome (*Polycomb response elements*, PRE) [7]. Les PRE sont des séquences d'environ 100 à 300 pb dont l'accumulation est nécessaire à la mise en place de cette répression. Le système antagoniste est assuré par les protéines de la famille Trithorax, ciblant les *Trithorax response elements* (TRE) et conduit à une activation de la transcription. Il est important de noter la conservation partielle des séquences PRE et TRE entre elles. L'action des protéines Polycomb peut se faire par différents moyens : une modification de l'état de la chromatine par modification covalente des histones, une inhibition directe par inhibition de la machinerie de transcription et une occupation des sites de reconnaissance des facteurs de transcription et enfin un recrutement de longues régions d'ADN à des domaines nucléaires enrichis en protéines Polycomb et autres inhibiteurs transcriptionnels. Il est proposé que ce soit l'état transcriptionnel du gène qui conditionne s'il sera la cible des protéines Polycomb ou Trithorax. Si le gène n'est pas transcrit, des protéines Polycomb iront cibler la séquence régulatrice PRE. Si le gène est transcrit, la séquence TRE (similaire en partie à la PRE) sera occupée par les protéines Trithorax et bloquera le ciblage par les Polycombs. Deux modèles sont proposés permettant l'héritabilité de cette marque à travers les divisions cellulaires : un copie directe du patron de Polycomb/Trithorax sur le brin néo synthétisé, ou bien l'intervention d'une marque (protéines autres que Polycomb/Trithorax, ou modification covalente des histones) qui servira de balise pour le recrutement de Polycomb/Trithorax après la division cellulaire.

A ces phénomènes vont s'ajouter d'autres mécanismes épigénétiques qui paraissent comme plus minoritaires en termes d'impact dans la littérature. D'autres acides nucléiques vont jouer un rôle fondamental dans la régulation de l'expression génique : les ARNs. Ce rôle sera rempli soit par la modification de l'ARN messager (ARNm) lui-même, soit par l'activité intrinsèque d'ARN non codants (ARNnc) longtemps considérés comme des « déchets » génomiques. Cette catégorie d'ARN comprend un grand nombre de molécules, de tailles très variables et de fonctions diverses. Elles pourront par exemple, selon les cas, conduire à la destruction d'un ARNm et réprimer son expression de manière post-transcriptionnelle, ou alors se combiner à d'autres mécanismes moléculaires pour conduire à la répression d'une région du génome.

iii. L'inactivation du X par un ARN non codant

Les mammifères sont des organismes diploïdes, portant deux copies de chaque chromosome. Dans le cas des autosomes (chromosomes non sexuels) les gènes seront présents en deux copies chez tous les individus. Dans le cas du chromosome

Y, les gènes portés par celui-ci seront présents en un seul exemplaire chez tous les individus mâles. Le cas du chromosome X est plus complexe: les mâles n'en possèdent qu'une copie alors que les femelles en possèdent le double. Pour certains des gènes présents, l'expression du double de copies du gène peut être problématique et il sera nécessaire de réprimer un des allèles. Chez la femme, Xist est un ARN non-codant de 17kb qui s'hybride directement sur le chromosome X surnuméraire [8]. La partie 5' de cet ARNnc est reconnue par des facteurs de répression transcriptionnelle. Une fois la mise en silence initiée par l'ancrage de l'ARN XIST, d'autres mécanismes se mettent en place pour « verrouiller » l'expression des gènes portés par ce chromosome et réprimer son expression à travers les divisions cellulaires.

iv. L'editing et l'épissage alternatif

Fidèlement à la vision initiale de Waddington, la régulation spatio-temporelle de l'expression génique par des mécanismes épigénétiques ne prend pas forcément place dans le noyau : l'épissage alternatif des ARN messagers peut être considéré par certains comme un événement épigénétique du fait qu'une région d'ADN donne un transcrit et que ce transcrit suivant divers facteurs environnementaux peut donner différentes protéines, proches en terme de séquence d'acides aminés, mais avec des fonctions bien distinctes. *L'editing* suit cette même définition et conduit à l'altération de la séquence d'un ARN (messenger ou non codant) par modification de ses nucléotides, sans modification de la séquence ADN correspondante. Cette modification chez les eucaryotes fait appel au système de protéines ADAR (*adenosine deaminase acting on RNA*) [9]. Néanmoins, la principale limite à cette définition est l'absence d'héritabilité de ces modifications.

Deux autres phénomènes vont maintenant nous intéresser plus particulièrement : la méthylation de l'ADN et la régulation traductionnelle par interférence des microARNs.

2) La méthylation de l'ADN

La modification chimique des nucléotides fut observée dès 1925 par Johnson & Coghill (référence indisponible), mais c'est en 1951 que Wyatt démontra par chromatographie que cette modification était une caractéristique commune à la plupart des animaux et que certaines modifications des nucléotides étaient présentes en quantité constante dans le génome [10]. Néanmoins, il fallu attendre la fin des années 1960, où trois publications de groupes indépendants proposèrent un rôle fonctionnel à une modification bien particulière : la méthylation des cytosines de l'ADN. Griffith, Holliday et Riggs proposent alors que la modification covalente des cytosines de l'ADN dans un contexte bien particulier est retrouvée sous forme de patrons, différents selon les types cellulaires et interfère avec la liaison de facteurs de transcription [11][12][13]. Nous allons dans ce premier chapitre d'introduction constater que ces observations et leurs implications ne sont pas encore pleinement comprises et qu'elles ont encore beaucoup à livrer.

a) Principe général

Tout comme la modification des histones, la méthylation de l'ADN ne modifie en rien la séquence d'acides nucléiques d'un gène. Cette réaction est catalysée par une famille d'enzyme : les *méthyltransférases de l'ADN* (ou DNMTs) [14]. Chez les mammifères, cette réaction se fait majoritairement dans un environnement génomique particulier : lorsque la cytosine est directement suivie d'une guanosine formant alors un « dinucléotide CpG » (p pour phosphate). Il est important de noter que ce contexte n'est pas strictement exclusif : les cellules embryonnaires murines (cellules ES) présentent une méthylation des cytosines au niveau de dinucléotides CpA, CpT (mais en bien plus faible proportion) [15].

Chez l'Homme, 70% à 80% des dinucléotides CpG du génome sont méthylés [16]. Un îlot CpG correspond à une région de plus de 500 pb dont le pourcentage de C+G est supérieur à 55% et que le ratio CG observé / CG attendu est supérieur à 0.65 [17][18]. Wang *et al.* rapportent en 2004 que près de 60% des gènes ont un îlot CpG recouvrant leur site d'initiation de la transcription [19]. Néanmoins le nombre de gènes réprimés par hyperméthylation de leur promoteur reste très modeste dans les cellules somatiques (inférieur à 10%) [20][21]. Ainsi, comment se fait-il que 80% des cytosines soient méthylées dans le génome si moins de 10% des promoteurs sont hyperméthylés ?

Cette observation s'explique par deux mécanismes :

Le premier est d'ordre statistique et fait appel à la répartition hétérogène des CpG dans le génome : les dinucléotides méthylés sont souvent retrouvés dans les régions peu dense en CpG (ne répondant donc pas à la définition des îlots CpG) à savoir principalement les séquences répétées du génome : les SINEs et les LINEs (*Short/Long Interspaced Nuclear Elements*), les rétro-transposons et les régions satellitaires péri-centromériques, représentant près de 40% du génome à eux seuls (Figure 3) [16][22][23][24][25].

Le second est le fait que dans une région codante, le phénomène de méthylation des cytosines ne se cantonne pas aux îlots CpG situés aux promoteurs. Des dinucléotides CpG sont dispersés tout au long et autour de la séquence codante, dans le corps du gène et dans les séquences régulatrices environnantes (*enhancers*, *insulators*) [26].

Cette méthylation de l'ADN est un phénomène physiologique et donc régulé. Nous allons maintenant définir les acteurs de sa mise en place et de son maintien à travers les divisions cellulaires. J'étendrai brièvement la discussion sur certains travaux récents, qui bien que s'éloignant du contexte du cancer, font un lien remarquable entre l'environnement et l'établissement des marques de méthylation pendant (et après) le développement d'un individu. Ce dernier point me semble crucial, afin de prendre conscience que l'épigénétique peut expliquer comment, à l'échelle d'une vie, le comportement d'une cellule ou d'un organe peut être modifié durablement par des facteurs sociaux (stress, violence, activité sportive etc...).

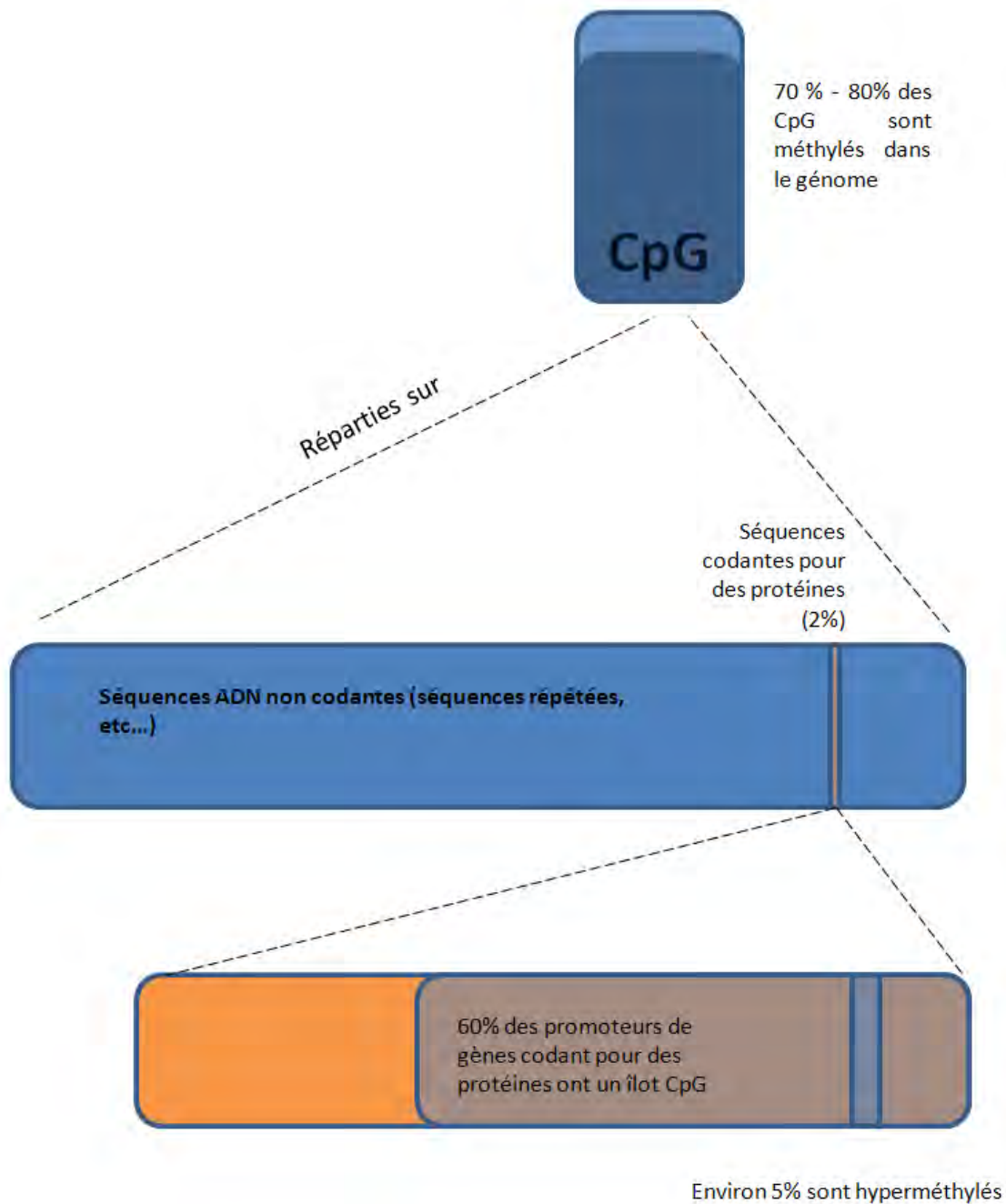


Figure 3 : Répartition des cytosines méthylées dans le génome.

Nous pouvons ici constater que le réservoir principal de cytosines méthylées correspond aux régions génomiques répétées, les séquences codantes pour des protéines étant très largement minoritaires. Voici donc (entre autre) pourquoi seulement 5% des promoteurs de gènes codants pour des protéines sont méthylés.

b) Les méthyltransférases de l'ADN

L'établissement et la maintenance des patrons de méthylation dans le génome n'est pas un phénomène spontané, mais résulte de l'action d'une famille d'enzymes : les méthyltransférases de l'ADN (DNMTs).

Ces dernières peuvent être classées en deux catégories selon leur substrat et leur mode d'action: les méthyltransférases *de novo* (comprenant les DNMT3a et 3b) et *de maintenance* (dont DNMT1 est l'unique représentante). La méthylation *de novo* correspond à l'établissement d'un patron de méthylation inédit, sur une région d'ADN vierge de toute marque de méthylation; à l'inverse de la méthylation *de maintenance* qui correspond à la copie d'un patron préexistant porté par un ADN hémiméthylé qui servira de modèle à DNMT1. Cette opération, prenant place lors de la réplication de l'ADN, a pour but le maintien de ces marques au fil des divisions cellulaires et garantie leur héritabilité.

La réaction biochimique de méthylation des cytosines est commune aux deux classes de DNMTs et correspond au transfert de manière covalente d'un groupement méthyle depuis la S-adénosyl-L-méthionine (SAM) vers le carbone 5 d'une cytosine [27] (Figure 4).

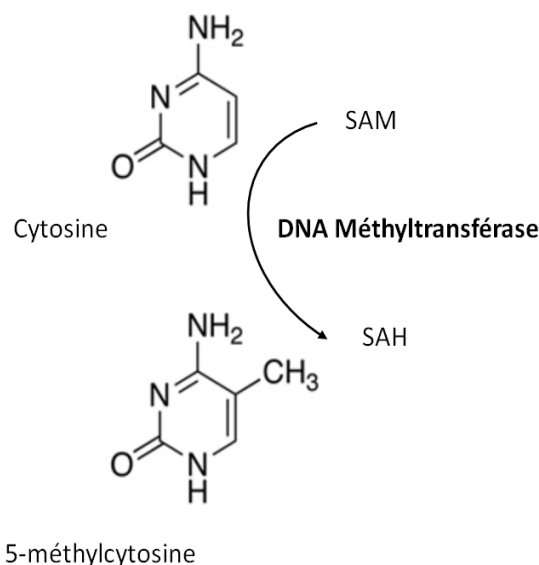


Figure 4 : Réaction de méthylation d'une cytosine par les méthyltransférases de l'ADN.

SAM :S-adénosyl-L-méthionine ; SAH : S-adénosyl-homocysteine .

Les DNMTs, bien que présentant des domaines protéiques très distincts, sont relativement conservées à travers les espèces et leurs structures présentent une certaine similarité dans leurs domaines protéiques [28][29] (Figure 5): Le domaine C-

terminal est le plus conservé entre les différentes DNMTs et porte l'activité méthyltransférase. Différents motifs (les motifs I, IV, VI, IX et X) sont retrouvés dans toutes les séquences des DNMTs. Brièvement, le centre catalytique est porté par le motif IV et le domaine de liaison à la S-adenosyl-L-méthionine est porté par les motifs I et X. Le ciblage de l'ADN quant à lui se fait par le domaine situé entre les motifs VIII et IX [30].

Le domaine N-terminal présente une plus grande variabilité entre les différentes enzymes et contient les régions de régulation propre à chacune des DNMTs. Ces régions portent les sites d'interaction avec d'autres facteurs protéiques. Chen et li décrivent que c'est principalement cette variabilité dans le domaine N-terminal qui entraîne la formation de différents complexes protéiques et qu'elle est responsable des différences fonctionnelles entre les différentes DNMTs [30].

c) La méthylation de l'ADN : de la mise en place ...

Les DNMT3 sont les enzymes responsables de l'établissement du patron de méthylation. Leur rôle dans la méthylation *de novo* a été établi sur les observations suivantes : i : elles sont fortement exprimées durant les premiers stades du développement (où sont établies la majorité des marques de méthylation) puis montrent une baisse de leur expression ; ii : elles n'ont pas de préférence pour l'ADN hémiméthylé ; iii : leur expression ectopique dans des cellules conduit à leur méthylation *de novo* ; iv : leur inactivation bloque l'établissement de la méthylation *in vitro* et *in vivo* [30]. Le gène *dnmt3a* (DNA (cytosine-5-)-methyltransferase 3 alpha) situé au locus 2p23, code DNMT3a et DNMT3a2 deux isoformes de 912 et 689 acides aminés (aa) respectivement. Ces deux enzymes sont toutes les deux actives mais leur différence réside dans leur localisation cellulaire. DNMT3a montre un marquage focal au niveau de l'hétérochromatine, alors que DNMT3a2 est diffus dans le nucléoplasme, excluant les nucléoles et l'hétérochromatine (Figure 6) [31][32]. Le gène *dnmt3b* (DNA (cytosine-5-)-methyltransferase 3 beta) situé au locus 20q11.2 code lui pour cinq isoformes chez l'Homme (DNMT3b1-DNMT3b5) dont la plus longue comporte 853 aa. Contrairement aux isoformes de DNMT3a, seules les formes 1 et 2 des DNMT3b montrent une activité catalytique, les autres présentant une perte partielle des domaines IX et X de leur partie C-terminale [33][34][35][36]. Il est proposé que ces isoformes inactifs jouent un rôle de dominant négatif pour la régulation de l'activité de DNMT3b [34][37]. Récemment, les travaux de Van Emburg ont démontré un rôle pour les variants des DNMT3b inactifs. Ces derniers modifient la capacité des variants actifs de DNMT3b à se lier à l'ADN, à s'homodimériser et à interagir avec DNMT3L (voir ci-après) [38]. Ainsi, l'expression de ces variants

d'épissage fonctionnerait comme un rhéostat, modulant l'activité des formes actives de DNMT3b. Les isoformes DNMT3a2 et DNMT3b1 s'expriment fortement durant l'embryogénèse puis subissent une répression jusqu'à devenir indétectable dans les tissus somatiques [32]. Les autres isoformes montrent une expression modeste tissu-spécifique, à l'exception de DNMT3a qui reste faiblement détectable de manière ubiquitaire [32]. L'expression des DNMT3a et DNMT3b n'est pas conservée dans tous les tissus somatiques après les premières étapes du développement et Chen propose en 2003 que DNMT1 et DNMT3a, en accord avec leurs patrons d'expression, sont responsables du maintien de la méthylation dans les tissus adultes [34].

La partie N-terminale des DNMT3a et DNMT3b est plus courte que celle de DNMT1 (Figure 5). Ces deux enzymes ont été montrées comme interagissant avec HDAC1 (à l'instar de DNMT1) et RP58 qui est un répresseur transcriptionnel de la famille des protéines à doigt de zinc [31][39]. Ceci suggère fortement que ces deux enzymes sont capables de réprimer la transcription indépendamment de leur activité catalytique. De plus, la modification post-traductionnelle de DNMT3a et -3b intervient par l'action de SUMO-1 qui va entraîner leur sumoylation. Même si l'effet de cette modification est inconnu pour DNMT3b, Ling *et al.* décrivent que celle-ci empêche l'interaction HDAC1 / DNMT3a et bloque sa fonction d'inhibition de la transcription [40].

En 2009, les travaux de Jeong ont démontré que les DNMT3a et -3b sont fortement associées aux nucléosomes contenant de l'ADN méthylé [41]. La même équipe montrera plus tard que cette association permet de limiter la présence de DNMT3a et -3b libre dans le nucléoplasme et de stabiliser la protéine [42]. De plus, le rapprochement des deux enzymes au niveau des nucléosomes entraîne une augmentation de leur activité catalytique respective [42].

Un troisième membre de la famille des DNMT3 a été identifié à la suite du séquençage du génome humain au début des années 2000 [43]. Le gène situé au locus 21q22.3 code pour une protéine qui, bien que partageant une certaine homologie avec DNMT3a et DNMT3b (surtout au niveau de leur partie C-terminale), diffère néanmoins par l'absence d'une partie des motifs IV et VI, entraînant l'absence totale de toute activité catalytique [44]. Ainsi, cette DNMT fut nommée DNMT3L (*DNA (cytosine-5-)-methyltransferase 3 like*) et ne correspond donc pas à une enzyme. Hata *et al.* démontrent dans leurs travaux de 2002 que la perte de DNMT3L dans une lignée murine entraîne une perte de l'empreinte génomique maternelle, prouvant que cette protéine joue un rôle crucial dans la méthylation *de novo* [44]. Dans ces mêmes travaux, les auteurs illustrent qu'en l'absence des DNMT3a et -3b,

DNMT3L montre une localisation cytoplasmique, alors qu'une co-transfection des trois enzymes entraîne leur co-localisation au niveau de l'hétérochromatine. Ceci suggère fortement une interaction entre ces trois protéines. En effet, au-delà de la simple colocalisation, la surexpression de DNMT3L stimule la méthylation *de novo* par l'action des DNMT3a et DNMT3b [45]. Par des approches de double hybride et de co-immunoprécipitation, Chen *et al.* démontrent en 2005 que DNMT3L stimule la méthylation *de novo*, que cette stimulation nécessite forcément une forme catalytiquement active de DNMT3a ou DNMT3b et enfin que cette stimulation se fait *via* une interaction directe entre les domaines C-terminaux des deux protéines [45]. Bien que les modalités de cette interaction restent majoritairement obscures, Cheng et Blumenthal apportent dans le cas du complexe DNMT3a-DNMT3L, une analyse structurale qui apporte quelques éclaircissements. L'interaction des DNMTs 3a et 3L conduit à la formation d'un tétramère 3L-3a-3a-3L. La conformation de ce tétramère stabilise la boucle formée au niveau du domaine catalytique de DNMT3a et augmente la liaison à la S-adénosyl-L-méthionine [46].

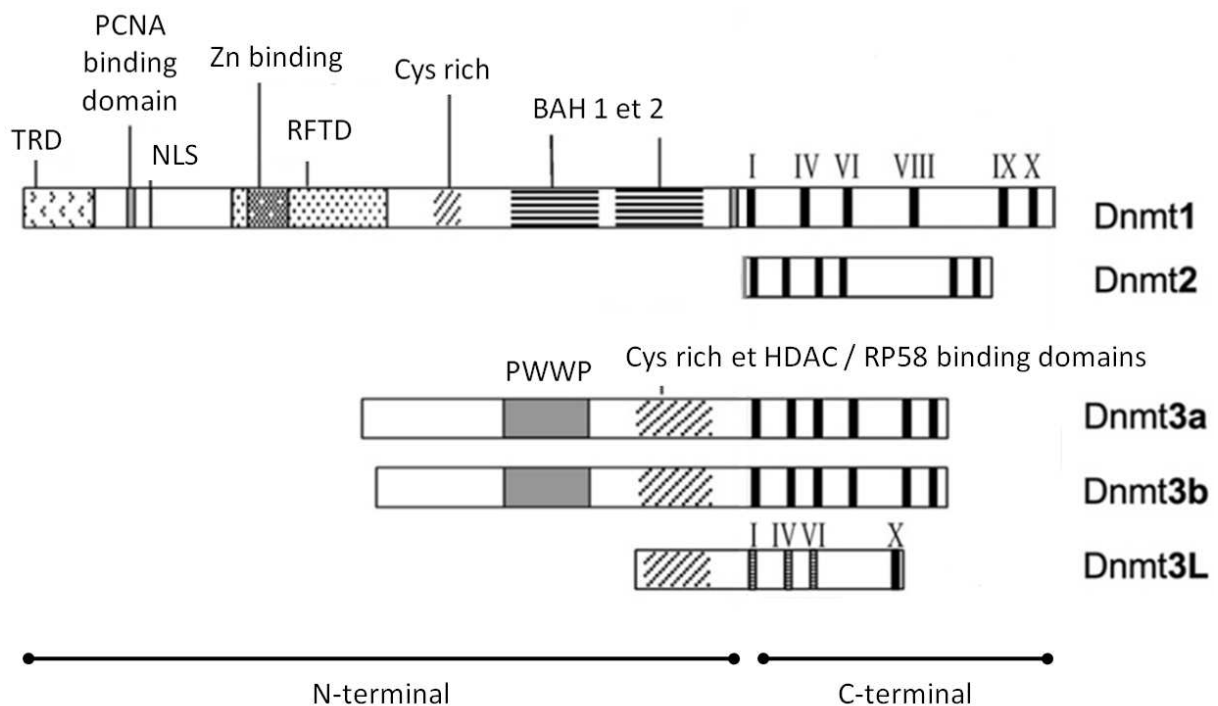


Figure 5 : Conservation des domaines protéiques des différentes DNMTs.

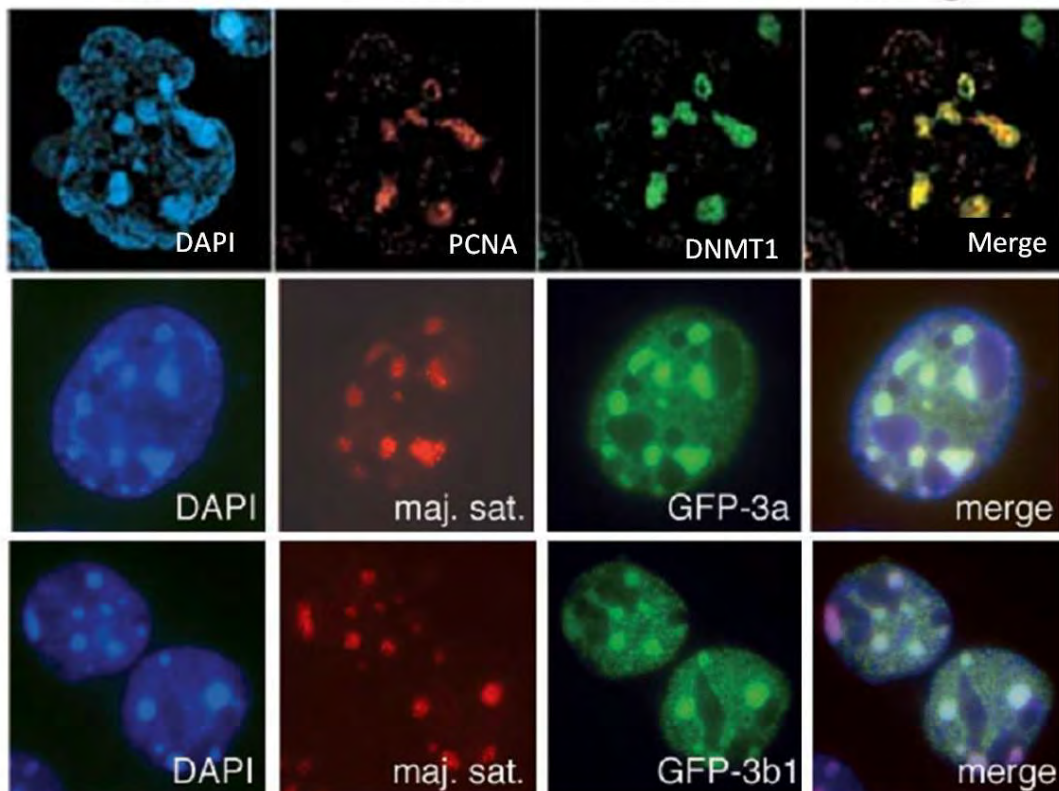


Figure 6 : Localisation nucléaire des différentes DNMTs.

DAPI : marqueur de l'ADN ; PCNA : marqueur des fourches de réplication de l'ADN ; maj. sat. : major satellite repeats. Merge : superposition des différents signaux de fluorescence [47,48].

De plus, les travaux d'Ooi *et al.* permettent de faire le lien entre méthylation *de novo* et l'activité transcriptionnelle d'un gène. Les gènes transcriptionnellement actifs ne possèdent pas de nucléosomes au niveau de leur promoteur ce qui permet la reconnaissance et l'ancrage de la machinerie de transcription. Or, Ooi démontre que le complexe DNMT3a :DNMT3l est recruté au niveau des nucléosomes et plus spécifiquement, que DNMT3l peut reconnaître des marques d'hétérochromatine portées par les queues des histones H3 [49]. Ce ciblage permet le recrutement de DNMT3a et la méthylation *de novo* de la séquence transcriptionnellement inactive. Ceci éclaire le fait que la méthylation *de novo* n'est probablement pas le premier mécanisme de répression à se mettre en place, mais qu'il est vraisemblablement précédé de modifications de la chromatine. De plus, ceci explique en partie comment la transcription d'un gène la protège de la répression par méthylation de son promoteur.

d) La méthylation de l'ADN : au maintien des marques de méthylation dans le génome

DNMT1 (DNA (cytosine-5-)-methyltransferase 1) est historiquement la première DNMT à avoir été clonée à partir de cellules murines et constitue la seule représentante de la classe des DNMTs *de maintenance, stricto sensu* [50]. Son rôle de méthyltransférase *de maintenance* repose sur plusieurs caractéristiques qui la distinguent des autres DNMTs:

- sa délétion dans des cellules souches murines entraîne la perte de la *quasi* intégralité des marques de méthylation au fil des divisions cellulaires [51].
- elle possède une affinité supérieure pour l'ADN hémi-méthylé [52].
- elle est la seule méthyltransférase présente au niveau de la fourche de réplication, dû à son interaction avec le *Proliferating Cell Nuclear Antigen* (PCNA) [29].

DNMT1 est la plus grande des DNMTs (1616 aa pour la forme humaine), grâce notamment à son long domaine N-terminal (le plus long parmi toutes les DNMTs, Figure 5). Ce domaine contient de multiples séquences d'interaction avec l'ADN ou avec des protéines [29].

Brièvement, le TRD (*Target Recognition Domain*) est le domaine de reconnaissance et de liaison à l'ADN, situé à proximité du domaine d'interaction avec PCNA. Suit le domaine de liaison aux protéines à doigt de zinc (*Zn binding*) qui est le site de reconnaissance pour les protéines Rb, HDAC1 et HDAC2 (*histones déacétylases*), présentant une activité de répresseurs transcriptionnels. Le domaine *Replication Foci targeting domain* (RFTD) contient la séquence nécessaire au recrutement de DNMT1 au niveau de la fourche de réplication. La fin du domaine N-terminal contient deux domaines *Bromo-Adjacent Homology* (BAH) qui sont retrouvés chez des protéines régulant l'état de la chromatine et serviraient à l'interaction avec d'autres complexes protéiques impliqués dans cette fonction. Nous pouvons donc ici constater que DNMT1 interagit avec des répresseurs transcriptionnels, des protéines chargées de la modification des histones et que son action va au-delà de son activité méthyltransférase.

Située au locus 19p13.2, la transcription du gène *dnmt1* est activée par le facteur de transcription E2F et réprimée par la protéine Rb [53]. *Dnmt1* est aussi régulée transcriptionnellement par P53. P53 inhibe l'expression de DNMT1 et cette inhibition est levée par la protéine Sp1 (*Specificity protein 1*) de fait que le ratio P53/Sp1 va être déterminant pour le niveau d'expression de cette protéine [54][55]. Ces

mécanismes de régulation jouent un rôle crucial dans les processus de carcinogénèse. Enfin, l'expression de DNMT1 peut être régulée de manière post-transcriptionnelle : Torrisani *et al.* ont montré en 2007 que la partie 3'-UTR (partie terminale de l'ARN messager, non traduite en séquence d'acides aminés) est la cible de AUF1 (*AU-rich element RNA binding protein*) accélérant la dégradation du transcrit par son envoi aux exosomes [56].

Différents variants de transcription de DNMT1 sont exprimés en fonction du contexte cellulaire: un variant "pleine taille" est exprimé dans les cellules somatiques, alors qu'un variant spécifique de l'oocyte conduit à la perte des 3 premiers exons et donc des 118 premiers acides aminés de la partie N-terminale [57][58][59]. DNMT1 s'exprime constitutivement dans les cellules en prolifération et de manière ubiquitaire dans les tissus somatiques avec un pic d'expression durant la phase S du cycle cellulaire [60][61]. La localisation de DNMT1 varie en fonction du cycle cellulaire : l'enzyme est diffuse dans le nucléoplasme durant les phases G₁ et G₂ mais se relocalise aux *foci* de réplication durant la phase S, grâce au domaine *Replication Foci targeting domain* décrit plus haut (Figure 6) [62]. *In vitro*, DNMT1 est à la fois capable de méthylater l'ADN hémi-méthylé et non méthylé mais avec une activité jusqu'à 50 fois supérieure pour un substrat hémi-méthylé [52]. Cette activité, associée à son interaction avec PCNA et sa séquence de recrutement à la fourche de réplication donne à DNMT1 sa fonction de méthyltransférase *de maintenance*, garante de l'héritabilité des patrons de méthylation à travers les divisions cellulaires.

En plus d'une régulation transcriptionnelle et post-transcriptionnelle, DNMT1 est la cible de plusieurs modifications post-traductionnelles, détaillées par Kinney *et al.* en 2011 [63]. En effet, la lysine 142 de DNMT1 peut être méthylée par la méthyltransférase SET7 à la fin de la phase S et conduit à la déstabilisation de la protéine (par ubiquitination de la protéine puis dégradation au protéasome). Cette marque peut être enlevée par la *lysine-specific demethylase 1* (LSD1). La sérine adjacente (sérine 143) est sujette à phosphorylation par AKT durant le cycle cellulaire et la forme phosphorylée de DNMT1 montre une demi-vie plus grande que la forme méthylée. De plus, la sérine 515 peut aussi être phosphorylée par une kinase (non identifiée) et conduit à une augmentation de son activité catalytique *in vitro*. Enfin, DNMT1 peut être sumoylée sur plusieurs lysines par SUMO-1 et ceci aurait pour conséquence d'augmenter son affinité pour l'ADN.

Enfin, une dernière catégorie de DNMT est fréquemment décrite dans la littérature comme « l'énigmatique classe DNMT2 ». Cette appellation trouve son origine dans l'absence totale d'activité méthyltransférase de l'ADN de cette enzyme, qui contraste avec sa très forte similarité de séquence protéique avec les autres DNMTs. En effet,

la délétion de DNMT2 dans des cellules ES n'a aucun impact sur l'établissement et la maintenance des marques de méthylation de l'ADN [64]. Suite à d'intenses recherches, il s'est avéré que DNMT2 n'était en fait pas une DNMT mais une enzyme capable de méthyler les ARNs de transfert [65–67]. Suite à cette observation, DNMT2 a été renommée TRDMT1 (*tRNA aspartic acid methyltransferase 1*) par le consortium HUGO *gene nomenclature*.

e) Un modèle à décompartimenter ?

Au fil des avancées, un modèle consensus s'est peu à peu mis en place selon lequel les marques de méthylation sont établies au cours du développement par les DNMT-3a et -3b, puis maintenues au fil des divisions cellulaires, du développement et du vieillissement par DNMT1. Néanmoins, différentes observations soulèvent des questions auxquelles le modèle présenté plus haut ne peut donner de réponses satisfaisantes.

En 1998, les travaux de Riggs démontrent que dans une population clonale de cellules en culture, certains CpG non-méthylés le deviennent après plusieurs générations et à l'inverse, des sites méthylés perdent leurs marques au fil des divisions cellulaires [68]. Cette hétérogénéité observée dans la copie du patron de méthylation introduit la notion de labilité des marques de méthylation et une certaine liberté (ou taux d'erreur) de DNMT1 dans son action. Pertinemment, Jones et Liang soulignent que chaque système de copie présent dans la nature possède en général un système couplé de correction d'erreurs (comme lors de la réplication de l'ADN) et qu'il serait étonnant de ne pas en retrouver un concernant la méthylation de l'ADN [69].

Rhee *et al.* montrent en 2000 que l'inactivation de DNMT1 dans un modèle de cellules cancéreuses humaines n'entraîne une diminution que de 20% de la méthylation au fil des passages cellulaires, alors que nous avons vu précédemment que son invalidation dans des cellules ES murines provoquait une déméthylation beaucoup plus importante [70]. Ceci sous-entend qu'un autre système est capable de reproduire la fonction de DNMT1, au moins dans un contexte de cellules cancéreuses.

Enfin, en se basant sur un système parfait de recopie du patron de méthylation, il ne devrait théoriquement subsister aucun site hémiméthylé après la réplication du génome, chacun d'entre eux étant immédiatement reconnu par DNMT1 lors de la réplication et méthylé. Or des travaux ont démontré que l'inactivation des enzymes DNMT3a et DNMT3b conduit à une forte élévation du nombre de sites hémiméthylés

dans les séquences répétées de cellules murines [71]. De plus, cette même invalidation conduit à une perte progressive des marques de méthylation au fil des divisions cellulaires, suggérant fortement que les enzymes impliquées dans la méthylation *de novo* interviennent aussi dans la maintenance de ces marques épigénétiques [34].

Ainsi, DNMT1 semble requérir l'action des méthyltransférases *de novo* pour accomplir sa fonction, remettant en cause le dogme selon lequel DNMT1 est la seule garante de la maintenance de ces marques au fil des divisions cellulaires et nécessitant une évolution du modèle actuel. Sur la base sur toutes ces observations, Jones et Liang proposent un modèle moins compartimenté, où DNMT1 reste la principale méthyltransférase *de maintenance* recrutée au niveau de la fourche de réplication [69]. DNMT1 y « lis » le patron de méthylation de manière concomitante à la synthèse de l'ADN. Seulement, la forte concentration de cytosines méthylées (au niveau notamment des séquences répétées) nécessite une cinétique enzymatique très rapide que DNMT1 n'est pas capable d'effectuer, induisant un taux d'erreur dans la copie de ce patron. La présence des DNMT3a et -3b aux nucléosomes présentant des modifications d'histones adéquates et de l'ADN méthylé permet, une fois la synthèse terminée et la copie (imparfaite) du patron de méthylation effectuée, de méthyler les sites « oubliés » par DNMT1.

Résumé

L'établissement et la maintenance de la méthylation de l'ADN est sous la responsabilité de trois enzymes : DNMT1, -3a et -3b.

L'expression et l'activité de ces enzymes est soumise à une régulation transcriptionnelle, post-transcriptionnelle, à des modifications (par phosphorylation, ubiquitination, sumoylation) ainsi qu'à une régulation par l'interaction avec des cofacteurs protéiques notamment *via* le domaine N-terminal des DNMTs.

Enfin, un dernier niveau de régulation de l'activité des DNMTs correspond à l'expression de différents variants d'épissage dont certains, dépourvu d'activité catalytique, vont modifier l'activité des isoformes actives.

f) Les enzymes reconnaissant les marques de méthylation

Comme décrit plus haut, la méthylation de l'ADN est principalement associée à une répression transcriptionnelle. Cet effet répresseur n'est pas intrinsèque à la modification des cytosines mais dépend de la reconnaissance et de l'interprétation du patron de méthylation par des protéines spécifiques [72][73]. Les *methyl-CpG Binding Proteins* jouent donc l'intermédiaire entre les marques de méthylation apposées sur le génome et de plus gros complexes protéiques portant le rôle

effecteur. Cette superfamille de protéines est divisée en trois branches distinctes, basées sur leur structure et leur mode d'action [74][72]. Ces trois familles sont :

- **Les protéines contenant un *methyl binding domain* (MBD).**
- **Les protéines liant les mCpG via un *SET and RING finger-associated domain* (SRA).**
- **Les protéines à doigts de zinc liant les mCpG.**

La diversité des interactions possibles entre les différents membres des *methyl-CpG Binding Proteins* et les autres acteurs de la répression transcriptionnelle me contraint ici à rester synthétique dans la description des mécanismes d'action (pour revue, lire Bogdanovic *et al.* [75]).

Famille	Membre	Caractéristique / Interaction
MBD	SETDB1	MCAF1, KAP1, AKT et DNMT3a [76] [77] [78] [79]
	SETDB 2	Non décrit
	BAZ2A	HDAC1 CpG [80]
	BAZ2B	Non décrit
	MeCP2	Sin3A, NCoR, c-Ski et CREB-1 [81][82][83] [84]
	MBD 1	Suv31h1-HP1 ou SETDB1(directement), HDAC1 et HDAC2(indirectement) [85][86]
	MBD 2	Mi2/NuRD
	MBD 3	Incapable de lier l'ADN [87], s'associe à Mi2/NuRD et à des gènes transcriptionnellement actifs [88]
	MBD 4	Sin3a et HDAC1 [89]
	MBD 5	Incapable de lier l'ADN méthylé [90]
	MBD 6	Incapable de lier l'ADN méthylé [90]
SRA	UHRF1	HDAC1 [91][92] DNMT1 [93,94]
	NIRF/UHRF2	cyclines (A2, B1, D1 et E1), CDK2, 4 et 6), pRB, p53, PCNA, DNMT1, -3a et -3b), HDAC1, l'histone H3 [95]
Protéines à doigts de zinc	Kaiso	N-cor [96]
	ZBTB4	Non décrit
	ZBTB38	Non décrit

Tableau 3 : Les différentes protéines reconnaissant les marques de méthylation de l'ADN.

v. Les protéines contenant un methyl-binding domain (MBD)

Cette famille comprend 11 membres qui eux-mêmes peuvent être repartis en trois sous familles :

- Les *histone méthyltransférases* à MBD

Les deux membres de cette famille (SETDB1 et 2) sont capables d'induire la compaction de la chromatine par leur activité histone méthyltransférase intrinsèque [97][98]. Alors que très peu de données sont disponibles pour SETDB2 de par sa caractérisation récente [98], SETDB1 a été montré comme interagissant avec MCAF1[76] KAP1[77] AKT[78] et DNMT3a [79]. L'interaction avec ces protéines va aussi jouer un rôle dans la répression transcriptionnelle.

MCAF1 (*MBD1 containing chromatin associated factor 1*) permet la formation d'un complexe MBD1:SETDB1:MCAF1 qui conduit à la conversion des di-méthyl H3-K9 portées par la queue des histones en tri-méthyl H3-K9 et provoque une compaction de la chromatine et une répression transcriptionnelle [76].

KRAP1 est un facteur impliqué dans la régulation des KRAB-ZFP (*Krüppel associated box domain zinc finger proteins*) qui représentent le plus grand groupe de répresseurs transcriptionnels chez les mammifères [99]. Les promoteurs ciblés par ces protéines présentent une répression transcriptionnelle qui peut avoir lieu sur de très longues distances. Les mécanismes précis de cette répression sont encore obscurs à ce jour, notamment concernant les KRAB-ZFP impliquées, mais cet effet implique une triméthylation de la lysine 9 de la queue des histones H3 et l'action de *l'heterochromatin protein 1 beta* pour la propagation et le maintien de l'hétérochromatine [77].

AKT est un effecteur de la voie des PI3 Kinases qui joue un rôle dans une multitude de processus physiologiques. Le résultat de l'interaction entre AKT et SETDB1 n'est pas encore très bien connu mais abouti à l'inhibition du facteur de transcription FOXO3 [78].

L'interaction entre SETDB1 et DNMT3a est ici un exemple d'une boucle renforçant l'établissement et le maintien de l'hétérochromatine. En effet, l'activité histone méthyltransférases intrinsèque SETDB1 va s'ajouter à l'activité méthyltransférase *de novo* de DNMT3b [79].

- Les histone acétyltransférases à MBD

Brièvement, ce groupe comprend deux membres BAZ2A et BAZ2B identifiés *in silico* par la recherche de motifs impliqués dans la régulation transcriptionnelle dépendant de la chromatine (bromodomaine) [100]. Malgré le fait que l'acétylation des histones soit associée à une forme active de la chromatine, la fonction principale de ces protéines est la répression de l'expression de l'ADN ribosomique nucléolaire [101][102][103][80]. En effet, bien que cela puisse paraître contradictoire, BAZ2A

s'associe à HDAC1 et induit la modification de la chromatine au niveau nucléolaire qui sera suivie de la méthylation de certains résidus CpG [80].

- Les MeCP2 à MBD

Cette famille porte le nom du premier membre identifié MeCP2, auquel doivent s'ajouter 6 autres membres identifiés par conservation de leur séquence génomique (nommés MBD1 à 6).

Le cas de MeCP2 est très intéressant car les rôles décrits pour cette protéine sont très variés, du fait qu'elle interagit avec une myriade de co-facteurs. Comme décrit dans la revue de Bagdanovic *et al.*, ces interactions ont été découvertes sous des conditions de faible stringence et peuvent impliquer d'autres acteurs intermédiaires [75]. MeCP2 est capable de se fixer à l'ADN méthylé et recruter le complexe Sin3A, NCoR et c-Ski pour provoquer la répression transcriptionnelle par déacétylation des histones [81][82][83]. Par ces interactions, MeCP2 est proposé comme un répresseur transcriptionnel conduisant à l'établissement de région d'hétérochromatine. Les observations d'autres études ont néanmoins apporté une vision moins stricte de l'action de cette protéine : les cerveaux de souris invalidées pour MeCP2 ne montrent que des changements limités dans leurs profils d'expression génique [104]. De la même manière, l'analyse transcriptomique de fibroblastes de patients souffrants du syndrome de Rett (Encart 1) montrent une dérégulation de l'expression de seulement 70 transcrits [105]. Ces deux études indépendantes semblent donc indiquer que les cibles régulées par MeCP2 sont minoritaires dans le génome et que cette protéine n'est pas un répresseur global de la transcription, mais ciblerait certaines régions génomiques pour en réguler l'expression.

En 2008, Chahrour *et al.* ont montré dans des modèles murins que MeCP2 contrôle l'expression de plusieurs centaines de transcrits dans l'hypothalamus et que pour 85% d'entre eux, MeCP2 active leur transcription vraisemblablement par une interaction avec le facteur de transcription CREB-1 [84]. Cette dernière étude va à l'encontre du rôle proposé jusqu'à lors pour MeCP2. Pourtant, plusieurs observations

Encart 1 - Le syndrome de Rett

Le syndrome de Rett est un trouble dominant liée à l'X qui apparaît avec une prévalence allant de 1/10000 à 1/15000 des naissances, et presque exclusivement chez les femmes. Le syndrome se caractérise par un développement normal jusqu'à environ 6-18 mois suivi d'une période de stagnation et de régression du développement intervenant dans les 3 premières années de la vie. Les caractéristiques de ce syndrome comprennent la perte de la parole et de la motricité, des malformations cranio-faciales, des mouvements stéréotypés des mains, des convulsions, des difficultés respiratoires, une scoliose et un retard de croissance. Des mutations de la protéine MECP2 ont été trouvées chez environ 65 à 77% des patients atteints du syndrome de Rett [104].

étayent le rôle proposé par les auteurs. I : les gènes surexprimés dans un modèle surexprimant MeCP2 sont réprimés dans le modèle murin invalidé ; ii : l'approche d'immuno-précipitation de chromatine confirme que l'activation de la transcription corrèle avec la liaison de MeCP2 au promoteur du gène. Les auteurs étudient aussi la possibilité que l'activation transcriptionnelle soit due à la répression d'un répresseur transcriptionnel (provoquant alors une perte d'inhibition indirecte) mais aucun répresseur transcriptionnel ne semble ciblé par MeCP2 d'après leur analyse transcriptomique. Ainsi, le rôle joué par MeCP2 semble moins consensuel que prévu mais l'absence d'autres études corrélant ce rôle activateur de la transcription conduit à la nécessité de confirmer ces résultats contradictoires.

La protéine MBD1 possède 13 isoformes qui diffèrent selon le nombre de domaines en doigts de zinc de type CXXC. Les isoformes en possédant 2 sont capables de se lier à l'ADN méthylé alors que celles en portant trois se lient à l'ADN indépendamment de leur état de méthylation [106]. MBD1 s'associe à des complexes de modification de la chromatine tels que Suv31h1-HP1 ou SETDB1 (deux histone méthyltransférases) et indirectement aux HDAC1 et HDAC2 (histones déacétylases) pour effectuer son action répressive [85][86].

Les protéines MBD2 et 3 possèdent une grande homologie dans leur séquence protéique avec 70% de similarité [107]. Pourtant, MBD3 n'est pas capable de se lier à l'ADN méthylé, dû à l'altération de son *methyl binding domain* [87]. Ces deux protéines interagissent avec le complexe Mi2/NuRD qui possède des activités *histone déacétylase* de remodelage de la chromatine ATP-dépendante. En 2013, Gunther *et al.* démontrent que, en accord avec cette différence d'affinité, MBD2 est retrouvée au niveau de promoteurs méthylés alors que MBD3 se localise au niveau de promoteurs exempts de ces marques. MBD2 convertit la chromatine ouverte en chromatine compactée. De plus, l'analyse transcriptomique suite à une approche d'ARN interférence contre ces deux protéines indique que MBD2 est associée à des gènes réprimés alors que MBD3 est associée à des gènes transcriptionnellement actifs [88]. Ces résultats sont en adéquation avec une étude précédente montrant que la déplétion de MBD3 dans des cellules ES murines entraîne une baisse d'expression pour une majorité de gènes [108]. Ainsi, malgré une association similaire au complexe NuRD, il ressort un rôle différentiel entre les deux complexes formés par MBD2 et MBD3.

La sous-représentation des CpG dans le génome est due à un phénomène de déamination spontanée qui induit la mutation des met-CpG en TpG et des CpG en UpG conduisant à un mésappariement. MBD4 est une *thymidine glycosylase* qui agit comme une protéine de réparation de l'ADN et cible ces deux types de

mésappariements [109]. Aucune activité de répression transcriptionnelle n'avait été démontrée, mettant MBD4 en marge des protéines de la même famille jusqu'aux travaux de Kondo *et al.* qui démontrent que MBD4 peut recruter Sin3a et HDAC1 afin d'effectuer une répression transcriptionnelle au niveau des promoteurs des gènes p16(INK4a) et hMLH1 [89]. Les auteurs concilient les deux fonctions de MBD4 en proposant l'hypothèse selon laquelle cette protéine localise au niveau de sites sensibles (proto-oncogènes, séquences répétées) et réprime leurs transcription. De plus, l'activité thymidine glycosylase permet d'assurer un maintien de sa présence à ces sites, nécessitant un ciblage méthylation-dépendant [89].

Deux autres MBDs (MBD5 et MBD6) ont été affiliées à cette famille due à leurs conservation de séquence et à la présence *d'un methyl binding domain* [100][110]. Peu de données sont disponibles sur ces deux protéines. Les travaux de Laget *et al.* démontrent l'existence de deux isoformes de MBD5 (de 230 et 110 kDa) qui sont différentiellement exprimés durant l'embryogénèse murine [111]. MBD5 et 6 localisent au niveau de l'hétérochromatine mais sont incapables de lier l'ADN méthylé, ce qui avait déjà été prédit par l'analyse de leur séquence dans des travaux précédents [90]. Néanmoins, il est prudent de penser que leur expression et leur localisation jouent un rôle au niveau cellulaire. En effet, une étude de cas cliniques de 2011 rapporte que la perte de MBD5 chez une patiente est liée à un défaut développemental, incluant un retard mental, une malformation cranio-faciale et des troubles du comportement [112].

vi. Les protéines liant les mCpG via un SET and RING finger-associated domain (SRA).

Les protéines contenant un domaine SET and RING finger-associated (SRA) sont au nombre de deux : UHRF1 et UHRF2 (*Ubiquitin-like, containing PHD and RING finger domains, 1 et 2*). La capacité du domaine SRA à se lier à l'ADN méthylé a été mis en évidence dans le cancer du sein où UHRF1 se lie au promoteur du gène EGR2 et où sa localisation corrèle avec l'hyperméthylation de ce promoteur [91]. UHRF2 a par la suite été identifiée grâce à son homologie avec le domaine SRA de UHRF1 [113].

UHRF1 a été décrite comme interagissant avec HDAC1, qu'elle recrute au niveau des promoteurs afin de réprimer ces derniers par déacétylation des histones [91][92]. Mais le rôle de UHRF1 ne semble pas s'arrêter là, du fait qu'il a été démontré plus tard qu'elle avait une affinité particulière pour l'ADN hémiméthylé et qu'elle est capable d'interagir avec DNMT1 pour assurer le maintien du patron de méthylation [93,94].

UHRF2 (ou NIRF pour Np95/ICBP90-like RING finger protein) est une *ubiquitine ligase* qui joue peut-être le rôle le plus important parmi les protéines reconnaissant l'ADN méthylé. En effet, UHRF2 est une protéine interagissant avec un grand nombre de protéines : différentes cyclines (A2, B1, D1 et E1), des *cyclin-dependent kinases* (CDK2, 4 et 6), les protéines pRB, p53 et PCNA, les différentes DNMTs (1, 3a et 3b), HDAC1 et l'histone H3 [95]. De part ces interactions, UHRF2 est à l'interface de différentes voies de signalisation cellulaire : la progression dans le cycle cellulaire (de par son interaction avec les cyclines), le système ubiquitine/protéasome par son activité *ubiquitine ligase* et l'épigénétique (par son association aux DNMTs et à l'ADN méthylé). Très brièvement, UHRF2 est capable de se lier à différentes protéines du cycle cellulaire et de réguler leur demi-vie par l'envoi au protéasome par ubiquitination. UHRF2 serait aussi capable d'intégrer l'état de la chromatine par lecture des marques de méthylation de l'ADN et des histones. L'interaction avec HDAC1 laisse aussi envisager que cette protéine pourrait intervenir sur cet état chromatinien. Ainsi, par son rôle de « protéine interface », UHRF2 recouperait les informations épigénétiques et protéiques (protéines du cycle cellulaire) et influencerait sur la décision de progresser dans le cycle par dégradation de ces facteurs cellulaires.

vii. Les protéines à doigts de zinc liant les mCpG.

Les protéines de cette famille sont capable de se lier à l'ADN méthylé par le biais d'un domaine à doigts de zinc [114]. La protéine Kaiso a été la première identifiée et la conservation de ce domaine à doigts de zinc a conduit à l'identification de deux autres membres ZBTB4 et ZBTB38 (*zinc finger and BTB domain containing 4* et 38) [115]. Alors que ZBTB4 et ZBTB38 se lient à l'ADN méthylé, Kaiso peut se lier aussi bien à l'ADN non méthylé [116]. Kaiso s'associe au complexe N-cor pour effectuer sa répression transcriptionnelle par une déacétylation et une méthylation des histones [96]. Très peu de données sont disponibles concernant le mode d'action de ZBTB4 et ZBTB38. Une approche d'immuno-précipitation de chromatine situe ces protéines au locus H19/igf2 qui est soumis à l'empreinte génomique parentale et leur transfection dans un modèle *in vitro* de gène rapporteur conduit à une répression transcriptionnelle [115].

Il est intéressant de noter que ces protéines peuvent agir selon différents mécanismes: soit par une activité intrinsèque (modification des queues des histones par exemple), soit en jouant le rôle d'adaptateur pour l'assemblage de plus gros complexes, soit les deux. La conséquence de la méthylation de l'ADN va donc dépendre de l'assemblage de ces facteurs, qui feront le lien entre méthylation de l'ADN et remodelage de la chromatine.

g) La méthylation de l'ADN dans les processus physiologiques

Comme nous l'avons vu dans l'introduction, l'épigénétique selon la définition de Conrad Waddington correspond à l'étude de tous les événements cellulaires qui vont permettre une complexification du zygote, comme des couches que l'on ajouterait successivement. En partant de l'état cellulaire le moins différencié possible, Tsumura *et al.* ont montré que les cellules ES ne portant aucune marque de méthylation de l'ADN restent viables *in vitro* montrant que cette méthylation n'est pas vitale à un état indifférencié [117]. En revanche, lorsque l'on induit la différenciation *in vitro* de ces cellules, elles entrent irrémédiablement en apoptose montrant que les marques de méthylation sont essentielles dans les processus de différenciation cellulaire [51]. De ce fait, la méthylation de l'ADN joue un rôle prépondérant dans cette complexification cellulaire et Hackett et Surani expliquent dans leurs travaux que les profils de méthylation de l'ADN vont peu à peu permettre la mise en place d'une identité cellulaire et engager un ensemble de cellules sur une voie de différenciation, de complexification qui leur sera propre [118]. Comment la méthylation de l'ADN intervient-elle dans la mise en place cette différenciation ?

La rencontre du spermatozoïde avec l'ovule va conduire à la fertilisation de ce dernier et au partage des deux génomes haploïdes. Ces deux génomes, hérités du père et de la mère vont respectivement porter des marques de méthylation, propre au type cellulaire « ovule » ou « spermatozoïde ». Ainsi la mise en place progressive d'un profil de méthylation pour aiguiller les cellules indifférenciées vers un lignage spécifique nécessite d'abord une remise à zéro pour permettre de partir de cellules pluripotentes. Cette déméthylation globale a lieu peu après la fertilisation de l'ovule (au stade E3.5 chez la souris). Le phénomène de déméthylation global est encore sujet à de nombreux travaux mais les mécanismes sous-jacents sont de mieux en mieux décrit. Deux voies synergiques fonctionnent en parallèle, une voie **passive** qui correspond à l'arrêt de la maintenance de la méthylation au cours des divisions cellulaires et qui entraîne une perte progressive de ces marques au fil des cycles cellulaires et une voie **active** mettant en jeu les protéines TET (Ten Eleven translocation proteins). Ces dernières convertissent les méthyl-cytosines en hydroxyméthyl-cytosines qui seront remplacées par une cytosine non méthylée [118][119]. Des études ont montré que lors de la fertilisation, le génome paternel subit une déméthylation globale très rapide, précédant la réplication de l'ADN alors que le génome maternel montre une déméthylation très progressive au fil des divisions cellulaires [120,121]. Ceci irait donc dans le sens d'une déméthylation active concernant le génome paternel et passive pour le génome maternel. Au moment de l'implantation de l'embryon, le génome des cellules va peu à peu se

méthyler : c'est la méthylation *de novo* que nous avons décrit précédemment faisant intervenir les enzymes DNMT3a et -3b. La mise en place progressive de ces marques de méthylation va ainsi aiguiller les cellules indifférenciées vers un lignage spécifique. Chez la souris plusieurs études ont montré que la majorité des événements de méthylation de l'ADN ont lieu **avant** le stade embryonnaire E6.5. En prenant plus spécifiquement l'exemple de la différenciation neuronale, la majorité des promoteurs méthylés dans les neurones le sont déjà dans les progéniteurs neuraux. Ainsi, la méthylation de l'ADN jouerait un rôle à un stade très précoce dans la restriction des lignages cellulaires vers lesquels se différencier, plutôt que dans la restriction successive des lignages vers un type cellulaire bien précis [122,123].

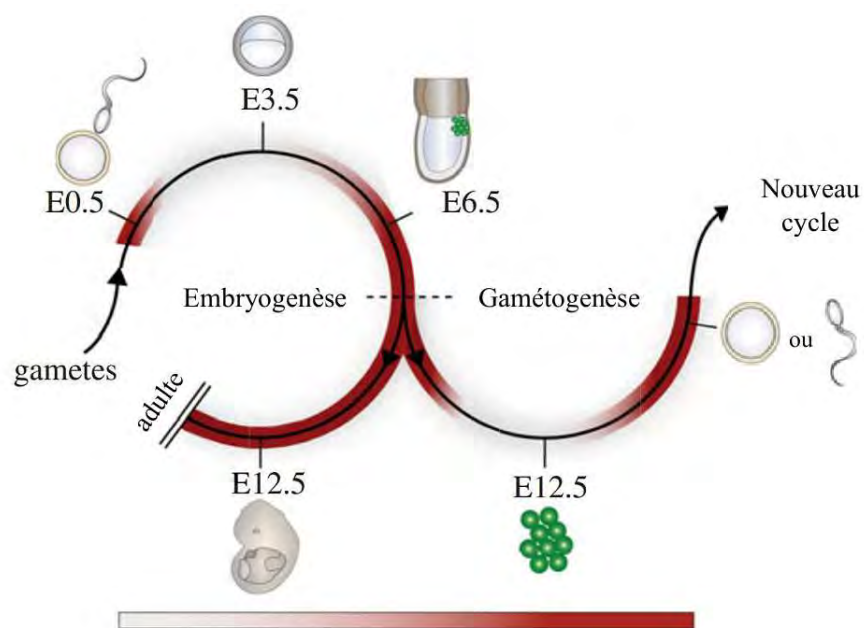


Figure 6 : Variation temporelle du niveau global de cytosines méthylées dans le génome (Adapté de Hackett et Surani [118]).

E : Stade embryonnaire murin (en jours).

La façon dont sont choisies les séquences qui vont être méthylées n'est pas encore totalement compris mais nous pouvons imaginer deux scénarii : une méthylation « par défaut », au hasard, où les gènes transcriptionnellement actifs sont protégés d'une répression par méthylation; ou bien un ciblage de certaines régions par des facteurs cellulaires qui vont induire sa répression. De récents travaux étayent cette dernière hypothèse qui ferait intervenir une modification locale de l'état de chromatine [124], le ciblage de certaines régions par des facteurs de liaison à l'ADN, [125] la nécessité d'une transcription du gène à réprimer [126] ainsi que le guidage de la machinerie de méthylation par des ARNs non codant. La plupart de ces mécanismes agirait de manière synergique afin de maintenir un état de la chromatine ouvert et/ou

reconnaissable par les DNMTs. Un argument démontrant la possibilité du ciblage de la méthylation de l'ADN correspond à l'interaction DNMT3b/CENP-C. CENP-C (*Centromere protein C1*) est une protéine constitutive des centromères et est reconnue par le domaine N-terminal de DNMT3b. Cette interaction est confirmée par le fait que l'inactivation de DNMT3b et CENP-C conduit à la perte de méthylation des régions centromériques et pericentromériques [127].

Deux phénomènes développementaux faisant intervenir la méthylation de l'ADN comme médiateur de la mise en silence de certaines régions du génome diffèrent un peu de ce modèle : les gènes soumis à l'empreinte parentale et l'inactivation du chromosome X chez la femme.

i. L'empreinte génomique parentale

L'empreinte génomique parentale est un mécanisme épigénétique développemental permettant à un groupe restreint de gènes de ne pas suivre les lois d'héritabilité mendélienne. Ces gènes sont exprimés de manière mono-allélique et parentale-dépendante. Ainsi, pour un locus donné, seul l'allèle hérité du père OU de la mère sera exprimé. Leur étude est très complexe car cette empreinte peut être tissu-dépendante, développement-dépendante ou espèce-dépendante. Par exemple chez la souris, les deux allèles (paternels et maternels) du gène *igf2r* vont être exprimés avant l'implantation de l'embryon, puis l'allèle paternel sera mis sous silence. Ce dernier sera ré-exprimé uniquement dans les neurones post-mitotiques (pour revue, lire Koerner et Renfree [128][129]). La liste de ces gènes ne cesse de s'allonger mais chez l'Homme, si 240 gènes sont proposées comme soumis à l'empreinte, seuls 87 ont été validés (<http://www.geneimprint.com>).

D'un point de vue génétique, les gènes soumis à l'empreinte parentale sont le plus souvent retrouvés en clusters et la répression par hyperméthylation de l'ADN se fera sur une grande séquence génomique. De plus, ces régions montrent un enrichissement massif en îlots CpG (88% contre seulement 50-60% pour les autres gènes) et sont fréquemment encadrés par des séquences répétées [130][131]. Enfin, même l'établissement de leur méthylation peut différer d'un gène à l'autre : certains gènes acquerront un profil de méthylation au stade des cellules germinales alors que d'autres subiront des changements stade- et tissus-spécifiques [132]. Donc, l'étude de ces gènes n'est pas simple du fait qu'ils ne présentent pas de séquences spécifiques, que leur organisation génétique soit commune à d'autres régions du génome et que l'établissement spatio-temporel de leur profil de méthylation varie d'un gène à l'autre.

D'un point de vue mécanistique, la méthylation de l'ADN va jouer un rôle d'interrupteur pouvant inhiber différentes fonctions (Figure 7):

- Au niveau d'un cluster de gène, une région très précise peut contrôler entièrement l'expression des gènes environnant : l'ICE (*imprinted control element*, ou ICR : *imprinted control region*). Cet ICE peut être reconnu par des facteurs de liaison à l'ADN, tel que CTCF (*CCCTC binding Factor*) qui est un *insulator*, c'est-à-dire une protéine capable d'isoler une région d'ADN des effets d'un *enhancer* environnant. Dans le cas du cluster *igf2/H19*, l'ICE de l'allèle paternel est méthylé, ce qui va empêcher CTCF de lier à son site de reconnaissance et permettre au gène *igf2* et à l'*enhancer* d'interagir, conduisant à la transcription du gène. Dans le cas de l'allèle maternel non méthylé, CTCF peut se lier bloquant cette interaction et inhibant la transcription génique de *igf2*.
- Un second mécanisme est retrouvé au niveau du gène *H13* (*minor histocompatibility antigen H13*) où l'ICE méthylé sur l'allèle maternel conduit à un transcrit pleine taille, alors que le non méthylé permet l'activation d'un promoteur intra-génique et conduit à l'expression du rétrogène *mcts2* et à la polyadénylation prématurée de *H13* (donnant une enzyme inactive).
- Enfin, dans le cas de la région *igf2r*, l'ICE est situé au niveau du promoteur d'un gène codant pour une séquence d'ARN non codant (ARNnc). La méthylation de l'ICE sur l'allèle maternel conduit à une transcription d'*igf2r* et des gènes environnant ainsi qu'à la mise en silence des l'ARNnc. Sur l'allèle paternel, l'ICE non méthylé permet la transcription des ARNnc qui vont à leur tour mettre en silence les autres gènes du cluster (de manière similaire à l'inactivation du X).

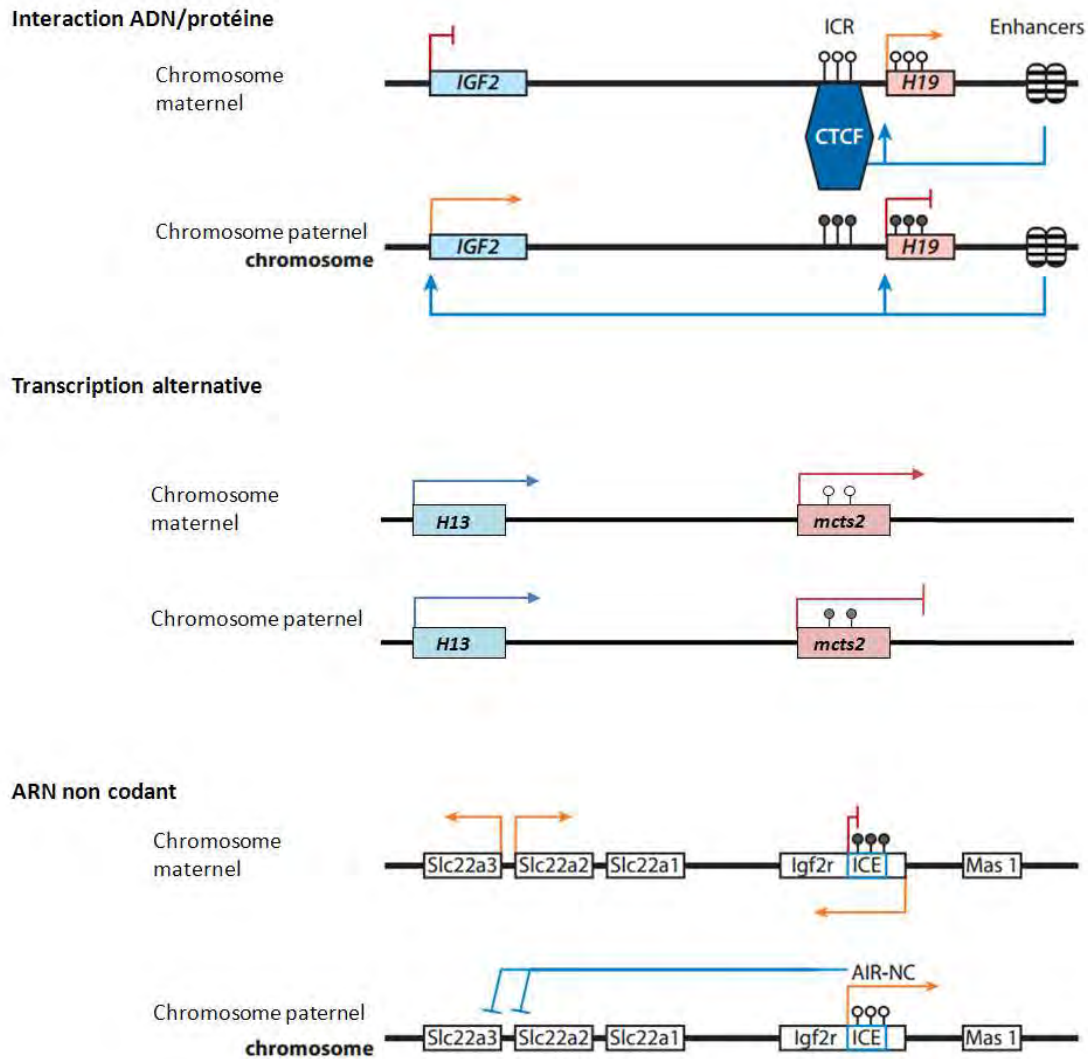


Figure 7 : Mécanisme d'action de la méthylation de l'ADN dans le contrôle de l'expression de gènes soumis à l'empreinte parentale.

ICR / ICE : Imprinted control region / Imprinted control element ; Les sphères grisées représentent les cytosines méthylées, les blanches représentent les cytosines non-méthylées ; Les flèches classiques représentent les régions génomiques transcriptionnellement actives et les flèches tronquées, les régions réprimées.

ii. L'inactivation du chromosome X

L'inactivation du chromosome X permet la compensation de dose des gènes exprimés sur ce chromosome. En effet, les individus mâles portent un seul de ces chromosomes et les individus femelles en portent deux copies. Dans le cas de certains gènes, l'expression du double de copies peut être problématique. Ce mécanisme a fait l'objet d'une excellente revue par Ng *et al.* [8].

Contrairement à l'empreinte génomique parentale, l'inactivation du X est aléatoire chez les mammifères mais nécessite tout de même un comptage de ces chromosomes. Les processus responsables ne sont pas encore clairement établis,

mais ils sont contrôlés au niveau de la région Xic (*X inactivation centre*, Figure 8). Cette région comprend de nombreux éléments de régulation et son expression ectopique dans des cellules mâles permet d'initier l'inactivation du X. De récents travaux proposent un modèle pour le comptage et l'initiation de cette inactivation : les loci Xic permettent un rapprochement des deux chromosomes X. Leur interaction active la transcription d'un gène codant pour un ARNnc « Xist ». Cet ARN va alors littéralement recouvrir le chromosome X à inactiver. L'expression de cet ARN lorsque son gène est cloné sur un autosome conduit au recouvrement partiel du chromosome par Xist, ce qui indique qu'il n'y a pas de séquence spécifique reconnue pour l'appariement. En revanche, Xist ne va recouvrir **entièrement** que le chromosome X, de part sa forte concentration en séquences LINEs qui, par un mécanisme encore inconnu, vont amplifier la propagation de Xist depuis le Xic, sur tout le reste du chromosome (Figure 8). L'analyse fonctionnelle de Xist montre que sa capacité à recouvrir le chromosome X et à initier sa mise en silence sont deux fonctions indépendantes. Cette dernière est conditionnée par la structure en tige-boucle qu'adopte cet ARN à son extrémité 5' et qui servira de plateforme pour la liaison à des facteurs protéiques. A court terme, Xist permet la mise en place de l'hétérochromatine et la compaction du X inactif, mais cet effet n'est présent que dans les premières étapes du développement. Les facteurs recrutés par Xist appartiennent entre autre à la famille Polycomb et vont induire une mise en silence notamment *via* le remaniement de la chromatine, par hypoacétylation des histones.

Le rôle de la méthylation de l'ADN dans l'inactivation du X est avéré depuis plus de 30 ans mais le mécanisme sous-jacent est encore sujet d'intenses recherches. En 1981, Mohandas *et al.* ont démontré que le traitement d'une lignée cellulaire avec un agent déméthylant de l'ADN (la 5-azacytidine) conduit à la réexpression génique de l'X inactif [133]. De plus, des études successives ont montré que les DNMT1 -3a et -3b ne sont pas nécessaires à l'établissement du X inactif [134–136]. Nous pouvons donc déduire de ces résultats que l'initiation de la mise en silence de l'X inactif ne met pas en jeu la méthylation de l'ADN. Elle est due à l'action des protéines recrutées par Xist remaniant la chromatine (pour revue, lire Ng *et al.* [8]) et la méthylation intervient à un stade plus tardif afin de maintenir cette répression au fil des divisions cellulaires.

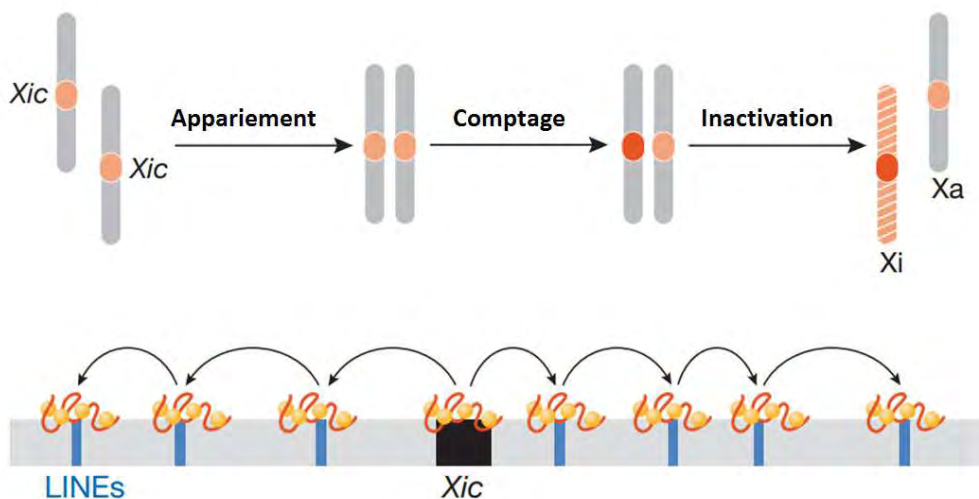


Figure 8 : Modèle de comptage, d'appariement et d'initiation de l'inactivation du Chromosome X (Adapté de Ng *et al.* [8]).

Xic: X inactivation centre, Xi: Chromosome X inactif, Xa: Chromosome X actif, LINEs: Long Interspaced Nuclear Elements.

h) La méthylation de l'ADN : un mécanisme de répression uniquement ?

Comme dit précédemment, 80% des cytosines sont méthylées dans le génome alors que seulement 5 à 10% des promoteurs possédant un îlot CpG sont hyperméthylés. Outre le fait que les séquences répétées du génome soient le principal réservoir de cytosines méthylées, il faut aussi considérer le fait que la méthylation de l'ADN intervient en dehors des îlots CpG dans les régions codantes du génome ainsi que dans des îlots CpG intra-géniques.

En 2012, Peter Jones fait la revue de la méthylation de ces régions « extra-promotrice ». Il souligne que beaucoup de gènes possèdent un site alternatif d'initiation de la transcription (TSS) situé dans leur région codante et que leur méthylation régulerait le choix du TSS, expliquant nombre de cas où la méthylation d'un gène au niveau de sa séquence promotrice ne reflète pas son niveau d'expression [26].

Jones détaille aussi la présence d'îlots CpG intragéniques, dont la méthylation n'entraîne pas la répression transcriptionnelle du gène. Ces îlots, bien qu'en faible nombre, montrent une fréquence de méthylation pouvant aller jusqu'à 34% selon les tissus [137]. Ces sites de méthylation sont reconnus par MeCP2 (généralement associé à une répression de la transcription) alors que le gène est

transcriptionnellement actif. Ainsi, l'élongation de la transcription ne serait pas inhibée par la méthylation de l'ADN et il existerait donc un paradoxe entre méthylation au niveau du promoteur et dans les régions intragéniques.

Même si le rôle de la méthylation intragénique n'est pas clairement défini, des travaux récents montrent que les exons sont plus fréquemment méthylés que les introns et que la variation du niveau de méthylation se fait plus nette à la jonction exon/intron laissant imaginer un mécanisme inédit de régulation de l'épissage alternatif [138].

Enfin, différents travaux rapportent la méthylation cyclique de promoteurs transcriptionnellement actifs [139,140]. Dans deux études, les auteurs décrivent une succession de cycles de méthylation/déméthylation apparaissant dans une échelle de temps de quelques dizaines de minutes. La déméthylation des promoteurs concernés corrèle avec des marques de chromatine ouverte et ferait intervenir les DNMT3a et -3b ainsi que la Thymidine glycosylase (TDG) pour enlever les marques de méthylation. Même si le rôle de la méthylation est ici inconnu, la cyclicité de ces marques démontre une fois de plus que la méthylation de l'ADN ne peut pas être résumée à un mécanisme de répression de l'expression génique. Son observation au niveau de promoteurs actifs et sa labilité semble démontrer un rôle à part entière dans le processus de transcription d'un gène.

Résumé

La méthylation de l'ADN ne présente pas d'activité répressive en soi. Elle requiert d'être « lue » par un ensemble de protéines qui porteront une fonction de répression de la transcription, ou pourront servir de plateforme pour le recrutement de plus gros complexes capables par exemple de modifier la chromatine. Impliquée dans la régulation spatio-temporelle de l'expression génique, la méthylation peut supporter quelques variations mécanistiques comme illustré par l'empreinte génomique parentale et l'inactivation du chromosome X.

Depuis maintenant quelques années, il devient de plus en plus évident que la méthylation de l'ADN ne peut pas se résumer simplement à la répression de l'expression génique, mais ferait aussi partie intégrante de la transcription et vraisemblablement de l'épissage alternatif des ARNm.

3) Les microARNs

Les microARNs sont de petits ARNs non codants (d'une vingtaine de nucléotides) qui vont cibler certains ARNm afin d'inhiber leur traduction. Ce mécanisme est conservé des plantes jusqu'à l'Homme. De par la conservation de leur séquence de reconnaissance (la *seed sequence*), chaque microARN peut réprimer l'expression de plusieurs dizaines voire centaines d'ARNm de manière post-transcriptionnelle [141][142]. Ainsi, grâce à ce spectre d'action, on estime que l'expression de plus de la moitié des protéines est modulée par les microARNs [143].

La base de données miR-base référençant tous les microARNs identifiés à ce jour compte 1600 précurseurs donnant lieu à 2042 microARNs matures (au 12 avril 2013). L'organisation génomique des gènes codants pour des microARNs a fait l'objet d'une revue par Olena *et al.* en 2009 dans laquelle il est décrit que ces gènes peuvent arborer différentes organisations [144]:

- Celle d'un gène exclusif codant pour un ou plusieurs microARNs (formant alors un cluster) et sous contrôle de son propre promoteur,
- Au sein d'un gène codant pour une autre molécule (protéine ou ARN non codant), la séquence codant pour un ou plusieurs microARNs sera située dans un intron et maturée après épissage. Dans ce cas, la transcription est dépendante du promoteur du gène hôte,
- Enfin, le cas le plus rare correspond à la présence d'une séquence codante pour un microARN recouvrant à la fois un intron et un exon du gène hôte et dont le processus de maturation reste obscur à ce jour [145].

L'étude de l'organisation fonctionnelle du génome a révélé que plus d'un tiers des gènes codant pour des microARNs est organisé en clusters [146]. Ces clusters codent donc pour un transcrypt pouvant faire plusieurs centaines voire milliers de paires de bases, qui suite à sa maturation produira plusieurs microARNs de séquences différentes. D'après Yuan, les microARNs d'un même cluster vont cibler différents représentants d'un groupe fonctionnel de protéines [147]. Ici, il est donc intéressant de noter que le clustering des microARNs associés entre eux ne se fasse pas au hasard mais que l'on retrouve une correspondance fonctionnelle.

i) La biogénèse et le mécanisme d'action des microARNs

La transcription des microARNs est principalement dépendante de l'ARN polymérase *Pol II* (ceci est compréhensible car comme démontré dans les travaux de Rodriguez, 60% des microARNs identifiés en 2004 sont situés dans des introns de gènes codant

pour des protéines. A ceci s'ajoute le fait que, après analyse génomique des promoteurs correspondant aux séquences codant pour des microARN intergéniques, 64% possèdent un îlot CpG, 19% contiennent une TATA box et un *TFIIB recognition element*, ce qui correspond exactement aux caractéristiques des promoteurs Pol II dépendants. Conceptuellement, l'ARN polymérase II est la plus régulée parmi les trois ARNs polymérase et ceci permet un contrôle très fin de son activité, tant au niveau transcriptionnel que post-transcriptionnel [148]. Il est néanmoins rapporté que certains microARNs sont transcrits dépendamment de la polymérase Pol III [149]. Cette différence semble dépendre du contexte génomique où sont situés ces microARNs. Ces microARNs sont retrouvés dans des régions riches en séquences ALU, qui contiennent des répétitions du promoteur 7SL (un petit ARN ribosomal), qui est dépendant de l'ARN polymérase III. Du fait que la ARN Pol III est principalement impliquée dans la transcription d'ARNs non codants tels que les ARNs de transfert, son activité chez les eucaryotes est restreinte à la transcription de gènes de ménage et on peut imaginer qu'elle soit soumise à une régulation moindre.

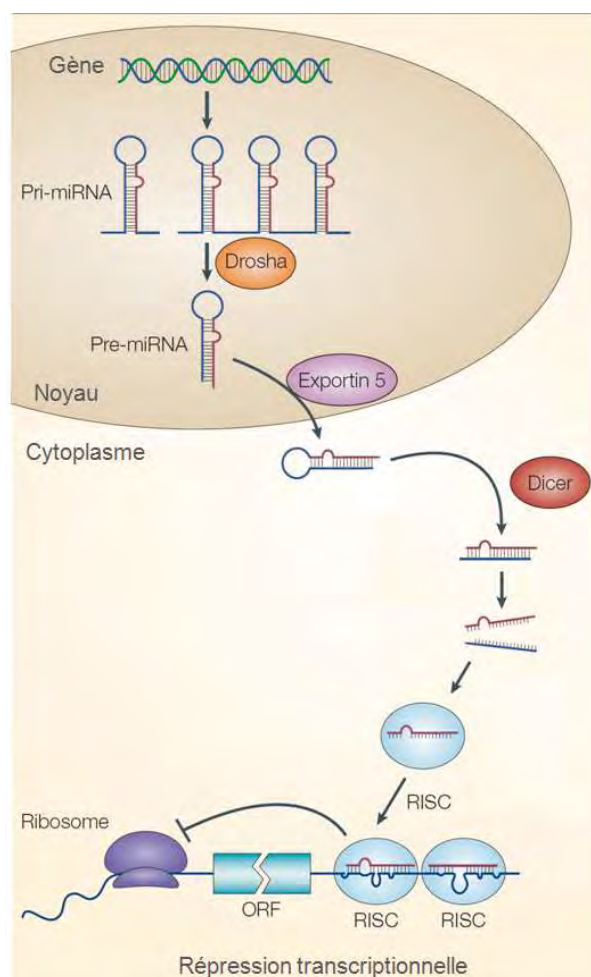


Figure 9 : Biogenèse des microARNs (adapté de Olena et al.) [144].

La transcription de ces gènes conduit à des transcrits primaires (appelés **pri-miARNs**) qui peuvent faire jusqu'à plusieurs milliers de nucléotides selon les gènes concernés et qui vont subir plusieurs étapes de maturation (Figure 9). Une fois la transcription effectuée par l'ARN polymérase, le pri-miARN va subir un processus de maturation [150].

Une fois le pri-miARN transcrit, celui-ci adopte invariablement la forme d'une tête d'épingle dû à une complémentarité partielle de sa séquence qui entraîne un repliement du transcrit sur lui-même. La première étape de maturation correspond alors au clivage du pri-miARN par le complexe DROSHA-DGCR8 libérant la tête de l'épingle, représentant alors environ 70 nucléotides, donnant alors le **pré-miARN**. Drosha est une endonucléase RNase III et porte donc l'activité catalytique alors que DGCR8 (*Di George Syndrome critical region gene 8*) est une protéine ciblant l'ARN double brin et qui va permettre de positionner Drosha pour effectuer le clivage [151]. Ce clivage a lieu dans le noyau et le pré-miARN est ensuite exporté de manière active dans le cytoplasme par le système Ran-GTP / Exportin5 [152]. Ce précurseur est alors pris en charge par une endonucléase cytoplasmique: DICER. DICER est aussi une RNase III, qui va cliver le précurseur à la base de la tête d'épingle et ainsi libérer un fragment d'ARN double brin, d'une vingtaine de nucléotides [153]. De manière concomitante au clivage, le duplex ARN va s'associer à TRBP (*TAR RNA-Binding Protein*) et PACT [154][155]. PACT et TRBP vont servir de médiateurs pour l'association du complexe DICER/ARN duplex avec une protéine Ago (de la famille des protéines argonautes). A ce complexe s'associeront différentes ARN hélicases (qui restent à être caractérisées) qui vont séparer les deux brins du duplex pour ne garder que le brin « guide » qui s'associera à la protéine Ago [156][157]. Le choix de ce brin ne se fait pas au hasard mais dépend des 2 nucléotides situés à l'extrémité 5', faisant que la constante thermodynamique la plus faible des deux déterminera le brin guide [158].

Les protéines Ago sont au nombre de 4 chez les mammifères (Ago1-4) [159]. Dans leurs travaux, Pillai *et al.* fusionnent une protéine Ago2 avec une séquence de reconnaissance spécifique (*B-box binding site*) et ciblent artificiellement l'ARN messenger codant pour la protéine rapporteur luciférase au niveau de sa région 3'-UTR dans laquelle est inséré un nombre variable de B-box [160]. Les auteurs montrent alors que l'interaction directe de la protéine Ago2 avec la partie 3'-UTR de l'ARNm par la B-Box est suffisante pour réprimer l'expression de la protéine rapporteur et que cette répression est proportionnelle au nombre de sites de reconnaissance insérés au niveau de l'ARNm. Ainsi, ces travaux démontrent que la fonction d'inhibition nécessite la liaison de la protéine Ago à l'ARNm cible mais que le

microARN ne semble posséder qu'une fonction de guidage vers l'ARNm cible. Le microARN agira donc comme la composante nucléotidique du complexe et la protéine Ago comme la composante protéique. Néanmoins, certains travaux suggèrent que sans un troisième acteur, le complexe microARN/Ago ne peut pas effectuer son rôle de répresseur traductionnel.

Cette troisième protéine est GW182 (*glycine-tryptophan repeat-containing protein of 182 kDa*). La déplétion de GW182 et l'inhibition de la formation du complexe Ago/GW182 conduisent toutes deux à un défaut de répression de traduction des ARNm par les microARNs [161]. L'interaction entre Ago et GW182 se fait par la partie N-terminale de cette dernière, la partie C-terminale étant appelé le « *silencing domain* » car sa délétion conduit à une perte de la répression traductionnelle par le système miARN. GW182 sert de plateforme pour le recrutement de plusieurs protéines qui porteront l'action répressive de ce complexe. Une fois associés, le microARN, la protéine Ago et GW182 forment le **RISC** (*RNA induced silencing complex*).

L'action du RISC peut se faire à travers différents mécanismes impliquant l'inhibition de la traduction au niveau de l'initiation ou l'élongation du polypeptide, ou la dégradation de l'ARNm cible [162]. S'il a longtemps été admis que les plantes privilégiaient la voie de la dégradation de l'ARNm cible et les cellules animales celle de l'inhibition de la traduction, l'avancée technologique dans les domaines de la protéomique et de la transcriptomique ont permis de mettre en évidence une réalité tout autre.

L'analyse parallèle du profil d'expression protéique et de l'expression des ARNm en réponse à une expression ectopique ou à la répression d'un microARN a démontré que la dégradation de l'ARNm semble être le mécanisme d'action principal du RISC [163][164][165]. Dans leur étude de 2009, Hendrickson *et al.* ont déterminé l'impact de la surexpression du microARN miR-124 sur l'expression génique tant au niveau de l'activité traductionnelle que de l'abondance en ARNm des cibles de ce microARN [164]. Leur étude mène à trois observations intéressantes :

- la déstabilisation de l'ARN messenger cible est le principal mécanisme de régulation de répression par miR-124,
- lorsque l'arrêt de la traduction intervient, c'est principalement au niveau de l'initiation,
- enfin, la plupart des cibles subissent une répression de leur expression de l'ordre de 1 à 3 fois.

Avant de décrire les mécanismes par lesquels se produisent l'arrêt de la traduction ou la dégradation de l'ARNm, il est bon de rappeler brièvement les principales étapes de la traduction d'un ARNm en protéine :

Très brièvement, les ARNm transcrits par l'ARN Polymérase II possèdent une structure dite « Cap » ou « coiffe » en 5' qui sera reconnue par les facteurs d'initiation de la traduction. Cette coiffe joue un rôle déterminant car elle protège en plus l'ARNm des exo-nucléases 5'-3'. La partie 3' de l'ARNm comporte une succession d'adénosine (appelée queue poly A) qui va avoir un rôle crucial dans le recrutement des ribosomes et dans la stabilité du transcrit. La protéine PABP (ou *poly (A)-binding protein*) s'associant avec la queue poly A va interagir avec les facteurs reconnaissant la coiffe (Figure 10). L'ARNm va alors se circulariser, les ribosomes seront recrutés au niveau de la coiffe pour initier la traduction et l'ARNm sera protégé de la dégradation et traduit en protéine.

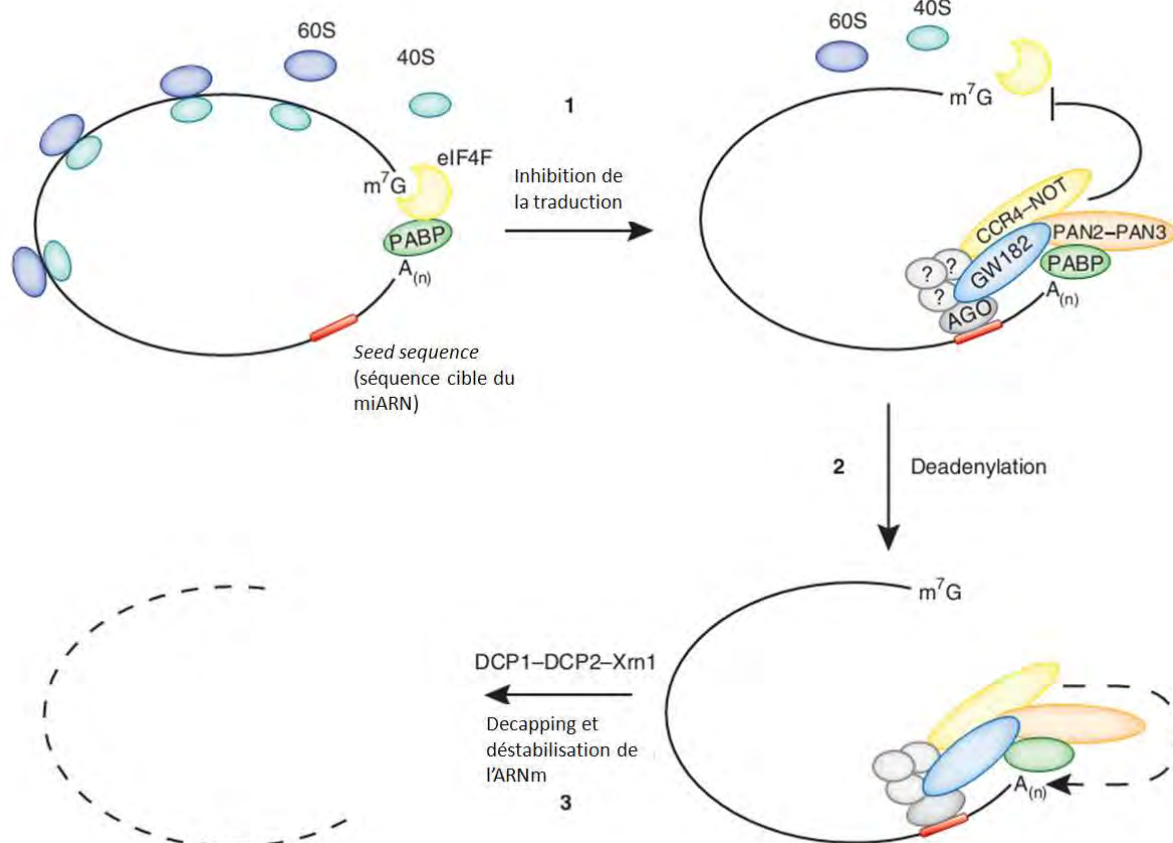


Figure 10 : Modèle de répression traductionnelle par les microARNs (adapté de Fabian et al. [161]).

Le complexe RISC est donc guidé par le microARN et vient se situer à proximité de PABP (grâce au domaine de liaison à PABP porté par la partie C-terminale de GW182) [161]. Cette interaction est proposée comme déstabilisant la liaison de PABP avec coiffe, bloquant ainsi la traduction. Le RISC recrute ensuite le complexe de déadénylation formé par les protéines CCR4 et NOT. Cette déadénylation peut

conduire d'une part à la linéarisation de l'ARN qui perd ainsi sa capacité à être traduite de manière cap-dépendante. D'autre part, le RISC recrute les enzymes de decapping DPC1 et DCP2 qui conduisent à la dégradation de l'ARNm par l'exonucléase XRN1 [161][162].

j) Régulation de l'expression des microARNs par méthylation de l'ADN

Comme nous l'avons vu précédemment, les séquences codant les microARNs peuvent être soit sous le contrôle du promoteur d'un gène « hôte », soit sous contrôle de leur propre promoteur. Ainsi, il est logique d'estimer que les phénomènes de régulation touchant les gènes codants pour des protéines touchent de la même manière les séquences codant des microARNs. Si plus de la moitié des promoteurs présente un îlot CpG, il est envisageable qu'une proportion équivalente de gènes codants pour des microARNs puisse être régulée par méthylation de l'ADN.

L'étude des profils de méthylation des gènes codant pour des microARNs fait face aux mêmes problèmes que pour les gènes codant les protéines : ces patrons vont varier de manière interindividuelle, de manière âge-dépendante, de manière tissu-spécifique et même entre différents types cellulaires d'un même tissu.

En 2011, Vrba *et al.* comparent les profils de méthylation et d'expression des microARNs de deux types cellulaires d'un même organe : les cellules épithéliales mammaires et les fibroblastes mammaires obtenus après mammoplastie [166]. Les auteurs comparent alors ces profils entre trois donneurs différents afin de prendre en compte la variabilité interindividuelle. De manière intéressante, cette variabilité concernant l'expression des microARNs est très faible pour les deux types cellulaires, indiquant que les trois donneurs expriment relativement les mêmes microARNs dans ces deux types cellulaires. En revanche, la variabilité inter-types cellulaires est beaucoup plus grande, indiquant que les deux types cellulaires ont des profils d'expression différents. En ne retenant que les microARNs dont l'expression varie d'un facteur supérieur à 10 entre les deux lignées (considérées lignée-spécifiques), les auteurs mesurent le niveau de méthylation de leurs promoteurs par immuno-précipitation des 5 methyl-cytosines puis hybridation sur puce à ADN. Pour ces microARNs, la différence d'expression corrèle avec une hyperméthylation de leur séquence promotrice pour 38% d'entre eux. Ces résultats illustrent parfaitement le concept d'épigénétique présenté précédemment selon lequel la différenciation successive d'une cellule unique pluripotente s'accompagne d'une répression par méthylation de l'ADN de l'expression d'un panel de gènes, aboutissant à deux types cellulaires différenciés, distincts, présentant des profils d'expression génique différents .

Ce concept est aussi très bien représenté dans un autre travail. Choi *et al.* en 2012 s'intéressent quant à eux aux patrons de méthylation des cellules souches mésenchymateuses (CSM) de la moelle osseuse [167]. Les CSM sont connues pour présenter une sénescence précoce lorsqu'elles sont maintenues en culture, associée à un changement dans leur profil d'expression génique. Les auteurs se sont donc intéressés à comparer les profils de méthylation de cellules à faible passage cellulaire, à ceux de cellules à un passage plus avancé. L'intérêt principal de cette étude est qu'elle s'intéresse aux variations de méthylation de l'ADN au sein d'une population cellulaire homogène, où la seule variable est le temps de culture. Les résultats indiquent que parmi 475 promoteurs de gènes codant pour des microARNs, 27 montrent une hyperméthylation à faible passage (5%) et que ce chiffre monte à 44 dix passages cellulaires plus tard (9%). De plus, parmi ces 44 microARNs, seulement 14 sont communs aux deux conditions. Ces résultats démontrent donc que pour un type cellulaire bien précis et sans altération physiopathologique, l'expression des microARNs est aussi soumise à une régulation par méthylation de l'ADN.

Résumé

Les microARNs sont de petits ARNs non-codants inhibant la traduction des ARNs messagers en protéines. Leur expression est régulée de manière spatio-temporelle, et joue un rôle déterminant dans le développement des différents tissus.

Comme abordé dans l'introduction, méthylation de l'ADN et expression des microARNs peuvent être sujets à une régulation mutuelle : l'expression de certains de ces microARNs est réprimée par méthylation de l'ADN, et l'expression des DNMTs peut être modulée par le ciblage des microARNs.

Nous avons vu que l'empreinte parentale est un mécanisme de répression de l'expression génique bien particulier, restreint à un très faible nombre de gènes. Pourtant, plusieurs gènes codant pour des microARNs sont soumis à ce type de mécanisme. Le cluster de microARNs situé sur le chromosome 19 est le plus grand cluster découvert à ce jour et code pour 46 microARNs. En 2010, Noguer-Dance *et al.* montrent que ce cluster est soumis à l'empreinte parentale dans le placenta et n'est exprimé qu'à partir de l'allèle paternel [168].

Ainsi, ces exemples montrent bien que la régulation de l'expression des microARNs peut se faire par méthylation de leur séquence génomique dans un contexte physiologique.

k) Régulation de la méthylation de l'ADN par les microARNs

Comme nous venons de le voir, les microARNs ont pour fonction la modulation du niveau d'expression de près de la moitié des protéines exprimées par une cellule. Il

en découle que les enzymes intervenant dans les mécanismes épigénétiques aient de fortes chances d'être la cible de ce type de régulation. En 2011, Saito *et al.* discutent de l'interrelation microARNs/épigénétique et décrivent succinctement la régulation de l'expression de protéines telles que l'histone-lysine N-méthyltransférase (EZH2) ou plusieurs histone déacétylases (HDAC) par des microARNs [169]. Ce ciblage concerne les protéines responsables de modifications de la chromatine, ainsi nous ne nous étendrons pas plus sur ce sujet dans ce chapitre, pour nous intéresser plutôt au ciblage des enzymes responsables de la méthylation de l'ADN.

Il est intéressant de constater que les trois DNMTs sont la cible de microARNs. Le tableau ci-dessous récapitule de manière exhaustive les microARNs ciblant les DNMTs. Nous pouvons noter que :

- chaque DNMT semble soumise à cette régulation d'expression,
- un même microARN peut cibler différentes DNMTs à l'exemple de miR-148 et de miR-29b,
- l'altération de certains microARNs peut entraîner une méthylation aberrante (quand le microARN est réprimé [170][171]), ou une hypométhylation globale (quand il est surexprimé [172][173]).

Enzyme	DNMT 1	DNMT3a	DNMT3b
microARN	miR-126 [174]	miR-101 [170]	miR-29b [175][172]
	miR-148 [176][173][177]	miR-143 [178]	miR-148 [179]
	miR-152 [176][171][180][181]	miR-29b [172][175]	
	miR-185 [181]	miR-370 [182]	
	miR-342 [183]	miR-450a [184]	

Ainsi, comme introduit en tout début de chapitre, nous pouvons remarquer que les deux mécanismes épigénétiques qui vont nous intéresser par la suite se régulent mutuellement. A l'instar de tous les mécanismes physiologiques, le développement, la croissance et le vieillissement vont mettre en jeu un équilibre dynamique entre ces processus moléculaires afin de maintenir une constante garante de l'homéostasie. Nous allons maintenant nous intéresser aux événements conséquents au déséquilibre dans cette balance et présentant un défaut de méthylation de l'ADN ou d'expression des microARNs.

II. La régulation épigénétique de l'expression génique : la physiopathologie

La majorité des pathologies associées à un défaut de méthylation de l'ADN ou d'expression des microARNs décrits dans la littérature correspond à des syndrômes néoplasiques. Nous décrivons plus en détails la relation entre épigénétique et cancer dans le chapitre suivant, pour nous intéresser ici aux pathologies autres que le cancer. Il est intéressant de constater que la méthylation de l'ADN est un mécanisme physiologique, dépendant d'une part de l'expression d'enzymes particulières (les DNMTs), mais soumise d'autre part à un impact environnemental.

i. Le syndrôme ICF

Le syndrôme ICF (*Immunodeficiency, Centromeric region instability and Facial anomalies*), est la conséquence d'une mutation des deux allèles de DNMT3b [185]. Cette pathologie à une incidence très faible (inférieure à 1/1000000). L'analyse génétique des patients montre que c'est la partie C-terminale et plus précisément la partie portant l'activité catalytique de DNMT3b qui est altérée dans le syndrôme ICF. En effet, les protéines recombinantes portant les altérations présentes chez les patients ICF montrent un défaut d'activité méthyltransférase. Les conséquences de cette perte de fonction sont que les patients présentent une hypométhylation et des réarrangements génomiques au niveau des centromères, des malformations cranio-faciales ainsi qu'une immunodéficience sévère due à un défaut de maturation des lymphocytes B. Ces symptômes conduisent à une espérance de vie réduite, avec un décès survenant généralement dans la petite enfance.

Le syndrôme ICF est à ma connaissance la seule pathologie non-cancéreuse résultant d'une mutation d'une DNMT. Mais la méthylation de l'ADN peut être altérée en réponse à des stimuli environnementaux (Encart 3).

ii. La méthylation de l'ADN et l'environnement

Il est aisé d'imaginer que des facteurs environnementaux tels que les toxines peuvent altérer l'épigénome comme certains le font sur la séquence nucléotidique

Encart 2 – Méthylation et mutations de l'ADN

En plus d'une déméthylation active, les méthylcytosines sont sujettes à la déamination spontanée en thymidine. Ces déaminations sont responsables de la sous-représentation des dinucléotides CpG dans le génome, qui ont été éliminés progressivement durant l'évolution [27][28]. De plus, ce processus est responsable d'un taux élevé de mutations qui peuvent être à l'origine de nombreuses pathologies [29].

de l'ADN (Ultra-violets, adduits, agents intercalant). L'équipe de Skinner a étudié l'effet de l'exposition de vinclozolin (fongicide utilisé en agriculture) sur des rates gestantes dont les embryons étaient au stade de la détermination gonadique [186]. Des défauts des tissus gonadiques ont été recherchés dans les cellules de Sertoli (type cellulaire des *testis*) de la troisième génération de rats (F3). Ces rats montrent une spermatogenèse imparfaite avec une apoptose accrue. Dans les cellules de Sertoli de ces rats, une centaine de promoteurs présente un changement dans leur profil de méthylation. Malheureusement, seulement deux gènes présentent une corrélation directe entre le changement de méthylation de leur séquence et leur expression montrant que ces changements sont soit des altérations « *passenger* » (des altérations qui sont une conséquence et non une cause du changement phénotypique), soit ils agissent de manière indirecte. De plus, aucune analyse génomique n'a été faite excluant du coup l'impact des mutations génétiques qui pourraient en toute évidence jouer un rôle prépondérant dans ces altérations.

Cet exemple d'altération épigénétique en réponse à une molécule environnementale rappelle de nombreuses situations maintes fois décrites en génétique. Mais certains travaux

décrivent une relation qui a représenté pour moi une avancée formidable : l'altération du profil de méthylation d'un individu par des facteurs environnementaux qui ne sont ni chimiques, ni physiques.

En 2013, Labonté *et al.* établissent un lien entre prédisposition au suicide et méthylation de l'ADN [188]. Le suicide est un acte faisant appel à un processus complexe incluant une prédisposition individuelle et de multiples facteurs environnementaux. Cette prédisposition est de plus en plus décrite comme s'appuyant sur une expression génique anormale aboutissant au dérèglement de

Encart 3 – Méthylation et environnement

Les cytosines méthylées sont, comme nous l'avons vu, sujettes à une déamination spontanée qui est à l'origine de nombreuses mutations. Ces cytosines sont aussi la cible des rayonnements UV. Grâce à une gamme d'absorption de longueur d'ondes plus grande que les cytosines non méthylées, ces sites sont particulièrement sujets à une conversion C->T [187]. Ce mécanisme est particulièrement décrit dans le cancer de la peau.

Néanmoins, une des avancées les plus excitantes dans le domaine de l'épigénétique correspond à l'observation de la modification épigénétique de l'ADN par des facteurs sociaux. En effet, la maltraitance durant l'enfance serait capable d'induire une modification épigénétique après l'embryogenèse, aboutissant à un désordre comportemental. Nous nous éloignons ici du schéma bien connu du « telle molécule induit telle altération qui induit tel comportement cellulaire » pour découvrir qu'à l'échelle d'un individu, la méthylation de l'ADN est capable d'induire un changement à long terme de l'expression génique, en réponse à un stimulus « social » (maltraitance) qui n'est ni chimique, ni physique.

comportements émotionnels et cognitifs. Dans leur travail, les auteurs étudient l'épigénome des cellules hippocampiques de personnes étant passées à l'acte, comparé à des personnes décédées ne présentant aucun trouble psychiatrique. Trois cents soixante six promoteurs sont rapportés comme différentiellement méthylés entre les deux groupes (273 hyperméthylés and 93 hypométhylés). L'analyse transcriptomique de ces cellules indique que le niveau de méthylation est inversement corrélé au niveau d'expression génique. L'étude des cellules non-neurales du tissu hippocampique (triées pas cytométrie de flux) indique que ces différences dans les niveaux de méthylation n'y sont pas reproduites. Ainsi, au sein d'un même tissu, deux lignages cellulaires présentent des patrons de méthylation différents (ce qui est en accord avec le principe méthylation de l'ADN type cellulaire-spécifique décrit précédemment) et que le patron de méthylation des neurones hippocampiques des personnes étant passées à l'acte les distingue des personnes exemptes de troubles psychiatriques. Une question reste néanmoins en suspens : ces marques épigénétiques sont-elles héritées et indépendantes du vécu des personnes suicidées, ou est-ce que l'environnement (un terreau social difficile par exemple) a conduit à la modification du patron de méthylation durant leur développement et leur petite enfance ?

En 2004, Weaver *et al.* ont démontré que les soins maternels après la naissance conditionnent la réponse au stress à l'âge adulte, par le biais de l'expression hippocampique du récepteur au glucocorticoïde [189]. Le gène codant pour le récepteur au glucocorticoïde (GR) possède dans son premier exon (non-codant), un promoteur alternatif contenant un site de fixation pour le facteur de transcription NGFI-A. La descendance étant soumise à un comportement « positif » de la mère présente un taux d'ARNm codants pour le GR plus important que la descendance soumise à une absence de traitement à un comportement « négatif » suggérant que l'utilisation de ce promoteur alternatif dépend du comportement maternel dans les jours suivants la naissance. Le site de reconnaissance de NGFI-A contient un dinucléotide CpG qui, après analyse, présente la particularité d'être systématiquement méthylé chez les individus soumis à un comportement négatif de la mère. Les auteurs démontrent légèrement que cette méthylation est indépendante de la lignée germinale en échangeant les portées des rates présentant un comportement négatif et positif dans les heures suivant la naissance. Ainsi, cette altération n'est donc pas héritée mais bien induite par l'environnement post-natal. Enfin, bien que le modèle établi décrit que la méthylation *de novo* intervienne durant l'embryogénèse, les auteurs apportent la preuve que cette marque de méthylation est apposée non pas au stade embryonnaire, mais dans les 6 premiers jours suivant la naissance. Ensemble, ces résultats indiquent que le patron de méthylation peut

directement dépendre d'un stress environnemental, sans incidence de la lignée germinale et que ce patron est mis en place après la naissance. La méthylation de l'ADN serait donc ici présentée comme une marque « malléable », pouvant apporter une plasticité dans le comportement d'un individu (avantageuse ou non) face à son environnement et donne une nouvelle dimension à la théorie de l'évolution darwinienne.

Chez l'Homme, d'autres travaux de Klengel *et al.* montrent la relation entre la méthylation de l'ADN et le risque de développement de syndrômes de stress post-traumatique chez l'adulte. Les auteurs démontrent que les individus exposés à un traumatisme dans la petite enfance présentent une déméthylation de l'exon 7 du gène codant FKBP5 (un régulateur négatif du récepteur au glucocorticoïde), conduisant à une augmentation de sa transcription et à terme augmente la résistance au glucocorticoïde [190]. Chez ces individus, l'établissement d'un syndrôme de stress post-traumatique requiert d'une part une prédisposition génétique (polymorphisme au niveau du 2^{ème} intron du gène codant pour FKBP5) et un stress durant la petite enfance conduisant à la transcription de FKBP5. Des travaux précédents ont montré qu'une transcription par l'ARN Polymérase II précède certains phénomènes de déméthylation [191]. Les auteurs, en étudiant la conformation de la chromatine du gène FKBP5, montrent que Pol II permet le rapprochement physique des exons 2 et 7 et conduirait à la déméthylation de ce dernier et provoquant une surexpression de FKBP5. Les conséquences fonctionnelles à long terme de cette perte de méthylation sont alors une perturbation de la boucle de rétro-inhibition de la réponse au glucocorticoïde par FKBP5 et une hypersensibilité au stress, définis comme un syndrôme de stress post-traumatique.

Ainsi, les preuves s'accumulent pour montrer que l'environnement et le vécu d'un individu peuvent altérer son profil d'expression génique, au-delà de la période embryonnaire. Ainsi, le domaine d'action de la méthylation de l'ADN pourrait ne pas s'arrêter à l'aiguillage des cellules vers un lignage particulier ou au maintien de l'intégrité du génome par la mise en silence des séquences répétée, mais peut être bien à permettre une adaptation (ou être responsable d'une dérégulation comme ici) à long terme d'un individu envers son environnement.

1) bouleversement des patrons de méthylation dans le cancer

L'altération des patrons de méthylation est une marque caractéristique du cancer [192]. De nombreux travaux décrivent la répression durant la carcinogénèse de gènes suppresseurs de tumeurs impliqués dans de différents processus cellulaires (cycle cellulaire, apoptose, maintenance du génome) par hyperméthylation de leurs promoteurs. Paradoxalement, les cellules cancéreuses montrent une hypométhylation globale qui conduit à une instabilité génétique et à la réexpression de gènes normalement réprimés [192][193]. Les mécanismes expliquant ce paradoxe ne sont pas encore pleinement expliqués. Wild and Flanagan illustrent les connaissances actuelles à propos de l'hypométhylation globale associée au cancer [194]. Brièvement, deux hypothèses s'affrontent pouvant expliquer ce phénomène : une hypométhylation « active » en opposition à une hypométhylation « passive ». La première implique un dysfonctionnement du lien entre la modification des histones et l'établissement de la méthylation de l'ADN, une localisation aberrante de DNMT1 à des sites de dommage à l'ADN ou une dérégulation métabolique favorisant une baisse de concentration en S-adenosyl-méthionine. A l'inverse la seconde théorie s'appuie sur un ensemble d'enzymes capables de déméthylation active. Les protéines TET (*Ten Eleven Translocation proteins*) sont décrites comme capables de déméthyliser les méthyl-cytosines par leur oxydation puis leur élimination par différents mécanismes [195](Figure 11). Les TETs facilitent la déméthylation passive par la conversion des méthyl-cytosines en 5-hydroxy-méthylcytosines (5 hmC) aboutissant à une reconnaissance moindre par UHRF1 et DNMT1 (capables de s'associer en complexe) et donc une maintenance moins efficace du patron de méthylation [196,197]. Le deuxième mécanisme implique quant à lui la voie de réparation de l'ADN. Une oxydation supplémentaire des hydroxy-méthylcytosines conduit à un mésappariement qui sera excisé puis remplacé par une cytosine par la *thymine DNA glycosylase* [198,199]. De manière intéressante, des travaux montrent que l'induction de l'expression des protéines TET inhibe la croissance, l'invasion et la dissémination des tumeurs mammaires dans un modèle murin de xénogreffes [200,201]. De plus, la répression de l'expression des TETs dans le carcinome hépatocellulaire corrèle avec un niveau plus faible de 5 hmC et est associée à une survie plus faible [202]. Ensemble, ces observations vont à l'encontre d'un modèle selon lequel les protéines TET seraient responsables de la déméthylation associée à la carcinogénèse.

La protéine AID (*Activation-Induced Cytidine deaminase*) est capable de déaminer les cytosines en uraciles sur l'ADN. Cette réaction chimique conduit chez les

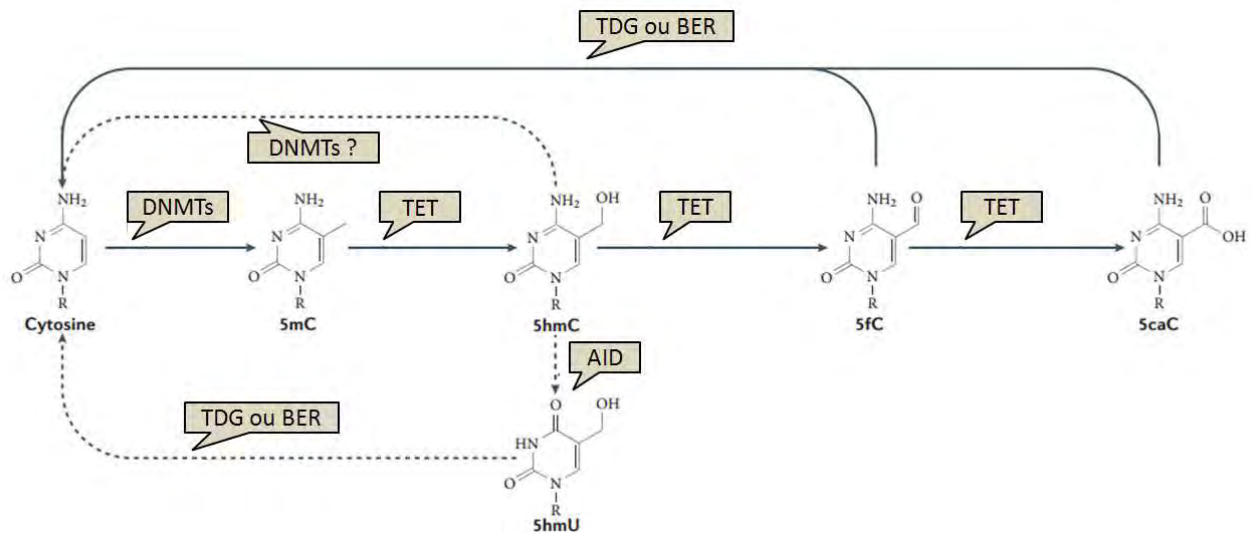


Figure 11 : Modifications des cytosines et mécanismes de déméthylation active (adapté de Pastor *et al.* [195]).

TDG : Thymidine glycosylase ; BER : Base excision repair ; TET : Ten Eleven Translocation proteins ; DNMT : méthyltransférases de l'ADN ; 5mC : 5-méthylcytosine ; 5hmC : 5 hydroxyméthylcytosine ; 5hmU : 5 hydroxyméthyluracile ; 5fC : 5-formylcytosine ; 5caC : 5-carboxylcytosine.

mammifères à un polymorphisme au niveau du locus codant les immunoglobulines, essentiel à la génération d'un vaste répertoire d'anticorps [203]. AID serait aussi impliquée dans la déméthylation active de l'ADN, du fait que la répression de son expression dans des hétérocaryons abolie la déméthylation rapide normalement observée au niveau des promoteurs OCT4 et NANOG [204]. La déamination des cytosines méthylées conduirait ici à un mésappariement qui serait excisé et remplacé par une cytosine non méthylée. Inversement, deux études récentes ont démontré que AID n'a pas ou peu d'implication dans la régulation de la méthylation de l'ADN : sa surexpression et sa répression n'ont pas d'impact visible sur l'état de méthylation du génome de lymphocytes B activés et de manière très intéressante, la méthylation des cytosines réduit fortement l'activité catalytique de l'enzyme, comparé à un substrat de cytosines méthylées [205,206]. Ensemble, ces résultats n'excluent pas forcément la possibilité d'une déméthylation par excision de bases *via* AID, mais soulignent que son rôle est plus probablement très modeste, ou concerne des régions très spécifiques de l'ADN telles que les promoteurs OCT4 et NANOG.

Pour finir, les travaux de Métivier *et al.* ont mis en avant une possible implication DNMT3a et -3b dans la déméthylation de l'ADN, en association avec la machinerie de réparation de l'ADN [140]. Ces deux enzymes sont recrutées au niveau du promoteur du gène pS2, en association avec les enzymes du *base excision repair* et la *Thymine DNA glycosylase* (TDG). Les auteurs démontrent *in vitro* que les

domaines catalytiques de DNMT3a et -3b sont capables de déaminer les cytosines méthylées et non méthylées. Il est important de noter que cette activité est démontrée uniquement sur le domaine catalytique. Elle s'affranchit donc de toutes les régulations possibles par la partie N-terminale de l'enzyme et par tout autre facteur nucléaire absent du milieu réactionnel utilisé. De plus, la déméthylation décrite ici est cyclique et corrèle avec l'activité transcriptionnelle du gène pS2. L'implication d'un tel mécanisme dans les processus de carcinogénèse reste à être démontrée.

En l'absence de résultats indiscutables identifiant une enzyme responsable de la déméthylation du génome dans le cancer, le consensus revient à une déméthylation lente et passive durant la carcinogénèse. A la vue des changements globaux du méthylome, il est peu probable que toutes les modifications aient un rôle de cause-à-effet accompagnant la carcinogénèse. Kalari et Pfeifer décrivent dans leur revue le concept d'altérations moléculaires "*driver*" et "*passenger*" dans le cancer. En effet, l'hyperméthylation de gènes suppresseurs de tumeurs peut être facilement associée à un effet carcinogène et décrit alors comme une altération « *driver* ». A l'inverse, un environnement chromatinien qui prédispose un gène à l'hyperméthylation, indépendamment de sa fonction et sans effet particulier sur la transformation cellulaire sera décrit comme un événement « *passenger* » [207].

2) Altération de l'expression des DNMTs dans le cancer

Malgré l'absence de preuve tangible incriminant les acteurs de la méthylation de l'ADN dans les processus de carcinogénèse, l'altération globale du patron de méthylation est souvent associée à une surexpression des DNMTs, comme décrit dans plusieurs types de tumeurs tels que le pancréas, le colon, le sein et les leucémies aiguës et chroniques [208][209][210][211]. Les mécanismes qui conduisent à la surexpression de ces DNMT sont toujours peu connus. Robertson *et al.* décrivent que le niveau de surexpression des DNMTs dans les tumeurs est toujours débattu, mais qu'une surexpression modeste serait la plus probable [212]. Plusieurs mécanismes expliqueraient la surexpression des DNMTs. Esteller *et al.* ont observé dans différentes lignées cellulaires dérivées de cancers la duplication du gène codant pour DNMT3b. Dans ces lignées, le nombre de copies corrèle avec un niveau plus important d'ARNs messagers et de protéines [213]. De plus le même groupe décrit que la surexpression de DNMT3b se fait par stabilisation de son ARNm dans la lignée d'adénocarcinome colique RKO [214]. En plus d'un niveau plus important de DNMT cellulaire, d'autres mécanismes sont proposés pour participer au

réarrangement du méthylome durant la carcinogénèse. Une dérégulation de la cinétique d'expression des DNMTs durant le cycle cellulaire pourrait aboutir à l'établissement de marques de méthylation en s'abrogeant de leurs mécanismes de régulation conventionnels. De plus, leur mauvaise localisation pourrait conduire au ciblage de mauvaises régions d'ADN ou à des interactions protéine-protéine inappropriées [212].

Enfin, la leucémie myéloïde aigüe est connue pour être fréquemment associée à la mutation de DNMT3a. La mesure de cette fréquence indique que 22% des patients présentent une mutation entraînant une mauvaise traduction de la protéine et que ces mutations interviennent principalement sur l'acide aminé R882. Il est néanmoins surprenant de constater que l'analyse transcriptomique de ces patients ne révèle pas de profil d'expression particulier pour les mutants DNMT3a. Les conséquences fonctionnelles de cette mutation ne sont pas clairement élucidées mais conduisent à une médiane de survie plus courte (12.3 mois vs. 41.1 mois) [215]. Enfin, aucune mutation pour DNMT1, -3b ou 3l n'est retrouvée chez ces patients ce qui suggère une certaine spécificité de la mutation de DNMT3a pour la leucémie aigüe myéloïde.

3) La méthylation de l'ADN, une marque associée au cancer

Comme nous l'avons déjà dit, la méthylation de l'ADN est altérée dans le cancer. L'intérêt de connaître et de comprendre ces altérations est multiple : mieux définir les acteurs et les étapes de la carcinogénèse, découvrir de nouvelles cibles thérapeutiques dont l'expression est modifiée par ces mécanismes épigénétiques et enfin mettre au jour des marques d'intérêt pour le diagnostic et la prise en charge du cancer (Encart 4). Cette section a pour but de

Encart 4 – Les inhibiteurs de la méthylation de l'ADN.

La méthylation de l'ADN peut aussi constituer une cible pour le traitement du cancer. Ainsi, il existe différents inhibiteurs de la méthylation classés en deux catégories : les inhibiteurs nucléotidiques et non nucléotidiques.

La première catégorie comprend l'azacytidine et la decitabine qui sont capables de se lier de manière covalente aux DNMTs et de causer leur déplétion, et la zebularine qui est un inhibiteur non spécifique des DNMTs [216][217][218][219]. Ces trois composés vont cibler les cellules en réplication et interférer avec la machinerie de méthylation de l'ADN.

Les inhibiteurs non nucleotidiques correspondent à la procainamide qui est un inhibiteur spécifique de DNMT1, l'hydralazine et les flavonoïdes (métabolites de plantes qui correspondent aux pigments responsables de leur coloration) qui inhibent indistinctement les trois DNMTs [220][221][222].

À l'exception de la Zebularine et de la procainamide, tous ces composés font l'objet d'essais cliniques concernant des cancers tels que la leucémie myéloïde aigüe, le cancer du sein, ou de la prostate (Cf. annexe 2).

donner un aperçu rapide et non-exhaustif des marques de méthylation les plus souvent décrites dans la littérature.

a) Les gènes hyperméthylés dans le cancer

Cycling Dependent Kinase Inhibitor, P16 ink4a

P16ink4a est un gène suppresseur de tumeur impliqué dans la régulation du cycle cellulaire. Il inhibe la formation du complexe activateur de la transcription E2F–DB active et induit la formation du complexe répresseur Rb–E2F. Ceci prévient la transcription E2F-dépendante et bloque la progression dans le cycle cellulaire dans la phase G₁/S [223]. P16ink4a est retrouvé hyperméthylé dans différents cancers (foie, poumon) mais notamment dans le sérum de 27% des patients porteurs d'un cancer colorectal, avec une sensibilité de 70% et une spécificité 100% [223][224][225][226].

O6-methylguanine-DNA-methyltransferase, MGMT

La protéine MGMT contribue à la réparation de l'ADN : la réparation s'opère en une seule réaction qui induit le transfert d'un groupement méthyle d'une O⁶-méthylguanine sur le site actif de la molécule MGMT. Ceci résulte en la restauration de la guanine endommagée sur l'ADN et la destruction de MGMT [227]. Cette protéine joue un double rôle dans le cancer : sa perte d'expression facilite les dommages à l'ADN et favorise le cancer alors que sa surexpression est en partie responsable de la chimiorésistance de certaines tumeurs. Quarante pour cent des tumeurs cérébrales ainsi que 46% des cancers colorectaux subissent une répression épigénétique du gène codant pour MGMT [228][229].

Glutathione S-transferase Pi 1, GSTP1

GSTP1 participe à la détoxification cellulaire en éliminant les composés exogènes en les conjuguant à une glutathionne [230]. De nombreux travaux montrent une expression altérée de GSTP1 dans différents cancers et son implication dans les phénomènes de chimiorésistance envers les agents thérapeutiques [231][232][233]. La perte d'expression de GSTP1 par hyperméthylation de son promoteur est présent dans 73% cancers de la prostate ainsi que dans les cancers mammaires et les lymphomes à cellules B [234][235][236][231].

MutL Homolog 1, MLH1

Le gène MLH1 code pour une protéine impliquée dans la machinerie de réparation des mésappariements de bases de l'ADN. Les événements d'insertion, de délétion et de mésappariements sont à l'origine d'erreurs de réplication de l'ADN et sont reconnus et corrigés par la machinerie de réparation des mésappariements (*DNA mismatch repair pathway*, MMR) [237][238]. Le gène codant pour MLH1 est fréquemment hyperméthylé dans le cancer du colon (86% of cases) en association avec une instabilité microsatellitaire [239]. La méthylation aberrante de cette région à aussi été décrite à de plus faible fréquences dans le cancer de l'utérus (37.5% des tumeurs primaires) et dans le cancer de l'ovaire (8% des patients) [240][241][242].

Breast Cancer Type 1 Susceptibility Protein, BRCA1

BRCA1 est impliqué dans la réparation des cassures doubles brin de l'ADN par la reconnaissance et la signalisation des cassures et participe à leur réparation par son interaction avec de nombreux cofacteurs [243]. La répression de l'expression de BRCA1 par hyperméthylation de son promoteur est décrite dans le cancer du sein (13% des cas), mais cette incidence varie suivant le sous-type de la tumeur pouvant alors varier entre 55 et 67% [242][244][245]. De plus, BRCA1 est hyperméthylé dans 31% des cancers de l'ovaire avec une perte d'hétérozygotie à ce même locus [244].

b) Les gènes hypométhylés dans le cancer

Comme nous l'avons vu, l'hypométhylation de l'ADN est fréquemment retrouvée au niveau des séquences répétées du génome [194]. Pendant longtemps, la découverte d'un biomarqueur reposait sur l'observation d'un changement dans l'expression d'une protéine et la recherche du mécanisme associé. Comme l'hypométhylation de l'ADN associée au cancer a plutôt lieu dans des régions pauvres en gènes, son intérêt pour le diagnostic du cancer a longtemps été négligé. La *S100 calcium-binding protein P* (S100p) stimule la prolifération cellulaire et la survie. Son hypométhylation a été retrouvée dans 100% des échantillons d'une petite cohorte de cancer du pancréas [246]. A une plus faible fréquence, cette même hypométhylation est décrite dans 50% des tumeurs de la prostate [247]. Enfin, le *Long Interspaced Nucleotide Element* (LINE-1) est une séquence répétée ancestrale contenant une forte concentration de CpG. Dans leurs travaux, Ogino *et al.* rapportent que dans une collection de 643 échantillons de cancers coliques, l'hypométhylation de LINE-1 est associée de manière indépendante à une survie plus courte des patients [248].

Les gènes soumis à l'empreinte génomique

A ce jour, près de 90 gènes soumis à l’empreinte parentale ont été clairement décrits chez l’Homme et contrôlent des processus cruciaux du développement embryonnaire [128]. Comme la carcinogénèse a un impact sur tout le méthylome, il est facile d’imaginer que les gènes soumis à l’empreinte ne soient pas épargnés. En effet, la perte de l’empreinte génomique des gènes *Insulin-like Growth Factor II* (IGF2) et de la région codante pour l’ARN non codant *H19* est décrite dans 100% des leucémies myéloïdes chroniques, 80% des cancers de l’ovaire, 66% des cancers colorectaux, 56% des cancers de l’œsophage, 50% des carcinomes rénaux, 47 à 85% des cancers du poumon et 30% des méningiomes [249].

Le but ici n’est pas de répertorier toutes les marques de méthylation altérées dans le cancer (ce qui serait de toute manière impossible avec l’arrivée des techniques de séquençage haut-débit) mais plutôt d’illustrer le fait que ces marques souvent décrites, ciblent des mécanismes moléculaires communs à presque tous les cancers. Il est donc crucial pour la suite de garder à l’esprit que :

- les marques couramment décrites sont le fruit de recherches ciblant des gènes d’intérêt (et le plus souvent leur promoteur), souvent altérés dans différents cancers,
- l’altération des patrons de méthylation dans le cancer ne s’arrête pas à ces quelques marques. En effet, les techniques de séquençage haut-débit permettent d’étudier des régions encore peu décrites (intergéniques ou intragéniques) et élargissent de manière considérable ce champ d’investigation.

c) La méthylation de l’ADN pour le diagnostic du cancer

L’amélioration des techniques d’études de la méthylation de l’ADN a permis de mettre en lumière une profusion de marques de méthylation associées au cancer [250][251]. Parce que des outils diagnostiques existent déjà pour la majorité des cancers, l’utilisation de la méthylation de l’ADN comme marqueur diagnostique doit impérativement apporter une amélioration pour sa validation par les autorités sanitaires (afin d’éviter la labellisation d’outils redondants). Ils doivent montrer une meilleure sensibilité ou spécificité que les standards actuels, ou permettre un diagnostic par des techniques moins invasives pour améliorer la prise en charge du patient. De ce fait, l’intérêt de la méthylation de l’ADN pour le diagnostic de cancers pour lesquels des outils diagnostiques sont déjà validés est faible.

Mais bien que modeste, leur intérêt est bien présent : McCluskey *et al.* rapportent par exemple que les différences dans le niveau de méthylation du gène *p16* permet de

faire la distinction entre les tumeurs ovariennes bénignes et malignes et que le promoteur distal de ce gène est méthylé dans 33% des tumeurs bénignes et dans 5% des carcinomes [252]. De la même manière, notre groupe a montré que le niveau de méthylation de miR-148a permet le diagnostic différentiel entre adénocarcinome pancréatique et pancréatite chronique, deux pathologies de pronostic et de prise en charge très différents [253].

i. Pour le diagnostic précoce et le dépistage du cancer

La détection précoce et le dépistage du cancer en l'absence de symptômes spécifiques représentent tous les deux un besoin crucial dans le domaine de la cancérologie. Tous deux exigent les mêmes critères de spécificité et de sensibilité mais auxquels s'ajoutent d'autres pré-requis. Non seulement l'altération doit avoir lieu très tôt durant la carcinogénèse, mais de plus, une vaste proportion de candidats sera négative pour le test car non-porteurs de tumeurs. De ce fait, le test nécessite de reposer sur des échantillons obtenus de manière non-invasive pour être acceptable par le patient. Pour un dépistage, une haute sensibilité sera requise pour ne pas écarter les vrai-positifs. Différents travaux ont eu pour but de montrer la faisabilité de la détection de marques de méthylation par des procédures non-invasives. Par exemple, Fujiwara *et al.* ont montré que le profil de méthylation de 5 gènes dans le sérum de patients permet la détection précoce du cancer du poumon : ainsi, quand au moins un des 5 gènes est hyperméthylé la spécificité est de 85% [254].

ii. Comme outil diagnostique « augmenté »

En marge du diagnostic du cancer, la classification des tumeurs a lieu après son identification et donne des informations importantes à propos de l'agressivité, du potentiel métastatique, du pronostic ou de la chimiosensibilité de la tumeur. De même que pour le diagnostic, cette classification s'appuie sur des marqueurs (cytologiques, moléculaires ...) afin de déterminer précisément l'origine cellulaire de la tumeur et les altérations qu'elle porte. Ici, la méthylation de l'ADN peut servir d'outil très puissant pour une classification plus résolutive de ces tumeurs. Par exemple, l'étude haut-débit de 67487 sondes ciblant des cytosines méthylées dispersées sur le génome dans 49 échantillons de leucémies lymphoblastiques aiguës (ALL) permet de séparer ces patients en différents groupes de pronostics différents [255]. L'ALL est décrite comme une pathologie très hétérogène montrant un fort degré de différenciation des lignages cellulaires. Figueroa *et al.* ont classé ces 344 patients en 16 groupes selon le profil épigénétique de 15 gènes. Parmi ces groupes, 5 montrent un profil original associé à un pronostic différent des autres groupes [256]. La

création de ces 5 nouveaux groupes permet donc une classification plus résolutive que celle délivrée par cytologie.

Au-delà de l'identification et de la classification des tumeurs, la prédiction de la réponse aux traitements représente une utilisation intéressante de la méthylation de l'ADN. De tels biomarqueurs prédictifs permettraient un suivi personnalisé du patient et le choix des options thérapeutiques selon un profil de méthylation. Par exemple, l'hyperméthylation de MGMT dans 40% des gliomes est associée à leur résistance aux agents alkylants conventionnels [228].

La complexité et l'abondance des marques épigénétiques fournies par les approches haut-débit ouvrent la voie à des nouveaux marqueurs, répondant à des besoins différents. A la vue de ces études préliminaires, il est facile d'imaginer la combinaison de tels marqueurs pour permettre un diagnostic « augmenté » du cancer, non invasif, couplé à la classification de la tumeur, au stade d'invasion, au pronostic du patient et aux options thérapeutiques recommandées, le tout en une seule étape.

4) Les microARNs, acteurs de la carcinogénèse

Le spectre d'action des microARNs, régulant près de la moitié des protéines, en fait une cible de choix pour la dérégulation globale des processus cellulaires. Différents acteurs de la machinerie de biogenèse des microARNs ont été retrouvés altérés dans différents cancers : DICER est réprimé dans le cancer du poumon et du sein et est associé à un mauvais pronostic [257,258]. Ceci est intéressant sachant que Lu *et al.* ont démontré que le profil d'expression des microARNs est capable de classifier les tumeurs entre elles et que le cancer est associé à une baisse générale du niveau d'expression des microARNs comparé au tissu sain [259]. Les protéines Argonautes sont aussi associées au cancer et les protéines AGO1 et 2 sont surexprimées dans l'adénocarcinome rénal. Cette caractéristique est aussi associée à un mauvais pronostic [260]. Ceci est contradictoire avec l'inhibition de la machinerie de biogenèse des microARNs suggérée par la répression de DICER (mais non démontrée dans ces travaux) et laisse entendre un mécanisme tissu spécifique, dépendant du profil d'expression génique propre à chaque type cellulaire. Néanmoins, cette surexpression est retrouvée dans le carcinome cutané où DGCR8, AGO1, AGO2, PACT et TARBP1 ont un niveau d'expression plus élevé que dans le tissu sain [261].

En marge de l'altération générale de leur machinerie de biogenèse, certains microARNs possèdent une activité oncogénique (appelés oncomiRs) ou suppresseur

de tumeur. La première piste indiquant que les microARNs pouvaient avoir un rôle suppresseur de tumeur vient de Calin *et al.* qui rapportent la délétion ou la répression de deux clusters codants pour des microARNs dans la leucémie chronique lymphocytaire [262]. D'autres travaux ont démontré plus tard que des proto-oncogènes tels que Ras ou BCL2 étaient modulés par des miRs et que leur perte d'expression favorisait la transformation cellulaire [263,264]. A l'inverse, certains oncomiRs sont surexprimés dans le cancer et ciblent des gènes suppresseurs de tumeurs. MiR-21 est surexprimé dans de multiples types de tumeurs et cible les gènes ANP32A et SMARCA4 qui sont tous deux des régulateurs de l'état de la chromatine [265–269]. De même, l'oncomiR miR-155 est fréquemment surexprimé dans différentes tumeurs tels que le cancer du pancréas, le cancer du sein et le lymphome à cellules B [270–272].

En plus de l'altération de la machinerie de maturation des microARNs, la méthylation de l'ADN participe à la répression de leur expression [273]. Saito *et al.* ont été les premiers à détailler la relation entre la répression de miR-127 et hyperméthylation de l'ADN [274]. D'autres groupes montrent des résultats similaires avec mir-9-1, mir-124a3, mir-148a, mir-152 et mir-663 dans 34 à 86 % des cancers du sein [275]. Pareillement, Wong *et al.* ont montré que le promoteur de miR-34a est hyperméthylé dans 18% des lymphomes non-Hodgkiniens [276].

Il est crucial de noter, à l'issue de ce chapitre que l'altération des mécanismes épigénétiques dans le cancer est fréquente (hypométhylation globale de l'ADN associées à une hyperméthylation locale), fait intervenir différents mécanismes (mutations ponctuelles, méthylation de l'ADN, altération de l'expression des microARNs) et que ces mécanismes altérés peuvent interagir entre eux (méthylation des séquences codantes pour des microARNs par exemple). Ceci donne un aperçu succinct du bouleversement colossal des processus cellulaires au cours de la carcinogénèse. Parmi les cancers présentant ces altérations, notre équipe rattachée au département de gastroentérologie du CHU Toulouse Rangueil, s'intéresse tout particulièrement à l'adénocarcinome pancréatique.

III. La carcinogénèse pancréatique

L'adénocarcinome pancréatique (AP) est la quatrième cause de décès par cancer dans les pays occidentaux alors qu'il ne représente que 3% des nouveaux cas de cancers chaque année [277]. Le tabac, le diabète et la pancréatite chronique sont décrits comme des facteurs de risque de l'AP [278]. Néanmoins, aucune population à risque n'a été clairement définie. Ainsi, le dépistage de l'AP avec les techniques d'imagerie actuelle n'est possible que pour les familles présentant une prédisposition ou pour les patients suivis pour d'autres pathologies pancréatiques. L'AP est diagnostiqué le plus souvent à un stade avancé du fait de l'absence de symptômes spécifiques à cette maladie (douleurs abdominales, perte de poids, ictère) [279]. Près de 60% des patients présentent un AP avancé au moment du diagnostic et ne sont donc pas éligible pour la chirurgie, impliquant une médiane de survie de seulement 3 à 6 mois [277]. En effet, la résection n'est possible que suivant certains critères comme la condition physique générale du patient, la localisation de la tumeur, sa taille et le degré d'invasion locale. Ainsi, l'amélioration du pronostic de l'AP nécessite absolument de détecter et de traiter ce cancer avant sa dissémination [279].

Afin d'améliorer la prise en charge de ce cancer, de nombreux efforts de recherche se sont concentrés sur la compréhension des événements qui interviennent dans les premières étapes de la carcinogénèse pancréatique. Nous allons ici décrire les principales lésions prénéoplasiques menant à l'AP, puis présenter les altérations moléculaires associées à l'AP et à ses lésions précurseurs.

1) Les lésions prénéoplasiques du pancréas

A ce jour, trois types de lésions précurseurs de l'adénocarcinome pancréatique ont été décrits et caractérisés. L'étude de ces lésions présente deux intérêts principaux :

- détecter et prendre en charge l'AP avant qu'il ne devienne invasif et inopérable,
- mieux comprendre la carcinogénèse pancréatique et les altérations moléculaires qui y sont associées, afin de développer de nouvelles thérapies.

Le développement de ces lésions est la plupart du temps asymptomatique, ainsi leur observation se fait en association des tumeurs pancréatiques [278]. La progression séquentielle de ces lésions est toujours débattue du fait de l'impossibilité de les détecter assez tôt et de pouvoir suivre leur évolution. De ce fait, la majorité des

études menées le sont sur des tissus opérés et fixés. Brièvement, ces observations tendent à confirmer que :

- les lésions des canaux pancréatiques sont beaucoup plus fréquentes dans les pancréas avec un adénocarcinome infiltrant [280][281],
- ces lésions sont de grade plus avancé à proximité de la tumeur [281],
- le peu de patients diagnostiqués pour des lésions précurseurs de l'AP et qui ne sont pas opérées développent des AP [280][281].

i. Pancreatic intraepithelial neoplasia (PanIN)

Les PanINs sont des lésions microscopiques des canaux pancréatiques mesurant en général moins d'un centimètre et sont localisées le plus souvent dans la tête du pancréas. Cette petite taille les rend difficilement détectable par Imagerie par Résonance Magnétique (IRM) ou tomographie par densitométrie. Leur observation est en général fortuite et concomitante à la résection de la tumeur. Les PanINs sont classées en trois grades: PanIN 1 (qui sont subdivisées en PanIN 1A et PanIN 1B), PanIN 2 et PanIN 3/cancer *in situ* (Figure 12). Cette classification est basée sur le degré d'atypie architecturale et cytologique. Brièvement, les épithélia plats et normaux des canaux secondaires vont peu à peu adopter une forme papillaire jusqu'à montrer une atypie cellulaire sévère, un taux de mitose accru qui précède le cancer invasif [278]. Les PanINs sont les lésions prénéoplasiques les plus fréquentes et sont observées dans 82% des cancers avec une tumeur pancréatique [281]. Les PanINs de bas grade semblent être des lésions assez communes, retrouvées dans 16-80% des pancréas normaux sains, alors que les PanINs de haut grade sont presque exclusivement associées à une tumeur pancréatique [281][282][283][284]. De plus, il est proposé que seulement 1% des PanINs évoluent en AP [285]. Ainsi, il serait possible que les PanINs de bas grade ne soient que des lésions bénignes en l'absence de mutations clés. Ces mutations essentielles pourraient favoriser la transition entre PanIN-1 et PanIN-2, empêchant ces lésions de se résorber et les engageant sur une « voie sans retour » vers l'AP. Un modèle murin exprimant constitutivement l'oncogène K-RAS muté G12D développe ces lésions PanINs et constitue un modèle de choix pour leur étude *in vivo* [286][287].

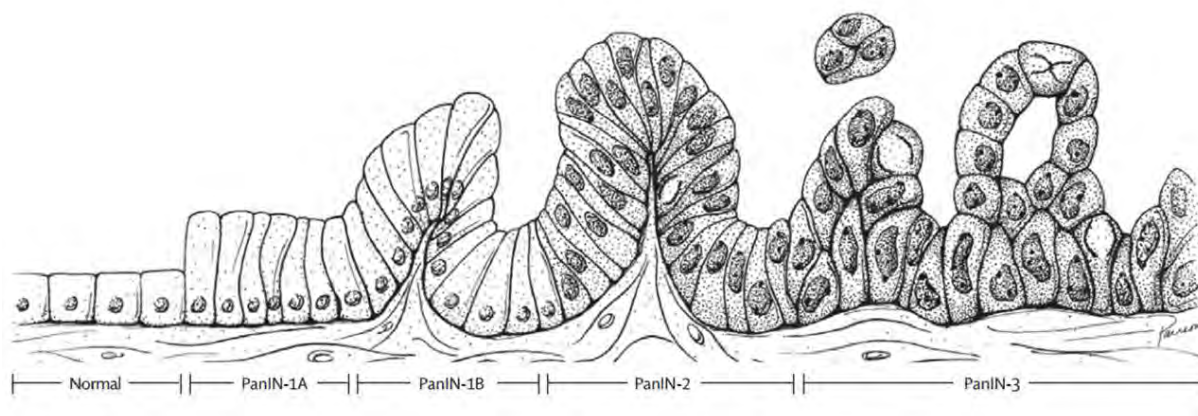


Figure 12 : Modèle de progression du canal normal vers une lésion PanIN (Adapté de Vincent *et al.* [288]).

i. Intraductal papillary mucinous neoplasms (IPMN)

Les IPMNs sont beaucoup moins fréquentes que les PanINs et sont responsables de 3-5% des tumeurs pancréatiques [289]. Les IPMNs sont divisées en adénome, tumeur borderline et carcinome selon le plus haut degré de dysplasie observé (Figure 13) [290]. Elles correspondent à de larges lésions avec une architecture papillaire digiforme, d'une taille supérieure à 1 cm et délimitées par un épithélium sécrétant de la mucine [291][292]. A la différence des PanINs, les IPMNs communiquent avec le canal principal. Le cancer invasif apparaît dans 20-50% des IPMNs et est localisé dans le canal pancréatique principal ou dans ses branches secondaires [289]. Il existe des critères anatomiques basés sur la localisation de la lésion dans l'organe. Ainsi les IPMNs sont classées en trois groupes : les IPMNs du canal principal, les IPMNs des canaux secondaires et les IPMNs mixtes [293]. Les connaissances actuelles sur les IPMNs indiquent qu'environ 70% des IPMNs progressent vers le cancer invasif [293]. La chirurgie représente le seul traitement curatif pour ces lésions [293]. Le suivi à long terme des patients opérés indique une survie à 5 ans de 88% pour les IPMNs bénins et non-invasifs et entre 36-60% pour les cancers invasifs [293][294].

Les PanINs et les IPMNs montrent les mêmes caractéristiques histologiques et moléculaires et la distinction entre ces deux types de lésions repose sur leur taille et leur localisation. Suivant l'origine de ces lésions (canal principal ou les canaux périphériques) les PanINs et les IPMNs pourraient être considérées comme des lésions semblables mais avec des pronostics différents. De plus, un modèle transgénique murin surexprimant K-RAS G12D et le TGF alpha développe des lésions PanINs, mais aussi des lésions cystiques ressemblant aux lésions IPMNs humaines, suggérant une origine commune pour ces deux types de lésions [295].

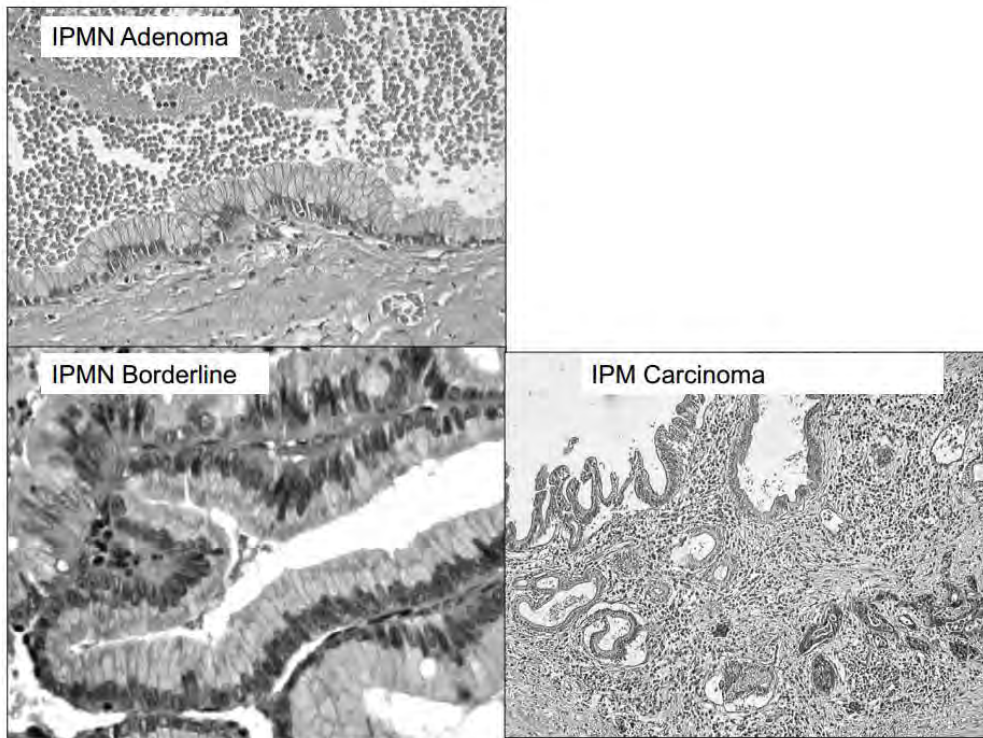


Figure 13 : Observations microscopiques de lésions IPMNs (Delpu *et al.* [296]).

i. Mucinous Cystic Neoplasms (MCN)

Les MCNs sont de rares et grosses lésions néoplasiques (1 à 3 cm) sécrétant des mucines [291]. Ce type de lésions est délimité par un épithélium « mucine sécrétant » et montre un stroma ovarien caractéristique sous la couche épithéliale, séparant la lésion du canal pancréatique principal (Figure 14). Pour des raisons inconnues, les MCNs sont plus fréquents chez la femme (ratio 20 pour 1). Les MCNs sont classés selon leur degré de dysplasie : les cystadénomes mucineux, les néoplasmes mucineux cystiques *borderline* et les néoplasmes cystiques avec carcinomes *in situ* [297]. A cause de leur taille et de leur localisation, ces lésions sont souvent associées à des symptômes non spécifiques comme des douleurs abdominales. Environ 20% des MCNs sont associés à un adénocarcinome [289]. Tous les MCNs progresseraient vers un cystadénocarcinome mucineux qui présente une résecabilité très faible et un très mauvais pronostic [293]. Le taux de survie à 5 ans des patients opérés pour un MCN en l'absence de cancer est proche de 100% et tombe à 60% quand d'autres néoplasies adjacentes sont observées [298]. Izeradjene *et al.* ont démontré que des souris exprimant K-RAS(G12D) et invalidées pour Smad4/Dpc4 développent des néoplasies cystiques du pancréas dans le corps et la tête du pancréas en plus de PanINs de bas grade [299]. De par leur taille importante, les IPMNs et les MCNs peuvent être détectés plus tôt grâce à l'IRM et la tomodensitométrie et donc présentent un meilleur pronostic que les lésions PanINs.

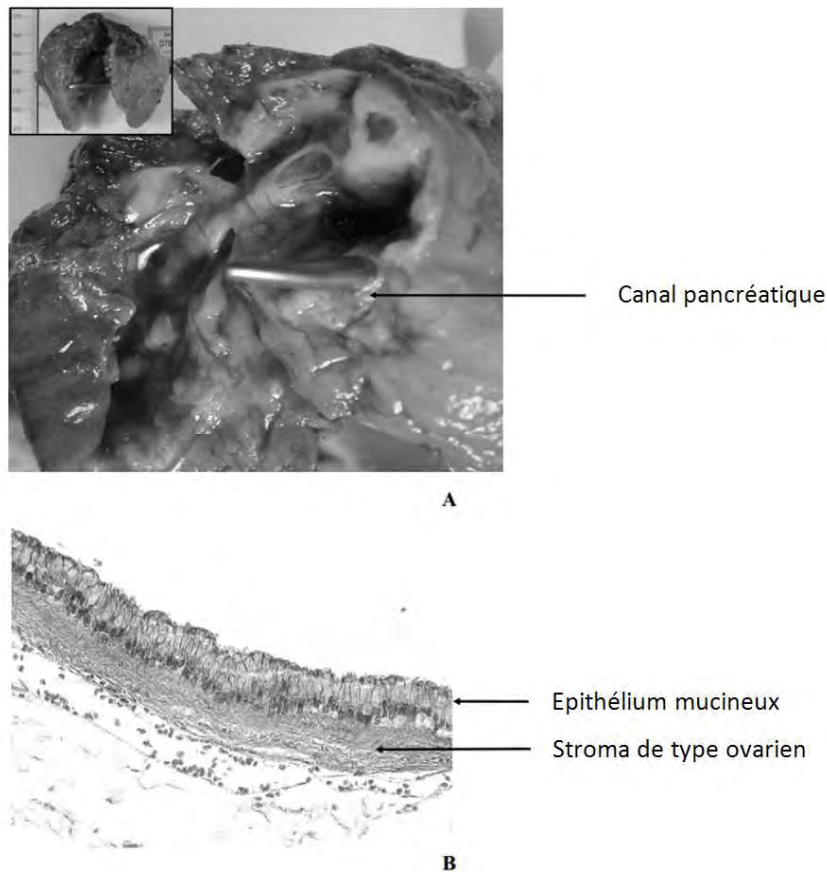


Figure 14 : Observations macroscopique et microscopique de lésions MCNs (Delpu *et al.* [296]).

i. L'origine cellulaire des lésions prénéoplasiques du pancréas

Les trois types de lésions précurseurs de l'AP présentent des caractéristiques de cellules épithéliales mais leur origine cellulaire est encore sujette à débat.

Chez la souris, l'induction de lésions du tissu pancréatique conduit à une dédifférenciation transitoire des acini en cellules mésenchymateuses, qui prolifèrent et se redifférencient pour effectuer une régénération partielle du tissu [300]. Chez les souris portant la mutation K-RAS G12D ce processus semble altéré et la redifférenciation ne s'opère pas, conduisant alors à la formation de métaplasies acino-canaliaires puis à des lésions précurseurs de l'AP telles que les PanINs [300]. L'implication de cellules pancréatiques immatures dans la carcinogénèse pancréatique soulève la question de l'existence de cellules souches cancéreuses pancréatiques (CSC).

Généralement, les cellules souches constituent une population cellulaire rare caractérisée par sa capacité d'auto-renouvellement, la présence de marqueurs de surface spécifiques et la capacité d'efflux cellulaire par les canaux MDR (*multi-drug*

resistance). De plus ces cellules donnent lieu à différents lignages cellulaires [301][302][303][304]. Les cellules souches cancéreuses dériveraient de cette population particulière, pour acquérir un phénotype légèrement transformé décrit comme la « déviation minimale » [302].

Des CSCs ont été identifiées dans le cancer du sein, la leucémie myéloïde et les cancers du colon et de la prostate [305]. Leur identification dans le cancer du pancréas s'appuie seulement sur la présence de marqueurs de surface et l'up-régulation de la voie *Sonic Hedgehog* (SHH), participant au mécanisme d'auto-renouvellement [306]. Zhou *et al.* décrivent une capacité d'efflux dans une sous-population des cellules PANC-1 mais aucun résultat *in vivo* ne vient étayer leurs observations [302][303][304][305][306][307]. Si la capacité d'efflux, leur localisation et la rareté de ces cellules dans la tumeur contribue à expliquer leur résistance aux thérapies conventionnelles, ces observations ne font que suggérer un caractère souche de ces cellules et d'autres travaux seront nécessaires pour valider cette hypothèse. De plus, l'existence de cellules souches cancéreuses pancréatiques implique l'existence de cellules souches pancréatiques chez l'adulte, desquelles elles pourraient dériver. A ce jour l'existence de telles cellules est toujours sujet à discussion [300][308]. D'un autre côté, il est aussi possible qu'une telle population « souche » pourrait plutôt dériver d'une sous-population de cellules acinaires dédifférenciées et incapables de se différencier en cellules canaliculaires. De plus, la présence de cellules souches adultes effectuant cette déviation minimale et évoluant irrémédiablement vers l'AP est contradictoire avec l'observation fréquente des PanINs de bas grade dans les pancréas normaux. Nous pouvons alors proposer que ces « cellules souches cancéreuses » proviennent d'une dédifférenciation accidentelle durant la régénération pancréatique. Leur statut de cellules mésenchymateuses leur permettrait alors de migrer, d'aller coloniser d'autres niches et d'entrer en quiescence. De ce fait, la présence de ces cellules pancréatiques dédifférenciées dans les marges de résection expliquerait la rechute fréquente des patients opérés.

2) Altérations épigénétiques des lésions prénéoplasiques du pancréas

L'évolution séquentielle depuis une lésion précurseur vers l'AP implique l'accumulation de diverses altérations moléculaires. De telles altérations fournissent de précieux indices pour comprendre le développement de l'AP et améliorer sa détection et son pronostic. Néanmoins, très peu de données sont disponibles sur la

cinétique d'apparition de ces événements moléculaires. Aujourd'hui, la mise au point de modèles murins développant les lésions précurseurs de l'AP et les progrès dans les approches de séquençage haut-débit génèrent de précieuses données sur les patrons de méthylation et les mutations ponctuelles accompagnant la carcinogénèse pancréatique.

Bien que la carcinogénèse pancréatique soit accompagnée de changements génétiques (tels que des remaniements chromosomiques ou des mutations ponctuelles, Encart 5), j'ai choisi ici de traiter principalement des altérations épigénétiques.

Comme décrit précédemment, la surexpression de proto-oncogènes dans le cancer peut être liée à l'hypométhylation de leur séquence génomique. En utilisant des lignées cellulaires et des échantillons tumoraux, Sato *et al.* ont analysé le statut de méthylation d'un groupe de 18 gènes précédemment décrits comme surexprimés dans le cancer du pancréas [309]. Les auteurs montrent que des gènes tels que ceux codants pour la mésotheline et la claudine 4 sont fréquemment hypométhylés dans l'AP (92% and 89% respectivement) et que leur niveau de méthylation corrèle avec leur niveau d'expression.

A l'inverse, l'hyperméthylation est responsable de l'inactivation de nombreux gènes suppresseurs de tumeurs et peut intervenir indépendamment ou en plus de mutations intragéniques [309][310][311]. Comme exemple, P16 est aussi bien sujet à des mutations qu'à une hyperméthylation aberrante de sa séquence génomique alors que *Cyclin D2*, *SOCS-1* et *APC* sont des suppresseurs de tumeurs inactivés uniquement par hyperméthylation de leurs promoteurs dans l'AP [312][313][314]. En comparant l'intégralité du méthylome d'AP et de tissus sains grâce à une approche haut-débit, Omura *et al.* ont déterminé que *MDF1*, *miR-9-1*, *ZNF415*, *CNTNAP2* et *EVOLV-4* sont les loci les plus fréquemment méthylés parmi 88000 sondes testées

Encart 5 - Les mutations génétiques dans l'AP

L'AP est aussi bien sûr sujet à de nombreuses altérations géniques qui peuvent correspondre à de larges remaniements chromosomiques ou à des mutations ponctuelles. Nous décrivons en détails ces altérations dans l'annexe 2, mais nous pouvons aussi citer les principales.

Par exemple, l'amplification du gène codant le récepteur à l'EGF est un événement précoce de la carcinogénèse pancréatique et est retrouvée chez 65% des patients. Par ailleurs, les approches haut-débit actuelles ont permis de mettre en évidence 144 régions étant la cible de remaniements chromosomiques, parmi lesquels celles codant pour p16INK4A, TP53, MYC, K-RAS2 et AKT2.

Parmi les mutations ponctuelles, les plus décrites correspondent aux gènes KRAS (muté dans 60 à 95% des AP), B-RAF (7 à 15%), p16 (95%), SMAD4/DPC4 (55%), p53 (75%). Pour la plupart, ces mutations interviennent très précocement dans la carcinogénèse pancréatique (dès le stade PanIN). Il est ici important de remarquer que p16 est à la fois la cible de remaniements chromosomiques, de mutations ponctuelles et d'inactivations par hyperméthylation de sa séquence génomique.

[311]. Il est intéressant de noter que seuls miR-9-1 et CNTNAP2 avaient été reliés à l'initiation ou à la progression du cancer.

Dans les PanINs, 8 gènes (*CDH3*, *reprimo*, *CLDN5*, *LHX1*, *NPTX2*, *SARP2*, *SPARC* et *ST14*) ont été rapportés comme différentiellement exprimés entre un épithélium normal et les lésions PanINs [315]. Pour ces gènes, le patron de méthylation varie durant l'évolution des PanINs montrant que l'hyperméthylation de l'ADN est un évènement intervenant très tôt dans la carcinogénèse pancréatique et que sa prévalence augmente progressivement en accord avec la carcinogénèse. Des résultats similaires ont été trouvés dans les IPMNs concernant un autre groupe de gènes : P16, ppENK, P14, P15, P17, APC, hMLH, E-Cadherin et MGMT [316]. Malheureusement, aucune donnée n'est disponible à ce jour concernant le statut de méthylation des MCNs. Ensemble, ces résultats concordent avec la surexpression de DNMT1 dans les PanINs et suggèrent que la méthylation précoce de certains loci est nécessaire à la progression de lésions précurseurs et ne serait pas simplement une conséquence de la carcinogénèse [317].

En plus des gènes suppresseurs de tumeurs, l'hyperméthylation de l'ADN intervient dans les régions spécifiques codantes pour des microARNs.

3) Altérations de l'expression des microARNs dans le cancer du pancréas

Différentes études ont montré la dérégulation de l'expression des microARNs dans l'AP. En 2006, Lee *et al.* ont étudié l'expression de plus de 200 précurseurs de microARNs dans une collection d'AP. Les auteurs rapportent que la moitié d'entre eux sont exprimés de manière aberrante dans les échantillons tumoraux comparé aux tissus sains et pouvaient permettre de les distinguer [318]. Parmi eux, nous retrouvons différents oncomiRs tels que miR-21 et miR-155 dont la dérégulation d'expression est retrouvée dans d'autres cancers. Les auteurs rapportent que la tendance générale dans l'AP correspond à une surexpression des microARNs comparé au tissu sain. Nous pouvons noter que ceci va à l'encontre de la baisse générale rapportée dans différents cancers et discutée précédemment.

Une autre approche a été utilisée par Szafranska *et al.* l'année suivante et consiste en l'hybridation des ARNs sur puce pour une lecture parallèle des niveaux d'expression de tous les microARNs connus à l'époque [319]. En comparant pancréas sains et AP, les auteurs fournissent une liste de microARNs les plus significativement dérégulés. Parmi eux, hsa-miR-29c, -30a-3p, -96, -130b, -141,-

148a, -148b, -216, -217, -375 et -494 sont réprimés plus de 5 fois et miR-31, -143, -145, -146a, -150, -155, -196a,-196b, -210, -222 et miR-223 sont fortement enrichis dans le cancer du pancréas.

Bloomston	Szafranska	Lee	Bloomston	Szafranska	Lee
Surexprimés			Réprimés		
miR-10	miR-145	let-7d		miR-29c	miR-139
miR-103	miR-150	let-7f-1		miR-30a-3p	miR-142-P
miR-107	miR-196	miR-15b		miR-96	miR-345
miR-125a	miR-31	miR-16-1		miR-130b	
miR-181c		miR-21		miR-141	
miR-181d		miR-212		miR-216	
miR-199a-1		miR-24		miR-217	
miR-199a-2		miR-301		miR-494	
miR-205		miR-376a	miR-148a	miR-148a	
miR-21		miR-424	miR-148b	miR-148b	
miR-213		miR-92-1	miR-375	miR-375	
miR-220					
miR-23					
miR-99					
miR-100	miR-143	miR-100			
miR-125b-1	miR-146	miR-107			
miR-143	miR-155	miR-125b-1			
miR-146	miR-210	miR-155			
miR-155	miR-222	miR-181			
miR-181	miR-223	miR-221			
miR-210					
miR-221					
miR-222					
miR-223					

Bloomston *et al.* ont conduit une étude similaire identifiant 21 miARNs induits dans l'AP et 4 réprimés [320]. Ces microARNs associés entre eux permettent de distinguer un pancréas normal, la pancréatite chronique et l'AP. De plus, ces microARNs

permettent de distinguer les patients décédant dans les 24 mois de ceux présentant une survie plus grande.

Le tableau ci-dessus récapitule les résultats des trois équipes et illustre le fait que, malgré la correspondance de certains miRs entre les études (notés en gras), il existe une grande variabilité dans les résultats observés par les auteurs. Ceci peut être expliqué par les différentes technologies utilisées et le faible nombre d'échantillons ayant servi pour ces travaux. Cette grande variabilité entre équipes et l'absence d'un consensus clair dans l'expression des microARNs constitue un des principaux écueils pour leur utilisation dans le diagnostic du cancer.

Résumé

L'adénocarcinome pancréatique résulte du développement de lésions précurseurs. Parmi ces lésions, les PanINs sont les plus fréquentes mais leur faible taille les rends difficilement détectables et complique leur étude.

Si les altérations moléculaires retrouvées dans le cancer du pancréas commencent à être bien caractérisées, beaucoup moins de données sont disponibles pour ses lésions précurseurs.

Une meilleure connaissance du développement de ces lésions et des événements moléculaires associés est cruciale car cela permettrait de faciliter leur détection et de développer de nouvelles thérapies pour lutter contre ce cancer.

IV. Résultats expérimentaux

Article 1 - « La répression de l'expression de miR-148a par hyperméthylation de l'ADN est un évènement précoce de la carcinogénèse pancréatique ».

Le développement d'une tumeur fait intervenir des évènements génétiques (remaniements chromosomiques, mutations ponctuelles) mais l'altération de l'expression des microARNs présente un intérêt tout particulier : les microARNs régulent près de la moitié des processus cellulaires. Différentes études montrent une différence de profil d'expression des microARNs entre tissu tumoral et tissu sain, allant dans le sens d'une baisse générale du niveau d'expression de ces molécules. Cette différence peut être de grande importance connaissant la multitude de cibles pouvant être ciblées par les microARNs et dont seulement une infime partie a sûrement été déterminée. Parmi ces cibles, nous retrouvons des gènes suppresseurs de tumeurs, mais aussi des proto-oncogènes. Ainsi, le profil d'expression des microARNs dans une tumeur pourrait conditionner le développement de la tumeur, son agressivité, son potentiel métastatique ou sa sensibilité aux thérapies conventionnelles. Depuis presque une décennie, de nombreuses études ont montré une variation de l'expression des microARNs dans l'adénocarcinome pancréatique mais les mécanismes moléculaires régissant leur expression restent obscurs. La méthylation de l'ADN a été présentée précédemment dans l'introduction comme un mécanisme pouvant conduire à une répression de l'expression des microARNs.

Comme précisé dans l'introduction, le cancer du pancréas est exempt de symptômes spécifiques au développement de la tumeur. La conséquence directe est que lors du diagnostic de la tumeur, celle-ci est le plus souvent invasive ou localement avancée (envahissement du système nerveux et circulatoire local) rendant la chirurgie impossible dans près de 80% des cas. Ainsi, afin d'améliorer le pronostic très sombre de ce cancer, il est nécessaire de le détecter plus tôt. Ceci peut être permis par une meilleure connaissance des évènements accompagnant la carcinogénèse pancréatique, passant par l'étude de ses lésions précurseurs.

Différentes lésions peuvent donner lieu à un adénocarcinome pancréatique, mais parmi elles, les PanINs sont les plus fréquemment retrouvées en marge des tumeurs lors de leur résection. Leur étude a été grandement facilitée par la mise au point de modèles murins qui développent ce type de lésions en réponse à l'altération de

différents gènes (Kras, CDKN2A, TP53 ou SMAD4/DPC4). Malgré cela, peu de données sont disponibles concernant les altérations moléculaires et l'expression des microARNs dans les lésions PanINs.

De plus, la localisation du pancréas (situé profondément entre l'estomac, le foie et la rate) en fait un organe difficile à observer. Ceci ajouté au fait que le cancer du pancréas est exempt de symptômes spécifiques, conduit à la méprise entre différentes pathologies pancréatiques.

L'exemple le plus fréquent correspond à la confusion entre AP et pancréatite chronique pseudo-tumorale. Cette dernière est une pathologie inflammatoire bénigne du pancréas, dont l'observation en écho-endoscopie présente une certaine similarité morphologique avec une tumeur pancréatique. Le diagnostic différentiel entre AP et pancréatite chronique pseudo-tumorale est généralement établi sur la base d'une cytoponction transduodénale, technique de biopsie invasive qui nécessite une anesthésie générale du patient et la mobilisation d'un personnel qualifié et d'un équipement spécifique. Enfin, la pancréatite chronique présente un pronostic et une prise en charge radicalement différente de l'AP, avec un taux de mortalité très faible et ne nécessite généralement pas de chirurgie. Des travaux précédents de l'équipe ont montré l'utilité de l'étude de la mutation du gène Kras dans le diagnostic différentiel entre AP et pancréatite chronique, améliorant la sensibilité du test diagnostique par rapport à l'anatomopathologie seule (83% VS 88%). Néanmoins, il persiste certains patients pour lesquels, ni l'analyse KRAS ni l'analyse cytologique ne permettent de statuer sur le type de pathologie, nécessitant alors une seconde biopsie.

Les objectifs de ces travaux étaient :

- **D'identifier les microARNs dont l'expression est régulée par méthylation de leur séquence génomique dans le cancer du pancréas.**
- **De déterminer à quel stade de la carcinogénèse pancréatique cette méthylation est altérée.**
- **D'évaluer le potentiel du profil de méthylation de ces régions comme outil de diagnostic différentiel entre AP et pancréatite chronique.**

The Silencing of MicroRNA 148a Production by DNA Hypermethylation Is an Early Event in Pancreatic Carcinogenesis

Naïma Hanoun,^{1,2†} Yannick Delpu,^{1,2†} Arief A. Suriawinata,³ Barbara Bournet,^{1,4} Christophe Bureau,^{1,2,5} Janick Selves,^{6,7,8} Gregory J. Tsongalis,³ Marlène Dufresne,^{1,2} Louis Buscail,^{1,2,4} Pierre Cordelier,^{1,2} and Jérôme Torrisani^{1,2*}

BACKGROUND: The poor prognosis of pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) is accounted for by the absence of early diagnostic markers and effective treatments. MicroRNAs inhibit the translation of their target mRNAs. The production of microRNAs is strongly altered in cancers, but the causes of these alterations are only partially known. DNA hypermethylation is a major cause of gene inactivation in cancer. Our aims were to identify microRNAs whose gene expression is inactivated by hypermethylation in PDAC and to determine whether this hypermethylation-mediated repression is an early event during pancreatic carcinogenesis. We also sought to investigate whether these differentially methylated regions can serve as a diagnostic marker for PDAC.

METHODS: MicroRNA production was measured by microarray hybridization and reverse-transcription quantitative PCR. The level of DNA methylation was measured by bisulfite mapping and semiquantitative methylation-specific PCR.

RESULTS: We identified 29 microRNAs encoded by genes whose expression is potentially inactivated by DNA hypermethylation. We focused our study on microRNA 148a (miR-148a) and found its production to be repressed, not only in PDAC samples but also in preneoplastic pancreatic intraepithelial neoplasia (PanIN) lesions. More importantly, we found that hypermethylation of the DNA region encoding miR-148a is responsible for its repression, which occurs in PanIN preneoplastic lesions. Finally, we show that the hypermethylated DNA region encoding miR-148a can serve as an ancillary

marker for the differential diagnosis of PDAC and chronic pancreatitis (CP).

CONCLUSIONS: We show that the hypermethylation of the DNA region encoding miR-148a is responsible for its repression in PDAC precursor lesions and can be a useful tool for the differential diagnosis of PDAC and CP.

© 2010 American Association for Clinical Chemistry

Pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC)⁹ is the fourth-leading cause of cancer death in Western countries (1). This poor prognosis is frequently explained by a lack of early diagnostic markers and effective therapeutic treatments. Therefore, a better understanding of the early genetic and epigenetic events governing PDAC development is valuable for diagnostic and new therapeutic strategies.

Similarly to models for other cancers, a progression model has been elaborated for PDAC precursor lesions (2). These lesions were codified under the term “pancreatic intraepithelial neoplasia” (PanIN) and categorized into 3 histologic stages (PanIN-1A and -1B, PanIN-2, and PanIN-3) according to the increasing degrees of architectural and nuclear atypia. Several murine models for pancreatic carcinogenesis have been established to mimic this progression of pancreatic cancer (3–5).

Several genetic alterations have been described to occur early in the PDAC development. Some of these

¹ INSERM, U858, Toulouse, France; ² Université de Toulouse, Université Paul Sabatier, Institut de Médecine Moléculaire de Rangueil, IFR150, Toulouse, France; ³ Dartmouth Medical School, Dartmouth Hitchcock Medical Center and Norris Cotton Cancer Center, Lebanon, NH; ⁴ CHU de Toulouse, Service de Gastroentérologie, Toulouse, France; ⁵ Service d'Hépatogastroentérologie, Fédération Digestive de Purpan, CHU Toulouse, Toulouse, France; ⁶ INSERM, U563, Centre de Physiopathologie de Toulouse-Purpan, Toulouse, France; ⁷ Université Paul Sabatier, Toulouse, France; ⁸ Laboratoire d'Anatomie Pathologique, CHU Purpan, Toulouse, France.

[†] These authors contributed equally to this work.

* Address correspondence to this author at: INSERM, U858-I2MR, Institut de

Médecine Moléculaire de Rangueil, 1, Ave. Jean Poulhès, BP 84225, 31 432 Toulouse Cedex 4, France. Fax +33-561322403.

Received February 12, 2010; accepted April 8, 2010.

Previously published online at DOI: 10.1373/clinchem.2010.144709

⁹ Nonstandard abbreviations: PDAC, pancreatic ductal adenocarcinoma; PanIN, pancreatic intraepithelial neoplasia; DMR, differentially methylated region; EUS-FNA, endoscopic ultrasound-guided fine-needle aspiration; CP, chronic pancreatitis; KRAS*, LSL K-ras G12D/Pdx1-Cre^{+/+}; 5-Aza-dC, 5-aza-2-deoxycytidine; TSA, trichostatin A; qRT-PCR, quantitative reverse-transcription PCR; miR-148a, microRNA 148a; T_m , melting temperature; qMS-PCR, semiquantitative methylation-specific PCR; Ct, threshold cycle.

changes include those in the oncogene *KRAS*¹⁰ (v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog), *CDKN2A* [cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (melanoma, p16, inhibits CDK4)], *TP53* (tumor protein 53), *SMAD4* (SMAD family member 4; alias, *DPC4*, deleted in pancreatic cancer 4), and others (4). DNA hypermethylation, a major epigenetic modification, has also been reported to be responsible for inactivating the expression of genes [e.g., *CDKN2A*, *PENK* (proenkephalin; alias, preproenkephalin), and others] early in the development of PDAC (6). More recently, DNA hypermethylation was reported to cause inactivation of microRNA production in several cancers (7). MicroRNAs, small RNAs that inhibit the translation of their target mRNAs (8), play important roles in cancer development. The expression profile of microRNA genes is profoundly altered in PDACs (9–11). We recently demonstrated that the microRNA let7 is frequently downregulated in PDAC samples (12) and that microRNA 21 (miR-21) is overproduced in PDAC precursor lesions (13).

In this study, we aimed to identify microRNAs encoded by genes whose expression is inactivated by DNA hypermethylation in PDAC, and, more interestingly, to determine whether this alteration occurs early in PDAC development. We also investigated whether these differentially methylated regions (DMRs) of DNA that encode microRNAs can serve as a diagnostic tool for PDAC.

Materials and Methods

TISSUE SAMPLES

The policies of the ethics committee at the University Hospital (CHU) of Toulouse and the Cancéropole Grand Sud-Ouest (France) were rigorously followed throughout the study. After receiving written informed consent, we obtained pancreatic tissue samples from patients undergoing pancreatic surgery (tumor bank collection of the University Hospital of Toulouse). Samples of PDAC tissue and matched adjacent tissue were macrodissected by on-site histopathology faculty. The percentage of tumor cells was >50% in all PDAC samples. Formalin-fixed, paraffin-embedded samples

from deidentified human macrodissected samples of nonpathologic pancreatic duct tissues (n = 5) and PanIN-1A (n = 8), PanIN-1B (n = 11), PanIN-2 (n = 10), and PanIN-3 (n = 10) lesions were obtained from the archives of the Department of Pathology at the Dartmouth Hitchcock Medical Center. Leukocytes were obtained from healthy donors.

DNA FROM ENDOSCOPIC ULTRASOUND-GUIDED FINE-NEEDLE ASPIRATION (EUS-FNA) BIOPSIES

DNA samples from EUS-FNA biopsies were obtained as previously described (14). DNA samples from 39 patients (male, 22; female, 16; mean age, 64.4 years) with confirmed PDAC (cytopathologic analysis) and 20 patients (male, 20; mean age, 56 years) with confirmed chronic pancreatitis (CP) (cytopathologic analysis and follow-up) were included in this pilot study.

MOUSE STRAINS

Conditional LSL K-ras G12D and Pdx1-Cre^{+/-} mouse strains were bred to generate LSL K-ras G12D/Pdx1-Cre^{+/-} (KRAS*) mice, as previously described (5). The LSL K-ras G12D mouse strain was obtained from the Mouse Models of Human Cancers Consortium Repository (National Cancer Institute). The Pdx1-Cre^{+/-} mouse strain was obtained from the Douglas A. Melton laboratory (Department of Molecular and Cellular Biology, and Howard Hughes Medical Institute, Harvard University) (15). The IFR150 animal care committee approved all procedures.

REAGENTS AND ANTIBODIES

Acetylated histone H3 and pan-H3 antibodies were purchased from Millipore. 5-Aza-2-deoxycytidine (5-Aza-dC) and trichostatin A (TSA) were purchased from Sigma-Aldrich.

CELL CULTURE

Human PDAC-derived cell lines Capan-1 and Capan-2 (ATCC) were grown in RPMI medium supplemented with 100 mL/L fetal calf serum, L-glutamine (2 mmol/L), antibiotics (50 mg/L), Fungizone® (0.25 mg/L; Invitrogen) and Plasmocin® (5 mg/L; InvivoGen). Human BxPC-3, MIA PaCa-2, and PANC-1 PDAC-derived cells were grown in DMEM containing 4.5 g/L glucose (Invitrogen), 100 mL/L fetal calf serum, L-glutamine (2 mmol/L), antibiotics (50 mg/L), and Fungizone (0.25 mg/L). Human pancreatic duct epithelial cells (16) were grown in Defined Keratinocyte-SFM medium (Invitrogen) supplemented with 50 g/L bovine pituitary extract and 5 g/L epidermal growth factor (both from Invitrogen). Cells were treated for 72 h with 2 μmol/L 5-Aza-dC and with either 100 nmol/L (BxPC-3 cells) or 400 nmol/L

¹⁰ Genes: *KRAS*, v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog; *CDKN2A*, cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (melanoma, p16, inhibits CDK4); *TP53*, tumor protein 53; *SMAD4*, SMAD family member 4 (alias, *DPC4*, deleted in pancreatic cancer 4); *PENK*, proenkephalin (alias, preproenkephalin); *MUC2*, mucin 2, oligomeric mucus/gel-forming; *MMP9*, matrix metalloproteinase 9 (gelatinase B, 92kDa gelatinase, 92kDa type IV collagenase); *ACTB*, actin, beta; *GAPDH*, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; *MIR148A*, microRNA 148a; *Pdx1-Cre*, Cre recombinase under the control of the *Mus musculus Pdx1* (pancreatic and duodenal homeobox 1) gene promoter; *SPARC*, secreted protein, acidic, cysteine-rich (osteonectin); *TFPI2*, tissue factor pathway inhibitor 2; *TGIF2*, TGFβ-induced factor homeobox 2; *DNMT3B*, DNA (cytosine-5)-methyltransferase 3 beta.

(Capan-1, Capan-2, MIA PaCa-2, and PANC-1 cells) TSA.

5-METHYLCYTOSINE QUANTIFICATION BY NEAREST-NEIGHBOR ANALYSIS

The 5-methylcytosine level was quantified by nearest-neighbor analysis as described previously (17). The intensities of 5-methylcytosine and cytosine mononucleotide spots were measured with a PhosphorImager screen and by ImageQuant quantification (GE Healthcare Life Sciences).

HISTONE EXTRACTION AND WESTERN BLOT ANALYSIS

Cells were incubated for 30 min in lysis buffer [10 mmol/L HEPES (pH 7.9), 1.5 mmol/L MgCl₂, 10 mmol/L KCl, 0.5 mmol/L dithiothreitol, Protease Inhibitor Cocktail (Roche), and 0.2 mol/L HCl] and centrifuged for 10 min at 11 000g. The amount of acetylated histone H3 on lysine 9 in response to 5-Aza-dC and TSA treatment was measured by western blot analysis after separation by SDS-PAGE on a 150-g/L acrylamide gel. The amount of total H3 was used as a loading control.

MICRODISSECTION OF PRENEOPLASTIC MURINE TISSUES

Pancreatic tissues were microdissected as previously described (13). Duct lesions were classified according to the WHO classification (2). Five hundred cells were microdissected from cryostat-embedded PanIN lesions generated in a conditional K-ras G12D mouse model (PanIN-1A, n = 6; PanIN-1B, n = 7; PanIN-2, n = 3; and PanIN-3, n = 3). Nonpathologic pancreatic ducts (n = 4) were microdissected from KRAS* and wild-type mice.

EXTRACTION OF GENOMIC DNA AND TOTAL RNA

We extracted genomic DNA from cell lines and leukocytes with the Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega) and from macro- and microdissected samples with the RecoverAll™ Total Nucleic Acid Isolation Kit for FFPE (Applied Biosystems). DNA was extracted from EUS-FNA biopsy samples with the QIAamp DNA Micro Kit (Qiagen), as previously described (14). Extracted DNA was quantified with the ND-1000 NanoDrop spectrophotometer (Thermo Scientific).

RNA was isolated from tumor samples and cell lines with TRIzol® Reagent (Invitrogen). Total RNA was extracted from microdissected samples as previously described (13). RNA quality was assessed with Experion automated electrophoresis technologies (Bio-Rad Laboratories). RNA concentration was measured with the ND-1000 NanoDrop spectrophotometer.

MICRORNA MICROARRAY

PDAC-derived cell lines were treated with 5-Aza-dC and TSA for 72 h. Total RNA was isolated as described above. The Genosensor Corporation used the GenoExplorer™ microRNA labeling kit and GenoExplorer™ Biochips to measure the production of 437 microRNAs. The microRNA data were normalized by dividing the signal intensity of a specific microRNA by the global microRNA signal intensity. This normalization value was then used for calculating the -fold change. The production of each microRNA was measured on 3 different Biochips in triplicate. MicroRNAs that were differentially produced in treated cells vs nontreated cells were identified by statistically significant results in *t*-tests. As commonly used in similar microRNA microarray studies (18, 19), a -fold change ≥ 2 was considered biologically relevant.

MEASUREMENT OF MicroRNA AND mRNA PRODUCTION BY QUANTITATIVE REVERSE-TRANSCRIPTION PCR (qRT-PCR)

mRNA and microRNA were reverse-transcribed with the miScript PCR System (Qiagen) as previously described (13). The mRNAs expressed by the *MUC2* (mucin 2, oligomeric mucus/gel-forming) and *MMP9* [matrix metalloproteinase 9 (gelatinase B, 92kDa gelatinase, 92kDa type IV collagenase)] genes in response to 5-Aza-dC and TSA treatment were measured by quantitative PCR (primers: *MMP9* Forward, 5'-CACGCACGACGTCTTCCA-3'; *MMP9* Reverse, 5'-AAGCGGTCCTGGCAGAAAT-3'; *MUC2* Forward, 5'-CAGCACCGATTGCTGAGTTG-3'; *MUC2* Reverse, 5'-GCTGGTCATCTCAATGGCAG-3') at a melting temperature (T_m) of 60 °C and with a StepOne™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Gene expression was normalized to that of *ACTB* (actin, beta) and *GAPDH* (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) by PCR analysis with the primers described previously (20). MicroRNAs were measured with the miScript PCR System and specific primers ($T_m = 55$ °C). Results were normalized to the concentration of U6 RNA, as assessed by PCR analysis with primers U6 Forward (5'-CTCGCTTCGGCAGCACA-3') and U6 Reverse (5'-AACGCTTCAGCAATTTGCGT-3'). PCR efficiency was calculated for each set of primers and was >90%.

CpG ISLAND DETERMINATION

A 20-kb genomic DNA fragment encompassing the microRNA coding sequences was analyzed with CpG plot software (<http://bioweb.pasteur.fr>). We used the following parameter values to report a CpG island: window size, 100 bp; minimum length of an island, 200 bp; window shift increment, 1; minimum observed-to-expected ratio, 0.6; and minimum percentage, 50%.

BISULFITE MAPPING

Genomic DNA (100 ng to 1 μ g) was treated with sodium bisulfite. In brief, genomic DNA was denatured in 0.3 mol/L NaOH for 15 min at 37 °C. Cytosines were sulfonated in 3.6 mol/L sodium bisulfite (Sigma–Aldrich) and 1 mmol/L hydroquinone (Sigma–Aldrich) overnight at 55 °C. The modified DNA samples were desalted through a column (CpGenome™ Fast DNA Modification Kit; Millipore). The concentrations of modified DNA were measured with a ND-1000 Nano-Drop spectrophotometer. We subjected 1–10 ng of the modified DNA to PCR amplification with AmpliTaq Gold® DNA polymerase (Applied Biosystems) and primers miR-148a Forward (5'-TGGGTATTTGTTT TTGTTGATTG-3') and miR-148a Reverse (5'-ACT ACACTTAAACCCCTCTAACC-3') as previously described (21). Thermocycling conditions were as follows: 5 min at 95 °C; 40 cycles of 15 s at 95 °C, 30 s at 60 °C, and 15 s at 72 °C; final extension of 10 min at 72 °C. After verification, the PCR products were cloned into pCR.II plasmids (Invitrogen) and sequenced in both orientations (MilleGen). Five to 6 clones were sequenced for each sample. Modified DNA from leukocytes of healthy donors was used as a negative control in the methylation analysis.

SEMIQUANTITATIVE METHYLATION-SPECIFIC PCR (qMS-PCR)

PCR products obtained for miR-148a bisulfite mapping analysis (see above) were diluted into water (1 volume into 250 volumes). Five microliters was then subjected to qMS-PCR with Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) and primers (methylated-specific miR-148a Forward, 5'-TGATTCGTTTTATTATCGGTC-3'; methylated-specific miR-148a Reverse, 5'-AACACTAACGA CATCGACG-3'; unmethylated-specific miR-148a Forward, 5'-TATGATTTGTTTTATTATTGGTT-3'; unmethylated-specific miR-148a Reverse, 5'-AAC ACTAACAACATCAACAACC-3'). The amplicon size was 235 bp. The PCR reactions were carried out on the StepOne apparatus under the following thermocycling conditions: 40 cycles of 15 s at 95 °C, 30 s at 54 °C (unmethylated) or 57 °C (methylated), and 30 s at 60 °C. Specificity and efficiency were verified for each primer set. The methylation level was calculated with the formula $2^{-\Delta Ct}$, where ΔCt is the difference in threshold cycle (Ct) values (i.e., methylated DNA – unmethylated DNA). The methylation level was expressed as a percentage.

STATISTICAL ANALYSIS

Results are expressed as the mean (SE). The statistical significance of differences was evaluated with the Student *t*-test, with a *P* value <0.05 considered statistically significant. To evaluate diagnostic performance, we

used SPSS software (version 15.0) to calculate the area under the ROC curve and the 95% CI. ROC curve analysis was used to determine the cutoff value (an optimal cutoff was determined by setting the threshold for specificity at 90% and then maximizing sensitivity). A specific case was considered positive when the miR-148a hypermethylation level was greater than the cutoff value. To evaluate the correlation of the methylation level of the miR-148a–coding region with miR-148a production, we calculated a Spearman correlation coefficient on the Biostatgv Web site (<http://www.u707.jussieu.fr/biostatgv/>).

Results

IDENTIFICATION OF MicroRNA INACTIVATED BY DNA HYPERMETHYLATION IN PDAC-DERIVED CELL LINES

To identify microRNAs whose production was aberrantly inhibited by DNA hypermethylation, we treated 4 PDAC-derived cell lines (BxPC-3, Capan-1, MIA PaCa-2, PANC-1) with a DNA-demethylating agent (5-Aza-dC) and a histone deacetylase inhibitor (TSA). Because each cell line displays a different sensitivity to these drugs, we optimized the 5-Aza-dC and TSA concentrations for each cell line (see Materials and Methods) by measuring the 5-methylcytosine content by nearest-neighbor analysis and the level of acetylated histone on lysine 9 by western blot analysis (see Fig. 1, A and B, in the Data Supplement that accompanies the online version of this article at <http://www.clinchem.org/content/vol56/issue7>). In parallel, we confirmed the induction of the *MUC2* and *MMP9* genes, both known to be hypermethylated in the BxPC-3, MIA PaCa-2, and PANC-1 cell lines (22, 23) (see Fig. 1C in the online Data Supplement).

The concentrations of 437 microRNAs in cells treated with 5-Aza-dC and TSA were measured by microRNA microarray hybridization and compared with the corresponding concentrations in untreated cells. We retained only the microRNAs that increased at least 2-fold after 5-Aza-dC and TSA treatment in at least 1 of the PDAC-derived cell lines. Among the 4 cell lines, 55 different microRNAs fulfilled this criterion (Table 1; see Fig. 2A in the online Data Supplement). The 5-Aza-dC/TSA-induced production of a panel of microRNAs that display important functions in cancer progression was further validated by qRT-PCR analysis (see Fig. 2B in the online Data Supplement). Of the 55 microRNA-coding regions, 29 (53%) were located in the vicinity of a CpG island (annotated with an asterisk in Table 1), therefore indicating potentially direct regulation by DNA hypermethylation.

Of these candidate microRNAs, we decided to focus on miR-148a for further study. First, the *MIR148A* (microRNA 148a) gene is located in close proximity to

Table 1. List of microRNAs upregulated by at least 2-fold in at least 1 PDAC-derived cell line after 5-Aza-dC and TSA treatment.^a

BxPC-3		Capan-1		MIA PaCa-2		PANC-1	
MicroRNA	-Fold up-regulation	MicroRNA	-Fold up-regulation	MicroRNA	-Fold up-regulation	MicroRNA	-Fold up-regulation
miR-494*	6.2	miR-16	3.8	miR-203*	23.8	miR-563	6.7
miR-140	5.8	let-7a1*	3.7	miR-29c	3.8	miR-382*	4.4
miR-148a*	3.6	miR-99a	3.6	miR-30a	3.7	miR-181a1	3.7
miR-200b*	2.6	miR-146b*	3.4	miR-148a*	3.4	miR-518b	3.0
miR-564*	2.2	miR-106b*	2.5	miR-374a	2.6	miR-127*	3.0
miR-513	2.0	miR-30a	2.4	miR-195*	2.5	miR-143	2.7
miR-637*	2.0	miR-638*	2.4	miR-98	2.5	miR-30b	2.6
miR-195*	2.0	miR-30d	2.3	miR-200a*	2.5	miR-184	2.6
		miR-19b1*	2.3	miR-17*	2.5	miR-148a*	2.5
		miR-29a	2.2	let-7i*	2.4	miR-146b*	2.3
		miR-135b	2.2	miR-30c1	2.4	miR-146a	2.2
		miR-30b	2.1	miR-16	2.4	miR-193a*	2.2
		miR-20a*	2.1	miR-30b	2.4	let-7f1*	2.1
		miR-338*	2.1	miR-9-1*	2.4	miR-335*	2.1
		miR-595	2.1	miR-30d	2.3	miR-133a1	2.1
		miR-123-1	2.0	miR-93*	2.2	miR-9-1*	2.1
		miR-494*	2.0	miR-92a1*	2.1	miR-518f	2.0
		miR-374a	2.0	miR-29b1	2.1	miR-203*	2.0
		miR-29c	2.0	let-7c	2.1	miR-17*	2.0
				miR-221	2.1		
				let-7d*	2.1		
				let-7e*	2.1		
				let-7b	2.0		
				let-7a1*	2.0		
				let-7g*	2.0		
n = 8		n = 19		n = 25		n = 19	

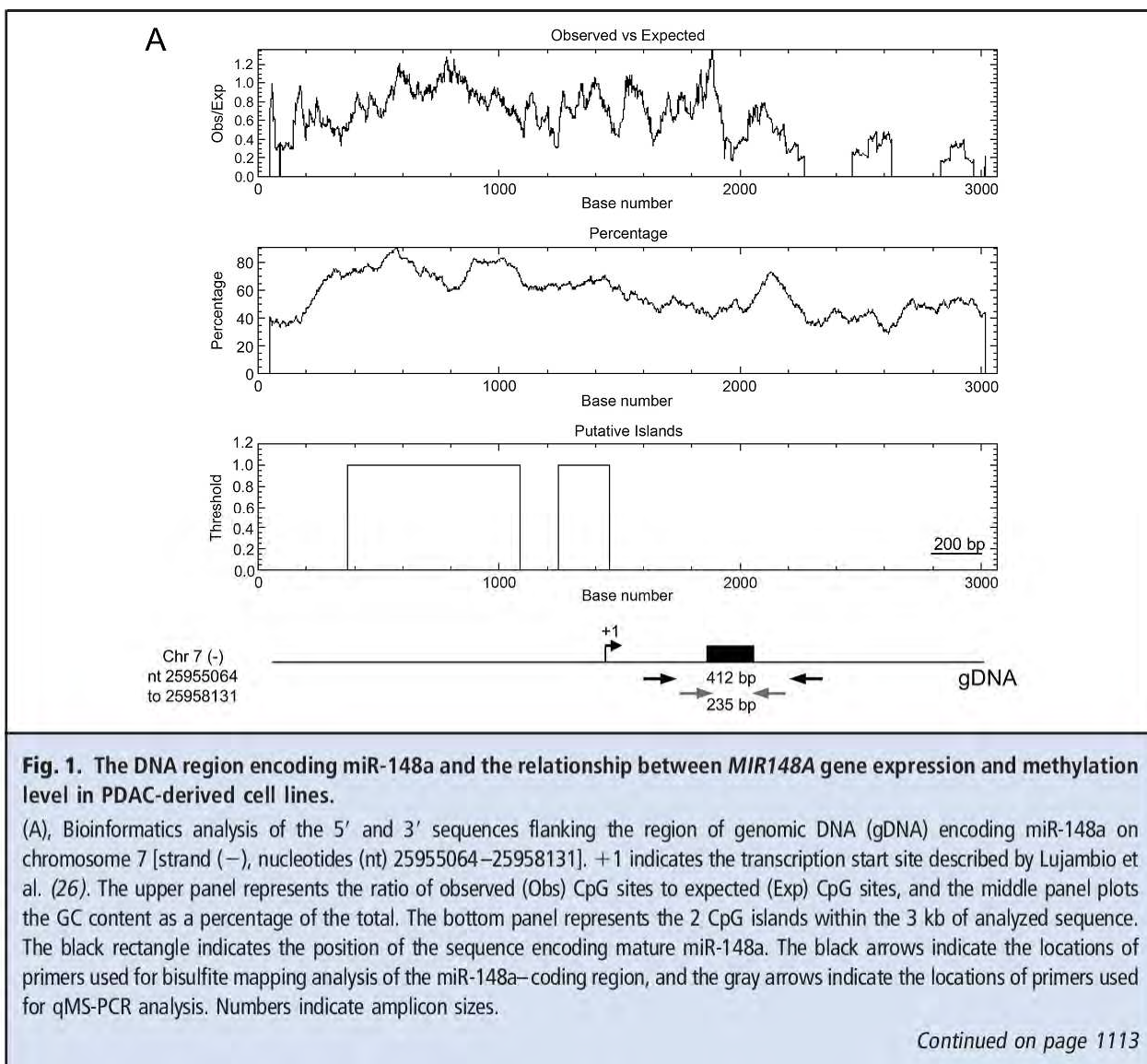
^a Genomic sequences encoding microRNAs annotated with an asterisk are located in the vicinity (within 20 kb) of a CpG island. miR-148a is highlighted.

2 CpG islands, and its expression was upregulated by 5-Aza-dC and TSA treatment in 3 of 4 PDAC-derived cell lines (see Fig. 2B in the online Data Supplement). Second, miR-148a was shown to be downregulated in pancreatic samples. The decreased expression of this microRNA gene distinguishes PDAC from CP and nonpathologic tissue (10, 11, 24).

DNA HYPERMETHYLATION CONTROLS *MIR148A* EXPRESSION IN PDAC CELL LINES

The DNA region encoding miR-148a is located in close proximity to 2 CpG islands, suggesting a potential for regulation by DNA methylation (Fig. 1A). Sodium bisulfite mapping analysis of the methylation status of the DNA region encoding miR-148a in different

PDAC-derived cell lines (Fig. 1B) revealed hypermethylation of this region in 4 of 5 PDAC-derived cell lines, whereas this region was weakly methylated (3.3%) in the Capan-1 cell line. DNA extracted from peripheral leukocytes of healthy donors, in which the miR-148a-coding region is not methylated, was used as a control. In parallel, we measured miR-148a production in these PDAC-derived cell lines (Fig. 1C). We observed that the methylation level of the DNA region of the *MIR148A* gene was inversely correlated with *MIR148A* expression, suggesting that DNA hypermethylation is responsible for the repressed production of miR-148a. We also measured the methylation level in the DNA region encoding miR-148a by qMS-PCR and showed that the methylation level obtained with this method



correlates with the level obtained by bisulfite mapping (Fig. 2A). Although the miR-148a–coding region was hypermethylated in the BxPC-3, the Capan-2, and, to a lesser extent, the MIA PaCa-2 cell lines, this region is weakly methylated in Capan-1, leukocytes from healthy donors, and nonpathologic human pancreatic ductal epithelial cells (16). Our qMS-PCR analysis showed that 5-Aza-dC and TSA treatment decreased the level of methylation of the miR-148a–coding region, leading to an induction of *MIR148A* expression (Fig. 2B). Moreover, we observed miR-148a down-regulation in 10 (71.4%) of 14 PDAC samples, compared with nonpathologic adjacent tissues (Fig. 2C), results that are in accord with those of previous studies (10, 11, 24). The methylation level of the miR-148a–coding region was measured by qMS-PCR in the same samples. Spearman correlation analysis revealed an in-

verse correlation ($r = -0.57$; $P < 0.05$) between the methylation status of the *MIR148A* gene and its expression. These results provide evidence that DNA hypermethylation controls miR-148a production and is responsible for its down-regulation in PDAC samples and PDAC-derived cell lines.

HYPERMETHYLATION OF THE DNA REGION ENCODING miR-148a IS AN EARLY EVENT IN PANCREATIC CARCINOGENESIS

Although we and others have demonstrated miR-148a down-regulation in PDAC samples [Fig. 2C and (10, 11, 24)], whether this down-regulation occurs as an early event in PDAC carcinogenesis is unknown.

To address this question, we used conditional K-ras G12D mice, a murine model of PDAC precursor PanIN lesions in which the endogenous expression of mutant *KRAS* in the pancreas is activated by a *Pdx1-Cre*

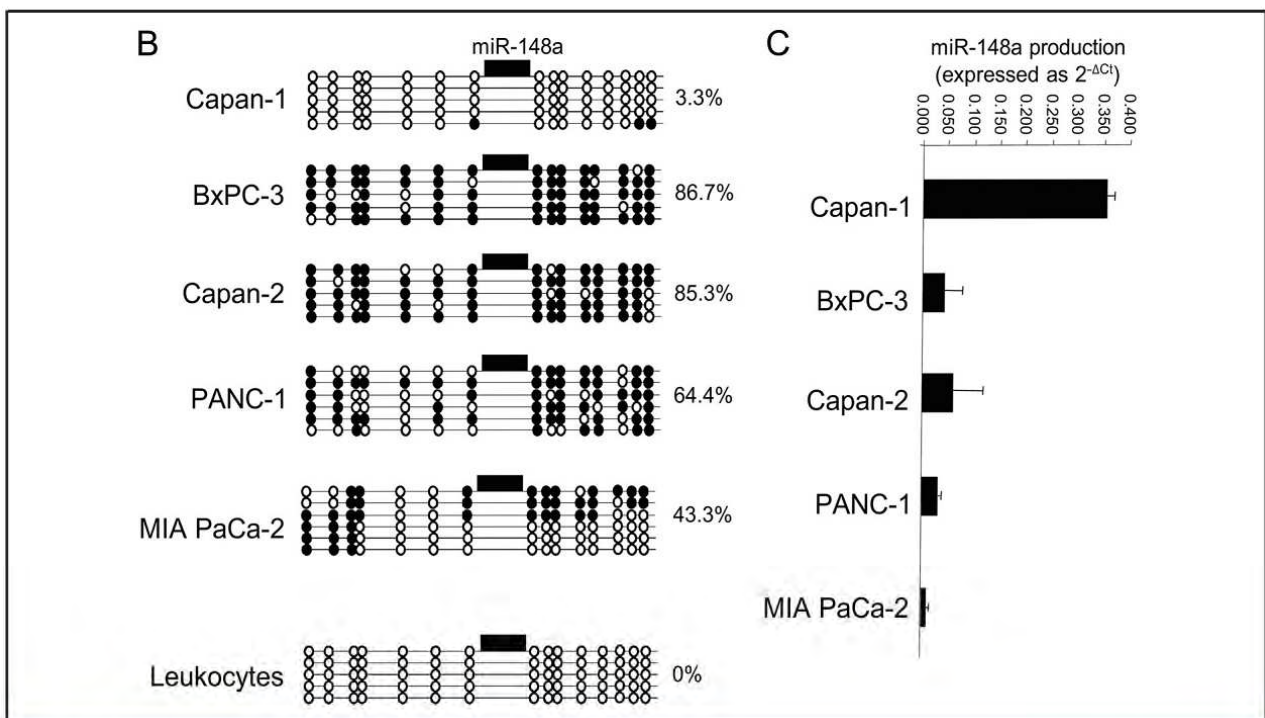


Fig. 1. Continued.

(B), Methylation level of the miR-148a–coding region in PDAC-derived cell lines as determined by bisulfite mapping analysis. Each line represents a clone. Empty and filled circles represent unmethylated cytosines and methylated cytosines, respectively. The numbers indicate the percentage of methylation. The black rectangle indicates the position of the DNA sequence encoding mature miR-148a. Leukocytes from healthy donors were used as negative controls. (C), miR-148a production in PDAC-derived cell lines as determined by qRT-PCR analysis. The concentration of U6 RNA was used for normalization. The results are the mean of 3 different quantifications and are expressed as $2^{-\Delta Ct}$.

transgene [Cre recombinase under the control of *Mus musculus Pdx1* (pancreatic and duodenal homeobox 1) gene promoter] (5) and that encompasses the entire panel of PanIN lesions (13). We measured the production of miR-148a in microdissected PanIN lesions by qRT-PCR. Nonpathologic ducts surrounding the PanIN lesions from KRAS* mice (KRAS* ducts) were used as a control. We included nonpathologic ducts from LSL K-ras G12D/Pdx1-Cre^{-/-} littermates. We observed significant miR-148a down-regulation in the PanIN-1B stage that persisted in PanIN-2 and PanIN-3 lesions, demonstrating that this miR-148a down-regulation occurs at an early stage of PDAC development (Fig. 3A).

PanIN lesions are detected in human pancreas as well and are considered precursors of PDAC. Similarly, we observed miR-148a down-regulation in human PanIN-1B lesions (Fig. 3B). These results confirm the down-regulation of miR-148a in precursor lesions of PDAC.

Our earlier results that DNA hypermethylation is responsible for the repression of miR-148a production in PDAC and PDAC-derived cell lines led us to use qMS-

PCR analysis to measure the methylation level of the miR-148a–coding region in our collection of human PanIN lesions. We observed an increased level of methylation in this region that increased significantly with PanIN progression and that was inversely correlated with miR-148a down-regulation (Fig. 3C). This finding strongly suggests that the early repression of miR-148a production in PDAC precursor lesions is provoked by DNA hypermethylation in the region encoding this microRNA.

THE HYPERMETHYLATION OF THE DNA REGION ENCODING miR-148a CAN BE USED AS A MARKER IN THE DIFFERENTIAL DIAGNOSIS OF PDAC AND CP

We tested the hypothesis that the hypermethylated DNA region encoding miR-148a can serve as a diagnostic marker to discriminate PDAC from CP. We successfully determined the methylation level of this DNA region by qMS-PCR in 100% of the patients in the training set (39 patients with proven PDAC and 20 patients with proven CP; Fig. 4A). This analysis revealed that the DNA region encoding miR-148a was significantly more methylated in PDAC samples than in CP samples

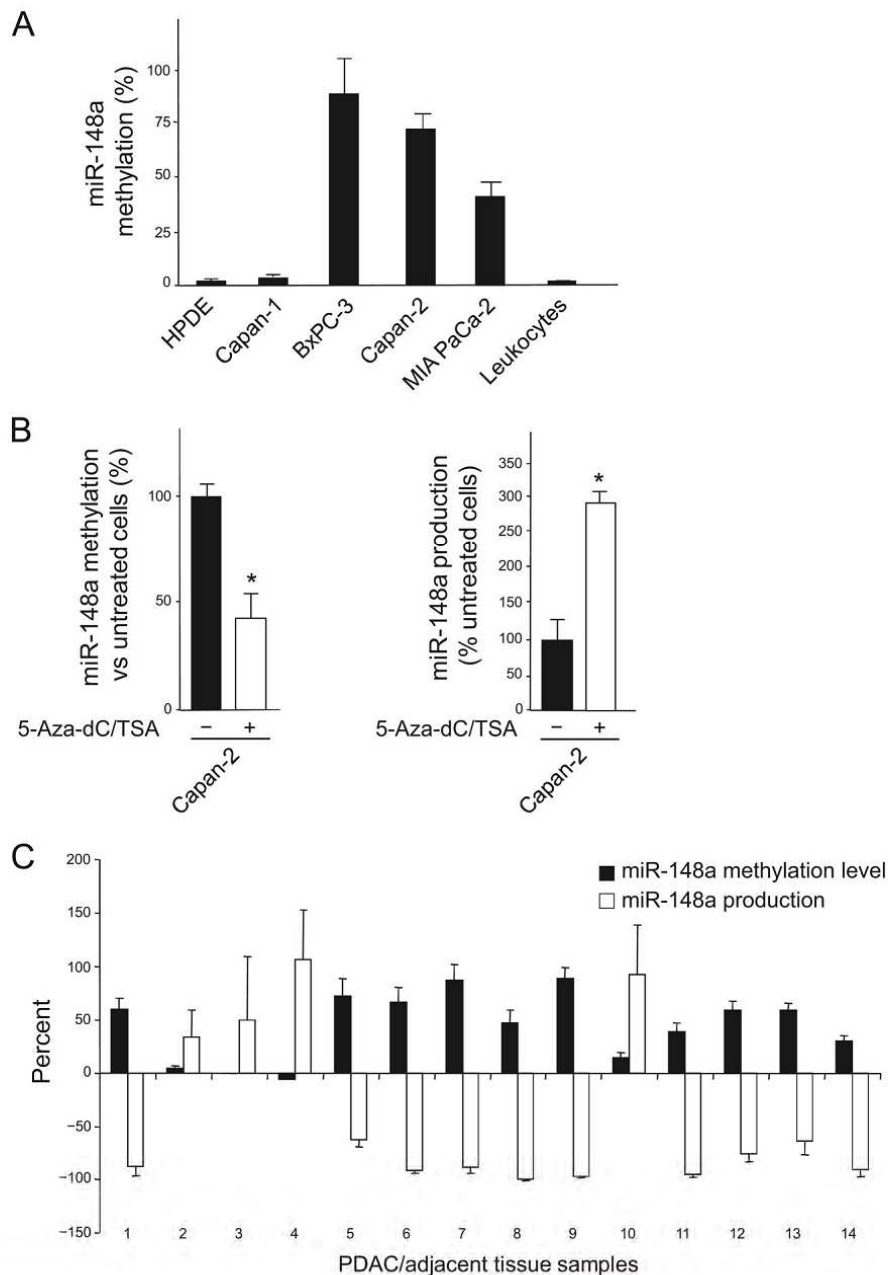


Fig. 2. Methylation level of the DNA region encoding miR-148a in PDAC-derived cell lines, its response to treatment with 5-Aza-dC and TSA, and its relationship to miR-148a production.

(A), Methylation level of the miR-148a–coding region in human pancreatic duct epithelial cells (HPDE), PDAC-derived cell lines, and leukocytes, as measured by qMS-PCR. Results represent the mean of 3 quantifications performed in duplicate and are expressed as the percentage of methylation. (B), The methylation level of the miR-148a–coding region and miR-148a production in Capan-2 cells in response to 5-Aza-dC and TSA treatment were measured by qMS-PCR and qRT-PCR, respectively. Data represent the mean of 3 quantifications performed in duplicate, and the methylation level and miR-148a production are expressed as a percentage of the corresponding values for untreated Capan-2 cells (100%, filled bars). * $P < 0.05$. (C), miR-148a production in 14 PDAC samples was measured by qRT-PCR and compared with the values for matching nonpathologic tissues. The U6 RNA concentration was used for normalization. Data are presented as the mean of 3 different quantifications performed in duplicate, and the production of miR-148a in PDAC samples is expressed as a percentage of that in adjacent tissues. The methylation level of the miR-148a–coding region was measured by qMS-PCR. Results represent the means of 3 quantifications and are expressed as the difference in the percentage of methylation between samples of PDAC and adjacent tissue. * $P < 0.05$.

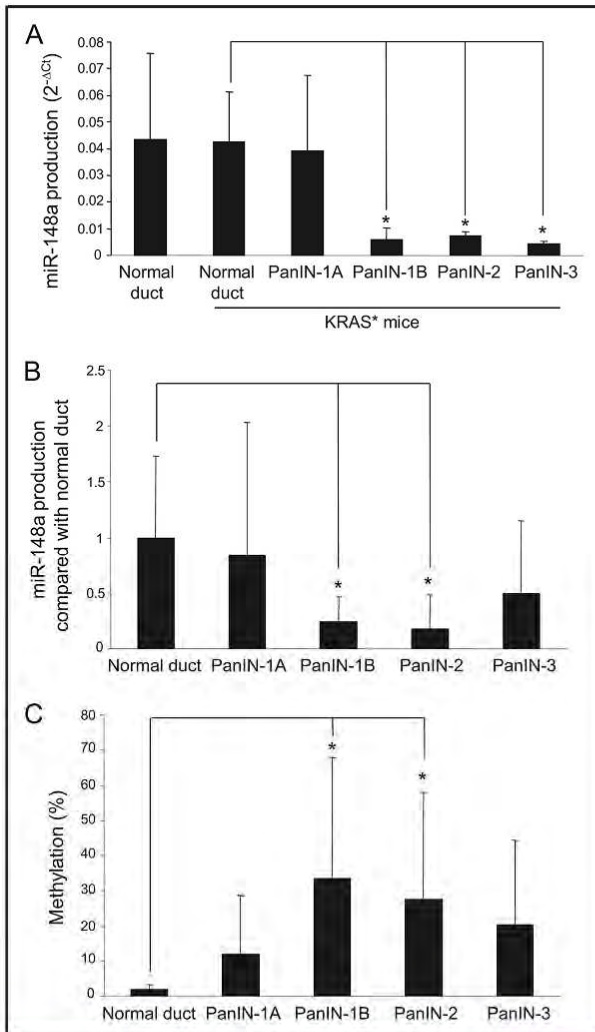


Fig. 3. miR-148a production and methylation level of the DNA region encoding miR-148a in PDAC precursor PanIN lesions.

(A), miR-148a production in murine nonpathologic ducts and preneoplastic PanIN lesions as measured by qRT-PCR. Nonpathologic ducts (normal duct) and PanIN lesions were obtained from KRAS* mice. Nonpathologic duct samples obtained from LSL K-ras G12D/Pdx1-Cre^{-/-} littermates were used as a control. The level of U6 RNA was used for normalization. Results represent the mean of 2 different quantifications and are expressed as 2^{-ΔCt}. *P < 0.05. (B), miR-148a production in human nonpathologic ducts (normal duct) and preneoplastic PanIN lesions as measured by qRT-PCR. The level of U6 RNA was used for normalization. Results are the mean of 2 different quantifications and are expressed as 2^{-ΔCt}. *P < 0.05. (C), Methylation levels of the miR-148a-coding region in nonpathologic ducts (normal duct) and preneoplastic PanIN lesions as measured by qMS-PCR. Results are the mean of 3 quantifications and are expressed as the percentage of methylation of the miR-148a-coding region. *P < 0.05.

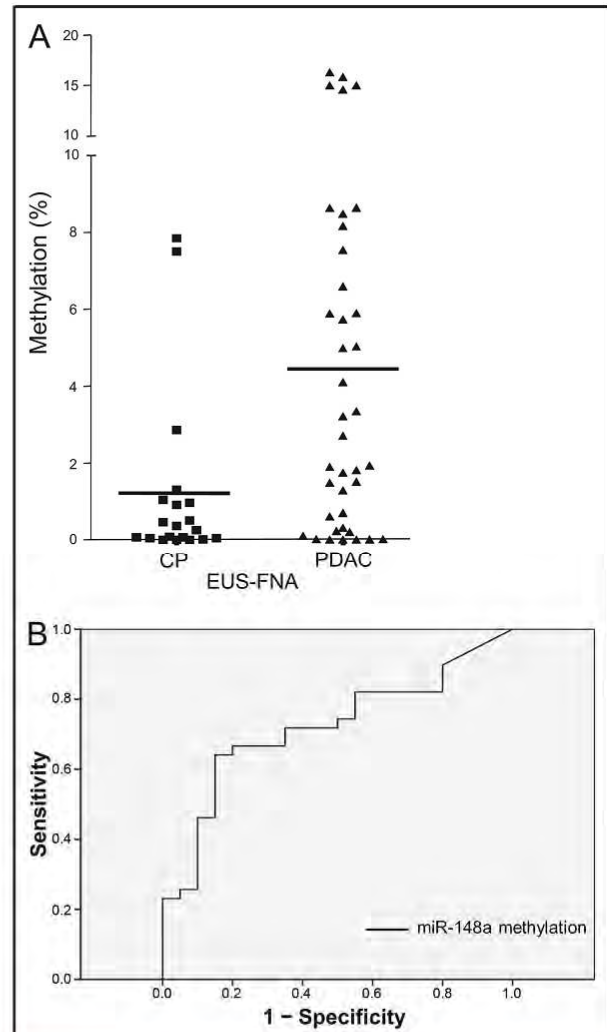


Fig. 4. Methylation of the miR-148a-coding region in EUS-FNA biopsy samples from patients with CP and PDAC.

(A), The DNA methylation level of the miR-148a-coding region was measured by qMS-PCR analysis of DNA extracted from EUS-FNA samples from 20 patients with proven CP and 39 patients with proven PDAC. The results represent the mean of 3 different quantifications and are expressed as the percentage of methylation. (B), ROC curve for the miR-148a methylation level in PDAC and CP patients.

(mean miR-148a methylation, 4.25% and 1.21%, respectively; P < 0.05). We calculated the area under the ROC curve (0.719; 95% CI, 0.587–0.852; P < 0.05) and determined 3% to be the best cutoff value for diagnostically differentiating PDAC from CP at a specificity set at 90%. The corresponding sensitivity, positive predictive value, and negative predictive value of the test were 46.2%, 90.4%, and 47.4%, respectively (Fig. 4B).

Discussion

The expression profiles of microRNA genes are substantially altered in cancers (25). Loss or gain of microRNA gene expression is a crucial event in carcinogenesis. DNA hypermethylation is one cause of inactivation for numerous tumor suppressor genes and has been identified more recently as a cause of inactivation of microRNA gene expression (7, 19, 26). In this study, we identified 55 microRNAs that were up-regulated after 5-Aza-dC and TSA treatment in at least 1 of 4 PDAC-derived cell lines (Table 1). A recent study that used a similar approach with MIA PaCa-2 and PANC-1 cells identified a different panel of microRNAs (18). Although certain microRNAs (miR-29a, miR-30b, and so on) are common to the 2 studies, the discrepancy between these 2 studies can be explained either by the different duration of the 5-Aza-dC treatment and its concentration or by the use of different techniques for microRNA microarray hybridization and/or normalization. Of these 55 microRNAs, the coding sequences for 29 (53%) of these microRNAs were located in the vicinity of a CpG island, therefore strongly suggesting direct repression by DNA hypermethylation. Of these 29 candidates, we focused our study on miR-148a for 3 reasons. First, the production of miR-148a was upregulated in response to 5-Aza-dC and TSA treatment in 3 of 4 PDAC-derived cell lines. Second, previous studies demonstrated a miR-148a down-regulation in PDAC that can distinguish PDAC from CP (11, 24). Third, miR-148a down-regulation has also been observed in other types of cancer, suggesting an important role for this microRNA in cancer development (19, 21, 27). We then demonstrated that aberrant DNA hypermethylation is the cause of the repression of miR-148a production in PDAC-derived cell lines and PDAC samples, compared with adjacent samples of nonpathologic tissue (Figs. 1 and 2). These findings are in accordance with previous studies that showed hypermethylation of the region encoding miR-148a in other cancer samples associated with the appearance of lymph node metastasis (19, 21). More interestingly, we further showed that this aberrant hypermethylation of the miR-148a-coding region occurs early in human PDAC precursor PanIN lesions (Fig. 3). Importantly, hypermethylation of the miR-148a-coding region, which correlates with a repression of miR-148a production, appears at the PanIN-1B stage. It is not unexpected that this early epigenetic event in PDAC carcinogenesis is also involved in the metastatic propensity of other cancers, as suggested by Lujambio et al. (19). Indeed, there are several examples of genes implicated in the regulation of invasion [e.g., *SPARC*, secreted protein, acidic, cysteine-rich (osteonectin); *TFPI2*, tissue factor pathway inhibitor 2]

that are silenced by hypermethylation in pancreatic preneoplastic lesions (28–30). Together, these findings favor an important role for the loss of *MIR148A* expression in PDAC development.

The identification of the mRNA targets of miR-148a will provide valuable information to better understand the consequences of the loss of miR-148a in PDAC development. To date, only a few mRNA targets have been described for miR-148a in other cancers. The mRNA of *TGIF2* (TGFB-induced factor homeobox 2) gene, which is overexpressed in ovarian cancer, was demonstrated to be targeted by miR-148a (19). The mRNA of pregnane X receptor, a major transcription factor regulating the inducible expression of a variety of transporters and drug-metabolizing enzymes, has also been demonstrated to be a miR-148a target (31). Interestingly, the mRNA of the *DNMT3B* [DNA (cytosine-5-)-methyltransferase 3 beta] gene, which encodes a DNA methyltransferase enzyme, is another known target of miR-148a (32). It is therefore tempting to speculate that the down-regulation of miR-148a observed early in preneoplastic lesions leads to an up-regulation of DNMT3B and consequently to the inactivation of tumor suppressor genes.

DMR detection is commonly used in clinics for cancer diagnosis (33), and the detection of DMRs in resected tumor samples has previously been described to diagnose PDAC (34). Unfortunately, only 15% of PDAC patients are eligible for surgical resection. As previously mentioned, miR-148a down-regulation distinguishes PDAC samples from CP samples (11, 24). Despite the improvements in imaging techniques, the differential diagnosis of PDAC and CP remains arduous in practice, especially in cases of the pseudotumoral form of CP. EUS-FNA biopsy is a safe and effective technique for diagnosing and staging PDAC; however, measurement of RNA production can be problematic because of the poor quality of the RNA extracted from these biopsies [(24) and our own experience]. EUS-FNA biopsy allows cytologic diagnosis and the detection of genetic alterations, such as mutation of the *KRAS* gene (14). Although a similar approach has been used to discriminate breast cancer from benign lesions (35), our study is the first to demonstrate the feasibility and potential value of qMS-PCR quantification of a specific DMR region in DNA extracted from EUS-FNA samples of patients with pancreatic ailments. Indeed, we have shown that the methylation level of the miR-148a-coding region is significantly higher in PDAC samples than in CP samples (4.25% vs 1.22%, $P < 0.05$; Fig. 4). The weak level of methylation compared with that in PDAC-derived cell lines (Figs. 1 and 2) can be easily explained by the lower content of cancerous cells in EUS-FNA biopsy samples. Our goal is to use this marker as a diagnostic tool

for PDAC rather than as a screening tool. For a specificity goal of $\geq 90\%$, we determined a cutoff value for miR-148a hypermethylation of 3% with a sensitivity at 46.2% (Fig. 4). We are aware that the accuracy of our test remains below that routinely achieved by cytopathology analysis. It is important to specify, however, that the differential diagnosis of PDAC and CP in the patients included in this study was established by EUS-FNA cytopathologic analysis, and despite the high specificity (100%), cytologic analysis with a sensitivity of only 83% is not a gold standard for the differential diagnosis of PDAC and CP (14). To measure the accuracy of our 2 tests (i.e., cytopathology and analysis of methylation levels in the miR-148a-coding region) or the performance of a combination of both methods will require study with resected tumors and pathology analysis. In this retrospective study, 2 of 20 patients with a CP diagnosis presented with a *MIR148A* methylation level greater than the cutoff threshold of 3%. We cannot exclude the possibility that these 2 patients with diagnosed CP actually have high-grade PanIN lesions or will develop PDAC in the near future.

In conclusion, we point out the potential value of this marker in the differential diagnosis of PDAC and CP. When cytology results are inconclusive, the use of this marker may avoid the need for additional invasive biopsies. Moreover, we envision combining study of the methylation level of the miR-148a-coding region with cytopathology analysis to improve the diagnosis of PDAC.

Author Contributions: All authors confirmed they have contributed to the intellectual content of this paper and have met the following 3 requirements: (a) significant contributions to the conception and design, acquisition of data, or analysis and interpretation of data; (b) drafting or revising the article for intellectual content; and (c) final approval of the published article.

Authors' Disclosures of Potential Conflicts of Interest: Upon manuscript submission, all authors completed the Disclosures of Potential Conflict of Interest form. Potential conflicts of interest:

Employment or Leadership: None declared.

Consultant or Advisory Role: None declared.

Stock Ownership: None declared.

Honoraria: None declared.

Research Funding: This work was funded by the Association sur la Recherche contre le Cancer and the Agence Nationale de la Recherche (ANR) (M. Dufresne, the project investigator; M. Dufresne and J. Torrisani were partners in the application). J. Torrisani, fellowship "Jeune chercheur confirmé" from the Ligue Nationale contre le Cancer.

Expert Testimony: None declared.

Role of Sponsor: The funding organizations played no role in the design of study, choice of enrolled patients, review and interpretation of data, or preparation or approval of manuscript.

Acknowledgments: We are grateful for the results provided from the quantitative transcriptomic (J.J. Maoret, IFR150) and experimental histopathology (Dr. Al Saati, IFR150) platforms. We thank Dr. T. Levade (INSERM U858) for leukocyte DNA samples, S. Péries for samples from the tumor bank collection of the University Hospital of Toulouse (Tumorotheque CHU Toulouse-Cancéropole Grand Sud-Ouest), and Dr. D. Arvanitis (Center of Developmental Biology, Toulouse) for a critical reading of the manuscript.

References

- Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Murray T, Thun MJ. Cancer statistics, 2008. *CA Cancer J Clin* 2008;58:71–96.
- Hruban RH, Adsay NV, Albores-Saavedra J, Compton C, Garrett ES, Goodman SN, et al. Pancreatic intraepithelial neoplasia: a new nomenclature and classification system for pancreatic duct lesions. *Am J Surg Pathol* 2001;25:579–86.
- Hruban RH, Goggins M, Parsons J, Kern SE. Progression model for pancreatic cancer. *Clin Cancer Res* 2000;6:2969–72.
- Maitra A, Hruban RH. Pancreatic cancer. *Annu Rev Pathol* 2008;3:157–88.
- Hingorani SR, Petricoin EF, Maitra A, Rajapakse V, King C, Jacobetz MA, et al. Preinvasive and invasive ductal pancreatic cancer and its early detection in the mouse. *Cancer Cell* 2003;4:437–50.
- Fukushima N, Sato N, Ueki T, Rosty C, Walter KM, Wilentz RE, et al. Aberrant methylation of preproenkephalin and p16 genes in pancreatic intraepithelial neoplasia and pancreatic ductal adenocarcinoma. *Am J Pathol* 2002;160:1573–81.
- Saito Y, Liang G, Egger G, Friedman JM, Chuang JC, Coetzee GA, Jones PA. Specific activation of microRNA-127 with downregulation of the proto-oncogene *BCL6* by chromatin-modifying drugs in human cancer cells. *Cancer Cell* 2006;9:435–43.
- Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 2004;116:281–97.
- Lee EJ, Gusev Y, Jiang J, Nuovo GJ, Lerner MR, Frankel WL, et al. Expression profiling identifies microRNA signature in pancreatic cancer. *Int J Cancer* 2007;120:1046–54.
- Szafrańska AE, Davison TS, John J, Cannon T, Sipos B, Maghnooj A, et al. MicroRNA expression alterations are linked to tumorigenesis and non-neoplastic processes in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Oncogene* 2007;26:4442–52.
- Bloomston M, Frankel WL, Petrocca F, Volinia S, Alder H, Hagan JP, et al. MicroRNA expression patterns to differentiate pancreatic adenocarcinoma from normal pancreas and chronic pancreatitis. *JAMA* 2007;297:1901–8.
- Torrisani J, Boumet B, du Rieu MC, Bouisson M, Souque A, Escourrou J, et al. let-7 microRNA transfer in pancreatic cancer-derived cells inhibits in vitro cell proliferation but fails to alter tumor progression. *Hum Gene Ther* 2009;20:831–44.
- du Rieu M, Torrisani J, Selves J, Al Saati T, Souque A, Dufresne M, et al. microRNA-21 is induced early in pancreatic ductal adenocarcinoma precursor lesions. *Clin Chem* 2010;56:603–12.
- Boumet B, Souque A, Senesse P, Assenat E, Barthelet M, Lesavre N, et al. Endoscopic ultrasound-guided fine-needle aspiration biopsy coupled with KRAS mutation assay to distinguish pancreatic cancer from pseudotumoral chronic pancreatitis. *Endoscopy* 2009;41:552–7.
- Gu G, Dubauskaite J, Melton DA. Direct evidence for the pancreatic lineage: NGN3+ cells are islet progenitors and are distinct from duct progenitors. *Development* 2002;129:2447–57.
- Liu N, Furukawa T, Kobari M, Tsao MS. Comparative phenotypic studies of duct epithelial cell lines derived from normal human pancreas and pancreatic carcinoma. *Am J Pathol* 1998;153:263–9.
- Torrisani J, Parmentier L, Buscail L, Cordelier P. Enjoy the silence: the story of let-7 microRNA and cancer. *Curr Genomics* 2007;8:229–33.
- Lee KH, Lotterman C, Karikari C, Omura N, Feldmann G, Habbe N, et al. Epigenetic silencing of microRNA miR-107 regulates cyclin-dependent kinase 6 expression in pancreatic cancer. *Pancreatology* 2009;9:293–301.
- Lujambio A, Calin GA, Villanueva A, Ropero S, Sanchez-Cespedes M, Blanco D, et al. A microRNA DNA methylation signature for human cancer metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:13556–61.
- Torrisani J, Bouisson M, Puente E, Capella G, Laurent-Puig P, Berger A, et al. Transcription of *SST2* somatostatin receptor gene in human pancreatic cancer cells is altered by single nucleotide promoter polymorphism. *Gastroenterology* 2001;120:200–9.
- Lehmann U, Hasemeier B, Christgen M, Müller M, Römermann D, Länger F, Kreipe H. Epigenetic inactivation of microRNA gene *hsa-mir-9-1* in

-
- human breast cancer. *J Pathol* 2008;214:17–24.
22. Sato N, Maehara N, Su GH, Goggins M. Effects of 5-aza-2'-deoxycytidine on matrix metalloproteinase expression and pancreatic cancer cell invasiveness. *J Natl Cancer Inst* 2003;95:327–30.
23. Siedow A, Szyf M, Gratchev A, Kobalz U, Hanski ML, Bumke-Vogt C, et al. De novo expression of the Muc2 gene in pancreas carcinoma cells is triggered by promoter demethylation. *Tumour Biol* 2002;23:54–60.
24. Szafranska AE, Doleshal M, Edmunds HS, Gordon S, Luttgies J, Munding JB, et al. Analysis of microRNAs in pancreatic fine-needle aspirates can classify benign and malignant tissues. *Clin Chem* 2008;54:1716–24.
25. Calin GA, Croce CM. MicroRNA signatures in human cancers. *Nat Rev Cancer* 2006;6:857–66.
26. Lujambio A, Ropero S, Ballestar E, Fraga MF, Cerrato C, Setién F, et al. Genetic unmasking of an epigenetically silenced microRNA in human cancer cells. *Cancer Res* 2007;67:1424–9.
27. Katada T, Ishiguro H, Kuwabara Y, Kimura M, Mitui A, Mori Y, et al. MicroRNA expression profile in undifferentiated gastric cancer. *Int J Oncol* 2009;34:537–42.
28. Chen G, Tian X, Liu Z, Zhou S, Schmidt B, Henne-Bruns D, et al. Inhibition of endogenous SPARC enhances pancreatic cancer cell growth: modulation by FGFR1-III isoform expression. *Br J Cancer* 2009;102:188–95.
29. Sato N, Fukushima N, Hruban RH, Goggins M. CpG island methylation profile of pancreatic intraepithelial neoplasia. *Mod Pathol* 2008;21:238–44.
30. Sato N, Parker AR, Fukushima N, Miyagi Y, Iacobuzio-Donahue CA, Eshleman JR, Goggins M. Epigenetic inactivation of TFPI-2 as a common mechanism associated with growth and invasion of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Oncogene* 2005;24:850–8.
31. Takagi S, Nakajima M, Mohri T, Yokoi T. Post-transcriptional regulation of human pregnane X receptor by micro-RNA affects the expression of cytochrome P450 3A4. *J Biol Chem* 2008;283:9674–80.
32. Duursma AM, Kedde M, Schrier M, le Sage C, Agami R. miR-148 targets human DNMT3b protein coding region. *RNA* 2008;14:872–7.
33. Jones PA, Baylin SB. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet* 2002;3:415–28.
34. Matsubayashi H, Canto M, Sato N, Klein A, Abe T, Yamashita K, et al. DNA methylation alterations in the pancreatic juice of patients with suspected pancreatic disease. *Cancer Res* 2006;66:1208–17.
35. Jeronimo C, Monteiro P, Henrique R, Dinis-Ribeiro M, Costa I, Costa VL, et al. Quantitative hypermethylation of a small panel of genes augments the diagnostic accuracy in fine-needle aspirate washings of breast lesions. *Breast Cancer Res Treat* 2008;109:27–34.

Dans cette étude, nous avons identifié 55 microARNs dont l'expression est augmentée en réponse à un traitement déméthylant de l'ADN (5-aza-dC et TSA) et ce, dans au moins 1 des 4 lignées cellulaires dérivées d'AP. Une étude récente a utilisé une approche similaire dans les cellules MIA PaCa-2 et les cellules PANC-1 et a identifié un panel différent de microARNs. Bien que certains microARNs (miR-29a, miR-30b) soient communs aux 2 études, la différence dans ce profil peut s'expliquer soit par la durée du traitement de 5-aza-dC et sa concentration soit par l'utilisation de différentes techniques de mesure de l'expression des microARNs. Parmi ces 55 microARNs, les séquences codantes pour 29 (53%) d'entre eux sont situées dans le voisinage d'un îlot CpG, suggérant fortement une répression directe par hyperméthylation de l'ADN. Parmi ces 29 candidats, nous nous sommes concentrés sur miR-148a pour 3 raisons :

- L'expression de miR-148a est induite en réponse à un traitement déméthylant de l'ADN dans 3 des 4 lignées cellulaires dérivées d'AP.
- Des études précédentes ont démontré une répression de l'expression de miR-148a dans l'AP et que cette répression peut distinguer l'AP de la pancréatite chronique.
- La répression de miR-148a a également été observée dans d'autres types de cancers, suggérant un rôle important de ce microARN dans les processus de carcinogénèse.

Nous avons ensuite démontré que la répression de l'expression de miR-148a était due à l'hyperméthylation aberrante de sa séquence génomique, dans différentes lignées cellulaires dérivées d'adénocarcinomes pancréatiques et dans une série d'échantillons tumoraux comparés à leurs tissus adjacents sains. Mais le point crucial de cette étude est la démonstration que cette hyperméthylation est un événement très précoce de la carcinogénèse pancréatique et intervient au stade des lésions PanINs. Ceci laisse présager un rôle potentiel pour la répression de ce microARN dans la carcinogénèse.

miR-148a présente la particularité d'être dans une région intergénique, ce qui suggère qu'il est sous le contrôle de son propre promoteur. Il est important de noter que nous avons mesuré le niveau de méthylation de la séquence génomique codant pour miR-148a et non de sa séquence promotrice. Le point d'initiation de la transcription de miR-148a a été décrit par Lujambio *et al.* à environ 500 pb en amont de la séquence de ce microARN. Nous avons étudié par bioinformatique les séquences humaine, murine et équine voisines de miR-148a et nous avons constaté la présence d'un motif extrêmement bien conservé entre les espèces à 1200 pb en amont de sa séquence codante, d'une longueur de 300 pb (figure supplémentaire).

```

hsa      GGCCGCCAGGCATTCCCGGGCCGGCTCCCCCTC-GCGCTCCGCTCCGCTCCCTTCCATC 1256
eca      GGCCGCCAGCCATTCCCGTGCGGGCTCCCCCTAGCGCTCCGCTCTGCTCTCTTCCATC 1290
mmu      GGCCGCTGAGC-----TAGGCTTCCAG-TGGGCGCTCCGCTCCGCTCCCTTCCATC 1096
***** *          **** *          ***** * *          *****

hsa      TTGACTTTTGCCGACGTGGAAATTTTGGGTTTGGAGACGACCTGCGCTCTTATTGGCTGC 1316
eca      TTGACTTTTGCCGACGTGGAAATTTTGGGTTTGGAGACGACCTGCGCTCTTATTGGCTGC 1350
mmu      TTGACTTTTGCCGACGTGGAAATTTTGGGTTTGGAGACGACCTGCGCTCTTATTGGCTGC 1156
*****

hsa      CGGCGGGCGGGGTCGGAGGTCACGGCTGCTCTCGCTATTCCGCGCCAAGGGGAGCCGCAC 1376
eca      CGGCGGGCGGGGTCGGAGGTCACGGCTGCTCTCGCTATTCCGCGCCAAGGGGAGCCGCAC 1410
mmu      CGGCGGGCGGGGTCGGAGGTCACGGCTGCTCTTGTATTCCGCGCCAAGGGGAGCCGCAA 1216
*****

hsa      AGCGGCTCGTGTCAA-GTCAGCAGGTTCCCTCCGCCTCCCCGGGGTACGTGCGCCCCG 1435
eca      AGCGGCTCGTGTCAAAGTACAGCAGGTTCCCTCCGCCTCCCC-GGGGTACGTGCGCCCCG 1469
mmu      AACGGCTCGTGTCAA-GTCAGCAGGTTCCCTCCGCCTCCTC-AGGGTACGTGCGCGCTG 1274
* ***** * ***** * ***** * ***** *

hsa      GGCGGGCCCGGAGACGCCTCCTT-ATGCAAATAGAGCGGCCGCGGGGCTGGG-GGC- 1492
eca      GGCGGGCCCGGAGCCGGCTCCTTTATGCAAATAGACTGCTCGCGCGGCTGGG-GGCC 1528
mmu      GGCGGGCGGGGAACCGCTCCTT-ATGCAAATAAA-CGACGAAGGGGCCAGGAGGAA 1332
***** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

```

Figure supplémentaire : Alignement des séquences humaine, murine et équine de la région située à environ 1200 pb en amont de la séquence codante de miR-148a.

La conservation de cette séquence en fait une région de choix pour la présence du promoteur de miR-148a. Malheureusement, malgré nos efforts, la très forte concentration en cytosines et guanosines ne nous a pas permis de cloner cette région afin d'en étudier l'impact sur l'activité transcriptionnelle d'un gène rapporteur.

Nous avons aussi démontré que la répression de miR-148a permet de distinguer les échantillons d'AP des échantillons de pancréatite chronique. Malgré les améliorations des techniques d'imagerie, le diagnostic différentiel entre AP et pancréatite chronique reste difficile, en particulier dans le cas de la forme pseudo tumorale de la pancréatite chronique. La cytoponction guidée par écho-endoscopie est une technique sûre et efficace pour le diagnostic de l'AP mais la mesure de l'expression d'ARNs peut être problématique en raison de la mauvaise qualité de l'ARN extrait à partir de ces biopsies. Cette technique de biopsie permet l'analyse cytologique et la détection d'altérations génétiques, comme la mutation du gène KRAS. Bien qu'une approche similaire ait été utilisée pour distinguer le cancer du sein de lésions bénignes, notre étude est la première à démontrer la faisabilité et la valeur potentielle de l'étude du niveau de méthylation d'une région spécifique d'ADN extrait de cytoponctions pancréatiques. En effet, nous avons montré que le niveau de méthylation de la région codant pour miR-148a est nettement plus élevé dans les échantillons AP que dans les échantillons de pancréatite chronique (4,25% vs 1,22%, p <0,05). Le faible niveau de méthylation par rapport à celui des lignées

cellulaires dérivées d'AP peut être facilement expliqué par la faible teneur en cellules cancéreuses des cytoponctions.

Afin d'utiliser ce marqueur comme un outil de diagnostic différentiel entre AP et pancréatite chronique, nous avons déterminé une valeur seuil de méthylation de miR-148a de 3% associée à une sensibilité de 46,2% et une spécificité de 90%. Cette marque de méthylation seule n'apporte donc pas d'amélioration par rapport à l'étude de la mutation KRAS ou l'analyse anatomopathologique qui restent des standards pour le diagnostic de l'AP. Néanmoins, le service de gastroentérologie du CHR Toulouse - Rangueil déplore 28% de patients (48 patients sur 173) sur une période de trois ans pour lesquels le diagnostic différentiel n'est pas possible lors de la première cytoponction. Bien que modeste, cette marque prouve ici son utilité en s'ajoutant à ces outils pour le diagnostic différentiel entre AP et pancréatite chronique.

En conclusion, nous soulignons la valeur potentielle de ce marqueur dans le diagnostic différentiel entre AP et PC. Lorsque les résultats de cytologie ne sont pas concluants, l'utilisation de ce marqueur peut éviter la nécessité de biopsies invasives supplémentaires.

Article 2 - « Absence d'effet thérapeutique suite à la restauration de l'expression de miR-148a dans le cancer du pancréas ».

La répression précoce de miR-148a durant la carcinogénèse pancréatique, outre le fait que ce microARN est réprimé dans différents cancers, suggère un rôle suppresseur de tumeur. En effet, la surexpression ectopique de miR-148a dans des cellules dérivées de cancer colorectal diminue l'expression de BCL2 et favorise l'apoptose [321]. De même, la surexpression de miR-148a met en place un effet chimiosensibilisant dans des cellules dérivées de cancer de l'œsophage [322] et antiprolifératif dans des cellules tumorales ovariennes. Cependant, différentes études présentent des résultats contradictoires : la surexpression de miR-148a dans des cellules dérivées de cancer de l'estomac augmente leur prolifération, mais diminue leur potentiel invasif [323][324]. Ainsi, selon les cancers étudiés et les équipes, le rôle de miR-148a semble soit anti-, soit pro-tumoral. Cette différence d'effet pourrait être expliquée par les transcrits ciblés, différents d'un cancer à l'autre. En effet, plusieurs études conduites sur différents cancers ont montré que miR-148a ciblent des transcrits codants pour des protéines impliquées dans la régulation du cycle cellulaire, l'apoptose ou la méthylation de l'ADN. La seule étude menée dans le cancer du pancréas a mis en évidence la régulation de l'expression de CDC25b par miR-148a, signifiant que la baisse d'expression de ce microARN conduit à un avantage prolifératif [325]. Devant les différents rôles proposés pour miR-148a parmi les différents cancers, la majorité semble démontrer un rôle suppresseur de tumeur en accord avec sa répression.

L'identification des ARNm cibles de miR-148a fournira des informations précieuses pour mieux comprendre les conséquences de sa perte d'expression dans l'AP. À ce jour, seuls quelques ARNm cibles ont été décrits pour miR-148a dans d'autres cancers : l'ARNm de TGIF2 (*TGFB induced factor homeobox 2*), qui est surexprimé dans le cancer de l'ovaire, a été montré comme étant la cible de miR-148a. L'ARNm du *Pregnan X Factor*, un facteur de transcription régulant l'expression d'une variété de transporteurs et d'enzymes métabolisant les médicaments, a également été démontré comme étant une cible de miR-148a. De manière très intéressante, les ARNm de DNMT3B et DNMT1 sont des cibles décrites de miR-148a. Il serait donc possible que la répression précoce de miR-148a par hyperméthylation de sa séquence génomique conduise à une surexpression de ces deux DNMTs, aboutissant à l'hyperméthylation de différents gènes suppresseurs de tumeurs. Cela constituerait une boucle de dérégulation très intéressante mais aucun travail ne

prouve que miR-148a soit responsable de l'hyperméthylation de gènes suppresseurs de tumeurs à un stade précoce.

L'adénocarcinome pancréatique est un cancer pour lequel la chirurgie représente le seul traitement curatif. Cette chirurgie n'est possible que dans 20% des cas suivant l'état général du patient et le stade d'invasion de la tumeur. En absence de chirurgie, la chimiothérapie (principalement par gemcitabine, un analogue non-métabolisable de la cytidine bloquant les cellules durant la réplication de l'ADN) n'est utilisé qu'à visées palliatives [296]. Ceci est dû à la résistance des tumeurs face aux thérapies conventionnelles. Des travaux précédents de l'équipe ont démontré l'intérêt de la thérapie génique pour le traitement du cancer du pancréas. Ces travaux ont donné lieu à un essai clinique (TerGAP, Thérapie Génique de l'Adénocarcinome Pancréatique) visant à étudier l'utilité du transfert de matériel génétique (codant pour deux enzymes du métabolisme de la gemcitabine et pour le récepteur SST2) pour la chimiosensibilisation des tumeurs [326]. Ce transfert de gène peut être effectué par transfection, comme dans le cas du TerGAP, entraînant une expression transitoire du gène médicament, mais de nombreux travaux ont démontré l'utilité de la transduction lentivirale pour une expression stable du gène d'intérêt dans les cellules tumorales [327][328]. La transduction lentivirale repose sur la production artificielle de particules pseudo-virales, non répliquatives, qui présentent l'intérêt de s'insérer dans le génome de la cellule hôte par le biais d'une intégrase.

Ce travail avait pour but de déterminer l'effet de la restauration de miR-148a dans des cellules dérivées de l'adénocarcinome pancréatique, afin d'évaluer le potentiel thérapeutique de ce microARN.

The Rescue of miR-148a Expression in Pancreatic Cancer: An Inappropriate Therapeutic Tool

Yannick Delpu^{1,2}, Hubert Lulka^{1,2}, Flavie Sicard^{1,2}, Nathalie Saint-Laurent^{2,4}, Frédéric Lopez^{2,4}, Naïma Hanoun^{1,2}, Louis Buscail^{1,2,3}, Pierre Cordelier^{1,2}, Jérôme Torrisani^{1,2*}

1INSERM UMR 1037- University of Toulouse III, Cancer Research Center of Toulouse (CRCT), University Hospital Center Rangueil, Toulouse, France, **2**Paul Sabatier University, Toulouse, France, **3**Department of Gastroenterology, University Hospital Center Rangueil-Larrey, Toulouse, France, **4**Basic and Clinical Proteomics Group, INSERM UMR 1037, Cancer Research Center of Toulouse, University Hospital Center Rangueil, Toulouse, France

Abstract

MicroRNAs are small non-coding RNAs that physiologically modulate proteins expression, and regulate numerous cellular mechanisms. Alteration of microRNA expression has been described in cancer and is associated to tumor initiation and progression. The microRNA 148a (miR-148a) is frequently down-regulated in cancer. We previously demonstrated that its down-regulation by DNA hypermethylation is an early event in pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) carcinogenesis, suggesting a tumor suppressive function. Here, we investigate the potential role of miR-148a over-expression in PDAC as a therapeutic tool. We first report the consequences of miR-148a over-expression in PDAC cell lines. We demonstrate that miR-148a over-expression has no dramatic effect on cell proliferation and cell chemo-sensitivity in four well described PDAC cell lines. We also investigate the modulation of protein expression by a global proteomic approach (2D-DIGE). We show that despite its massive over-expression, miR-148a weakly modulates protein expression, thus preventing the identification of protein targets in PDAC cell lines. More importantly, *in vivo* data demonstrate that modulating miR-148a expression either in the epithelia tumor cells and/or in the tumor microenvironment does not impede tumor growth. Taken together, we demonstrate herein that miR-148a does not impact PDAC proliferation both *in vitro* and *in vivo* thus suggesting a weak potential as a therapeutic tool.

Citation: Delpu Y, Lulka H, Sicard F, Saint-Laurent N, Lopez F, et al. (2013) The Rescue of miR-148a Expression in Pancreatic Cancer: An Inappropriate Therapeutic Tool. PLoS ONE 8(1): e55513. doi:10.1371/journal.pone.0055513

Editor: Guenter Schneider, Technische Universität München, Germany

Received: January 6, 2012; **Accepted:** January 2, 2013; **Published:** January 31, 2013

Copyright: © 2013 Delpu et al. 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.

Funding: This work was funded by the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM, www.inserm.fr) and the Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC, www.arc-cancer.net). Proteomics studies were supported by the Toulouse Proteomics Infrastructure with financial support of «Association pour la Recherche sur le Cancer» (ARC- ARECA Program). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: jerome.torrisani@inserm.fr

Introduction

Pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) is the fourth leading cause of death by cancer in Western countries whereas it represents only 3% of new cases each year [1]. PDAC prognosis is frequently explained by a lack of early specific diagnostic markers and by the absence of efficient treatments. To date, surgery represents the only curative approach for PDAC management but concerns a small subset of patients due to PDAC aggressiveness and invasive phenotype. For the remaining patients diagnosed with locally advanced or metastatic PDAC, gemcitabine chemotherapy is the standard palliative treatment with modest effect on survival [2]. Consequently, remarkable studies have been performed to elucidate the key events driving pancreatic carcinogenesis, to identify new targets and to develop tumor-targeted therapies [3,4]. Genetic and epigenetic alterations have been described as an early event in the development of PDAC [5]. In the last decade, significant works highlighted the impact of such molecular alterations on microRNAs expression in PDAC. MicroRNAs are small non coding RNAs that inhibit the translation of their target mRNAs. They play important roles in cancer development, invasiveness and resistance to chemotherapies [6].

We previously demonstrated that microRNA-148a expression (miR-148a) is down-regulated early during PDAC development by hypermethylation of its genomic DNA sequence [7]. Other studies reported the down-regulation of miR-148a expression in other cancers (*i.e.*: colorectal, esophageal, gastric cancers and cancer metastasis) [8,9,10,11]. Several miR-148a mRNA targets were described in different types of cancer. These targets regroup cell cycle, apoptosis or DNA methylation effectors.

Previous studies evoked a tumor suppressive effect consequent to an over-expression of miR-148a in colorectal and gastric cancer-derived cell lines [8,10]. Consequently, the present study aimed to determine whether restoring miR-148a expression impacts PDAC proliferation both *in vitro* and *in vivo* and therefore could be proposed as a therapeutic tool.

Materials and Methods

Cell culture

Human PDAC Capan-2 and IMIM-PC2 cell lines was grown in RPMI medium supplemented with 100 mL/L fetal calf serum, L-glutamine (2 mM) (Life Technologies), antibiotic and antimycotic cocktail (Life Technologies) and Plasmocin® (5 µg/mL) (Invivo-Gen). MIA PaCa-2 and PANC-1 PDAC cells and Human

Embryonic Kidney HEK-293FT cells were grown in DMEM containing 4.5 g/L glucose (Life Technologies), 100 mL/L fetal calf serum, L-glutamine, antibiotics, Fungizone[®] and Plasmocin[®] (InvivoGen). Human PDAC-derived BxPC-3 cells were grown in DMEM containing 1 g/L glucose (Life Technologies), 100 mL/L fetal calf serum, L-glutamine, antibiotic and antimycotic cocktails. Human Pancreatic Nestin positive Epithelial cells (HPNE) were grown in 75% DMEM 4.5 g/L glucose (Life Technologies), 25% Medium M3 Base (Incell Corp.), fetal bovine serum 5%, 10 ng/mL human recombinant EGF (Sigma-Aldrich) and 750 ng/mL gentamycin (Life Technologies). All cell lines were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC) excepted for HPDE cells and HPNE cells which are kind gifts from Dr M.S. Tsao (University of Toronto, Canada) and Dr M. Ouellette (University of Nebraska Medical Center, Omaha, USA), respectively [12][13]. IMIM-PC2 cells were obtained from Dr FX Real (Spanish National Cancer Research Centre, Madrid, Spain).

Cell transfection

For all *in vitro* experiments, miR-148a pre-miRTM miRNA precursors (Ambion) at 25 nM and 50 nM were transfected using siPORTTM NeoFXTM Transfection Agent (Ambion) according to manufacturer's instructions. CyTM3 dye-labeled Pre-miR was used as negative control and was transfected using the same conditions.

Cell cycle analysis by flow cytometry

Transfected Capan-2 cells were collected, rinsed once in phosphate-buffered saline (PBS) and fixed in ice-cold 70% ethanol overnight at 4°C. Cells were collected by centrifugation at 1.000 g and rinsed with PBS. Cells were labeled with propidium iodide (Life Technologies) following manufacturer's recommendations. Cell cycle distribution was assessed using BD FACS Calibur apparatus (Beckton Dickinson) and Cell quest pro software (Beckton Dickinson) as described by Hanoun *et al.* [14].

2D-DIGE electrophoresis

Cell lysis was performed in Urea 8M, Thiourea 2M, CHAPS 4%, pH 8.5. After clean-up precipitation (2D Clean Up kit, GE Healthcare), proteins were resuspended in 2D-DIGE sample buffer (Urea 8M, Thiourea 2M, CHAPS 4%, pH 8.5). Protein concentration was determined with 2D Quant kit (GE-Healthcare). Fifty micrograms of proteins were labeled with 400 pmol of CyDye DIGE Fluor Minimal Dyes (GE Healthcare) and incubated on ice in the dark for 30 min according to manufacturer's instructions. The reaction was stopped by the addition of 1 µl of 10 mM lysine and incubated on ice for 10 min. The differentially Cy-3 and Cy-5 labeled samples were mixed with the Cy-2 labeled internal standard (sample composed of equal aliquots of each sample of the experiment) and IsoElectric Focusing (IEF) re-hydration buffer (Urea 8M, Thiourea 2M, CHAPS 2%, 10 mM DTT, 1,2% IPG (Immobilized pH Gradient) buffer, pH 4–7, GE Healthcare) was added up to 350 µL. For the 2D-DIGE analysis, IEF was performed using an IPGPhor 2 apparatus (GE Healthcare) according to the manufacturer's recommendations with immobilized pH gradient (IPG) pH 4–7, 18 cm. Strips were first incubated in equilibration buffer (Urea 6 M, SDS 2%, Tris-HCl 50 mM pH 8.6, glycerol 30%, bromophenol blue trace) containing 1% DTT for 15 min and thereafter in the same buffer with 4.5% iodoacetamide, for 15 min, in the dark. The strips were loaded on the top of 12.5% acrylamide gels and ran at 1 W/h for 1.5 h and at 15 W/h until the bromophenol blue reaches the bottom-end of the gel. The gels were scanned using a Typhoon trio Imager (GE Healthcare) at 100 µm resolution with λ_{ex}/em of 488/520, 532/580, and 633/670 nm for Cy-2, Cy-3 and Cy-5,

respectively. Image analysis was performed using DeCyder 6.5 software (GE Healthcare).

Plasmids

The pLVMND-SLuc plasmid encoding the secreted Gaussia Luciferase (Gluc) was kindly provided by Cayla-InVivoGen (Toulouse, France). Lentiviral expression vector encoding miR-148a and the copGFP (pMIRNA1-miR148a) or copGFP alone (pMIRNA1-GFP) were obtained from Biovalley (Marne-la-Vallée, France). Plenti6-TR, encoding the TET repressor, was obtained from Life Technologies. For the inducible expression of miR-148, two partially complementary oligonucleotides corresponding to mature miR-148a or a control scrambled miR (miR-CT) were hybridized and cloned into pcDNA6.2-GW/emGFP-miR vector (Life Technologies) before recombination into pLenti4/TO/V5 DEST vector (Life Technologies) using Gateway[®] strategy. For lentivectors production, packaging plasmids pHCMV-G, encoding for VSV-G protein, and pCMV Δ 8.91, encoding for HIV-1 accessory proteins, were kindly donated by Dr A. Dubart-Kupperschmitt (Paris, France).

Lentiviral vector production

All replication defective, self-inactivating lentiviral vectors were generated in a BSL-3 facility (Vectorology platform, INSERM U1037 Cancer Research Center of Toulouse, Toulouse, France) as previously described by Torrisani *et al.* [15]. Briefly, transient transfection of HEK-293FT cells with packaging and lentiviral vector plasmids were performed using calcium phosphate precipitation. pLenti4/TO/GFP-miR-148a, pLenti4/TO/GFP miR-CT were used to obtain lentiviral particles encoding inducible miR-148a or miR-CT (namely, LV-TO-miR-148a or LV-TO-miR-CT, respectively). On the other hand, pMIRNA1-miR148a and pMIRNA1-GFP were used to obtain lentiviral particles constitutively encoding miR-148a or miR-CT (LV-miR-148a or LV-GFP, respectively). Plenti6-TR and pLVMND-SLuc plasmids were used to obtain lentiviral particles encoding the Tet repressor or the secreted luciferase (LV-TR or LV-Gluc, respectively). All batches were verified replicative virus-free. The viral titers were determined on HT-1080 cells and expressed in transduction unit/ml (TU/ml) as described elsewhere. In addition, vector concentrations were quantified by p24 ELISA (Innotest, Ingen, Paris).

Generation of MIA PaCa-2 stable cell line over-expressing miR-148a

MIA PaCa-2 cells were incubated with the LV-TR lentiviral particles (multiplicity of infection = 5) for 24 h and subsequently selected with blasticidin (Invivogen, Toulouse, France) at 100 µg/mL for 2 weeks and cloned by serial dilution to obtain MIA PaCa-2 TR cells. MIA PaCa-2 TR cells were further transduced by LV-Gluc (multiplicity of infection = 5) and cloned by serial dilution to give MIA PaC-2 TR-Gluc cells. The latter cells were incubated with LV-TO-miR-148a or LV-TO-miR-CT (multiplicity of infection = 5) for 24 h and selected with zeocin (Invivogen) at 100 µg/mL for 3 weeks and cloned by serial dilution to generate MIA PaCa-2 TR-Gluc miR-148a and MIA PaCa-2 TR-Gluc miR-CT cell lines, respectively. An optimal doxycyclin concentration of 1 µg/mL was determined to induce a maximal expression of miR-148a. The different stable cell lines were then constantly grown in the presence or the absence of doxycyclin.

Measurement of miR-148a expression by qRT-PCR

Cells were first transiently transfected or stably transduced as described above. Total RNA was isolated from cell lines with

TRIzol Reagent (Life Technologies) according to supplier's instructions. RNA concentration was measured with a NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (Thermo Scientific). The miScript PCR System (Qiagen) was used according to the manufacturer's instructions to quantify mature microRNAs from 1 µg of total RNA. U6 and 5S RNAs were used as internal controls. cDNA samples were diluted 1 into 100 for microRNA detection or U6 and 1 into 10,000 for 5S RNA detection. Duplicate qRT-PCR assays were carried out in a StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems) with SYBR Green PCR Master Mix (Qiagen). Relative amounts of miRNA were calculated by the comparative threshold cycle (CT) method as $2^{-\Delta\text{CT}}$, where $\Delta\text{CT} = \text{CT}_{\text{miRNA}} - \text{CT}_{\text{geometric mean of U6 and 5S}}$.

Proliferation assay

MiR-148a precursor or CyTM3 dye-labeled Negative Control precursor transfected cells were seeded at 6×10^3 cells per well of a 96 well dish and grown in complete medium. Number of viable cells was determined by colorimetric method using CellTiter 96® AQueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay (Promega) according to manufacturer's instructions at day 4. For proliferation measurement, cells were seeded at 5×10^4 cells per well of a 35 mm dishes. Cells were grown in complete medium supplemented with 1 µg/mL of doxycycline. Five hundred nanograms of doxycycline were added at 48 h to prevent its decay in culture medium. Cells were counted with a Coulter counter model ZM (Beckman Coulter) after 24 h, 48 h, 72 h and 96 h of culture.

Gemcitabine sensitivity assay

Twenty five thousand exponentially growing MIA PaCa-2 cells stably expressing miR-148a or control microRNA grown with or without doxycycline were plated in 35 mm dishes. Twenty four hours later, cells were treated with gemcitabine (Eli Lilly) at different doses ranging from 1×10^{-9} M to 1×10^{-4} M. After 72 h of treatment, cells were counted using Coulter counter model ZM (Beckman Coulter). Gemcitabine "Lethal Concentration 50" (LC₅₀) is the concentration of gemcitabine for which 50% of treated cells died comparatively to untreated cells at 96 hours. For the measurement of gemcitabine sensitivity in cell transiently over-expressing miR-148a, 1000 of exponentially growing PDAC cells transiently over-expressing miR-148a or a control microRNA (miR-CT) were plated in 96 well plate. Cells were treated with different doses of gemcitabine ranging from 1×10^{-9} M to 1×10^{-4} M for 72 h. For each cell line, cell viability was assessed by colorimetric method, compared to viability measured in 1×10^{-9} M treated wells and represented as a percentage of surviving cells.

Migration and invasion assays

One hundred thousand exponentially growing cells over-expressing miR-148a or the GFP reporter protein were serum-starved for 24 h and seeded into 24 well-plate sized inserts (8 µm porous 24 well format inserts for migration assays and Biotac Matrigel invasion chambers for invasion assays, BD Falcon) according to manufacturer instructions. After 15 h, migrated cells were stained with a 1% crystal violet in 20% methanol solution, lysed and cellular density was determined by optical density measure of cell lysates at 560 nm. Results are expressed as percentage of migrating or invading miR-148a over-expressing cells compared to GFP expressing cells.

Orthotopic cell graft

Eight-week-old SCID/beige CB 17 leaky mice (TAKONIC) were used for cell graft experiments. Each mouse received 12×10^6 of exponentially growing MIA PaCa-2 cells stably overexpressing miR-148a in 100 µL of PBS injected in the tail of the pancreas. Injections were performed with a 29 gauge lymphography catheter set with a 29 gauge insulin needle. Mice grafted with miR-148a expressing cells received water *ad libitum* supplemented with sucrose (25 g/L) and doxycycline (2 g/L). Control mice received water *ad libitum* supplemented with sucrose only (25 g/L). Thirty days after xenograft, mice were sacrificed and tumors were removed, weighed and measured. Tumor volume was determined by the formula $((\text{Tumor Length}) \times (\text{Tumor Width}^2))/2$. This study was performed in strict accordance with the recommendations in the chart for the Care and Use of Laboratory Animals of the INSERM. All surgery was performed under isoflurane anesthesia, and every effort was made to minimize suffering. All protocols including animals were approved by the ANEXPLO ethic committee. Macroscopic observation of tumors was performed by a skilled pathologist.

In vivo tumor transduction of MIA PaCa-2 tumors

Orthotopic tumors were established in SCID CB17 mice pancreas by injection of 12×10^6 of exponentially growing MIA PaCa-2-Gluc (as described above). Tumors were grown for 15 days before injection of 250 ng p24 of LV-miR148a lentivector using a 29 gauge lymphography catheter set with a 29 gauge insulin needle. LV-GFP was injected in control mice. Tumor progression before and after transduction was monitored by measurement of Gluc level in mice serum (as described below) and by abdominal palpation.

Luciferase activity in mice serum

Luciferase activity was measured from mice serum. Blood was collected from retro-orbital sampling using Pasteur capillary pipette (VWR) prefilled with 10 µL of a 20% EDTA solution. Blood samples were kept on ice until centrifugation. Samples were spun 3,000 g for 15 min at 4°C and serum were collected and stored -20°C until use. Luciferase activity was determined from 5 µL of serum and 45 µL of a 50 µM coelenterazine solution (Fluka analytical) on a Luminoskan ascent device (Thermo Scientific).

Statistical analysis

Results are expressed as the mean ± Standard Error. The statistical significance of differences was measured with the Mann-Whitney non parametric test, with a *p* value < 0.05 considered statistically significant. The symbol * indicates a *p* value < 0.05, ** indicates a *p* value < 0.01 and *** indicates a *p* value < 0.005.

Results

Effect of transient miR-148a over-expression on PDAC cell line growth

We previously reported that miR-148a expression is repressed by DNA hypermethylation of its genomic sequence in PDAC cell lines and tumors [7]. One could speculate that the loss of miR-148a expression is crucial for PDAC development. To assess tumor suppressive effects of miR-148a in PDAC, Capan-2, PANC-1, MIA PaCa-2 and BxPC-3 PDAC cell lines were transfected by a miR-148a oligonucleotide precursor (miR-148a) or a control precursor (miR-CT). HPNE cells which are human pancreatic cells displaying a normal phenotype were used as "non-

cancerous” control cells. Cell proliferation was measured by colorimetric method 4 days after transfection. MiR-CT transfected cells were used as internal reference for each cell line (Figure 1A). Transfection efficiency was assessed for each cell line by Cy3 fluorescence measurement and reached 90–100% (data not shown). Resulting miR-148a expression was measured by qRT-PCR (Figure S1A). MiR-148a over-expression in HPNE pancreatic normal cells did not induce significant changes in cell proliferation. Similarly, no significant change in cell proliferation was observed in the four PDAC cell lines compared to Cy3 control transfected cells. In parallel, cell cycle distribution in Capan-2 cells was determined by FACS analysis (Figure 1B). According to the absence of effect concerning cellular proliferation, no alteration in cell cycle distribution was observed in miR-148a transfected cells compared to miR-CT cells. These results indicate that transient miR-148a over-expression has no particular effect on cell proliferation of four PDAC cell lines.

Effect of stable miR-148a over-expression on PDAC cell line behavior

In addition to transient transfection experiments, we generated Tet-ON-based lentiviral particles for stable expression of miR-148a to prevent rapid oligonucleotide decay and to allow a long term follow-up of cellular events in PDAC cell lines. We transduced MIA PaCa-2 cells due to their low expression level of endogenous miR-148a [7]. In these cells, doxycycline treatment leads to a five-fold increase in miR-148a expression, as compared to miR-CT over-expressing cells (Figure S1B). However, stable expression of miR-148a does not lead to significant changes in cellular proliferation in these cells, when compared to control cells (Figure 2). Additionally, migration and invasion potential of cells over-expressing miR-148a was measured and compared to control cells (Figure S2). Here, we observed that miR-148a over-expression does not modify these two cellular functions in our MIA PaCa-2 cell line model. Taken together, we demonstrate

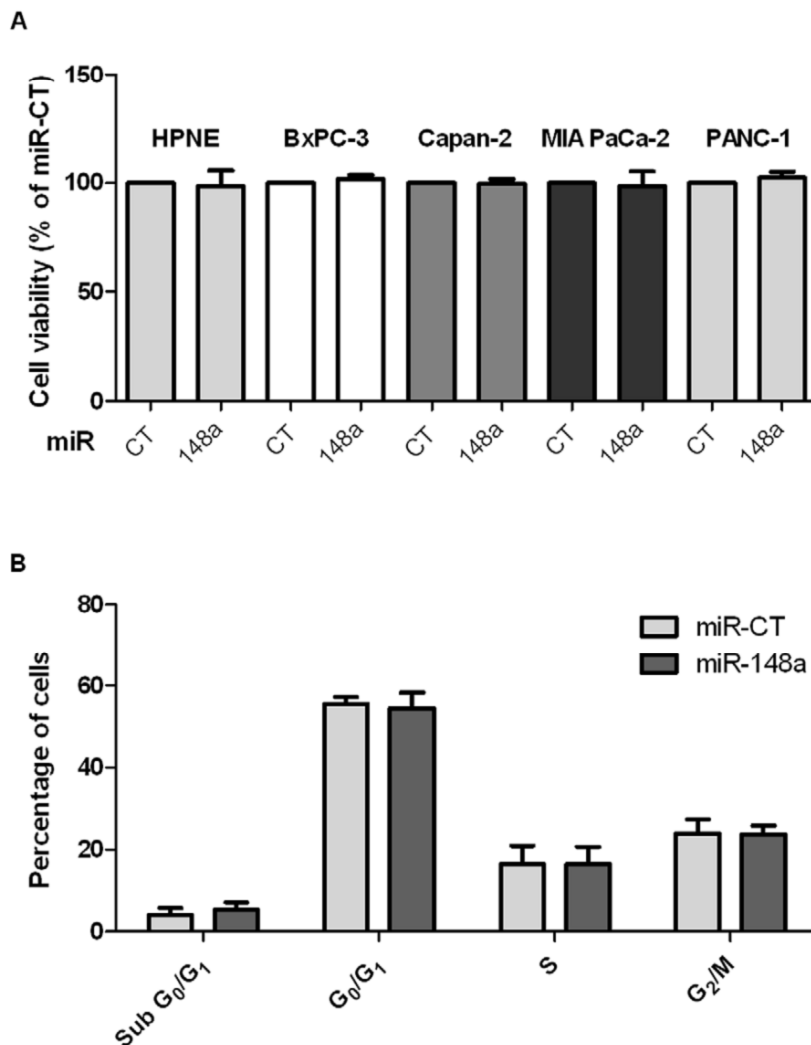


Figure 1. Transient over-expression of miR-148a in PDAC cell lines. (A) Capan-2, PANC-1, MIA PaCa-2 and BxPC-3 PDAC-derived cell lines and non-cancerous HPNE cell line were transiently transfected with miR-CT or miR-148a precursors. Four days after transfection, cell viability was assessed by colorimetric methods. For each cell line, the miR-148a-cell viability was compared to miR-CT cell viability (100%). The results are the mean of three independent experiments (\pm SEM) and are expressed as percentage of cell viability of control cells. (B), Cell cycle distribution was measured by propidium iodide staining followed by FACS analysis 72 hours after transfection of Capan-2 cells with miR-CT or miR-148a precursors. doi:10.1371/journal.pone.0055513.g001

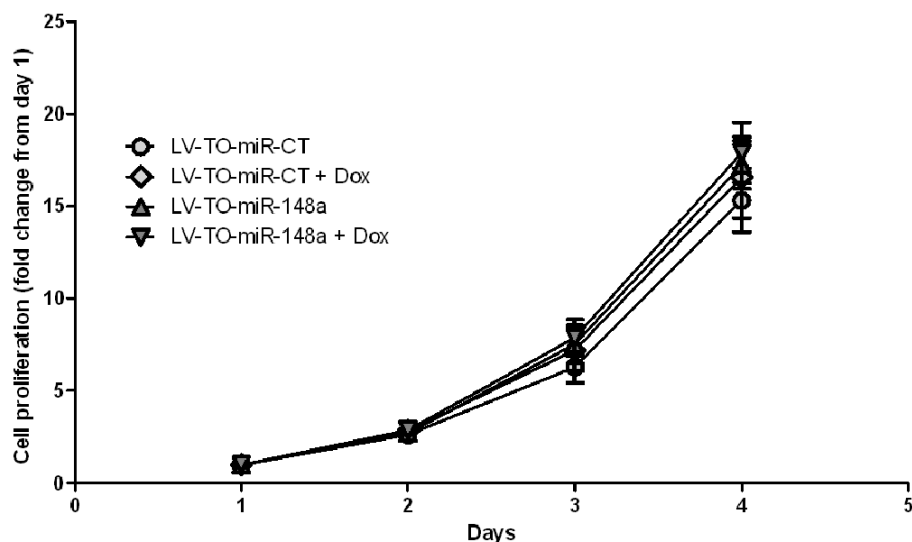


Figure 2. Effect of stable miR-148a over-expression in PDAC cell line. MIA PaCa-2 cells were incubated with inducible lentiviral vectors encoding for scramble microRNA (miR-CT) or miR-148a (miR-148a). MIA PaCa-2 miR-CT or miR-148a proliferation rate was assessed in the presence or the absence of doxycycline in culture medium. For each condition, cell count was performed every 24 h and compared to the number of adherent cells at day 1. The results are the mean of three independent experiments (\pm SEM). doi:10.1371/journal.pone.0055513.g002

that similarly to transient over-expression, long-lasting expressions of miR-148a is ineffective for the inhibition of PDAC cell proliferation and does not impact cell behavior *in vitro*.

Gemcitabine sensitivity of PDAC cell lines over-expressing miR-148a

It has been proposed previously that microRNAs can affect chemosensitivity by targeting drug transporters or impairing cellular pathway crucial for drug metabolism or cell survival [16]. As described above, gemcitabine is the reference chemotherapy for PDAC. We assessed whether miR-148a participates to PDAC cells sensitivity against this drug. We first noticed no significant correlation between miR-148a endogenous level (Figure 3A) and gemcitabine sensitivity in several PDAC cell lines (Figure 3B). In parallel, we evaluated gemcitabine sensitivity in MIA PaCa-2 cells stably over-expressing miR-148a or a miR-CT (Figure 3C). Results obtained from three independent assays indicate a non significant decrease in the lethal concentration 50 value (LC50) of gemcitabine in the presence of miR-148a as compared to control cells. Similar results were obtained after transient transfection of miR-148a in several PDAC cell lines (Figure S3). Altogether, these results indicate that miR-148a does not dramatically influence PDAC cell lines sensitivity against gemcitabine.

Protein expression profile analysis after transient miR-148a over-expression

Each microRNA can potentially affect the translation of dozens of mRNA targets according to the conservation of its target sequence [6]. The absence of cellular effects after miR-148a over-expression could be explained both by a weak change in protein expression profile, insufficient to produce a cellular effect, or by the up-regulation of a rescuing molecular pathway, consequent to miR-148a target decay. Consequently, we performed a large scale analysis of protein expression profiles by 2D-DIGE after transient miR-148a over-expression in Capan-2 cells. Capan-2 cells

transfected with miR-CT were used as control. Fluorescence analysis of 2D-gels revealed that miR-148a over-expression only results in a faint modulation of approximately 2200 protein expression when compared to control cells (Figure S4). None of these variations reached the cut-off value (1.5 fold change as compared to control transfected cells) despite a massive over-expression of miR-148a (Figure S1A). In consequence, no protein species were identified by mass spectrometry.

These results indicate that miR-148a does not dramatically affect protein expression profiles in Capan-2 cells that may account for the absence of biological effects consequent to its over-expression.

In vivo effects of miR-148a over-expression

To determine whether miR-148a may influence tumor growth *in vivo*, we generated orthotopic PDAC tumors in SCID CB17 mice using MIA PaCa-2 cells stably over-expressing miR-148a by 5 fold (Figure S1B). These cells constitutively express Gaussia luciferase (Gluc) for non-invasive tracking of tumor growth. As described by Chung and coworkers, Gluc quantification in serum accurately reflects the amount of viable cancer cells in xenograft tumors [17]. For *in vivo* studies, Gluc was sampled every 5 days and mice were sacrificed after 33 days, according to tumor size estimated by abdominal palpation. The correlation between tumor weight and Gluc signal ($R^2 = 0.79$) was confirmed after tumor resection and comparison to Gluc dosage in serum sampled the day of surgery (Figure S5).

During the course of this experiment, we found that Gluc levels were not altered by miR-148a expression indicating that miR-148a does not inhibit PDAC tumor progression *in vivo* (Figure 4A). Consistent with these findings, the analysis of tumors following surgery failed to reveal miR-148a inhibitory effects on tumor weight (Dox: 0.368 ± 0.16 g vs Untreated: 0.348 ± 0.22 g) (Figure 4B). Furthermore, histological study of the tumors indicates no difference in tissue organization between the different groups (Figure S6). These observations reveal no dramatic effect of

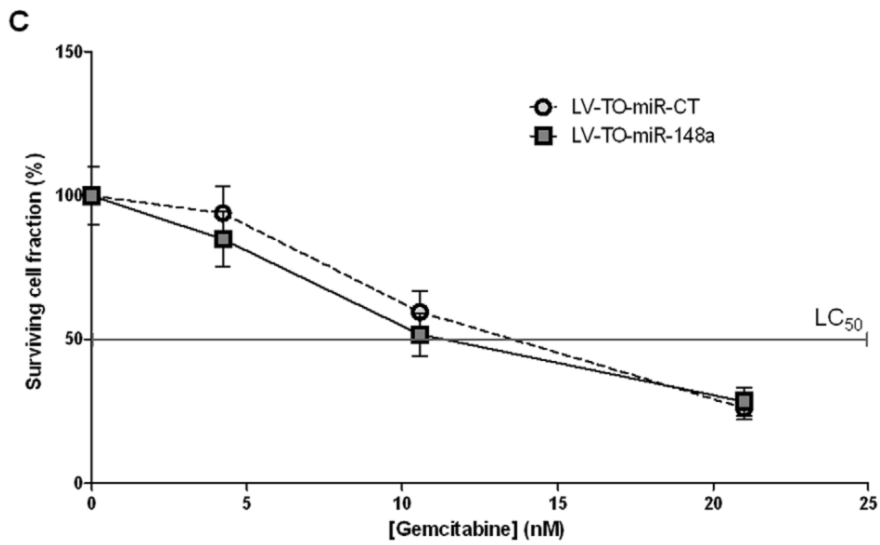
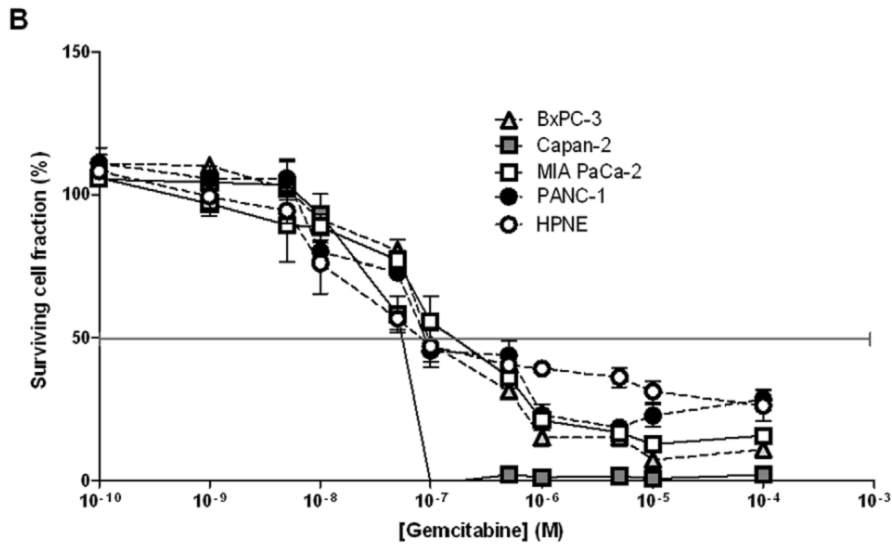
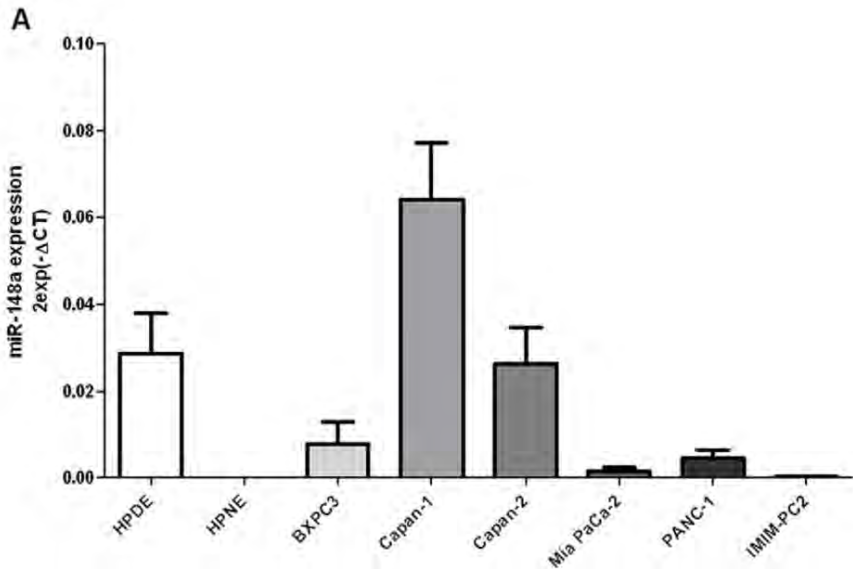


Figure 3. Gemcitabine sensitivity of PDAC cell lines over-expressing miR-148a. (A) miR-148a endogenous expression level was measured by qRT-PCR in several PDAC cell lines and in hPDE and hPNE normal pancreatic cell lines. (B) Cell sensitivity to gemcitabine was measured after a 72 h-treatment in several PDAC cell lines and in normal hPNE pancreatic cells. Surviving cell fraction represents the number of treated cells during 72 h compared to the number of untreated cells (represented as 100%). The lethal concentration 50 (LC50) represents the dose of gemcitabine sufficient to obtain 50% of surviving cells compared to untreated cells. The results are the mean of three independent experiments (\pm SEM). (C) Cell sensitivity to gemcitabine was measured in MIA PaCa-2 cells stably over-expressing miR-148a (LV-TO-miR-148a) or a control miR (LV-TO-miR-CT) to gemcitabine in presence of doxycycline after a 72 h-treatment. Surviving cell fraction represents the number of treated cells during 72 h compared to the number of untreated cells (represented as 100%). The results are the mean of three independent experiments (\pm SEM).
doi:10.1371/journal.pone.0055513.g003

miR-148a expression on tumor growth or tumor tissue development *in vivo*.

In vivo measurement of miR-148a therapeutic potential

To assess an anti-tumor potential of an acute miR-148a over-expression in both tumor cells and the microenvironment, we injected lentiviral particles encoding miR-148a (LV-miR-148a) in pre-established MIA PaCa-2-Gluc tumors engrafted in the pancreas of SCID CB17 mice. Lentiviral particles encoding GFP reporter protein (LV-GFP) were used as control. MiR-148a over-expression in LV-miR-148a-injected tumors was verified by qRT-PCR (Figure S7). Tumor progression was monitored by Gluc sampling in mice serum. A decrease in Gluc signal was observed

within 5 days after tumor transduction for both particles (Figure 4C). From day 5 to day 10, Gluc levels were strictly similar in miR-148a and control-transduced tumors, which indicate no difference in tumor viability following lentiviral vectors injection. In accordance with Gluc dosage, resected tumor weights at day 10 are similar in LV-miR-148a and LV-GFP-transduced groups (LV-miR-148a: $1.77 \text{ g} \pm 0.30 \text{ g}$ vs LV-GFP: $1.97 \text{ g} \pm 0.63 \text{ g}$) (Figure 4D). These results indicate that miR-148a gene transfer in both tumor tissue and microenvironment does not impact tumor viability and reveals no particular therapeutic potential.

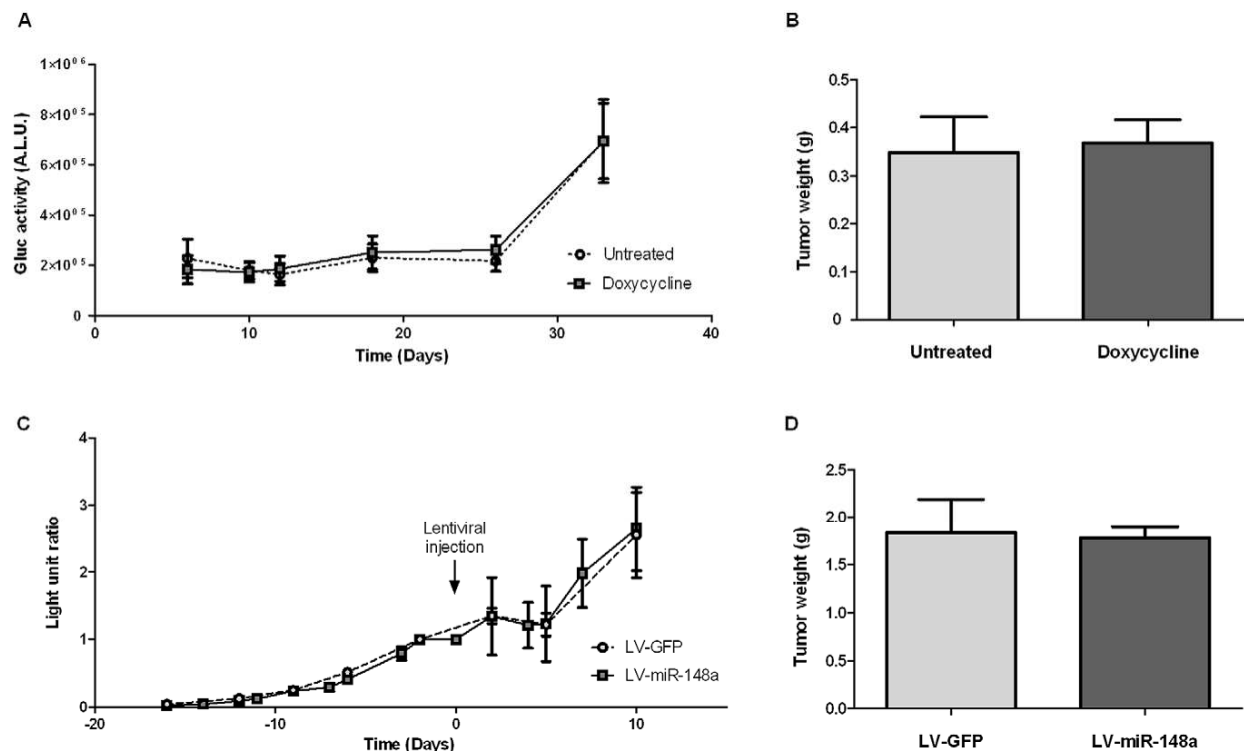


Figure 4. Murine orthotopic xenograft and tumor progression monitoring. (A) *In vivo* monitoring of xenograft tumor progression: MIA PaCa-2 cells expressing miR-148a and secreted Gaussia luciferase (Gluc) were injected in the pancreas of SCID mice. Mice received normal water (untreated, n = 10) or water supplemented with doxycycline (doxycycline, n = 12) for miR-148a expression induction until sacrifice. Gluc levels were measured in mice serum. The results are the mean of Gluc activities (\pm SEM) and are expressed as Arbitrary Light Unit (A.L.U.). (B) Tumors were removed and weighted the day of surgery. Results are mean (\pm SEM) of tumor weight in the untreated group (n = 10) and the doxycycline treated group (n = 12) (C) *In vivo* monitoring of xenograft tumor progression: MIA PaCa-2 cells expressing secreted Gaussia luciferase were injected in the pancreas of SCID mice (n = 10). Fifteen days later, lentiviral vectors encoding miR-148a (miR-148a, n = 7) or GFP only (GFP, n = 3) were injected in the tumors (the arrow indicates the lentiviral particles injection). The amount of Gluc was measured in mice serum and compared to the Gluc amount measured the day of lentivector injection (Day 0). The results are the mean of the Gluc level ratio in each group (\pm SEM) and are expressed as arbitrary light unit ratio. (D) Tumors receiving miR-148 (miR-148a, n = 7) or GFP (GFP, n = 3) were removed 10 days after lentiviral injection and were weighted. The graph represents the comparison of tumor weight expressing miR-148a (n = 7) or GFP (n = 3). The results are the mean of tumor weight in each group (\pm SEM).
doi:10.1371/journal.pone.0055513.g004

Discussion

MiR-148a expression is altered in several types of cancer and its down-regulation is well described in various solid tumors such as colorectal, ovarian, prostate and gastric cancers [8,11,18,19]. Our previous study reports that miR-148a expression is down-regulated by DNA hypermethylation of its genomic sequence [7]. This down-regulation occurs early in PDAC development and suggests a tumor suppressive effect. However, the role of miR-148a in pancreatic carcinogenesis has not been largely investigated yet. Liffers *et al.* are the only group that investigated the functions of miR-148a in PDAC cell lines [20]. Their work highlighted the targeting of cell-division-cycle-25-homolog-b (CDC25b) in several PDAC cells, raising the evidence of a miR-148a dependent control of cell cycle through G₂/M checkpoint. Based on these results, our study was aimed at determining whether restoring miR-148a expression in PDAC cells could inhibit cell proliferation and tumor progression and therefore could be used as a therapeutic tool against PDAC.

We used both transient and stable miR-148a over-expression approaches in several PDAC cell lines. Despite significant miR-148a over-expression, we could not observe any growth inhibition of all PDAC cell lines tested *in vitro* and *in vivo*. This absence of effects contradicts Liffers' study on the potential of miR-148a to inhibit PDAC cell growth. However, this discrepancy can be explained by the fact that the miR-148a inhibitory effect described by Liffers *et al.* is only observed *in vitro* after a 100 fold-stable over-expression of miR-148a in IMIM-PC2 cells, which are rarely used as cellular model in PDAC studies and certainly display different genetic and epigenetic alterations than the PDAC cells used in our study.

At first sight, this absence of miR-148a effects on cell growth in a PDAC context also contradicts most of published articles on the role of miR-148a in other cancer. Indeed, Lujambio *et al.* demonstrated in SIHN-011B cell line that miR-148a over-expression suppresses tumor invasion and dissemination *in vitro* and *in vivo* [11]. In colorectal cancer cells, Zhang *et al.* showed a pro-apoptotic effect of miR-148a transient expression by the targeting of BCL-2 (B-cell lymphoma 2) mRNA [10]. Additionally, Fujita *et al.* described that transfection with miR-148a precursor inhibits cell growth, migration and invasion of prostate cancer-derived cells [19]. However, if we carefully read the literature, it is clear that miR-148a effects are cancer type-dependent or even more team-dependent. Indeed, a recent study revealed that the inhibition of miR-148a in HepG2 and Hep3B cells suppresses cell proliferation, cell cycle progression, cell migration *in vitro* and *in vivo* suggesting proliferative functions for miR-148a in hepatocellular carcinoma context [21]. Moreover, miR-148a down-regulation is described in gastric cancer by several groups [22,23]. Interestingly, the consequence of miR-148a over-expression in gastric cancer-derived cell lines is variable among teams. Indeed, Zheng *et al.* demonstrated that the stable over-expression of miR-148a in human gastric cancer AGS and MGC-803 cell lines has no obvious effects on cell proliferation but suppresses tumor cell invasion and metastasis [8]. They therefore proposed a tumor suppressive function for miR-148a. Conversely, Guo's group established that miR-148a over-expression in the same AGS cell line leads to an increase in cell migration and proliferation suggesting an oncogenic effect [24]. Taken together, these data from the literature strongly force us to be extremely careful regarding the effects (or absence of effects) of microRNAs that greatly depend on cellular and experimental contexts.

MicroRNA are thought to impact chemo-sensitivity through the targeting of drug transporters or enzymes necessary for their

metabolism [16]. MiR-148a was shown to influence cell chemosensitivity to paclitaxel, cisplatin and 5-FU in various cancer derived-cell lines although the molecular mechanisms remain unclear [9,19]. Since gemcitabine is the reference chemotherapy against PDAC we assessed whether miR-148a participates to PDAC cell sensitivity against this drug. We first observed that no correlation exists between miR-148a endogenous expression level in several PDAC cell lines and intrinsic sensitivity to gemcitabine. Additionally, we showed that neither transient nor stable over-expression of miR-148a improves PDAC-derived cell lines sensitivity to gemcitabine *in vitro*.

The absence of miR-148a effects on cell growth and chemosensitivity in our PDAC cellular models prompted us to verify the functionality of our miR-148a expressing tools. At that time, several mRNA targets of miR-148a such as DNA methyltransferase 3 beta (DNMT3B), DNA methyltransferase 1 (DNMT1), BCL2 were described in various cancers using transient transfection and Western blot analysis [10,25,26]. Nevertheless, CDC25b was the only miR-148a target described in a PDAC-derived cell line [20]. Using qRT-PCR, luciferase reporter construct containing CDC25b 3'-UTR and Western blot, we ensured the proper expression and functionality of our mature miR-148a expressing tools (Figures S1C and S1D), which are in accordance with Liffers' observations. These results demonstrate that the absence of miR-148a effects on cell growth and chemoresistance was not due to an impairment of miR-148a constructs used in the present study.

We next decided to perform a large scale proteomic analysis. Indeed, the targeting of several molecular pathways could lead to a cross inhibition and explain the marginal effect of this microRNA in our PDAC cellular context. To our knowledge, only two groups have performed 2D-DIGE analysis after transfection of microRNA precursors *in vitro* [27,28]. Our results are consistent with these studies which indicate that microRNAs are fine tuning molecules which modestly modulate protein expression. Our 2D-DIGE approach did not reveal changes in protein expression that reach the common 1.5 fold cut-off value suggesting that our miR-148a over-expression in PDAC cellular context faintly modifies protein expression profiles. This is in accordance with the 30% decrease of CDC25b protein expression in response to miR-148a transient over-expression (Figure S1D).

Altogether our *in vitro* results strongly suggest that delivering either plasmid-driven gene or synthetic miR-148a oligonucleotides is not sufficient to counteract the cancerous phenotype of four well described PDAC-derived cell lines in contrary to other cancer-type derived cell lines. This can be explained by the extreme aggressiveness of PDAC-derived cell lines that have developed a molecular arsenal to resist to all tested chemotherapy.

We finally asked whether miR-148a could exert a tumor suppressive effect in a preclinical PDAC *in vivo* model. Xenograft of miR-148a over-expressing cells has been already performed in colorectal, gastric and head and neck cancer [8,10,11]. Consequences were highly variables as they promoted or decreased tumor progression depending on cancer type. Here, we used similar strategies of either stable or acute *in vivo* miRNA over-expression that we previously described for *let-7* in PDAC tumors [15]. The first approach of xenograft we describe herein consisted in the injection of MIA PaCa-2 cells overexpressing miR-148a under doxycycline treatment. In accordance with our *in vitro* findings demonstrating that miR-148a has no clear effect on cell proliferation or survival of PDAC cells, we describe that miR-148a does not impede tumor engraftment and *in vivo* progression.

The second *in vivo* approach consisted in the transduction of pre-established Mia PaCa-2 tumors, with miR-148a expressing lentiviral particles. This strategy permits an acute miR-148a

expression in both tumor cells and tumor microenvironment. Despite a weak decrease in tumor progression in both groups 5 days following transduction, over-expressing miR-148a in PDAC did not inhibit tumor progression. Determination of miR-148a over-expression *in vivo* is challenging, considering the strict conservation of both miR-148a precursor and mature sequence between mouse and human genome and the considerable part of murine cells participating to tumor formation in orthotopic xenograft model. Despite these experimental barriers, the injection of viral particles in Mia PaCa-2 tumors leads to a clear increase in miR-148a expression in the tumors (Figure S7).

Taken together, our *in vivo* experiments show that miR-148a over-expression fails to inhibit PDAC tumor engraftment and *in vivo* progression. Consequently, we conclude that miR-148a restoration is not an appropriate therapeutic target for the management of advanced PDAC.

Supporting Information

Figure S1 Functionality of miR-148a over-expressing tools. MiR-148a expression level was measured by qRT-PCR following: **(A)** transient transfection in Capan-2 cells using a miR-148a precursor oligonucleotide or a control oligonucleotide, **(B)** stable transduction of MIA PaCa-2 cells using LV-TO-miR-148a or LV-TO-CT or **(C)** stable transduction of MIA PaCa-2 cells using LV-miR-148a or LV-GFP. **(D)** To determine whether the miR-148a encoded by our different tools is properly processed and functional, the targeting of CDC25b 3'-UTR is measured using a luciferase reporter construct as described by Liffers *et al.*. Results are expressed as percentage of luciferase signal compared to control cells. **(E)** The expression of cdc25b protein was assessed by Western blot after transient over-expression of miR-148a in IMIM-PC2 PDAC cells as described by Liffers *et al.* The graph represents the quantification of three independent Western blot experiments. Results are expressed as percentage of CDC25b protein expression compared to miR-CT transfected cells. (PDF)

Figure S2 Migration (A) and invasion (B) capacity of miR-148a over-expressing cells. One hundred thousand exponentially growing cells over-expressing miR-148a or GFP were starved for 24 h and seeded into 8 μ m trans-wells non-coated (migration test) or coated (invasion test) with matrigel. After 15 h, migrated cells were stained; lysed and cellular density was determined by optical density measure of cell lysates at 560 nm. Graphs represent results of three independent experiments and are expressed as percentage of migrating or invading miR-148a over-expressing cells compared to GFP expressing cells. (PDF)

Figure S3 Gemcitabine sensitivity of PDAC cell lines. One thousand of exponentially growing PDAC cells transiently over-expressing miR-148a or control microRNA (miR-CT) were plated in 96 well plate. Cells were treated with different doses of gemcitabine ranging from 10^{-9} M to 10^{-4} M for 72 h. For each cell line, cell viability was assessed by colorimetric method, compared to viability measured in 10^{-9} M treated wells and represented as percentage of surviving cells. (PDF)

Figure S4 Two Dimensions-Gel Electrophoresis proteomic analysis after transient miR-148a over-expression in Capan-2 cells. Capan-2 cells were transiently transfected with miR-CT or miR-148a as described in Materials and Methods

section (n = 4). Proteins were extracted, differentially labeled with cyanines and ran depending on their charge and their isoelectric point as described in Materials and Methods section. For each gel, spot variation between our two conditions was measured using DeCyder 6.5 software (GE Healthcare).

(PDF)

Figure S5 Correlation analysis between Gluc serum content and tumor weight. Orthotopic MIA PaCa-2-Gluc cell xenografts were performed in SCID mice as described in Materials and Methods section (n = 24). Thirty three days after injection, tumors were removed; scaled and 100 μ l of blood was sampled with 10 μ l of a 20% EDTA solution. Serum was isolated and Gluc content was assessed as described in Materials and Methods section. A regressive linear correlation was calculated to assess the correspondence between Gluc serum level and tumor weight and displayed a $R^2 = 0.79$.

(PDF)

Figure S6 Histological organization of grafted tumors. Twelve million of exponentially growing MIA PaCa-2 cells stably over-expressing miR-148a were injected in the tail of the pancreas of SCID mice. Mice grafted with miR-148a expressing cells (doxycycline) received water *ad libitum* supplemented with sucrose (25 g/L) and doxycycline (2 g/L). Control mice (untreated) received water *ad libitum* supplemented with sucrose only (25 g/L). Thirty days after xenograft, mice were sacrificed and tumors were removed, weighed and measured. Anatomopathological examination of tumors revealed no difference in histological organization, characterized by a classic fibrous capsule **(A)** surrounding a necrotic core **(B)**, lined by a thin layer of tumor cells **(C)**.

(PDF)

Figure S7 MiR-148a expression after *in vivo* tumor transduction of MIA PaCa-2 tumors. Orthotopic tumors were established in SCID CB17 mice pancreas by injection of 12×10^6 of exponentially growing MIA PaCa-2-Gluc and were injected with lentiviral particles encoding miR-148a or the GFP reporter protein (as described in Materials and Methods section). After removal, whole tumors were homogenized in TRIzol Reagent. Total RNAs were extracted and miR-148a expression was determined by qRT-PCR using specific primers directed against mature miR-148a and U6 RNA used for normalization. Relative amounts of miRNA were calculated by the comparative threshold cycle (CT) method.

(PDF)

Acknowledgments

We are grateful for the results provided JJ. Maoret from the quantitative transcriptomic platforms (INSERM - PAUL SABATIER University UMR 1048).

The authors thank the vectorology platform (Vectorology platform, INSERM U1037 Cancer Research Center of Toulouse, Toulouse, France) for vector production.

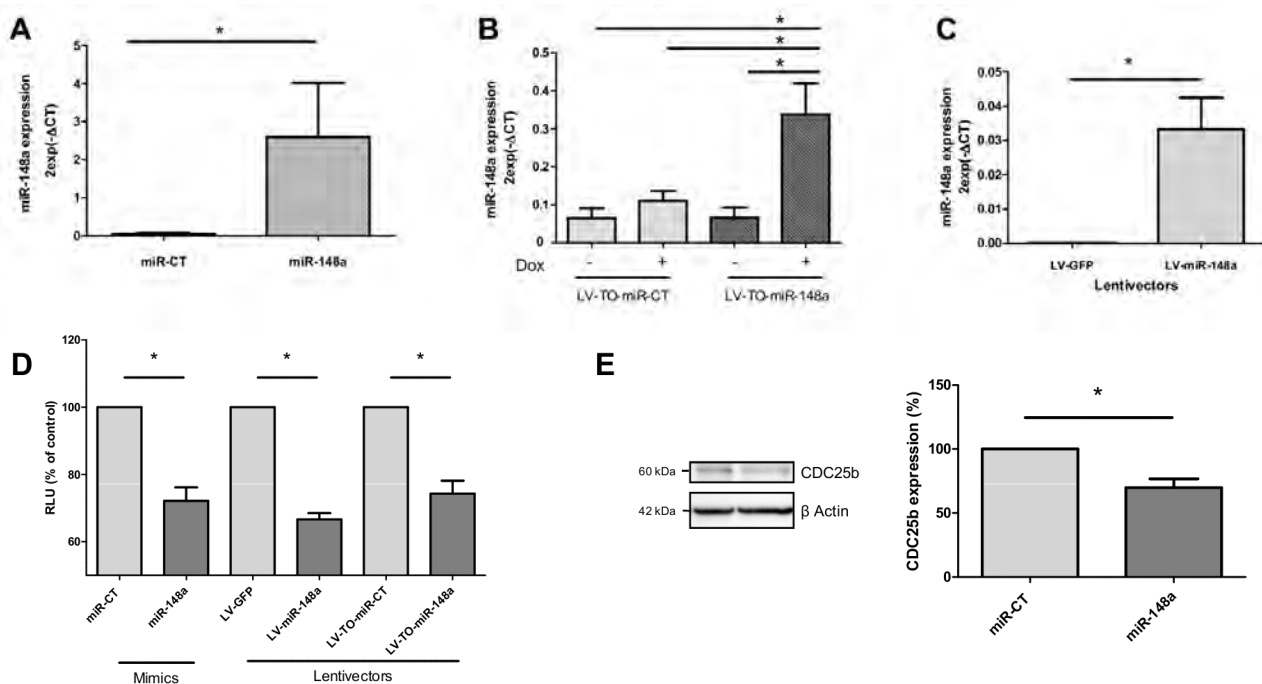
We are grateful to Pr Janick Selves (M.D., PhD) for the anatomopathological examination of tumors.

Author Contributions

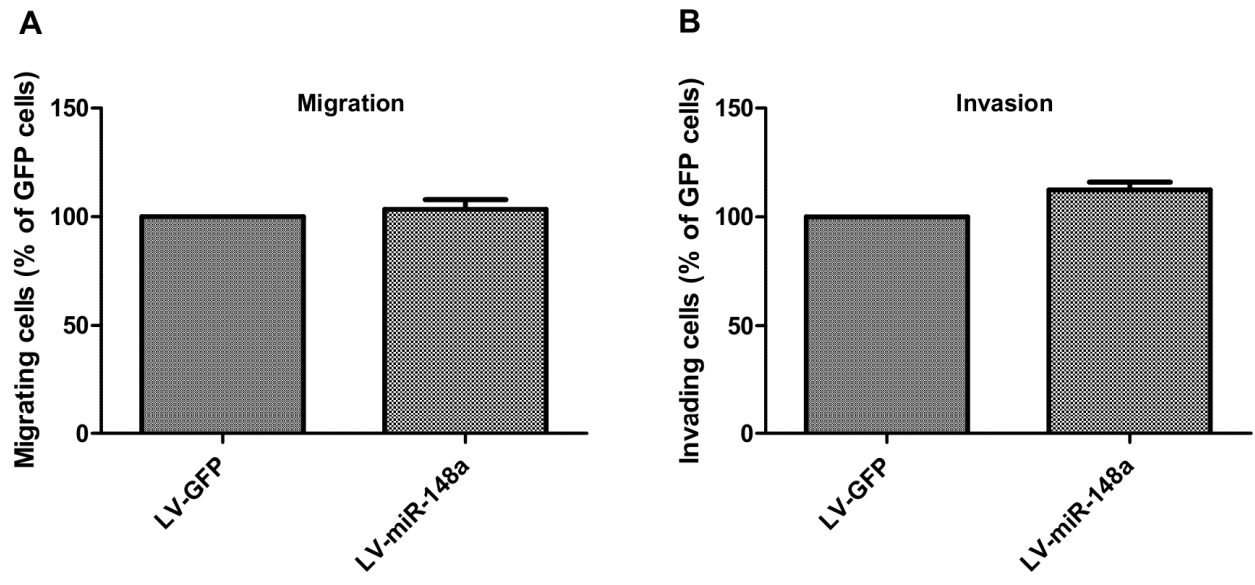
Conceived and designed the experiments: YD FL PC JT LB. Performed the experiments: YD HL FS NSL NH. Analyzed the data: YD FL PC JT. Contributed reagents/materials/analysis tools: YD FL. Wrote the paper: YD PC JT.

References

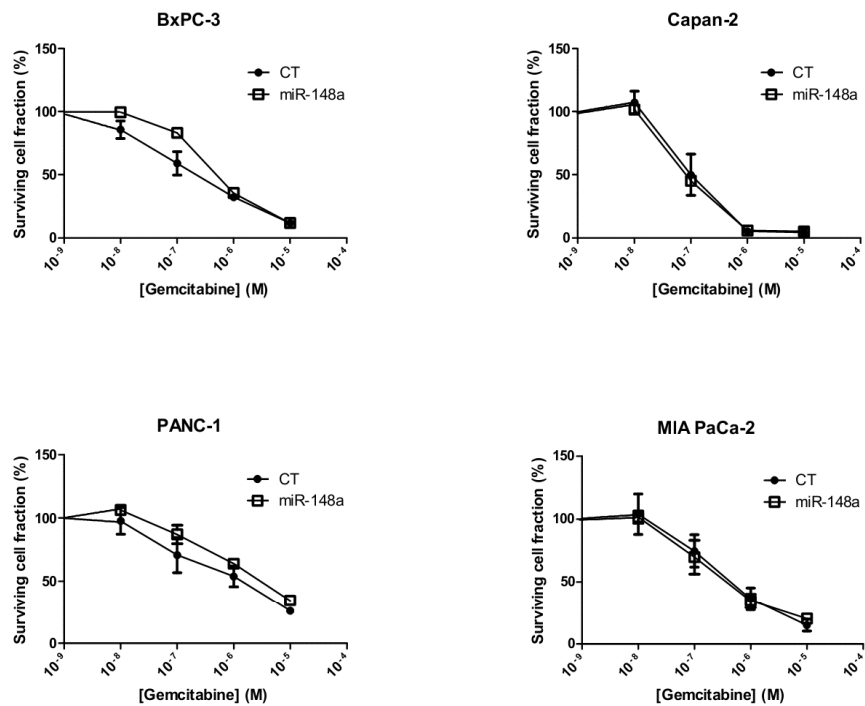
1. Siegel R, Naishadham D, Jemal A (2012) Cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin* 62: 10–29.
2. Hidalgo M (2010) Pancreatic cancer. *N Engl J Med* 362: 1605–1617.
3. Ghaneh P, Costello E, Neoptolemos JP (2007) Biology and management of pancreatic cancer. *Gut* 56: 1134–1152.
4. Vincent A, Herman J, Schulick R, Hruban RH, Goggins M (2004) Pancreatic cancer. *Lancet* 363: 1049–1057.
5. Delpu Y, Hanoun N, Lulka H, Sicard F, Selves J, et al. (2011) Genetic and Epigenetic Alterations in Pancreatic Carcinogenesis. *Curr Genomics* 12: 15–24.
6. Bartel DP (2004) MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 116: 281–297.
7. Hanoun N, Delpu Y, Suriawinata AA, Bournet B, Bureau C, et al. (2010) The silencing of microRNA 148a production by DNA hypermethylation is an early event in pancreatic carcinogenesis. *Clin Chem* 56: 1107–1118. doi:10.1373/clinchem.2010.144709.
8. Zheng B, Liang L, Wang C, Huang S, Cao X, et al. (2011) MicroRNA-148a suppresses tumor cell invasion and metastasis by downregulating ROCK1 in gastric cancer. *Clin Cancer Res* 17: 7574–7583.
9. Hummel R, Watson DI, Smith C, Kist J, Michael MZ, et al. (2011) Mir-148a improves response to chemotherapy in sensitive and resistant oesophageal adenocarcinoma and squamous cell carcinoma cells. *J Gastrointest Surg* 15: 429–438.
10. Zhang H, Li Y, Huang Q, Ren X, Hu H, et al. (2011) MiR-148a promotes apoptosis by targeting Bcl-2 in colorectal cancer. *Cell Death Differ* 18: 1702–1710.
11. Lujambio A, Calin GA, Villanueva A, Ropero S, Sanchez-Cespedes M, et al. (2008) A microRNA DNA methylation signature for human cancer metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 13556–13561.
12. Liu N, Furukawa T, Kobari M, Tsao MS (1998) Comparative phenotypic studies of duct epithelial cell lines derived from normal human pancreas and pancreatic carcinoma. *Am J Pathol* 153: 263–269.
13. Lee KM, Nguyen C, Ulrich AB, Pour PM, Ouellette MM (2003) Immortalization with telomerase of the Nestin-positive cells of the human pancreas. *Biochem Biophys Res Commun* 301: 1038–1044.
14. Hanoun N, Bureau C, Diab T, Gayet O, Dusetti N, et al. (2010) The SV2 variant of KLF6 is down-regulated in hepatocellular carcinoma and displays anti-proliferative and pro-apoptotic functions. *J Hepatol* 53: 880–888.
15. Torrisani J, Boumet B, Du Rieu MC, Bouisson M, Souque A, et al. (2009) let-7 MicroRNA transfer in pancreatic cancer-derived cells inhibits in vitro cell proliferation but fails to alter tumor progression. *Hum Gene Ther* 20: 831–844.
16. Kutanzi KR, Yurchenko OV, Beland FA, Checkhun VF, Pogribny IP (2011) MicroRNA-mediated drug resistance in breast cancer. *Clin Epigenetics* 2: 171–185. doi:10.1007/s13148-011-0040-8.
17. Chung E, Yamashita H, Au P, Tannous BA, Fukumura D, et al. (2009) Secreted Gaussia luciferase as a biomarker for monitoring tumor progression and treatment response of systemic metastases. *PLoS One* 4: e8316.
18. Zhou X, Zhao F, Wang Z-N, Song Y-X, Chang H, et al. (2012) Altered expression of miR-152 and miR-148a in ovarian cancer is related to cell proliferation. *Oncol Rep* 27: 447–454.
19. Fujita Y, Kojima K, Ohhashi R, Hamada N, Nozawa Y, et al. (2010) MiR-148a attenuates paclitaxel resistance of hormone-refractory, drug-resistant prostate cancer PC3 cells by regulating MSK1 expression. *J Biol Chem* 285: 19076–19084.
20. Liffers S-T, Munding JB, Vogt M, Kuhlmann JD, Verdoodt B, et al. (2011) MicroRNA-148a is down-regulated in human pancreatic ductal adenocarcinomas and regulates cell survival by targeting CDC25B. *Lab Invest* 91: 1472–1479. doi:10.1038/labinvest.2011.99.
21. Yuan K, Lian Z, Sun B, Clayton MM, Ng IOL, et al. (2012) Role of miR-148a in hepatitis B associated hepatocellular carcinoma. *PLoS ONE* 7: e35331.
22. Chen Y, Song Y, Wang Z, Yue Z, Xu H, et al. (2010) Altered expression of MiR-148a and MiR-152 in gastrointestinal cancers and its clinical significance. *J Gastrointest Surg* 14: 1170–1179.
23. Katada T, Ishiguro H, Kuwabara Y, Kimura M, Mitui A, et al. (2009) microRNA expression profile in undifferentiated gastric cancer. *Int J Oncol* 34: 537–542.
24. Guo S-L, Peng Z, Yang X, Fan K-J, Ye H, et al. (2011) miR-148a Promoted Cell Proliferation by Targeting p27 in Gastric Cancer Cells. *Int J Biol Sci* 7: 567–574.
25. Duursma AM, Kedde M, Schrier M, Le Sage C, Agami R (2008) miR-148 targets human DNMT3b protein coding region. *Rna* 14: 872–877.
26. Braconi C, Huang N, Patel T (2010) MicroRNA-dependent regulation of DNA methyltransferase-1 and tumor suppressor gene expression by interleukin-6 in human malignant cholangiocytes. *Hepatology* 51: 881–890.
27. Schramedci K, Mörbt N, Pfeifer G, Läter J, Rosolowski M, et al. (2011) MicroRNA-21 targets tumor suppressor genes ANP32A and SMARCA4. *Oncogene* 30: 2975–2985.
28. Muniyappa MK, Dowling P, Henry M, Meleady P, Doolan P, et al. (2009) MiRNA-29a regulates the expression of numerous proteins and reduces the invasiveness and proliferation of human carcinoma cell lines. *Eur J Cancer* 45: 3104–3118.



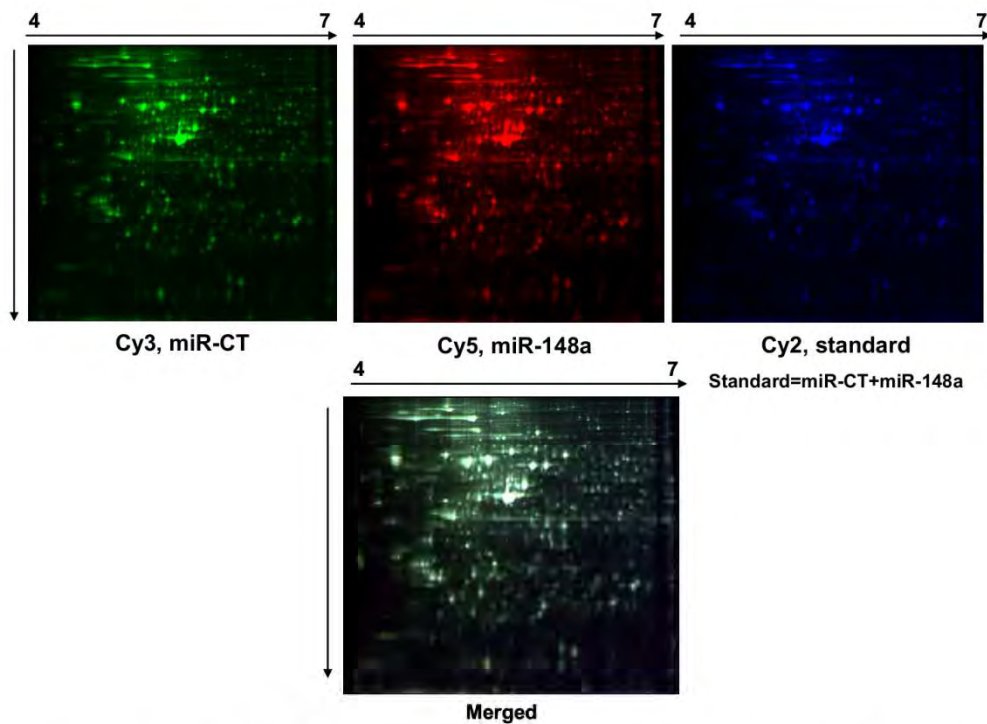
Supplementary Figure 1. Functionality of miR-148a over-expressing tools. MiR-148a expression level was measured by qRT-PCR following : **(A)** transient transfection in Capan-2 cells using a miR-148a precursor oligonucleotide or a control oligonucleotide, **(B)** stable transduction of MIA PaCA-2 cells using LV-TO-miR-148a or LV-TO-CT or **(C)** stable transduction of MIA PaCA-2 cells using LV-miR-148a or LV-GFP. **(D)** To determine whether the miR-148a encoded by our different tools is properly processed and functional, the targeting of CDC25b 3'-UTR is measured using a luciferase reporter construct as described by Liffers *et al.*. Results are expressed as percentage of luciferase signal compared to control cells. **(E)** The expression of *cdc25b* protein was assessed by Western blot after transient over-expression of miR-148a in IMIM-PC2 PDAC cells as described by Liffers *et al.*. The graph represents the quantification of three independent Western blot experiments. Results are expressed as percentage of CDC25b protein expression compared to miR-CT transfected cells.



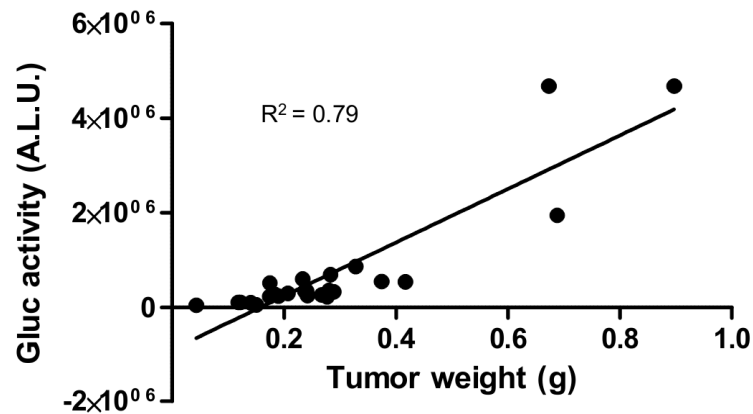
Supplementary Figure 2. Migration (A) and invasion (B) capacity of miR-148a over-expressing cells. One hundred thousand exponentially growing cells over-expressing miR-148a or GFP were starved for 24h and seeded into 8 μ m transwells non-coated (migration test) or coated (invasion test) with matrigel. After 15h, migrated cells were stained, lysed and cellular density was determined by optical density measure of cell lysates at 560 nm. Graphs represent results of three independent experiments and are expressed as percentage of migrating or invading miR-148a over-expressing cells compared to GFP expressing cells.



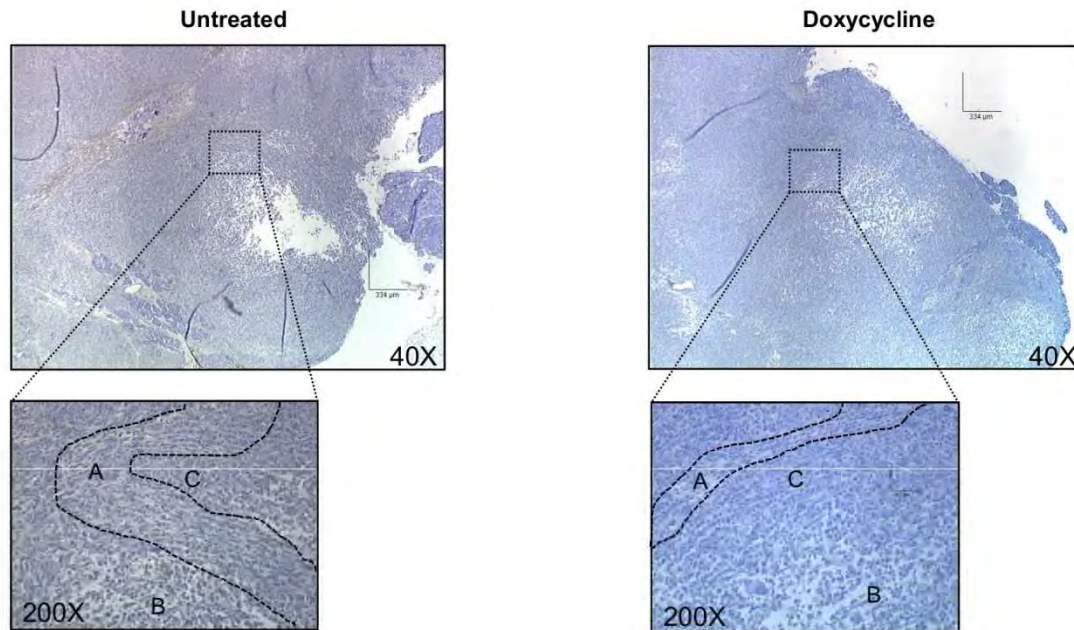
Supplementary Figure 3. Gemcitabine sensitivity of PDAC cell lines. One thousand of exponentially growing PDAC cells transiently over-expressing miR-148a or a control microRNA (miR-CT) were plated in 96 well plate. Cells were treated with different doses of gemcitabine ranging from 10^{-9} M to 10^{-4} M for 72h. For each cell line, cell viability was assessed by colorimetric method, compared to viability measured in 10^{-9} M treated wells and represented as percentage of surviving cells.



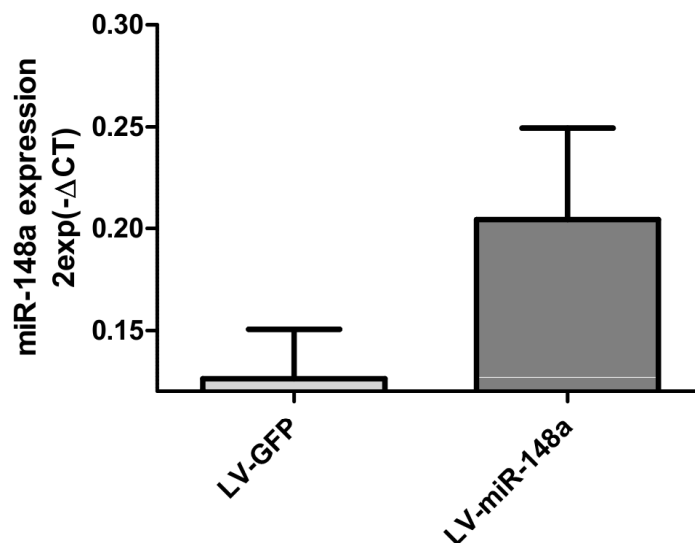
Supplementary Figure 4. Two Dimensions-Gel Electrophoresis proteomic analysis after transient miR-148a over-expression in Capan-2 cells. Capan-2 cells were transiently transfected with miR-CT or miR-148a as described in Materials and Methods section (n=4). Proteins were extracted, differentially labeled with cyanines and ran depending on their charge and their isoelectric point as described in Materials and Methods section. For each gel, spot variation between our two conditions was measured using DeCyder 6.5 software (GE Healthcare).



Supplementary Figure 5. Correlation analysis between Gluc serum content and tumor weight. Orthotopic MIA PaCa-2-Gluc cell xenografts were performed in SCID mice as described in Materials and Methods section (n=24). Thirty three days after injection, tumors were removed, scaled and 100 μ l of blood was sampled with 10 μ l of a 20% EDTA solution. Serum was isolated and Gluc content was assessed as described in Materials and Methods section. A regressive linear correlation was calculated to assess the correspondence between Gluc serum level and tumor weight and displayed a $R^2=0.79$.



Supplementary Figure 6. Histological organization of grafted tumors. Twelve million of exponentially growing MIA PaCa-2 cells stably over-expressing miR-148a were injected in the tail of the pancreas of SCID mice. Mice grafted with miR-148a expressing cells (doxycycline) received water *ad libitum* supplemented with sucrose (25 g/L) and doxycycline (2 g/L). Control mice (untreated) received water *ad libitum* supplemented with sucrose only (25 g/L). Thirty days after xenograft, mice were sacrificed and tumors were removed, weighed and measured. Anatomopathological examination of tumors revealed no difference in histological organization, characterized by a classic fibrous capsule (A) surrounding a necrotic core (B), lined by a thin layer of tumor cells (C).



Supplementary Figure 7. MiR-148a expression after *in vivo* tumor transduction of MIA PaCa-2 tumors. Orthotopic tumors were established in SCID CB17 mice pancreas by injection of 12×10^6 of exponentially growing MIA PaCa-2-Gluc and were injected with lentiviral particles encoding miR-148a or the GFP reporter protein (as described in Materials and Methods section). After removal, whole tumors were homogenized in TRIzol Reagent. Total RNAs were extracted and miR-148a expression was determined by qRT-PCR using specific primers directed against mature miR-148a and U6 RNA used for normalization. Relative amounts of miRNA were calculated by the comparative threshold cycle (CT) method.

Discussion :

Nos travaux ont mis en évidence l'absence d'effets bénéfiques conséquents à la restauration de l'expression de miR-148a dans des lignées dérivées d'AP.

Nous avons démontré par différents procédés expérimentaux que la restauration de miR-148a dans différentes lignées cancéreuses pancréatiques ne modifie pas la répartition dans le cycle cellulaire, la prolifération, la migration, l'invasion, la tumorigénicité ainsi que la sensibilité à la gemcitabine. De plus, le transfert de gène dans un modèle de tumeur établi chez la souris n'inhibe pas la croissance tumorale. Ces observations corrélerent avec l'absence de changement significatif dans le profil d'expression protéique des cellules surexprimant miR-148a.

Ces résultats sont en désaccord avec les données de la littérature. En effet, Lujambio *et al.* ont démontré dans la lignée SIHN-011B que la surexpression de miR-148a inhibe l'invasion et la dissémination tumorale *in vitro* et *in vivo* [329]. Dans des cellules cancéreuses coliques, Zhang *et al.* ont démontré un effet pro-apoptotique par le ciblage de BCL-2 (*B Cell lymphoma 2*) en réponse à une surexpression transitoire de miR-148a [321]. De plus, Fujita *et al.* décrivent une inhibition de croissance, de migration et d'invasion après transfection de mimics-148a (oligonucléotide précurseurs de microARNs) dans des lignées dérivées de cancer de la prostate [330]. Néanmoins, l'action de miR-148a semble dépendante du cancer. Des travaux récents ont montré que l'inhibition de miR-148a dans un contexte de cancer du foie enrayer la prolifération cellulaire, la migration et l'invasion *in vitro* et *in vivo*, suggérant une action pro-oncogénique de ce microARN [331]. De plus, si la répression de miR-148a est décrite dans le cancer de l'estomac, différentes équipes ne s'accordent pas sur son action. Sa surexpression stable dans les cellules AGS et MGC-803 n'a pas d'effet sur la prolifération mais inhibe l'invasion [324]. A l'inverse, Guo *et al.* montrent dans la même lignée AGS que la surexpression de miR-148a entraîne une augmentation de la prolifération et de la migration, suggérant un effet pro-oncogénique [323]. L'ensemble de ces résultats démontre bien une absence de consensus quant à l'action de ce microARN et vraisemblablement une grande variabilité expérimentale.

Comme dit précédemment, la gemcitabine est la chimiothérapie de référence pour l'AP. Nous avons, dans un premier temps, déterminé l'absence de corrélation entre le niveau d'expression endogène de miR-148a et la sensibilité intrinsèque à la gemcitabine dans 5 lignées pancréatiques de référence. De plus, ni la surexpression transitoire, ni la surexpression stable de miR-148a n'influent sur cette sensibilité.

Afin d'écarter l'hypothèse d'outils de biologie moléculaire défectueux pour l'expression de ce microARN, nous les avons validés en répétant les expériences de la seule étude prenant place dans un contexte d'AP. Liffers *et al.* ont montré le ciblage de CDC25b par miR-148a dans des cellules cancéreuses pancréatiques [325]. Nous avons observé ce ciblage au niveau protéique par Western blot et par l'inhibition de la traduction du gène rapporteur de la luciférase cloné en amont de la partie 3'-UTR de l'ARNm de CDC25b prouvant la validité de nos outils.

A notre connaissance, seules deux études ont utilisé la même approche de 2D-DIGE (*Two Dimension – Differential Gel Electrophoresis*) pour étudier la réponse à la surexpression d'un microARN [267][332]. Parmi les études d'autres groupes que nous citons, les auteurs utilisent différentes approches pour montrer le ciblage d'un transcrite par un microARN (rapporteur luciférase, 2D-DIGE, Western blot, immunohistochimie), suivant une surexpression ectopique de celui-ci. Encore une fois, les niveaux de surexpression varient selon les groupes, allant de 5 fois pour notre étude à près de 1000 fois dans les travaux de Hummel *et al.* Il est fort probable que l'absence de standardisation dans les techniques employées pour l'étude du ciblage d'un transcrite par un microARN, participe à la variabilité observée dans les résultats des différentes équipes.

La surexpression de miR-148a dans nos lignées est de 200 fois en transfection transitoire et de seulement 5 fois en surexpression stable. Cette différence s'explique par les différentes stratégies utilisées faisant appel à la transfection transitoire d'un précurseur de miR-148a d'une part et à l'expression stable par transduction lentivirale d'autre part. Il est très important de garder à l'esprit que miR-148a est réprimé entre 5 et 10 fois dans l'AP, comparé au tissu adjacent sain correspondant et 4 fois dans le cancer de l'estomac [324][253,325]. Alors que la plupart des études privilégie une très forte surexpression pour étudier l'effet de miR-148a (jusqu'à 1000 fois pour l'étude de Hummel *et al.* [322]), il est légitime de se demander si de tels niveaux d'expression mettent en évidence les cibles et les effets physiologiques de ce microARN. Il est clairement établi que le ciblage par ARN interférence est moins spécifique plus la concentration d'ARNs interférents augmente (phénomène appelé *off-Target*). Afin de parer à toute éventualité, nous avons choisi d'effectuer les deux approches de surexpression pour s'assurer la spécificité de nos observations. La cohérence dans nos résultats démontrant l'absence d'effet anti-tumoral d'une surexpression stable ou transitoire de miR-148a et ce dans plusieurs lignées classiquement utilisées, ainsi que la validation préalable de nos outils de biologie moléculaire nous confortent donc dans nos observations.

Article 3 - « Rôle de la méthylation de l'ADN dans les processus de carcinogénèse pancréatique »

La surexpression des DNMTs est une caractéristique commune à de nombreux cancers [208]. Comme nous l'avons vu dans l'article 1, ainsi que dans d'autres études, l'hyperméthylation de l'ADN est un évènement précoce dans la carcinogénèse pancréatique ainsi que dans d'autres cancers. En effet, l'altération des profils de méthylation est observable dès les stades précurseurs du cancer tels que les lésions PanINs de l'AP ainsi que d'autres lésions précancéreuses d'autres organes [333][334].

Ce changement aberrant des profils de méthylation est en corrélation avec une surexpression des DNMTs, mais si l'association paraît évidente, aucun lien de causalité n'a encore été clairement établi dans le cancer entre surexpression stable d'une DNMT et transformation cellulaire. Néanmoins, certaines pistes semblent prouver ce lien. Différentes voies oncogéniques, telles que les voies activées par Ras ou SV40 (*Simian Virus 40*) peuvent mener à la surexpression de DNMT1 par sa dérégulation transcriptionnelle ou post-transcriptionnelle [335–337]. De plus, une surexpression de DNMT ou une dérégulation de son expression en fonction du cycle cellulaire serait associée à la transformation de cellules normales [336][338]. Enfin, les travaux de Linhart *et al.* ont montré que la surexpression inductible de DNMT3b favorise l'apparition de tumeurs intestinales chez la souris APC^{+/-} (*adenomatus poliposis coli*, gène suppresseur de tumeur) [339]. Le rôle joué par DNMT3b est ici difficile à déterminer, puisque la souche murine hétérozygote pour APC présente déjà une prédisposition au développement de néoplasies intestinales [340]. Ainsi, la surexpression de DNMT3b est sûrement un facteur nécessaire mais peut-être pas une altération suffisante au développement de tumeurs. Ces résultats sont néanmoins en adéquation avec les travaux de l'équipe de Fan et Xie, qui ont démontré qu'un polymorphisme dans le promoteur de DNMT3b induisait une augmentation de la transcription de ce transcrit et était un facteur prédisposant au cancer de l'estomac [341].

Tous ces résultats vont dans le sens d'une implication des DNMTs dans l'initiation du cancer, alors que Gao *et al.* décrivent en 2011 que c'est la délétion de DNMT3a qui favorise la progression tumorale dans le cancer du poumon, en augmentant la prolifération cellulaire ainsi que l'invasion mais n'initie pas la carcinogénèse [342].

Cette dichotomie du rôle de la méthylation de l'ADN dans la carcinogénèse semble donc dépendre de l'enzyme étudiée ainsi que du tissu d'intérêt. En conséquence

nous avons voulu déterminer si la surexpression des méthyltransférases de l'ADN dans des lignées pancréatiques normales était suffisante à la transformation de ces cellules. Dans le cas d'un changement de phénotype en réponse à cette surexpression, nous avons proposé de déterminer la nature du changement dans le profil de méthylation et sa répercussion dans le profil d'expression génique. De plus, la conception d'outils de biologie moléculaire permettant l'expression stable des différentes DNMTs nous permet d'évaluer si les profils mis en place en réponse à leur surexpression sont propres à chaque enzyme, ou si leur dérégulation entraîne la méthylation des mêmes séquences génomiques.

Résultats :

Surexpression des ARNm des différentes DNMTs dans les lignées cancéreuses pancréatiques

La surexpression des différentes DNMTs dans l'AP a déjà été démontrée par les travaux de Robertson et Peng. Nous avons voulu déterminer le niveau de cette surexpression dans différentes lignées dérivées d'AP et couramment utilisées comme modèle d'étude. Nous constatons que toutes les lignées surexpriment les ARNm de chaque DNMT à des niveaux variables (Figure 1A). La surexpression de l'ARNm de DNMT1 et DNMT3a est de l'ordre de 5 à 10 fois dans les lignées dérivées d'AP comparée à la lignée hPNE (*human Pancreatic Nestin positive Epithelial cells*, cellules pancréatiques non cancéreuses). La surexpression de DNMT3b est comparable à celle des autres DNMTs dans les lignées BxPc-3, Miapaca-2 et Panc-1 mais est presque 5 fois supérieure dans les lignées Capan-1 et Capan-2.

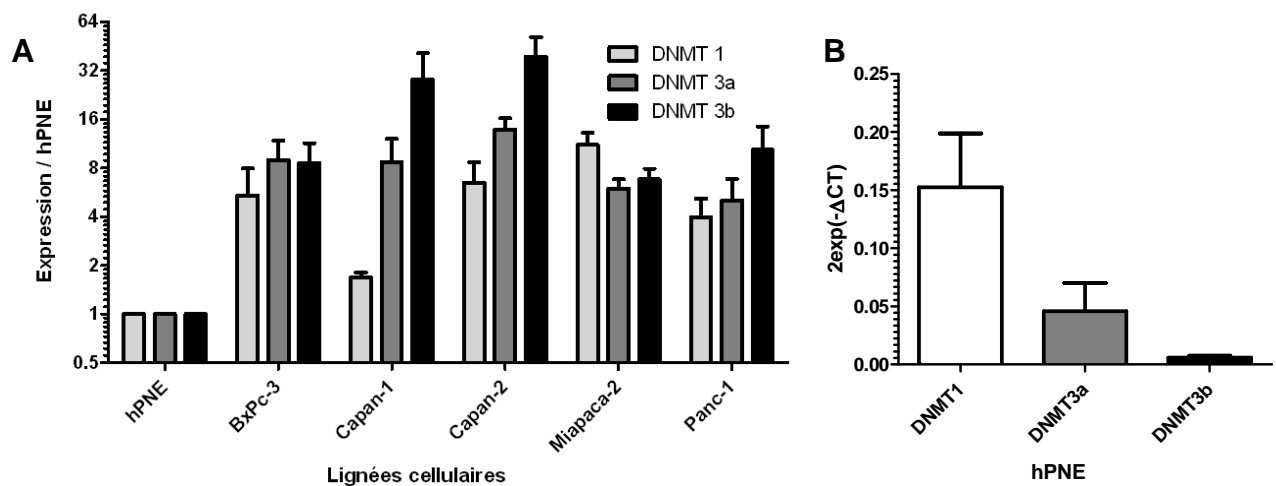


Figure 1 : Expression des ARNm des DNMTs dans différentes lignées cellulaires dérivées d'AP.

L'expression des différentes DNMTs a été mesurée par q-RT-PCR. Comme l'expression des DNMTs est induite lors du cycle cellulaire, les niveaux d'expression sont normalisés par rapport au gène CyclineD1. L'expression de chaque DNMT a ensuite été comparée à l'expression dans la lignée pancréatique non-cancéreuse hPNE (arbitrairement fixé à 1) (A). L'expression endogène des différentes DNMTs dans la lignée témoin hPNE est représentée Figure 1B. Chaque expérience est reproduite en triplicat.

Etablissement de lignées pancréatiques normales surexprimant les différentes DNMTs

Afin de déterminer les conséquences à long terme de la surexpression des différentes DNMTs, nous avons établi des lignées pancréatiques hPNE surexprimant de manière stable chaque DNMT. Ces lignées ont été établies par transduction

lentivirale permettant l'intégration stable d'une séquence codante pour DNMT1, -3a ou -3b fusionnée à un épitope HA dans la partie N-terminale. La surexpression de ces protéines est confirmée au niveau de l'ARN (Figure 2A, 2B et 2C) et protéique (Figure 2D)

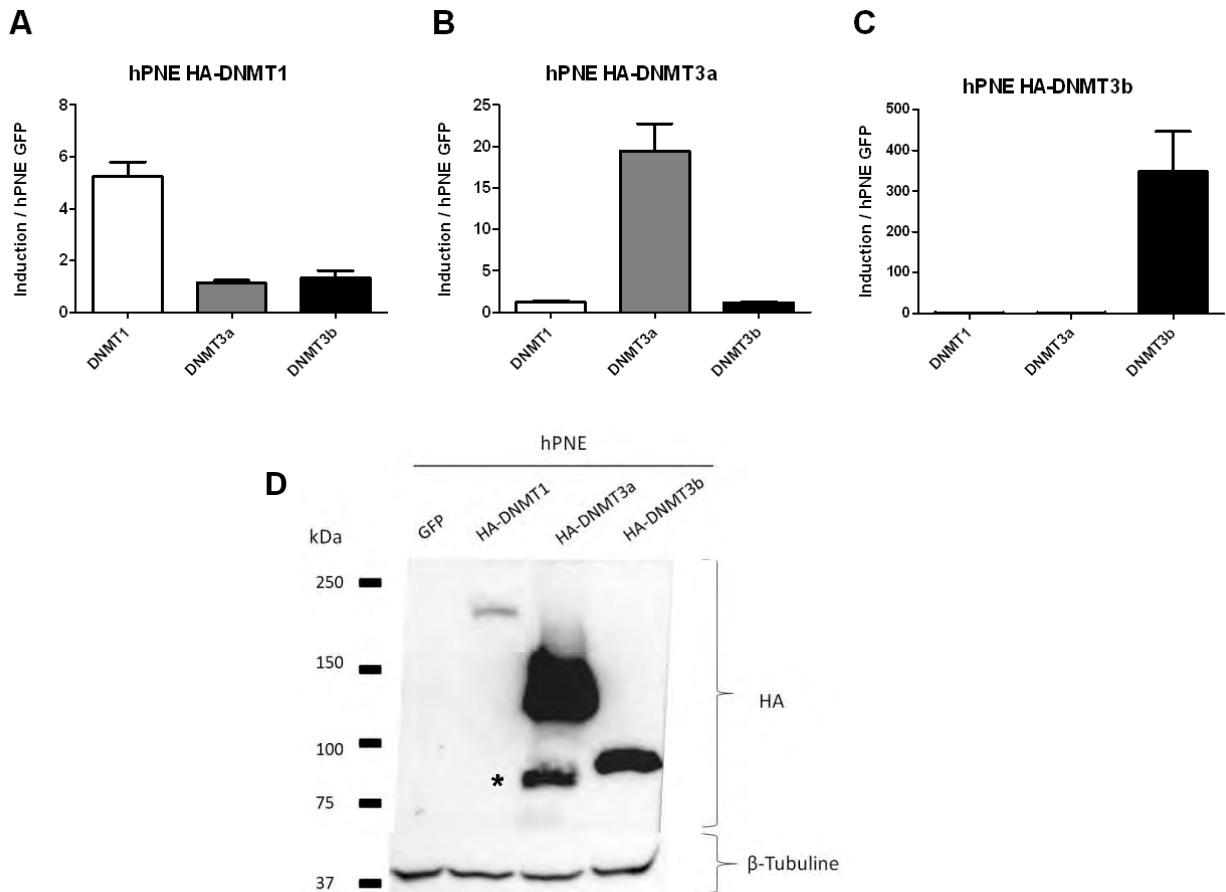


Figure 2 : Expression stable des différentes DNMTs dans la lignée hPNE.

Les cellules hPNE sont transduites par des vecteurs lentiviraux codant pour les différentes DNMTs fusionnées à l'épitope HA à l'extrémité N-terminale. L'expression de l'ARNm de chaque DNMT (endogène + exogène) est mesurée par q-RT-PCR (A, B, C) et l'expression des formes exogènes est validée par Western blot (D). * = produit de dégradation. Chaque expérience est reproduite en triplicat.

La surexpression de l'ARNm de DNMT1, -3a et -3b dans les lignées hPNE correspondantes est respectivement d'un facteur 5, 20 et 300. De plus, il est important de noter que la surexpression d'une DNMT n'altère pas l'expression de l'ARNm des deux autres enzymes dans ces lignées. L'analyse en Western blot confirme l'expression de la forme exogène de ces enzymes par la reconnaissance de l'épitope HA. L'expression de la protéine HA-DNMT1 est moins importante pour les formes HA-DNMT3a et HA-DNMT3b. Hormis pour HA-DNMT3b nous pouvons constater que la surexpression de ces enzymes se fait dans le même ordre de grandeur que celle observée dans les lignées dérivées de l'AP (Figure 1).

Afin de permettre la mise en place d'un profil de méthylation par les DNMTs surexprimées, nous avons cultivé les cellules pendant 60 jours avant de réaliser nos études. Pour s'assurer que les DNMTs sont exprimées de manière stable, les cellules sont cultivées en condition de sélection par un antibiotique dont la résistance est apportée par notre vecteur lentiviral.

Etude du profil de méthylation en réponse à la surexpression des différentes DNMTs

Afin de déterminer l'impact de la surexpression des différentes DNMTs dans nos lignées cellulaires, nous avons déterminé leur profil de méthylation par la méthode *Infinium Methylation 450K* (Integrage, Evry). Cette approche permet de déterminer le niveau de méthylation de 485460 dinucléotides CpG répartis sur le génome. La répartition de ces sondes selon leur contexte génomique ou selon leur distance à l'îlot CpG est représentée Figure 3.

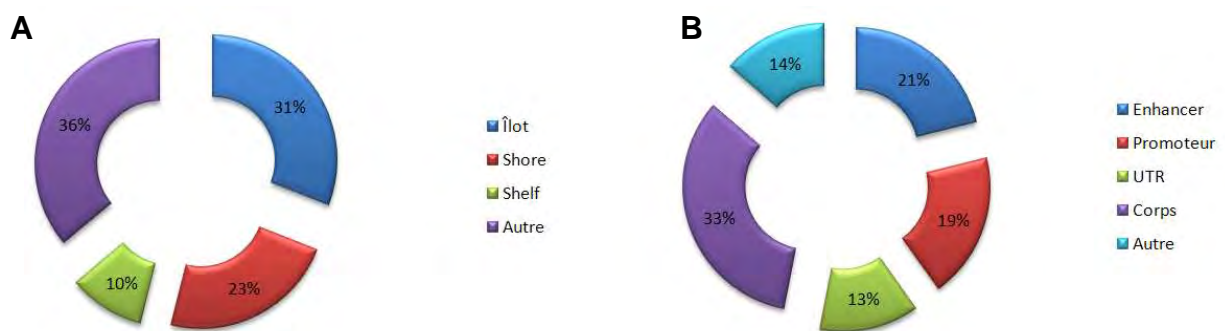


Figure 3 : Répartition sur le génome des sondes de l'*Infinium Methylation 450K*.

La répartition des sondes est illustrée en fonction de leur distance par rapport aux îlots CpG (A), ou de leur distance par rapport aux gènes (B). UTR : *Untranslated Region*.

Nous pouvons constater que 86% des cytosines étudiées sont situées à proximité d'un gène (enhancer, promoteur, UTR ou corps du gène) et que seulement 14% des cytosines se situent dans un contexte non codant (séquences répétées, satellites etc....) (Figure 3B). Parmi toutes les cytosines, 31% sont concentrées en îlots CpG, 23% sont situées jusqu'à 2kb autour de ces îlots (shores) et 10% en sont éloignées d'entre 2 et 4kb (shelves). Trente six pour cent de ces cytosines en revanche ne répondent à aucune de ces définitions et sont dispersées en faible concentration (Figure 3A).

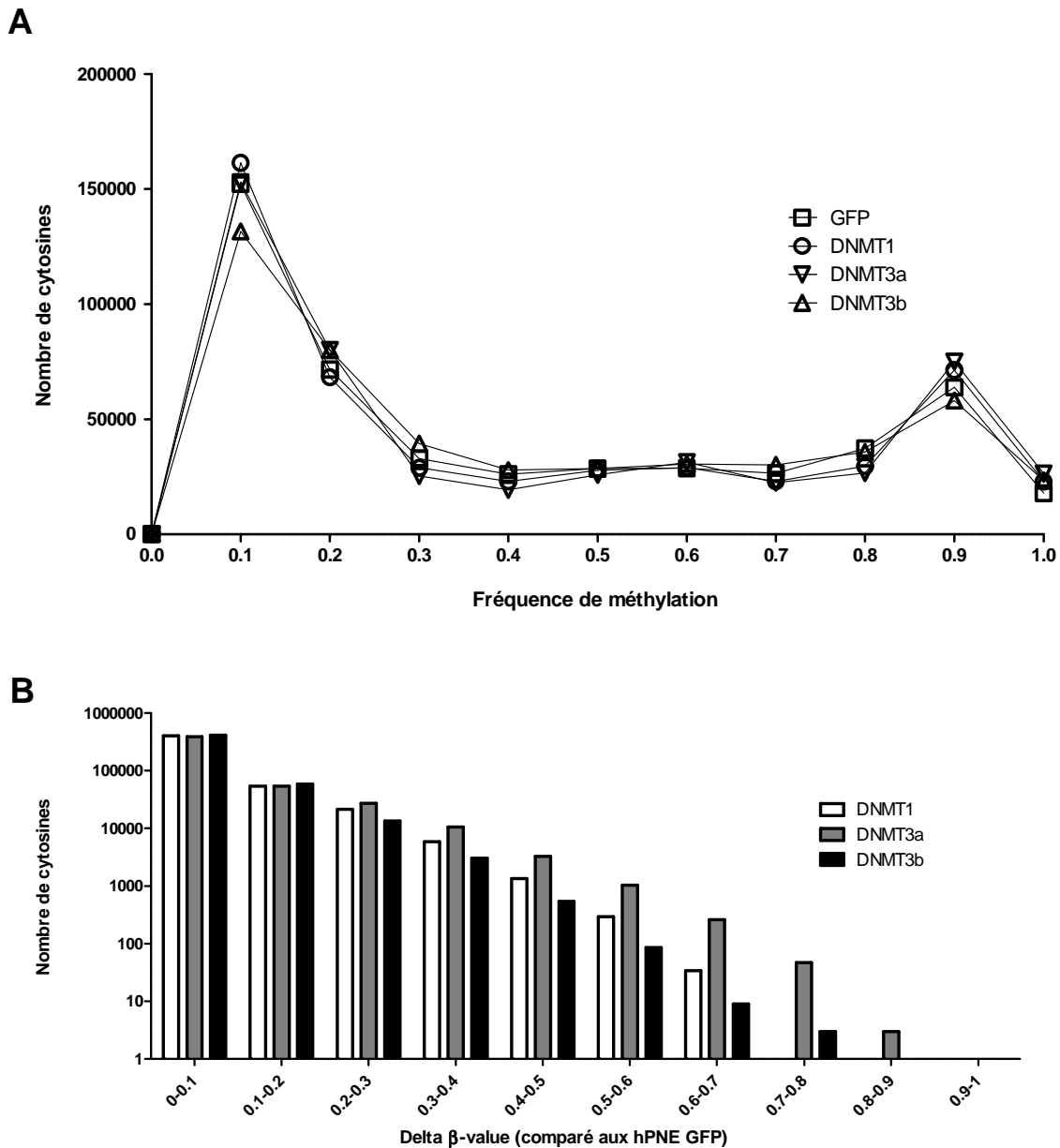


Figure 4 : Profils de méthylation des lignées hPNE surexprimant les différentes DNMTs

La fréquence de méthylation des 485460 dinucléotides CpG est représentée pour chaque lignée hPNE (A). Ces fréquences de méthylation sont comparées à la lignée témoin hPNE-GFP (B). La différence de méthylation pour chaque dinucléotide CpG entre les lignées DNMTs et la lignée GFP est exprimée en Delta β -value.

Nous avons ensuite mesuré la fréquence de méthylation de chaque cytosine dans nos 4 lignées hPNE exprimant la protéine GFP, HA-DNMT1, HA-DNMT3a ou HA-DNMT3b et représenté le nombre d'occurrences pour chaque intervalle de fréquence de méthylation. Les cytosines montrant une fréquence de méthylation (β -value) de l'ordre de 0 à 0.2 sont considérées comme globalement non méthylées, alors que celles comprises entre 0.8 et 1 sont considérées comme hyperméthylées. Nous observons que la majorité des cytosines sont globalement non-méthylées et ce,

indépendamment de la lignée cellulaire. Près de la moitié des cytosines est ensuite répartie sur des fréquences de méthylation allant de 0.3 à 0.8 dans toutes nos lignées. En revanche, un nombre important de cytosines présente une très forte fréquence de méthylation dans toutes nos lignées. Il est intéressant de constater que la surexpression des DNMTs n'induit pas un bouleversement global de la méthylation des cytosines dans notre modèle cellulaire, avec un décalage des cytosines vers les fortes fréquences de méthylation.

Nous avons dans un deuxième temps comparé le niveau de méthylation de chaque cytosine de la lignée hPNE GFP (β -value) à la cytosine correspondante dans les lignées DNMTs (Figure 4B). La valeur absolue de la différence de méthylation observée est appelée Delta β -value. Afin de limiter les biais dus à la technique de conversion au bisulfite de sodium, à la mesure par l'*Infinium Methylation 450K*, ou à nos répliques biologiques, nous nous sommes concentrés sur les cytosines différentiellement méthylées (CDM) montrant une Delta β -value supérieure à 0.5. De plus, comme nous souhaitons étudier les cibles potentielles des différentes DNMTs, nous nous focalisons sur les cytosines hyperméthylées comparées à la lignée GFP. Plus de 90% des CDM montrent une différence de méthylation observée entre les lignées GFP et DNMTs comprise entre 0 et 0.2. De plus, les Delta β -values supérieures à 0.5 ne concernent que moins de 1% des cytosines.

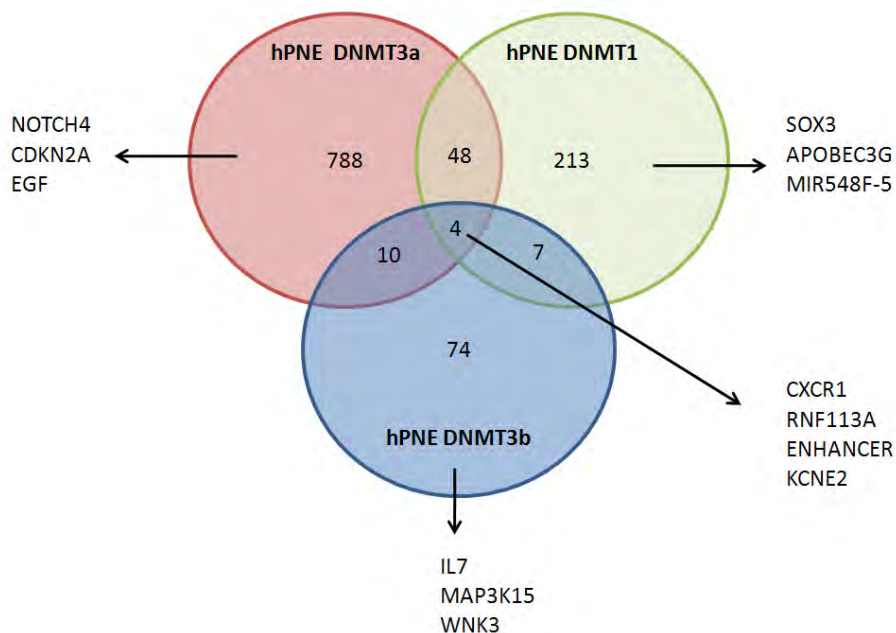


Figure 5 : Nombre de cytosines hyperméthylées en réponse à la surexpression des différentes DNMTs.

Le diagramme de Venn représente le nombre de cytosines hyperméthylées (delta β -value>0.5) dans les différentes lignées hPNE DNMTs. Le recouvrement de plusieurs cercles indique les cytosines hyperméthylées communes à plusieurs lignées. Un exemple de gènes correspondants aux cytosines hyperméthylées est donné pour chaque lignée, ainsi que la liste des gènes correspondants aux cytosines hyperméthylées à la fois dans les trois lignées.

L'analyse épigénétique des CDM entre nos lignées GFP et surexprimant les DNMTs montre que 213 CDM dépassent notre valeur seuil ($\Delta \beta$ -value > 0.5) dans la lignée hPNE DNMT1, 788 dans la lignée DNMT3a et 74 dans la lignée DNMT3b. Des exemples de gènes correspondants aux sites hyperméthylés dans chaque lignée sont présentés Figure 5. Conformément à nos observations Figure 4B, la majorité de nos 485460 dinucléotides CpG présente une variation de méthylation < 0.5. De plus, nous observons que la lignée hPNE HA-DNMT3a présente la proportion la plus importante de cytosines hyperméthylées. En revanche, la lignée hPNE DNMT1 montre un nombre de CDM plus élevé que les hPNE DNMT3b. Par ailleurs, peu de CDM sont communes à 2 lignées hPNE DNMTs et seulement 4 sont communes aux 3 : CXCR1 (récepteur aux chemokines), RNF113A (Ring Finger Protein 113A de fonction inconnue), KCNE2 (canal potassique voltage dépendant) et un enhancer situé sur le chromosome 2 n'étant relié à aucun gène. Par cette observation, nous pouvons déduire que chaque DNMT établit un profil d'hyperméthylation spécifique.

Nous avons voulu déterminer si des gènes correspondants aux sites hyperméthylés en réponse à la surexpression de nos DNMTs étaient aussi rapportés comme différentiellement méthylés dans l'AP. Nous avons pour cela comparé nos CDM présentant un $\Delta \beta$ -value>0.5, à une base de donnée de gènes dont la méthylation est altérée dans le cancer du pancréas (<http://www.pubmeth.org/>).

	hPNE DNMT1	hPNE DNMT3a	hPNE DNMT3b
Gènes communs		CDKN2A	
		RARB	
		CCND2	
		SFRP1	

Tableau 1 : Tableau de correspondance entre les CDM identifiées pour chaque lignée DNMT et une base de données de gènes différentiellement méthylés dans l'AP.

Nous pouvons noter l'absence de gènes hyperméthylés communs entre nos lignées hPNE DNMT1 ou -3b et les gènes présents dans cette base de données. En revanche, les hPNE DNMT3a montrent 4 gènes communs : CDKN2A (p16, régulateur du cycle cellulaire), RARB (*Retinoic acid receptor beta*, récepteur nucléaire), CCND2 (cycline D2, régulateur du cycle cellulaire) et SFRP1 (Secreted frizzled-related protein 1, modulateur de la voie WNT).

L'ensemble de ces résultats suggère que la surexpression de DNMT3a induit un génotype plus grave que pour les deux autres DNMTs et que chacune de ces enzymes met en place un profil de méthylation spécifique. En revanche, la stringence

de nos conditions d'analyse induit l'exclusion d'une majorité de sites différenciellement méthylés.

Etude du profil d'expression génique en réponse à la surexpression des différentes DNMTs

Nous avons par la suite déterminé les conséquences de la surexpression des différentes DNMTs sur le profil d'expression génique de nos lignées cellulaires par une approche de puce à ARN (Agilent SurePrint G3 Human Gene Expression 8x60K v2 Microarray, plateforme TRIX, Toulouse). Cette technique nous a permis d'étudier en parallèle l'expression de tous les gènes annotés chez l'Homme dans nos différentes lignées et de comparer ces profils à notre lignée témoin surexprimant la GFP.

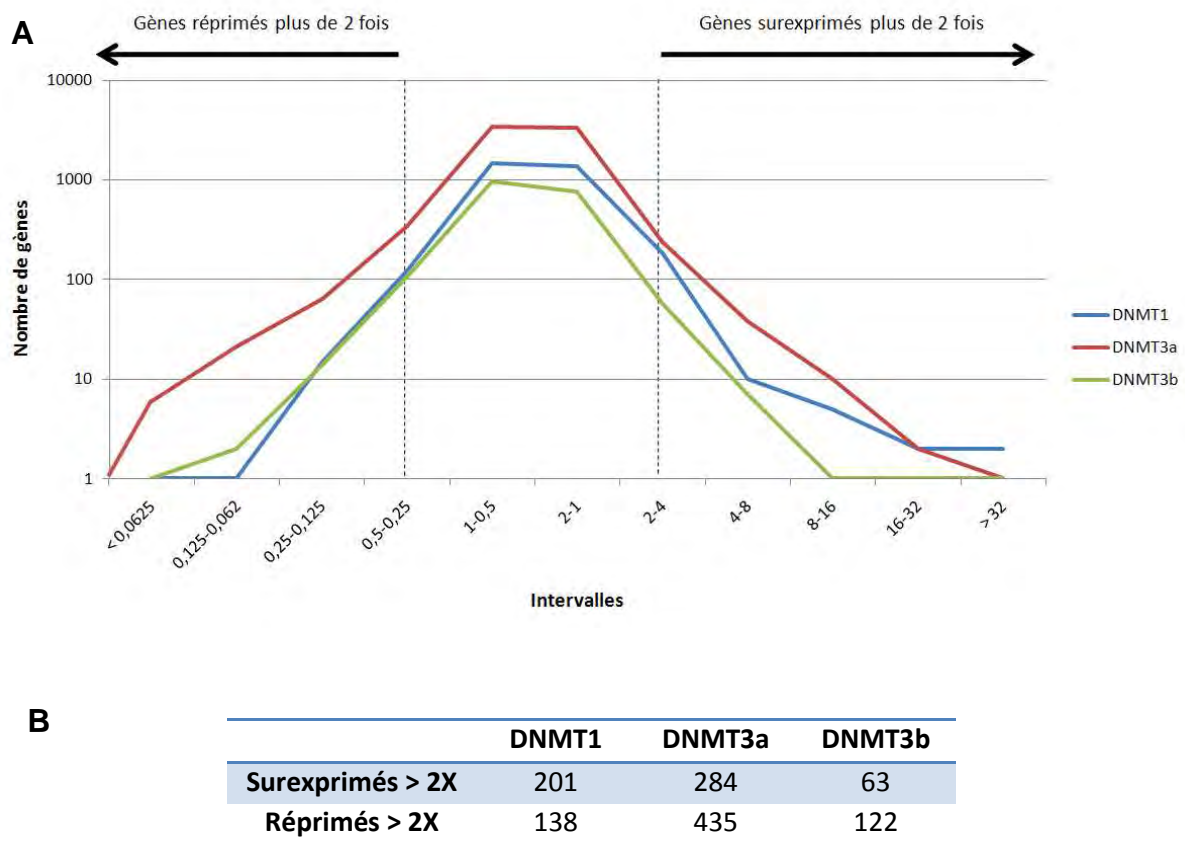


Figure 6 : Analyse transcriptomique des lignées hPNE DNMTs.

L'analyse transcriptomique a été réalisée à partir des ARNs totaux des différentes lignées hPNE (GFP et DNMTs) et effectuée en quadruplet. Seuls les gènes montrant un p-value ajustée (par la méthode Benjamini-Hochberg) inférieure à $p < 0.05$ ont été pris en compte. Le niveau d'expression de chaque gène dans les lignées DNMTs est comparé à celui de la lignée hPNE-GFP (A). Le nombre de gènes montrant une différence d'expression de plus de 2 fois est reporté en B.

La majorité des différences d'expression entre lignées témoin et DNMTs est modeste, avec une surexpression inférieure à 2 fois ou une répression de moins de 50% (Figure 6A). Afin de limiter le nombre de faux-positifs dû à la technique de mesure ou à nos répliques biologiques, nous considérerons comme différentiellement exprimés les gènes induits ou réprimés plus de deux fois. De plus, comme la méthylation de l'ADN est communément associée à une répression de la transcription et que nous étudions ici les conséquences directes de la surexpression des DNMTs, nous nous focaliserons sur les gènes réprimés dans nos lignées DNMTs.

Le nombre de gènes différentiellement exprimés entre lignée témoin et lignées DNMTs varie drastiquement d'une lignée à l'autre (Figure 7). Nous pouvons noter que le nombre de gènes surexprimés dans la lignée hPNE HA-DNMT1 est plus important que le nombre de gènes réprimés. En corrélation avec l'étude épigénétique de ces lignées, les hPNE DNMT3a montrent la plus grande altération dans leur profil d'expression génique en termes de nombre de gènes différentiellement exprimés et les hPNE DNMT3b le moins important.

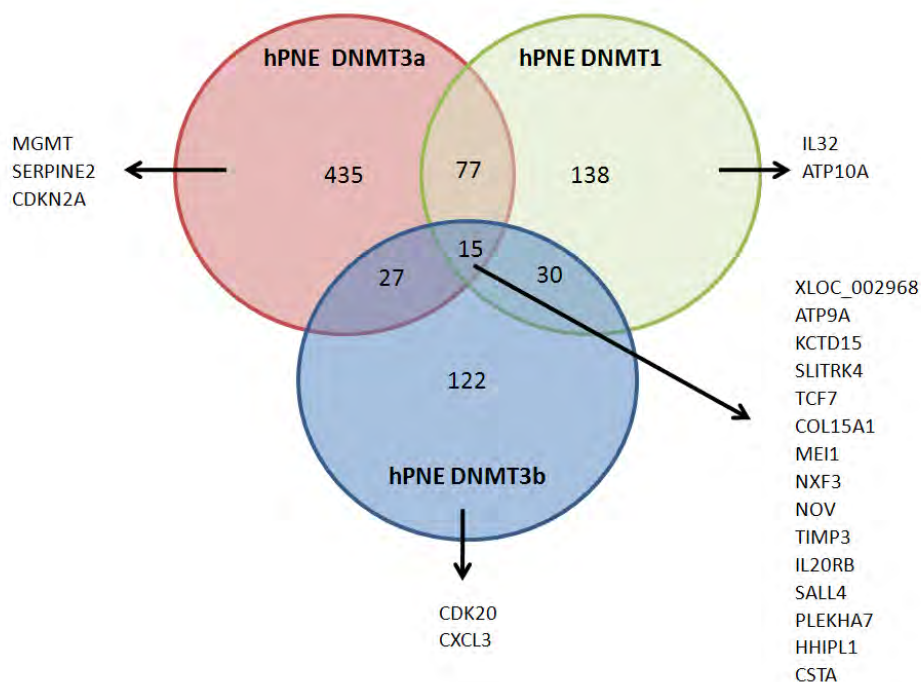


Figure 7 : Nombre de gènes réprimés dans les lignées hPNE DNMTs.

Le diagramme de Vern représente le nombre de gènes réprimés plus de deux fois dans les différentes lignées hPNE DNMTs. Le recouvrement de plusieurs cercles indique les gènes réprimés communs à plusieurs lignées. Un exemple de gènes spécifiques réprimés dans chaque lignée est présenté, ainsi que la liste des gènes réprimés à la fois dans les trois lignées.

Nous avons comparé les gènes réprimés afin de déterminer si les profils d'expression génique sont propres à chaque lignée. De manière intéressante, la proportion de gènes réprimés communs à deux lignées est beaucoup plus importante que la proportion de cytosines hyperméthylées.

Cytosines différenciellement méthylées			
Communs avec	DNMT1	DNMT3a	DNMT3b
DNMT1		6%	9%
DNMT3a	23%		14%
DNMT3b	3%	1%	
Gènes différenciellement exprimés			
Communs avec	DNMT1	DNMT3a	DNMT3b
DNMT1		18%	25%
DNMT3a	56%		22%
DNMT3b	22%	6%	

Tableau 2: Proportion des CDM ou des gènes réprimés communs à deux lignées hpNE DNMTs. Ce tableau reprend les données des figures 5 et 7 et représente les proportions CDM commun / CDM totaux pour chaque lignée (exprimées en pourcentages).

Nous avons ensuite étudié la corrélation entre les CDM hyperméthylés dans nos différentes lignées et les gènes soumis à une répression dans notre analyse transcriptomique.

	hPNE DNMT1	hPNE DNMT3a	hPNE DNMT3b
Corrélation méthylation / répression	POSTN	BANK1	
	STAP2	C12orf34	
		CDC42EP3	
		CDKN2A	
		CRIP1	
		ECHDC3	
		IFI30	
		MYZAP	
		PRICKLE1	
		SLC27A3	
		SPINT2	
		STAP2	

Tableau 3: Tableau de correspondance entre les CDM identifiées dans nos lignées DNMTs et les gènes réprimés identifiés par analyse transcriptomique de ces mêmes lignées.

Dans notre lignée hPNE HA-DNMT1, seuls deux gènes présentent une corrélation entre l'hyperméthylation observée par l'*Infinium Methylation 450K* et une répression transcriptionnelle. Douze gènes présentent cette corrélation dans la lignée hPNE HA-DNMT3a et aucun dans la lignée hPNE HA-DNMT3b.

Etude de la prolifération et de la clonogénicité des lignées hPNE HA-DNMTs

La surexpression des DNMTs est une caractéristique commune à beaucoup de cancers. Face aux changements conséquents des profils de méthylation et d'expression génique dans nos lignées cellulaires, nous avons déterminé si cette seule surexpression des DNMTs est suffisante à la transformation d'une lignée pancréatique non-cancéreuse (hPNE).

Nous avons dans un premier temps mesuré le taux de croissance cellulaire de nos différentes lignées hPNE GFP, HA-DNMT1, HA-DNMT3a et HA-DNMT3b (Figure 8A). Le taux de croissance des cellules hPNE GFP est utilisé comme référence. Les cellules hPNE HA-DNMT1 ont un taux de croissance supérieur aux hPNE GFP jusqu'à J7, puis ralentissent jusqu'à J12. Les cellules hPNE HA-DNMT3a ont un taux de croissance supérieur de J1 à J12 alors que les hPNE HA-DNMT3b ne présentent aucune différence par rapport aux cellules témoins. La mesure du temps de doublement cellulaire des différentes lignées entre J1 et J4 est présenté Figure 8B. En adéquation avec la mesure du taux de croissance, le temps de doublement des hPNE HA-DNMT1 est réduit de 6h par rapport aux cellules témoins et celui des

hPNE HA-DNMT3a est diminué de 15h. Les cellules hPNE HA-DNMT3b ne présentent aucune différence significative par rapport aux cellules témoins.

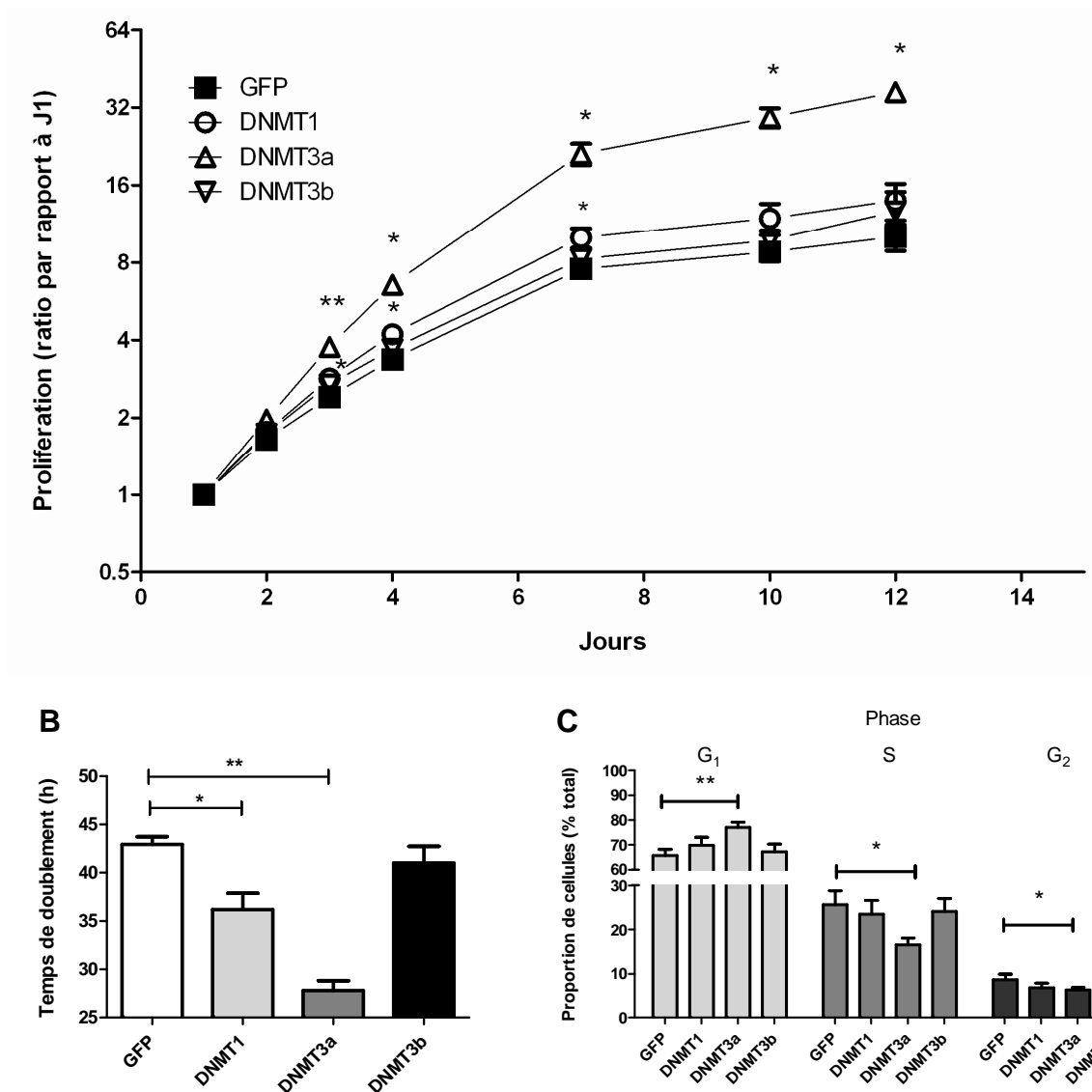


Figure 8 : Mesure de l'effet de la surexpression des DNMTs sur la croissance cellulaire.

Les cellules sontensemencées à une concentration de 2000 cellules/cm² cultivées pendant 12 jours. Pour la mesure du taux de prolifération, le nombre de cellules compté tous les jours est comparé à celui de J1 (A). Le temps de doublement cellulaire est déterminé durant la phase exponentielle de croissance entre J1 et J4 (B). La répartition des cellules dans le cycle cellulaire est mesurée à 6 jours par marquage à l'iodure de propidium et analyse en cytométrie de flux (C). Chaque expérience est reproduite en triplicat.

Nous avons mesuré la répartition des différentes lignées hPNE dans le cycle cellulaire par un marquage de l'ADN à l'iodure de propidium et analyse en cytométrie de flux (Figure 8C). Si les lignées hPNE HA-DNMT1 et -3b ne montrent pas de

différence significative par rapport aux cellules témoins, la lignée hPNE HA-DNMT3a montre une augmentation de la proportion des cellules en phase G₁ et une diminution de la proportion dans les phases S et G₂. Ceci, additionné à la réduction du temps de doublement cellulaire observé Figure 8B, suggère que ces deux dernières phases du cycle cellulaire sont raccourcies et que les cellules se concentrent en phase G₁.

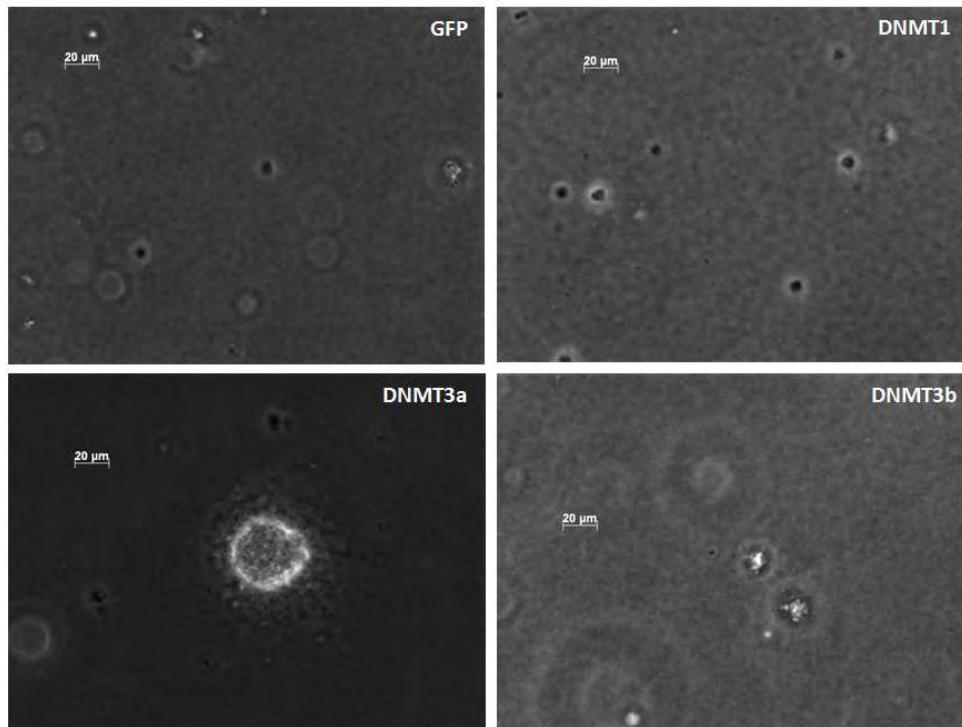


Figure 9 : Mesure des capacités de clonogénicité des lignées hPNE DNMTs.

Vingt mille cellules sontensemencées en plaque 6 puits dans une solution d'agar à 0.35% et cultivées durant 40 jours. Les colonies formées sont observées en contraste de phase (échelle = 20 μm). Chaque expérience est reproduite en triplicat.

En plus de l'augmentation de la prolifération, la clonogénicité est une caractéristique des cellules transformées. Nous avons mesuré la capacité de nos lignées à pousser dans un milieu semi-solide (agar mou) pendant 40 jours (Figure 9). Les cellules hPNE GFP et HA-DNMT1 forment des colonies qui cessent très rapidement de croître et conduisent à des colonies de très petites tailles (<10 μm). Les cellules hPNE HA-DNMT3a forment quant à elles des colonies de taille >20 μm et les cellules hPNE HA-DNMT3b à des colonies de taille supérieure aux lignées GFP et HA-DNMT1 mais <20 μm. Ces observations *in vitro* suggèrent, en corrélation avec l'altération du patron de méthylation et du profil transcriptomique, que la surexpression de DNMT3a conduit à des altérations moléculaires majeures, permettant de franchir les premières étapes de la transformation cellulaire et d'acquérir les caractéristiques principales de cellules transformées.

La capacité à former des tumeurs *in vivo* est une caractéristique essentielle de la transformation cellulaire. Devant les changements opérés dans notre lignée hPNE HA-DNMT3a, nous avons mesuré la capacité de nos lignées hPNE à former des tumeurs chez la souris SCID (Figure 10). Des cellules hPNE mutées pour le proto-oncogène KRAS (transition G12D) ont été décrites comme étant capables d'induire ce type de tumeurs et sont utilisées comme témoins positifs. Parmi les 5 lignées injectées *in vivo*, seules les cellules hPNE KRAS G12D forment des masses dès 15 jours. Par soucis éthique, les souris ayant reçu ces cellules sont sacrifiées après 30 jours seulement. Aucune tumeur n'est détectable pour les 4 autres lignées après 60 jours. Nous pouvons donc conclure que la surexpression des DNMTs n'est pas suffisante pour induire la formation de tumeurs *in vivo* après injection en sous-cutané.

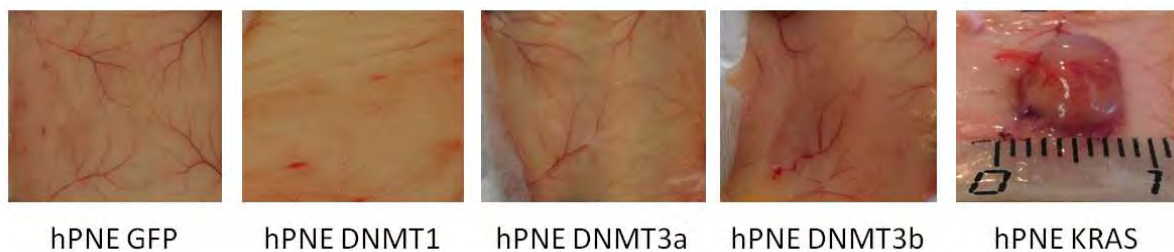


Figure 10 : Injection sous-cutanée des cellules hPNE DNMTs.

Deux millions de cellules sont injectées en sous-cutané chez des souris SCID CB-17 et laissées durant 60 jours (n=5 pour chaque lignée cellulaire).

Conclusion et Perspectives :

Dans ces travaux, nous avons mis en évidence les conséquences de la surexpression stable des différentes DNMTs.

La première perspective à court terme de ces travaux correspond à la validation de nos résultats d'épigénétique et de transcriptomique. Le niveau de méthylation des gènes identifiés comme hyperméthylés dans nos analyses sera mesuré par pyroséquençage et nous nous assurerons de la correspondance des résultats obtenus avec les deux approches. Par ailleurs, les résultats de transcriptomique seront eux validés par q-RT-PCR aussi bien au niveau de gènes réprimés que de gènes induits.

Dans nos travaux l'approche *Infinium Methylation 450K* nous permet d'étudier le niveau de méthylation de plus de 99% des gènes annotés mais à la résolution d'une seule voire deux cytosines par gène. Il est donc fortement probable que des changements de méthylation soient présents sur des cytosines adjacentes à celles étudiées, qui ne seront donc pas pris en compte dans notre étude. De plus DNMT3a et -3b sont localisées au niveau de l'hétérochromatine. Il serait donc logique que les formes ectopiques de ces enzymes soient localisées à ces mêmes loci. La majorité des cytosines étudiées par l'approche *Infinium Methylation 450K* est située au niveau de gènes ou à proximité et ignorent pratiquement les séquences répétées constituant principale de l'hétérochromatine. Il est donc possible que les effets observés dans les lignées DNMT3a et -3b soient sous-estimés. Enfin, nous avons placé une valeur seuil très haute ($\Delta \beta$ -value >0.5) pour définir les cytosines différentiellement méthylées entre les lignées GFP et DNMTs. Dans leurs travaux, Shen *et al.* utilisent exactement la même approche [343]. En revanche, ils utilisent un seuil beaucoup plus permissif pour leur analyse ($\Delta \beta$ -value >0.2). L'analyse de nos données avec un tel seuil augmenterait assurément le nombre de CDM dans chaque lignée mais au risque de majorer le nombre de faux-positifs.

Les sondes utilisées dans notre approche sont réparties sur des enhancers, des promoteurs, sur différentes parties des gènes (UTR, introns...) et associés ou non en îlots CpG. Nous pourrions ainsi étudier si les DNMTs que nous surexprimons ciblent particulièrement un type de région génomique (îlot, UTR ...).

Nous avons vu dans l'introduction que la méthylation dans le corps d'un gène n'est pas forcément corrélée avec une répression transcriptionnelle. Les travaux de Métiérier *et al.* démontrent la méthylation cyclique d'un promoteur transcriptionnellement actif [140]. Nos analyses se sont concentrées sur la corrélation entre l'hyperméthylation de l'ADN et la répression transcriptionnelle dans

les lignées hPNE en occultant un nombre conséquent de gènes induits. La suite de nos analyses s'intéressera donc aux mécanismes responsables de la surexpression de ces gènes et la part jouée par l'hyperméthylation de certaines régions en réponse à la surexpression des DNMTs.

Comme nous en avons discuté dans l'introduction, la méthylation de l'ADN intervient dans la régulation de l'expression des microARNs. Pour des raisons techniques, les microARNs n'étaient pas pris en compte dans notre étude transcriptomique. Nous proposons à court terme d'étudier le profil d'expression d'un panel de 96 microARNs dans nos lignées cellulaires par *BioMark*TM.

Nous avons vu que la surexpression de DNMT3a est capable de favoriser la croissance des cellules et leur clonogénicité *in vitro*. De par leur interaction avec d'autres protéines, il est possible que les DNMTs induisent des changements dans le comportement des cellules indépendamment de la méthylation de l'ADN. Nous proposons donc de surexprimer des DNMTs mutées sur leurs sites catalytiques afin de déterminer si les effets observés au niveau des lignées DNMT1 et -3a sont dépendants des protéines ou de leur activité enzymatique. De plus, nous avons constaté que la surexpression de nos DNMTs entraîne une modification des patrons de méthylation dans nos lignées stables. Nous pouvons donc nous demander si la restauration d'une activité méthyltransférase normale permet une restauration de paramètres normaux de prolifération et de clonogénicité, ou si une fois les marques de méthylation apposée sur le génome, les cellules présentent un phénotype altéré durablement. Les vecteurs utilisés pour l'établissement de nos lignées stables sont sous le contrôle d'un opérateur TET, pouvant être inhibé constitutivement par l'expression stable d'un répresseur TET. Nous procéderons donc à la transduction lentivirale de nos lignées DNMTs par un vecteur codant pour ce répresseur et nous déterminerons si les patrons de méthylation subsistent après un retour à un niveau normal d'expression des DNMTs et mesurerons les paramètres de prolifération et de clonogénicité.

Alors que les cellules hPNE HA-DNMT3a montrent des caractéristiques de cellules transformées *in vitro*, elles sont incapables de former des tumeurs après injection en sous-cutanée chez la souris. Cette observation contraste avec les résultats obtenus avec les cellules hPNE mutées KRAS G12D. Ceci suggère que l'altération de l'expression des DNMTs et de la méthylation de l'ADN, bien que précoce dans la carcinogénèse pancréatique est insuffisante pour la transformation des cellules pancréatiques normales. Néanmoins, les résultats obtenus montrent clairement que cette altération joue un rôle au moins dans la promotion de la carcinogénèse et que parmi les DNMTs, DNMT3a joue un rôle plus important que DNMT1 et -3b. Nous

pourrions injecter les cellules dans le pancréas des souris SCID, afin de reproduire au mieux l'environnement physiologique de ces cellules. Il serait aussi possible de combiner la surexpression des DNMTs avec la mutation KRAS G12D afin de voir s'il existe un effet synergique des deux types d'altérations intervenant de manière concomitante durant la carcinogénèse pancréatique.

Pour finir, devant les résultats observés dans un contexte pancréatique, nous proposons de reproduire ces expériences dans des cellules non-cancéreuses provenant d'autres organes afin de déterminer si l'action de DNMT3a que nous avons mis en évidence n'est pas dépendante d'un tissu ou d'un organe particulier.

V. Conclusion et perspectives

L'équipe du Pr Buscail et du Dr Cordelier se consacre à l'étude de l'AP en vue de déterminer des biomarqueurs de ce cancer et de nouvelles thérapies. L'équipe s'attache tout particulièrement à l'étude des microARNs qui présentent la particularité de pouvoir moduler l'expression d'un grand nombre de protéines et dont le profil d'expression a montré un potentiel diagnostique dans certains cancers.

L'objectif de ce travail de thèse était d'étudier la part jouée par la méthylation de l'ADN dans la carcinogénèse pancréatique avec un intérêt particulier sur son implication dans la régulation de l'expression des microARNs. Ces travaux ont permis différentes observations :

- Nous avons dans un premier temps mis en évidence une liste de microARNs potentiellement réprimés par hyperméthylation de l'ADN dans l'AP. Parmi ces candidats, miR-148a présentait un intérêt particulier du fait qu'il est réprimé dans différents cancers, suggérant un rôle suppresseur de tumeur. Nous avons constaté pour la première fois dans l'AP la répression précoce d'un gène codant pour un microARN à un stade préneoplasique. Cette répression est dépendante de l'hyperméthylation de sa séquence génomique et peut être levée par un traitement déméthylant de l'ADN. De plus, nous avons démontré que cette marque d'hyperméthylation pouvait aider au diagnostic différentiel entre deux pathologies pancréatiques de pronostic et de traitement radicalement différents. Ce travail a donc décrit que la méthylation de l'ADN joue un rôle à part entière dans la répression de certains microARNs mais surtout qu'elle intervient très tôt dans la carcinogénèse (Article1).
- Nous avons alors montré que la restauration de l'expression de miR-148a n'a pas d'impact significatif sur le comportement des cellules tumorales pancréatiques, que ce soit *in vitro* ou *in vivo*. Ces résultats sont d'une grande importance du fait qu'ils permettent de clore le débat sur le potentiel thérapeutique de miR-148a proposé dans la littérature, du moins dans un contexte pancréatique. Par une mise en situation « dans les conditions du réel » nous avons démontré que cette altération bien que précoce n'induit pas de changement significatif au niveau cellulaire (et correspond à une altération « *passenger* »), ou bien la restauration de ce miR est compensée par des voies moléculaires redondantes (Article 2).

- Nous avons enfin observé que la surexpression de DNMT3a dans des cellules pancréatiques non-cancéreuses induit des changements drastiques en termes de prolifération et de clonogénicité mais aussi au niveau épigénétique et transcriptomique. Mais de manière très intéressante, cette surexpression n'induit pas de changements suffisants pour l'établissement de tumeurs chez la souris (Article 3).

Ces observations fournissent de nombreuses pistes à explorer. En effet, elles fournissent une base solide pour une étude plus approfondie de l'implication de la méthylation de l'ADN dans la carcinogénèse et de son utilisation pour le diagnostic du cancer.

L'implication des DNMTs dans la carcinogénèse

La surexpression des DNMTs induit un changement du profil d'expression génique dans notre modèle *in vitro*. Ces changements impliquent une répression de certains gènes, mais aussi l'induction d'autres gènes. Nous proposons dans un premier temps l'analyse de ces gènes différentiellement exprimés et leur regroupement en différentes unités fonctionnelles afin de déterminer quelles grandes fonctions sont affectées dans notre modèle cellulaire. Une meilleure compréhension de ces fonctions aidera à élucider les mécanismes moléculaires responsables du changement phénotypique orchestré par DNMT3a et pourquoi DNMT1 et -3b n'induisent pas de tels changements.

Par ailleurs, la méthylation des cytosines entraîne une forte augmentation de la probabilité d'une transition d'une cytosine vers une thymidine et est donc la source de mutations ponctuelles dans les loci méthylés. Cette méthylation peut avoir lieu aux alentours mais aussi au sein de gènes. Dans le cadre d'une surexpression des DNMTs, le patron de méthylation est modifié et des séquences intragéniques se retrouvent méthylées. Nous pourrions étudier l'apparition de mutations ponctuelles dans nos cellules hPNE DNMTs dues notamment à la déamination spontanée. De plus, la mutation des DNMTs elle-même a déjà été décrite dans d'autres cancers (notamment les tumeurs liquides). Ces mutations peuvent entraîner une altération de l'activité catalytique de ces enzymes ou leur mauvaise localisation dans la cellule. Une étude de la présence de mutations des 3 DNMTs serait alors intéressante dans le cadre de l'étude de l'adénocarcinome pancréatique. En addition des mutations des DNMTs il n'y a, à ma connaissance, aucune étude disponible concernant l'expression des variants des DNMTs dans le cancer du pancréas. Nos travaux ont porté sur la surexpression des formes actives de ces enzymes. Bien que le rôle de

leurs variants dans la cellule ne soit pas encore élucidé, leur statut d'expression dans une situation physiopathologique apporterait de nouveaux indices sur leur fonction.

Enfin, d'autres mécanismes cellulaires n'ont pas été étudiés dans nos travaux tels que l'invasion, la migration, la transdifférenciation ou la résistance à l'hypoxie. Un modèle de monoculture *in vitro* est souvent insuffisant pour déterminer pleinement l'ampleur des changements opérés dans un type cellulaire. L'établissement d'un modèle murin de surexpression des DNMTs spécifiquement dans les cellules épithéliales canalaire pancréatiques serait à même de répondre, dans des conditions physiologiques, au rôle joué par ces enzymes dans la carcinogénèse pancréatique. Par ailleurs, les changements épigénétiques orchestrés par les DNMTs et plus précisément par DNMT3a peuvent avoir un impact sur l'environnement des cellules surexprimant les DNMTs. Dans le cas où des molécules secrétées (facteurs de croissances, enzymes, mucines) ou des protéines de surface seraient différenciellement exprimées, la méthylation de l'ADN pourrait participer à la carcinogénèse par des voies que nous n'avons pas encore étudiées. Le modèle murin surexprimant les DNMTs spécifiquement dans les cellules épithéliales canalaire pancréatiques serait alors un outil précieux pour ces travaux.

L'implication de l'environnement dans la carcinogénèse pancréatique

Comme décrit dans l'introduction, la méthylation de l'ADN se met en place durant le développement et est influencée par l'environnement (toxines, stress, contexte social...). Dans la mesure où la population à risque susceptible de développer un AP n'est pas clairement définie, nous pourrions évaluer l'impact de l'environnement sur le développement de ce cancer. Nous avons aussi vu dans l'introduction à travers les travaux de Weaver *et al.* que le comportement maternel en début de vie a un impact significatif sur la réponse au stress pendant le reste de la vie adulte. Enfin Lillycrop *et al.* décrivent dans leur revue que le régime alimentaire maternel influe directement sur l'état de méthylation de différents gènes impliqués dans le métabolisme et dans différentes fonctions endocrines [344]. Ainsi, nous proposons d'évaluer le rôle du stress et du régime alimentaire dans l'émergence et la prédisposition à cette maladie digestive qu'est l'AP. Ces travaux pourront prendre place chez l'Homme, par une étude transgénérationnelle des environnements sociaux des patients diagnostiqués pour l'AP et l'étude de leurs habitudes alimentaires. Nous conduirons aussi ces travaux chez le rongeur, modèle chez lequel nous pourrions facilement induire un stress, contrôler le régime alimentaire et étudier des phénomènes prenant place dans leur descendance.

L'utilité de la méthylation de l'ADN dans le diagnostic de l'AP

L'utilité de la méthylation de la séquence codant pour miR148a dans le diagnostic différentiel entre AP et pancréatite chronique nous ramène à l'utilisation de la méthylation de l'ADN pour le diagnostic précoce du cancer discuté dans l'introduction. Le matériel biologique utilisé dans nos travaux est du liquide de rinçage de cytoponction à l'aiguille fine. Nous proposons de reproduire notre approche *Infinium Methylation 450K* à partir cette fois d'échantillons biologiques plus faciles d'accès tel que le sérum ou les eaux fécales des patients. Les études actuelles focalisent leur étude sur l'hyperméthylation d'un groupe restreint de gènes. Or, nos travaux illustrent que i : la surexpression des DNMTs est accompagnée d'une déméthylation de certaines régions géniques; ii : les nouvelles approches haut-débit telles que l'*Infinium Methylation 450K* permettent de mettre en évidence des changements de méthylation sur l'ensemble du génome en une seule analyse. Une analyse prospective du profil de méthylation serait précieuse pour la mise au point d'outils diagnostiques « augmentés » visant ainsi à détecter et classifier la tumeur et adapter l'option thérapeutique.

Enfin, durant notre dernière étude, nos observations suggèrent une spécificité des patrons de méthylation en fonction des DNMTs. Nous avons, travaillé à partir de pools cellulaires (ensemble hétérogène de cellules), impliquant que les patrons de méthylation observés sont ceux d'un ensemble de clones présentant des niveaux de transduction différents et donc des niveaux d'expression de DNMTs différents. Cette possibilité nécessite des approfondissements. Nous pouvons envisager d'étudier ce mécanisme en établissant des clones de chaque lignée DNMT, dont le profil de méthylation sera étudié en parallèle. La concordance des patrons de méthylation entre différents clones d'une même lignée et la différence entre les patrons de méthylation de clones de lignées différentes indiquera avec précision s'il y a spécificité dans le ciblage de certains gènes par une DNMT particulière (voir schéma ci-après).

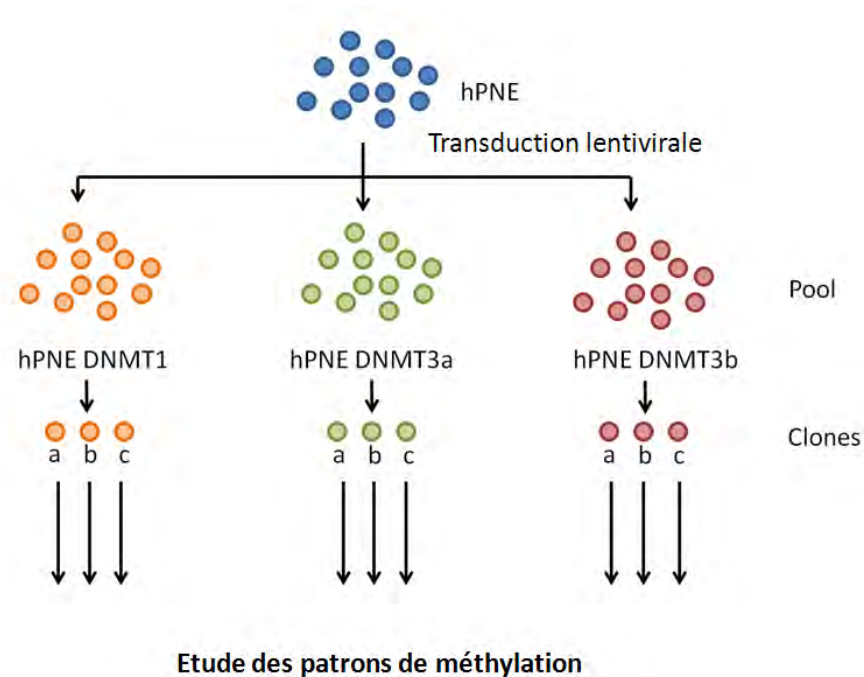


Schéma : Etude de la spécificité des patrons de méthylation de l'ADN en fonction des DNMTs

Ainsi, nous pouvons conclure de ces travaux de thèse qu'ils ont contribué à une meilleure compréhension des mécanismes de la carcinogénèse pancréatique et qu'ils ont apporté un point de vue critique sur l'utilité d'un microARN proposé dans la littérature comme un outil thérapeutique potentiel de l'AP. Mais au-delà, ces travaux ont permis de soulever d'autres questions sur l'implication des DNMTs dans l'avènement du cancer et le rôle joué par l'environnement démontrant que ce mécanisme épigénétique a encore énormément de réponses à livrer.

VI. Annexes

Annexe 1 - Revue 1

« Genetic and epigenetic alterations in pancreatic carcinogenesis »

Genetic and Epigenetic Alterations in Pancreatic Carcinogenesis

Yannick Delpu*, Naïma Hanoun, Hubert Lulka, Flavie Sicard, Janick Selves, Louis Buscail, Jérôme Torrisani and Pierre Cordelier

Inserm UMR 1037- University of Toulouse III, Cancer Research Center of Toulouse (CRCT), BP 84225, CHU Rangueil, Toulouse 31432, Cedex 4, France

Abstract: Pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) is one of the most lethal cancers worldwide. Despite significant progresses in the last decades, the origin of this cancer remains unclear and no efficient therapy exists. PDAC does not arise *de novo*: three remarkable different types of pancreatic lesions can evolve towards pancreatic cancer. These precursor lesions include: Pancreatic intraepithelial neoplasia (PanIN) that are microscopic lesions of the pancreas, Intraductal Papillary Mucinous Neoplasms (IPMN) and Mucinous Cystic Neoplasms (MCN) that are both macroscopic lesions. However, the cellular origin of these lesions is still a matter of debate.

Classically, neoplasm initiation or progression is driven by several genetic and epigenetic alterations. The aim of this review is to assemble the current information on genetic mutations and epigenetic disorders that affect genes during pancreatic carcinogenesis. We will further discuss the interest of the genetic and epigenetic alterations for the diagnosis and prognosis of PDAC. Large genetic alterations (chromosomal deletion/amplification) and single point mutations are well described for carcinogenesis inducers. Mutations classically occur within key regions of the genome. Consequences are various and include activation of mitogenic pathways or silencing of apoptotic processes. Alterations of K-RAS, P16 and DPC4 genes are frequently observed in PDAC samples and have been described to arise gradually during carcinogenesis. DNA methylation is an epigenetic process involved in imprinting and X chromosome inactivation. Alteration of DNA methylation patterns leads to deregulation of gene expression, in the absence of mutation. Both genetic and epigenetic events influence genes and non-coding RNA expression, with dramatic effects on proliferation, survival and invasion. Besides improvement in our fundamental understanding of PDAC development, highlighting the molecular alterations that occur in pancreatic carcinogenesis could provide new clinical tools for early diagnosis of PDAC and the molecular basis for the development of new effective therapies.

Received on: November 22, 2010 - Revised on: December 10, 2010 - Accepted on: December 10, 2010

Keywords: Pancreas, Cancer, Preneoplastic lesions, DNA methylation, Genetic alteration.

1. INTRODUCTION

Pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) is the fourth cause of death by cancer in Western countries, while representing only 3% of the new cancer cases each year [1]. Tobacco, diabetes, obesity and chronic pancreatitis are described as risk factors for PDAC [2]. However, with the exception of familial PDAC, no high risk population is defined. Consequently, screening for PDAC with current imaging techniques seems possible only for patients presenting a familial history of PDAC or already managed for others pancreatic diseases. Hence, PDAC is diagnosed at late stage due to the absence of specific symptoms (abdominal discomfort and abdominal mass due to compression of pancreatic duct) [2, 3]. Up to 60% of patients have advanced PDAC at the time of diagnosis and are not eligible for surgery; their median survival is only 3 to 6 months [1]. Resection relies on the general condition of the patient, the location, size and tumor local invasion. Because of its poor prognosis, improvement of PDAC prognostic requires detecting and

managing this cancer before regional invasion and metastasis [3]. For a better clinical care and a better understanding of PDAC, remarkable works have been done to elucidate the early events driving pancreatic carcinogenesis. We will first describe the main preneoplastic lesions leading to PDAC, to further introduce the molecular alterations associated with PDAC and their lesion-stage dependent appearance. We will finally discuss the molecular marker potential and the clinical interest of such alterations.

2. PRENEOPLASTIC LESIONS OF THE PANCREAS

To date, three types of neoplastic lesion precursor to PDAC are described and characterized. The study of these lesions is of prime importance to:

1. detect and manage PDAC before it becomes invasive and incurable.
2. better understand PDAC carcinogenesis to elaborate new therapies.

Development of such lesions is most of the time asymptomatic, and their discovery occurs together with unresectable carcinoma. They all follow a multistep progression to invasive cancer classified upon morphological and cytological features [2]. The sequential evolution from precursor lesion

*Address correspondence to this author at the Inserm UMR 1037- University of Toulouse III, Cancer Research Center of Toulouse (CRCT), BP 84225, CHU Rangueil, Toulouse 31432, Cedex 4, France; Tel: +33(0) 561322404; Fax: +33(0)561322403; E-mail: yannick.delpu@inserm.fr

to cancer is still a matter of debate because of the absence of early detection and follow-up of these lesions. Main obstacles for precursor detection and follow-up using current diagnostic technologies are their small size and the absence of high risk population to screen. Consequently, studies are usually conducted on fixed resected tissue. In other words, the following observations are in favor of a multistep carcinogenesis:

1. duct lesions are far more common in pancreas with infiltrating carcinoma [4, 5].
2. there is an increase in the grade of lesions surrounding infiltrating carcinoma [5].
3. patients diagnosed with intraductal mucinous neoplasms that are not resected eventually develop infiltrating carcinoma [4, 5].

2.1. Pancreatic Intraepithelial Neoplasia (PanIN)

PanINs are microscopic ductal lesions usually measuring less than 1 cm, generally located in the head of the pancreas. The small size of PanINs renders illusive their detection by MRI (Magnetic Resonance Imagery) or CT (Computed Tomography). Observation of these lesions is usually fortuitous and concomitant to tumor resection. PanINs are classified into 3 grades: PanIN-1 (which are subdivided into PanIN-1A and PanIN-1B), PanIN-2 and PanIN-3/ *in situ* carcinoma (Fig. 1). This classification depends on the degree of architectural and cytological atypia. Briefly, flat and normal epithelia of secondary duct branches show increasing papillary architecture and finally adopt a severe cellular atypia and frequent mitosis, preceding invasive carcinoma [2]. PanINs are the most frequent preneoplastic lesions of the pancreas and are observed in 82% of pancreas with pancreatic cancer [5]. Low grade PanINs appear to be common lesions found in 16-80% of normal pancreas in the absence of neoplasia, while high grade PanINs are nearly exclusively associated with adenocarcinoma [5-8]. Besides, it is suggested that only 1% of PanINs evolve into PDAC [9]. As a result, it is tempting to consider low grade PanINs as benign lesions in absence of key point mutations. Key genetic events would enhance PanIN-1 to PanIN-2 transition, leading to a “no turning back” development into PDAC. A mouse model expressing the constitutively activated K-RAS G12D proto-oncogene recapitulates PanIN lesions and is the common *in vivo* model for PanINs study [10].

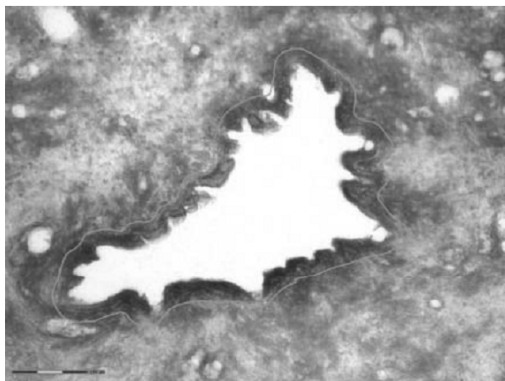


Fig. (1). Microscopic view of Pancreatic intraepithelial neoplasia.

2.2. Intraductal Papillary Mucinous Neoplasms (IPMN)

IPMNs are far less common than PanIN lesions and account for 3-5% of pancreatic tumors [11]. IPMNs are divided into adenoma, borderline and intraductal papillary mucinous carcinoma (IPMC) according to the highest degree of dysplasia detected (Fig. 2A and 2B) [12]. They comprise large lesions with long finger-like papillary architecture, larger than 1 cm and delimited by a columnar mucin-secreting epithelium [13, 14]. IPMNs communicate with pancreatic main duct. Invasive carcinoma occurs in 20-50% of IPMNs and are located on the main pancreatic duct or in the secondary branches of the main duct [11]. Additionally, further anatomical criteria depending on the extension of the disease in the organ are taken into consideration. In fact, IPMNs are classified into three groups: main pancreatic duct IPMN (MPD-IPMN), branch duct IPMN (BD-IPMN), and mixed IPMN [15]. Current knowledge on IPMN indicates that approximately 70% of MPD-IPMNs may progress into invasive cancer [15]. Resection represents the only curative treatment for IPMNs [15]. The long-term follow-up of resected patients shows 5-year survival rates of 88% for benign and non-invasive lesions and between 36 and 60% for IPMC [15, 16].

PanINs and IPMNs lesions exhibit similar histological and molecular features and the distinction between those two types of lesions is based on their size and location. Depending on the lesion origin (main duct or peripheral ductules), PanINs and IPMNs can be considered as similar lesions with different clinical outcome. Moreover, a mouse model develops PanIN lesions in addition to cystic lesions of the pancreas resembling human IPMNs following TGF- α overexpression in mutant K-RAS(G12D) transgenic mice [17]. This observation is in favor of a common origin of both types of lesions.

2.3. Mucinous Cystic Neoplasms (MCN)

MCNs are rare and large (1 to 3 cm) mucin secreting neoplasms [13]. This type of lesions is lined by a columnar, mucin-filled epithelium and shows a characteristic ovarian-type stroma beneath the epithelial layer, separating the lesion from the pancreatic main duct (Fig. 3A and 3B). MCNs present a higher incidence in women as compared to men (ratio 20 to 1) for unknown reasons. MCNs are classified according to their degree of epithelial dysplasia: Mucinous cystadenoma, borderline mucinous cystic neoplasms and mucinous cystic neoplasms with *in situ* carcinoma [18]. Because of their size and their location, they are often associated with non-specific symptoms (abdominal discomfort and abdominal mass due to compression of pancreatic duct). About 20% of MCNs are associated with PDAC [11]. All MCNs may progress to mucinous cystadenocarcinoma, which has a very low resectability and a very poor prognosis [35, 36, 15]. The 5 year-survival rate for patient with a surgically resected MCNs in the absence of PDAC is close to 100%; such survival rate falls to 60% when an adjacent neoplasia is diagnosed [19]. Izeradjene and co-workers demonstrated that mice expressing activated K-RAS(G12D) and deleted for Smad4/Dpc4 develop pancreatic cystic neoplasms in the

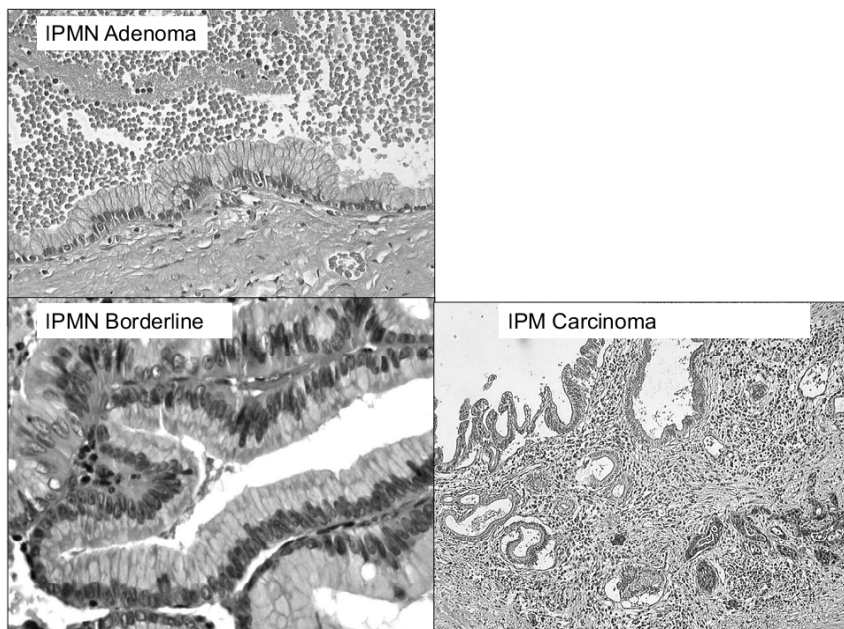
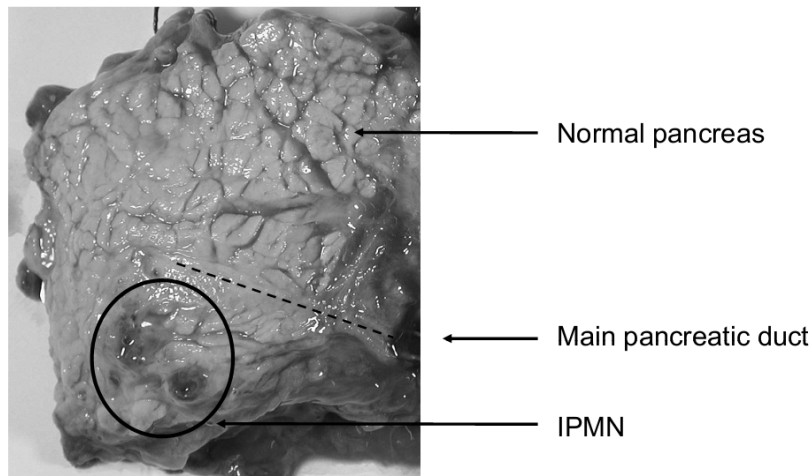


Fig. (2). **A:** Macroscopic view of an Intraductal Papillary Mucinous Neoplasm. **B:** Microscopic view of an Intraductal Papillary Mucinous Neoplasm.

body and the tail of the pancreas in addition to low-grade PanINs [20]. According to the size of these lesions, IPMNs and MCNs can be detected using CT and MRI and present a better prognostic as compared to microscopic lesions PanIN.

3. CELLULAR ORIGIN OF PRENEOPLASTIC LESIONS

All three known precursor lesions bear ductal epithelial cells characteristics, but the precise cellular origin of these lesions is still highly debated.

In mice, induction of short term pancreatic injuries using caerulein leads to transient acinar cells dedifferentiation into mesenchymal cells. These proliferating cells differentiate

into acinar cells to partially repopulate the wounded organ [21]. In mice carrying activating K-RAS mutation, this process seems altered and mesenchymal cells differentiation is impaired, leading to acinar-to-ductal metaplasia, and then to PDAC precursor lesions such as PanINs [21]. The contribution of immature pancreatic precursors to PDAC progression raises the possibility of the presence of pancreatic cancer stem cells (CSC). Classically, stem cells constitute a rare cellular population characterized by its self-renewal, specific cell surface markers, and cellular efflux through multidrug resistance channels. Furthermore, these cells give rise to an heterogeneous lineage [22-25]. Cancer stem cells may derive from this particular population, to acquire a slightly transformed phenotype, known as “minimal deviation” [23].

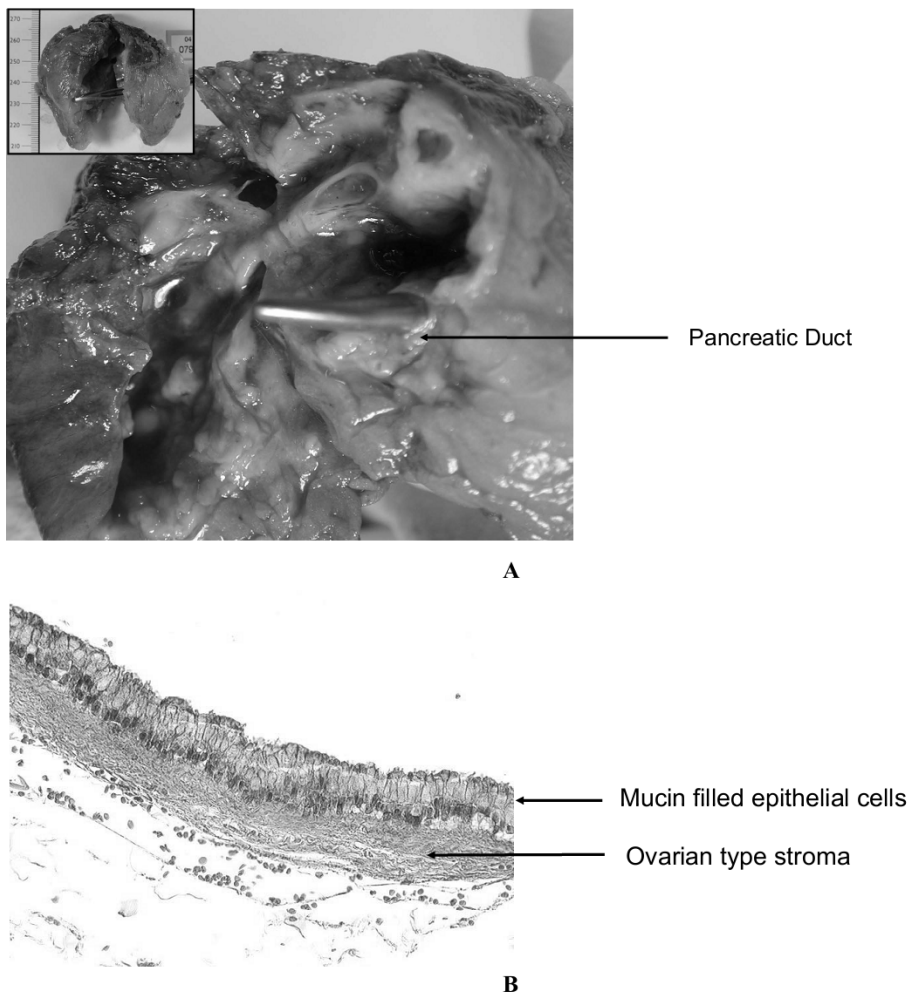


Fig. (3). **A:** Macroscopic view of Mucinous Cystic Neoplasm. **B:** Microscopic view of Mucinous Cystic Neoplasm.

CSCs have been identified in breast cancer, myeloid leukemia, colon and prostate cancer [26]. The identification of such CSCs in the pancreas only relies on the presence of cell surface markers and the up-regulation of Sonic Hedgehog pathway (SHH), participating in self renewal mechanisms [27]. Zhou and co-workers reported dye efflux capacities of PANC-1 cells side population *in vitro* but not *in vivo* [22, 28]. If the capacity of efflux, the location and the rarity of these cells within the tumor would contribute to explain their resistance against conventional therapies, this evidence only suggests the “stem” nature of a subpopulation of pancreatic cancer cells and further studies will be required to conclude on their status. Furthermore, the existence of pancreatic cancer stem cells implies the existence of adult pancreatic stem cells to deviate from. To date, existence of such cell type is still a matter of debate [21, 29]. On the other hand, one could hypothesize that a so-called stem cell population would rather arise from a subpopulation of de-differentiated acinar cell, unable to fully differentiate into epithelial ductal cells. Additionally, adult stem cell performing minimal deviation and leading irretrievably to PDAC is contradictory because of the frequent observation of low grade PanINs in normal

pancreas. “Cancer stem cell” would then originate from de-differentiation failure during pancreas regeneration. The status of mesenchymal cell would allow them to migrate, colonize new niche and then, enter dormancy. Consequently, residual undifferentiated pancreatic cell in resection margin would explain frequent relapse of patients after surgery, together with distant, microscopic metastasis.

4. DNA ALTERATIONS IN PRENEOPLASTIC LESIONS

Classically, sequential evolution from precursor lesion to PDAC involves the accumulation of diverse molecular changes. Such alterations provide precious evidence for understanding PDAC development, and devising new detection and diagnostic tools. However, little is known about the kinetic of appearance of these molecular events. To date improvement in high throughput sequencing technologies provides whole genomic methylation patterns and single point mutation analysis. Moreover, recent design of mouse models recapitulating preneoplastic lesions of the pancreas allowed great advances in our understanding of PDAC related molecular alterations.

4.1. Genetic Alterations

4.1.1. Large Chromosomal Alterations in PDAC

Genetic alterations in pancreatic cancer have been described for decades. In the late 80's, Korc and coworkers reported that Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) altered expression is linked with qualitative and quantitative chromosomal defects such as reciprocal translocation and chromosomal deletion of chromosome 7 [30]. EGFR belongs to the cell surface receptor family with tyrosine kinase activity. EGFR activation by its ligand EGF leads to signal transduction through three main pathways: Mitogen-activated protein (MAP) kinase cascade, phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K) pathway and the signal transducer and activator of transcription (STAT) pathway, promoting cell division and survival [31]. In PDAC as in other cancers, EGFR is frequently subjected to gene amplification (65% of cases) [32-34]. Intragenic mutations are far less common (3.6% of PDAC) and lead to EGFR over-activation [35]. Overexpression of EGFR is an early event in pancreatic carcinogenesis and occurs from PanIN-1 stage to invasive PDAC [36]. Besides, 61.2% of malignant MCNs exhibit increased expression of EGFR, whereas EGFR is not detected in any of benign MCN [37].

Recent studies based on high throughput sequencing approaches described numerous original regions prone to frequent large genetic alterations during carcinogenesis. One hundred and forty four minimal regions identified in 119 independent loci are subjected to such changes and play a potential role in tumor progression, with loci encoding for p16INK4A, TP53, MYC, K-RAS2, and AKT2 previously described as duplicated or deleted in PDAC [38]. Using Representational Oligonucleotide Microarray (ROMA), Lucito *et al.* identified 31 amplifications and 25 deletions involving more than 500 genes in familial pancreatic cancer [39]. Campbell *et al.* recently analyzed patterns of genomic instability in PDAC and pancreatic metastasis [40]. Resulting evidence indicates that PDAC bears specific pattern of genomic alterations (deletion, fold-back inversion, tandem duplication), as compared to other type of cancer. Moreover, these alterations are sequentially detectable from primary tumor to metastatic disease. However, the status of such alterations in preneoplastic lesions is unknown. Additionally to tumor suppressor genes, genetic instability occurs in specific regions encoding microRNAs [41]. MicroRNAs (miRNA) are small non coding RNAs (20-22nt) involved in the negative regulation of mRNAs translation [42]. miRNAs may regulate about 60% of cellular processes and their deregulation is a critical event in carcinogenesis. Alteration in miRNAs expression is a hallmark of cancer and leads to oncogene loss of repression or direct tumor suppressor gene downregulation [42]. Such deregulation leads to a wide range of consequences, influencing tumor progression including cell cycle regulation, epithelial to mesenchymal transition, cellular migration and angiogenesis. Over 130 microRNAs are documented as deregulated in PDAC and pancreatic cancer cell lines but few data exist on the precise mechanisms of such alteration [43, 44]. Similarly to tumor suppressor genes, miRNAs expression alteration can occur anywhere from early to late precursor lesions during PDAC progression. In fact 52.5% of miR genes are in cancer-

associated genomic regions or in fragile sites, subjected to loss of heterozygosity, minimal regions of amplification, or common breakpoint regions [45].

4.1.2. Single Point Mutation

Single point mutations correspond to single base substitution in DNA sequence. Such replacement can have various outcomes depending on the genomic region targeted and the new codon generated by this modification. Many tumor suppressor genes and proto-oncogenes are associated with activating or inhibiting mutation in PDAC. If many of these mutations are known for decades, the dynamic of their appearance in preneoplastic lesions of the pancreas have long remained unclear. Here, we present a non-exhaustive list of genes for which single point mutation have been identified in preneoplastic grades. The **K-RAS** gene (Kirsten-RAS) encodes a RAS homolog that belongs to the cytosolic GTPase family. A single amino acid substitution from G to D at codon 12 is responsible for a constitutive activation observed in up to 95% (60-95%) of PDAC and therefore represents the most common mutation for this cancer [46]. Oncogenic K-RAS activates the MAP Kinase, and/or the PI3K pathways, leading to increased mitogenic activity. K-RAS mutation is an early event during pancreatic carcinogenesis and occurs in 35% of PanIN-1 lesions and reaches 75% in PanIN-3 [6, 46]. The low frequency of K-RAS mutation in PanIN-1 suggests that K-RAS mutation facilitates the progression from low-grade to high-grade PanINs but is not a *sine qua non* condition to PanIN-1 initiation. On the other hand, K-RAS G12D mutation specifically expressed in the whole mice pancreas at the embryonic stage is sufficient to develop PanIN lesions [10, 47]. K-RAS mutation is observed in a third of IPMN adenomas and its mutation frequency increases with lesion grade (50 % of mutated K-RAS in IPMN borderline and IPMC with invasion) [12, 48]. Similarly, MCNs harbor K-RAS mutation in 20% of benign MCNs, 33% of borderline lesions, and 89% of malignant MCNs [49]. **B-RAF** is a member of the RAF family, belonging to the MAP Kinase pathway. B-RAF mutation is observed in 7%-15% of PDAC [12, 50]. Activating intragenic mutation of B-RAF leads to activation of RAF effector MEK. Previous reports proposed that K-RAS and BRAF mutation are exclusive in PDAC [2, 51] and that oncogenic B-RAF would represent an alternative for MAP Kinase pathway activation in the absence of K-RAS mutation [50]. Ishimura and co-workers reported concomitant K-RAS and BRAF activating mutations in tumor samples [50], with no clinicopathological incidence as compared to K-RAS mutation alone, suggesting that there is no cumulative effect and that the addition of the two mutations is not an advantage for tumor progression. When compared to the very high K-RAS mutation frequency in preneoplastic lesions, mutation of B-Raf only occurs in 2.7% of IPMTs [12]. The study of B-RAF mutation in PanINs and MCNs is still to be done. As mentioned above, Schonleben *et al* reported that **EGFR** mutations are very infrequent in IPMTs (no mutation found in 36 IPMT) whereas another group reported EGFR point mutation in 7.5% of Intestine Type IPMTs [48, 52]. To date, no mutational analysis of EGFR concerning PanIN and MCN lesions are available. **DKN2A** is a tumor suppressor gene which encodes the P16 tumor suppressor protein. P16 indirectly provokes Rb protein phosphorylation and its loss of function leads to entry in cell cy-

cle and acute cell proliferation. P16 is the most frequently inactivated tumor suppressor gene in PDAC and is observed in up to 95% of patients [13]. Interestingly, different mechanisms are responsible of its inactivation including homozygous deletion, intragenic mutation and epigenetic silencing by promoter methylation (40%, 40% and 15% of PDAC respectively) (see paragraph below) [2]. All of these invalidating modifications arise at late stages of pancreatic carcinogenesis, in both PanINs and IPMNs (adenoma 45%, borderline 50%, IPMC 53%) with a greater incidence in PanINs (PanIN-1 30-44%, PanIN-2 80%, PanIN-3 92-100%) [53]. However, these data are based on protein expression studies using immunohistochemistry detection and does not identify the alterations leading to p16 loss of function. Cell line derived from non invasive MCNs harbors p16 mutation at codon 58, indicating that such genetic alteration is an early event in MCNs multistep development [54]. **SMAD4/DPC4** (Mothers against decapentaplegic homolog 4/Deleted in Pancreatic Cancer 4) is subjected to frequent deletion or intragenic mutation in PDAC (55%) [55]. SMAD4 is a key actor in TGF beta signaling pathway, and activates transcription of cell cycle inhibitory factors, particularly p21 [56]. Thus, loss of SMAD4 leads to relapse of growth inhibition and uncontrolled proliferation [53]. SMAD4 expression is normal in low grade PanINs (PanIN-1 and -2) and inactivation occurs at late stage in 31% of PanIN-3 [55]. Similarly, SMAD4 expression is normal in adenoma and borderline IPMNs and occurs in 38% of IPMCs [53]. During MCNs development, DPC4 loss of expression is a late event, as the protein is not detectable at invasive stage [57].

Mutation in Tumor Protein 53 (**TP53**) locus is the most common single point mutation in human cancer. TP53 acts as a transcription factor and binds to DNA to activate transcription of genes regulating DNA repair, cell cycle and apoptosis [56]. Inactivating mutations in TP53 are observed in up to 75% of pancreatic cancers [13]. Nonetheless, mutational inactivation of TP53 is a late event during PanIN multistep progression to PDAC (0% in PanIN-1 to 12% in PanIN-3) and seems to be more frequent in IPMN (30% in IPMN adenoma, 30% in IPMN borderline and in IPMC 50-63%) [2, 13, 53, 56, 58]. Cell line derived from non invasive MCN harbors p53 mutation at codon 132, indicating that such genetic alteration takes place before invasive MCN grade [54]. Whole genome analysis approach represent the next step for the discovery of new actors that have not previously been linked to cancer progression or initiation. The genome-wide study of twelve prospective cohorts of PDAC patients identified SNPs located in three novel genomic regions associated with the risk of PDAC [59]. Two of these regions are coding region while the third locus on chromosome 13q22.1 maps to a large non coding region that requires further characterization.

4.2. Epigenetic Alterations

DNA methylation consists of the addition of a methyl (CH₃) residue on cytosine preceding a guanosine, known as CpG dinucleotides (p stands for phosphate). This modification is catalyzed by a DNA methyltransferase family (DNMT1, 3a and 3b). CpG dinucleotides are not equally interspaced in the genome and are frequently grouped in CpG island. Sixty percent of gene in human genome display

one or more CpG islands in their promoter and therefore can be potentially inactivated by methylation. Only 5% of these promoters are methylated. They promote transcription of genes involved in development, or subject to X chromosome inactivation and genomic imprinting [60]. Alteration in DNA methylation pattern is a hallmark of cancer and is associated with an overexpression of DNMTs [61, 62]. Interestingly, whole genome analysis indicates global hypomethylation and only local hypermethylation [63, 64]. Global hypomethylation phenomenon despite DNMTs overexpression may involve targeted DNA methylation [65]. However, the molecular mechanisms involved in such regulation remain unclear to date. Frequent over expression of proto-oncogene in cancer may be linked to their genomic sequence hypomethylation. Understanding global methylation patterns has long been limited by technological concerns limiting the number of genes analyzed. Using cell lines and tumor samples, Sato and co-workers analyzed the methylation status of a subset of 18 genes previously identified as over expressed in PDAC as compared to normal pancreas [66]. The authors describe that Mesothelin and Claudin 4 genes are frequently hypomethylated in PDAC (92% and 89%, respectively) and their methylation status correlates with their expression pattern. On the other hand, hypermethylation occurs during cancer, and may lead to gene silencing. Hypermethylation is responsible for the inactivation of numerous tumor suppressor genes and can occur independently or additionally to intragenic mutation [66-68]. As an example, P16 is equally subjected to mutation or hypermethylation, whereas RASSF1A, Cyclin D2, SOCS-1, APC are tumor suppressor genes silenced only following hypermethylation of their promoting sequence in PDAC [69-71]. By comparing the whole methylome of PDAC with healthy tissue using high throughput technologies, Omura *et al.* determined that MDF1, miR-9-1, ZNF415, CNTNAP2 and EVOLV-4 were the most frequently methylated loci among 88000 probes tested [68]. Interestingly, only miR-9-1 and CNTNAP2 have previously been linked to cancer progression or initiation. In PanINs, eight genes (*CDH3*, *reprimin*, *CLDN5*, *LHX1*, *NPTX2*, *SARF2*, *SPARC* and *ST14*) were reported to be differentially methylated between normal epithelia and PanIN lesions [72]. Interestingly the pattern of methylation during the progression of PanINs is variable among genes. This work proves that CpG island hypermethylation is an early event in PDAC initiation, and its prevalence progressively increases during neoplastic progression. Similar results were found in IPMNs concerning another subset of genes including P16, ppENK, P14, P15, P17, APC, hMLH, E-Cadherin and MGMT [73]. Gene methylation status have not been studied yet in MCN. Taken together, DNA aberrant hypermethylation correlates with DNMT1 over expression in PanINs, and strongly suggests that early methylation may induce precursor lesion progression, and is probably not a consequence of deregulated cellular processes [62]. As stated before, **miRNAs** have been linked to cancer initiation or progression but miR-148a, 107, 34a and Mir 9-3 are the only miRNA genes hypermethylated in cancer [41, 74-76]. Few miRNAs are described as early actors of pancreatic carcinogenesis. MiR-148a is described to be down regulated in numerous cancers (colon, melanoma, lung cancer) [41]. Our recent works demonstrated mir-148a down regulation by DNA hypermethylation in PanIN-1 and -2 [74]. To date, no

data are available concerning miR-148a expression in IPMNs or MCNs. On the other hand, miR-200 and miR-34a alteration of expression are late events in PDAC. Indeed, miR-200 overexpression takes place in invasive PDAC consequently to its genomic sequence hypomethylation and indirectly suppresses E-cadherin expression and contributes to epithelial to mesenchymal transition [77]. Inversely, miR-34a is down-regulated by hypermethylation of its DNA coding sequence and its re-expression induces senescence and cell cycle arrest [76, 78]. Consistent work has been done on molecular characteristics of invasive cancer. Further efforts will be needed to improve our understanding of molecular alterations in preneoplastic lesion during their multistep evolution. In fact, most of the studies are performed on PanIN lesions, due to their higher frequency as compared to IPMNs and MCNs. Further work is needed to better understand IPMN and MCN carcinogenesis. As described above, alteration in miRNAs expression caused by aberrant DNA methylation is an early event in PDAC carcinogenesis, but the consequences of such modification is not clearly defined. Because miRNAs are fine regulator of multiple cellular pathways and because their alteration occurs very early in the oncogenic cascade, it is tempting to speculate that miRNAs may induce carcinogenesis. Transgenic mouse models for miR-17-92, miR-21, miR-29 or miR-155 miRNAs were recently published [79-82]. In these models, expression of miR specifically targeted to the hematopoietic compartment induced lymphopathies. To date, no PDAC transgenic mouse model with impaired miRNAs expression is available.

5. GENERAL INTEREST OF GENETIC MUTATION AND METHYLATED GENE AS BIOMARKERS FOR PDAC

For routine clinical use, molecular markers must be highly sensitive, highly specific and easy to access. To date, current molecular markers mainly rely on variations of proteins/mRNAs expression or histological features. However, the use of such markers presents several issues: i: proteins and mRNAs are not stable and are subject to extensive degradation following collection and ii: histological and protein analysis require consequent amount of tissue. PDAC grading is currently based on CA 19-9, mucin expression or histological study from pancreatic fluids or biopsy. Determination of new molecular markers to improve early diagnosis of this malignancy is impeded by the low frequency of PDAC (4% of new cases of cancer) and its late diagnosis [1]. Genetic and epigenetic alterations both represent an important source of biomarkers for PDAC early detection. In comparison to standard molecular markers, DNA mutation and DNA methylation patterns confer the advantage to be stable and quantified from very low amounts of material from diverse biological samples (biopsies, urines, stool, blood...).

5.1. Diagnostic Marker

Recent studies considered K-RAS mutation analysis in Fine Needle Aspiration (FNA) for PDAC diagnosis, and achieved respectable sensitivity and specificity [83-85]. Our work indicates that miR-148a genomic sequence hypermethylation also discriminate PDAC from chronic pancreatitis [74]. Moreover, 289 methylation patterns in 2016 genes have been demonstrated to successfully discriminate healthy tis-

sue from PDAC [67]. However, this pattern is not specific for PDAC among other types of cancer and requires biopsy so is not suitable for large scale screening of PDAC. Finally, recent works proved that measuring methylation patterns specific for PDAC in blood samples is possible with a sensitivity of 81.7%, and can be a first step towards a sensitive, specific and non-invasive diagnosis tool [86].

5.1.1. Predictive Marker

Another promising application of genetic mutation and methylated gene derived biomarkers is to predict patients resistance to therapy. According to Tan and co-workers, methylation status of GSTM1 and ONECUT2_E96_F is predictive of tumor chemosensitivity [67]. Determination by high throughput technologies of global methylation patterns in patients diagnosed for PDAC and correlation with response to gemcitabine treatment after follow up could identify predictive and surrogate markers for chemotherapeutic response [67].

6. SUMMARY AND FUTURE DIRECTIONS

Despite recent progress in understanding the multistep progression from precursor lesion to invasive cancer and metastasis, PDAC is still detected too late for surgical treatment. As a consequence, early diagnosis of this disease is urgently needed. Detecting alterations in DNA methylation patterns is one most promising avenue for biomarker discovery for PDAC. It is our belief that the future use of unbiased high throughput sequencing will allow the characterization of whole methylation patterns to identify new biomarkers helpful for PDAC diagnosis and prognosis.

REFERENCES

- [1] Jemal, A.; Siegel, R.; Ward, E.; Hao, Y.; Xu, J.; Thun, M. J. Cancer statistics, 2009. *CA Cancer J. Clin.*, **2009**, *59*, 225-249.
- [2] Koorstra, J. B.; Hustinx, S. R.; Offerhaus, G. J.; Maitra, A. Pancreatic carcinogenesis. *Pancreatology*, **2008**, *8*, 110-125.
- [3] Ghaneh, P.; Costello, E.; Neoptolemos, J. P. Biology and management of pancreatic cancer. *Gut*, **2007**, *56*, 1134-1152.
- [4] Brat, D. J.; Lillemo, K. D.; Yeo, C. J.; Warfield, P. B.; Hruban, R. H. Progression of pancreatic intraductal neoplasias to infiltrating adenocarcinoma of the pancreas. *Am. J. Surg. Pathol.*, **1998**, *22*, 163-169.
- [5] Hruban, R. H.; Maitra, A.; Goggins, M. Update on pancreatic intraepithelial neoplasia. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.*, **2008**, *1*, 306-316.
- [6] Sipos, B.; Frank, S.; Gress, T.; Hahn, S.; Kloppel, G. Pancreatic intraepithelial neoplasia revisited and updated. *Pancreatology*, **2009**, *9*, 45-54.
- [7] Yamaguchi, K.; Yokohata, K.; Noshiro, H.; Chijiwa, K.; Tanaka, M. Mucinous cystic neoplasm of the pancreas or intraductal papillary-mucinous tumour of the pancreas. *Eur. J. Surg.*, **2000**, *166*, 141-148.
- [8] Andea, A.; Sarkar, F.; Adsay, V. N. Clinicopathological correlates of pancreatic intraepithelial neoplasia: a comparative analysis of 82 cases with and 152 cases without pancreatic ductal adenocarcinoma. *Mod. Pathol.*, **2003**, *16*, 996-1006.
- [9] Terhune, P. G.; Phifer, D. M.; Tosteson, T. D.; Longnecker, D. S. K-ras mutation in focal proliferative lesions of human pancreas. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, **1998**, *7*, 515-521.
- [10] Hingorani, S. R.; Petricoin, E. F.; Maitra, A.; Rajapakse, V.; King, C.; Jacobetz, M. A.; Ross, S.; Conrads, T.P.; Veenstra, T.D.; Hitt, B.A.; Kawaguchi, Y.; Johann, D.; Liotta, L.A.; Crawford, H.C.; Putt, M.E.; Jacks, T.; Wright, C.V.; Hruban, R.H.; Lowy, A.M.; Tuveson, D.A. Preinvasive and invasive ductal pancreatic cancer and its early detection in the mouse. *Cancer Cell*, **2003**, *4*, 437-450.

- [11] Roggin, K. K.; Chennat, J.; Oto, A.; Noffsinger, A.; Briggs, A.; Matthews, J. B. Pancreatic cystic neoplasm. *Curr. Probl. Surg.*, **47**, 459-510.
- [12] Schonleben, F.; Qiu, W.; Bruckman, K. C.; Ciau, N. T.; Li, X.; Lauerman, M. H.; Frucht, H.; Chabot, J.A.; Allendorf, J.D.; Remotti, H.E.; Su, G.H. BRAF and KRAS gene mutations in intraductal papillary mucinous neoplasm/carcinoma (IPMN/IPMC) of the pancreas. *Cancer Lett.*, **2007**, *249*, 242-248.
- [13] Yonezawa, S.; Higashi, M.; Yamada, N.; Goto, M. Precursor lesions of pancreatic cancer. *Gut Liver*, **2008**, *2*, 137-154.
- [14] Hruban, R. H.; Adsay, N. V. Molecular classification of neoplasms of the pancreas. *Hum. Pathol.*, **2009**, *40*, 612-623.
- [15] Tanaka, M.; Chari, S.; Adsay, V.; Fernandez-del Castillo, C.; Falconi, M.; Shimizu, M.; Yamaguchi, K.; Yamao, K.; Matsuno, S.; International Association of Pancreatology. International consensus guidelines for management of intraductal papillary mucinous neoplasms and mucinous cystic neoplasms of the pancreas. *Pancreatology*, **2006**, *6*, 17-32.
- [16] Maire, F.; Hammel, P.; Terris, B.; Paye, F.; Scoazec, J. Y.; Cellier, C.; Barthet, M.; O'Toole, D.; Rufat, P.; Partensky, C.; Cuillerier, E.; Lévy, P.; Belghiti, J.; Ruszniewski, P. Prognosis of malignant intraductal papillary mucinous tumours of the pancreas after surgical resection. Comparison with pancreatic ductal adenocarcinoma. *Gut*, **2002**, *51*, 717-722.
- [17] Siveke, J. T.; Einwächter, H.; Sipos, B.; Lubeseder-Martellato, C.; Kloppel, G.; Schmid, R. M. Concomitant pancreatic activation of Kras(G12D) and Tgf β results in cystic papillary neoplasms reminiscent of human IPMN. *Cancer Cell*, **2007**, *12*, 266-279.
- [18] Wilentz, R. E.; Albores-Saavedra, J.; Hruban, R. H. Mucinous cystic neoplasms of the pancreas. *Semin. Diagn. Pathol.*, **2000**, *17*, 31-42.
- [19] Hruban, R. H.; Maitra, A.; Kern, S. E.; Goggins, M. Precursors to pancreatic cancer. *Gastroenterol. Clin. North Am.*, **2007**, *36*, 831-849.
- [20] Izeradjene, K.; Combs, C.; Best, M.; Gopinathan, A.; Wagner, A.; Grady, W.M.; Deng, C.X.; Hruban, R.H.; Adsay, N.V.; Tuveson, D.A.; Hingorani, S.R. Kras(G12D) and Smad4/Dpc4 haploinsufficiency cooperate to induce mucinous cystic neoplasms and invasive adenocarcinoma of the pancreas. *Cancer Cell*, **2007**, *11*, 229-243.
- [21] Jensen, J. N.; Cameron, E.; Garay, M. V.; Starkey, T. W.; Gianani, R.; Jensen, J. Recapitulation of elements of embryonic development in adult mouse pancreatic regeneration. *Gastroenterology*, **2005**, *128*, 728-741.
- [22] Sergeant, G.; Vankelecom, H.; Gremeaux, L.; Topal, B. Role of cancer stem cells in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Nat. Rev. Clin. Oncol.*, **2009**, *6*, 580-586.
- [23] Bhagwandin, V. J.; Shay, J. W. Pancreatic cancer stem cells: fact or fiction? *Biochim. Biophys. Acta*, **2009**, *1792*, 248-259.
- [24] Lee, C. J.; Dosch, J.; Simeone, D. M. Pancreatic cancer stem cells. *J. Clin. Oncol.*, **2008**, *26*, 2806-2812.
- [25] Hermann, P. C.; Mueller, M. T.; Heeschen, C. Pancreatic cancer stem cells—insights and perspectives. *Expert Opin. Biol. Ther.*, **2009**, *9*, 1271-1278.
- [26] Simeone, D. M. Pancreatic cancer stem cells: implications for the treatment of pancreatic cancer. *Clin. Cancer Res.*, **2008**, *14*, 5646-5648.
- [27] Li, C.; Heidt, D.G.; Dalerba, P.; Burant, C.F.; Zhang, L.; Adsay, V.; Wicha, M.; Clarke, M.F.; Simeone, D.M. Identification of pancreatic cancer stem cells. *Cancer Res.*, **2007**, *67*, 1030-1037.
- [28] Zhou, J.; Wang, C.Y.; Liu, T.; Wu, B.; Zhou, F.; Xiong, J.X.; Wu, H.S.; Tao, J.; Zhao, G.; Yang, M.; Gou, S.M. Persistence of side population cells with high drug efflux capacity in pancreatic cancer. *World J. Gastroenterol.*, **2008**, *14*, 925-930.
- [29] Iovanna, J. L.; Lechene de la Porte, P.; Dagorn, J. C. Expression of genes associated with dedifferentiation and cell proliferation during pancreatic regeneration following acute pancreatitis. *Pancreas*, **1992**, *7*, 712-718.
- [30] Korc, M.; Meltzer, P.; Trent, J. Enhanced expression of epidermal growth factor receptor correlates with alterations of chromosome 7 in human pancreatic cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1986**, *83*, 5141-5144.
- [31] Papageorgio, C.; Perry, M. C. Epidermal growth factor receptor-targeted therapy for pancreatic cancer. *Cancer Invest.*, **2007**, *25*, 647-657.
- [32] Dancer, J.; Takei, H.; Ro, J. Y.; Lowery-Nordberg, M. Coexpression of EGFR and HER-2 in pancreatic ductal adenocarcinoma: a comparative study using immunohistochemistry correlated with gene amplification by fluorescent in situ hybridization. *Oncol. Rep.*, **2007**, *18*, 151-155.
- [33] Moore, M.J.; Goldstein, D.; Hamm, J.; Figer, A.; Hecht, J.R.; Gallinger, S.; Au, H.J.; Murawa, P.; Walde, D.; Wolff, R.A.; Campos, D.; Lim, R.; Ding, K.; Clark, G.; Voskoglou-Nomikos, T.; Ptasynski, M.; Parulekar, W.; National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. Erlotinib plus gemcitabine compared with gemcitabine alone in patients with advanced pancreatic cancer: a phase III trial of the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. *J. Clin. Oncol.*, **2007**, *25*, 1960-1966.
- [34] Xiong, H.Q.; Rosenberg, A.; LoBuglio, A.; Schmidt, W.; Wolff, R.A.; Deutsch, J.; Needle, M.; Abbruzzese, J.L. Cetuximab, a monoclonal antibody targeting the epidermal growth factor receptor, in combination with gemcitabine for advanced pancreatic cancer: a multicenter phase II trial. *J. Clin. Oncol.*, **2004**, *22*, 2610-2616.
- [35] Kwak, E.L.; Jankowski, J.; Thayer, S.P.; Lauwers, G.Y.; Brannigan, B.W.; Harris, P.L.; Okimoto, R.A.; Haserlat, S.M.; Driscoll, D.R.; Ferry, D.; Muir, B.; Settleman, J.; Fuchs, C.S.; Kulke, M.H.; Ryan, D.P.; Clark, J.W.; Sgroi, D.C.; Haber, D.A.; Bell, D.W. Epidermal growth factor receptor kinase domain mutations in esophageal and pancreatic adenocarcinomas. *Clin. Cancer Res.*, **2006**, *12*, 4283-4287.
- [36] Ozaki, N.; Ohmuraya, M.; Hirota, M.; Ida, S.; Wang, J.; Takamori, H.; Higashiyama, S.; Baba, H.; Yamamura, K. Serine protease inhibitor Kazal type 1 promotes proliferation of pancreatic cancer cells through the epidermal growth factor receptor. *Mol. Cancer Res.*, **2009**, *7*, 1572-1581.
- [37] Kirby, R. E.; Lewandowski, K. B.; Southern, J. F.; Compton, C. C.; Warshaw, A. L. Relation of epidermal growth factor receptor and estrogen receptor-independent pS2 protein to the malignant transformation of mucinous cystic neoplasms of the pancreas. *Arch. Surg.*, **1995**, *130*, 69-72.
- [38] Aguirre, A. J.; Brennan, C.; Bailey, G.; Sinha, R.; Feng, B.; Leo, C.; Zhang, Y.; Zhang, J.; Gans, J.D.; Bardeesy, N.; Cauwels, C.; Cordon-Cardo, C.; Redston, M.S.; DePinho, R.A.; Chin, L. High-resolution characterization of the pancreatic adenocarcinoma genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2004**, *101*, 9067-9072.
- [39] Lucito, R.; Suresh, S.; Walter, K.; Pandey, A.; Lakshmi, B.; Krasnitz, A.; Sebat, J.; Wigler, M.; Klein, A.P.; Brune, K.; Palmisano, E.; Maitra, A.; Goggins, M.; Hruban, R.H. Copy-number variants in patients with a strong family history of pancreatic cancer. *Cancer Biol. Ther.*, **2007**, *6*, 1592-1599.
- [40] Campbell, P. J.; Yachida, S.; Mudie, L. J.; Stephens, P. J.; Pleasance, E. D.; Stebbings, L. A.; Morsberger, L.A.; Latimer, C.; McLaren, S.; Lin, M.L.; McBride, D.J.; Varela, I.; Nik-Zainal, S.A.; Leroy, C.; Jia, M.; Menzies, A.; Butler, A.P.; Teague, J.W.; Griffin, C.A.; Burton, J.; Swerdlow, H.; Quail, M.A.; Stratton, M.R.; Iacobuzio-Donahue, C.; Futreal, P.A. The patterns and dynamics of genomic instability in metastatic pancreatic cancer. *Nature*, **2010**, *467*, 1109-1113.
- [41] Lujambio, A.; Calin, G. A.; Villanueva, A.; Ropero, S.; Sanchez-Cespedes, M.; Blanco, D.; Montuenga, L.M.; Rossi, S.; Nicoloso, M.S.; Faller, W.J.; Gallagher, W.M.; Eccles, S.A.; Croce, C.M.; Esteller, M. A microRNA DNA methylation signature for human cancer metastasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2008**, *105*, 13556-13561.
- [42] Bartel, D. P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, **2004**, *116*, 281-297.
- [43] Rachagani, S.; Kumar, S.; Batra, S. K. MicroRNA in pancreatic cancer: pathological, diagnostic and therapeutic implications. *Cancer Lett.*, **2010**, *292*, 8-16.
- [44] Zhang, Y.; Li, M.; Wang, H.; Fisher, W. E.; Lin, P. H.; Yao, Q.; Chen, C. Profiling of 95 microRNAs in pancreatic cancer cell lines and surgical specimens by real-time PCR analysis. *World J. Surg.*, **2009**, *33*, 698-709.
- [45] Calin, G. A.; Sevignani, C.; Dumitru, C. D.; Hyslop, T.; Noch, E.; Yendamuri, S.; Shimizu, M.; Rattan, S.; Bullrich, F.; Negrini, M.; Croce, C.M. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2004**, *101*, 2999-3004.
- [46] Feldmann, G.; Beaty, R.; Hruban, R. H.; Maitra, A. Molecular genetics of pancreatic intraepithelial neoplasia. *J. Hepatobiliary Pancreat. Surg.*, **2007**, *14*, 224-232.

- [47] Habbe, N.; Shi, G.; Meguid, R. A.; Fendrich, V.; Esni, F.; Chen, H.; Feldmann, G.; Stoffers, D.A.; Konieczny, S.F.; Leach, S.D.; Maitra, A. Spontaneous induction of murine pancreatic intraepithelial neoplasia (mPanIN) by acinar cell targeting of oncogenic Kras in adult mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2008**, *105*, 18913-18918.
- [48] Schonleben, F.; Allendorf, J. D.; Qiu, W.; Li, X.; Ho, D. J.; Ciau, N. T.; Fine, R.L.; Chabot, J.A.; Remotti, H.E.; Su, G.H. Mutational analyses of multiple oncogenic pathways in intraductal papillary mucinous neoplasms of the pancreas. *Pancreas*, **2008**, *36*, 168-172.
- [49] Jimenez, R. E.; Warshaw, A. L.; Z'Graggen, K.; Hartwig, W.; Taylor, D. Z.; Compton, C. C.; Fernández-del Castillo, C. Sequential accumulation of K-ras mutations and p53 overexpression in the progression of pancreatic mucinous cystic neoplasms to malignancy. *Ann. Surg.*, **1999**, *230*, 501-509; discussion 509-511.
- [50] Ishimura, N.; Yamasawa, K.; Karim Rumi, M. A.; Kadowaki, Y.; Ishihara, S.; Amano, Y.; Nio, Y.; Higami, T.; Kinoshita, Y. BRAF and K-ras gene mutations in human pancreatic cancers. *Cancer Lett.*, **2003**, *199*, 169-173.
- [51] Calhoun, E. S.; Jones, J. B.; Ashfaq, R.; Adsay, V.; Baker, S. J.; Valentine, V.; Hempen, P.M.; Hilgers, W.; Yeo, C.J.; Hruban, R.H.; Kern, S.E. BRAF and FBXW7 (CDC4, FBW7, AGO, SEL10) mutations in distinct subsets of pancreatic cancer: potential therapeutic targets. *Am. J. Pathol.*, **2003**, *163*, 1255-1260.
- [52] Chadwick, B.; Willmore-Payne, C.; Tripp, S.; Layfield, L. J.; Hirschowitz, S.; Holden, J. Histologic, immunohistochemical, and molecular classification of 52 IPMNs of the pancreas. *Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol.*, **2009**, *17*, 31-39.
- [53] Biankin, A. V.; Biankin, S. A.; Kench, J. G.; Morey, A. L.; Lee, C. S.; Head, D. R.; Eckstein, R.P.; Hugh, T.B.; Henshall, S.M.; Sutherland, R.L. Aberrant p16(INK4A) and DPC4/Smad4 expression in intraductal papillary mucinous tumours of the pancreas is associated with invasive ductal adenocarcinoma. *Gut*, **2002**, *50*, 861-868.
- [54] Sorio, C.; Capelli, P.; Lissandrini, D.; Moore, P. S.; Balzarini, P.; Falconi, M.; Zamboni, G.; Scarpa, A. Mucinous cystic carcinoma of the pancreas: a unique cell line and xenograft model of a pre-invasive lesion. *Virchows Arch.*, **2005**, *446*, 239-245.
- [55] Iacobuzio-Donahue, C. A.; Klimstra, D. S.; Adsay, N. V.; Wilentz, R. E.; Argani, P.; Sohn, T. A.; Yeo, C.J.; Cameron, J.L.; Kern, S.E.; Hruban R.H. Dpc-4 protein is expressed in virtually all human intraductal papillary mucinous neoplasms of the pancreas: comparison with conventional ductal adenocarcinomas. *Am. J. Pathol.*, **2000**, *157*, 755-761.
- [56] Yachida, S.; Iacobuzio-Donahue, C. A. The pathology and genetics of metastatic pancreatic cancer. *Arch. Pathol. Lab. Med.*, **2009**, *133*, 413-422.
- [57] Luttgies, J.; Feyerabend, B.; Buchelt, T.; Pacena, M.Kloppel, G. The mucin profile of noninvasive and invasive mucinous cystic neoplasms of the pancreas. *Am. J. Surg. Pathol.*, **2002**, *26*, 466-471.
- [58] Flejou, J. F.; Boulange, B.; Bernades, P.; Belghiti, J.Henin, D. p53 protein expression and DNA ploidy in cystic tumors of the pancreas. *Pancreas*, **1996**, *13*, 247-252.
- [59] Petersen, G. M.; Amundadottir, L.; Fuchs, C. S.; Kraft, P.; Stolzenberg-Solomon, R. Z.; Jacobs, K. B.; Arslan, A.A.; Bueno-de-Mesquita, H.B.; Gallinger, S.; Gross, M.; Helzlsouer, K.; Holly, E.A.; Jacobs, E.J.; Klein, A.P.; LaCroix, A.; Li, D.; Mandelsohn, M.T.; Olson, S.H.; Risch, H.A.; Zheng, W.; Albanes, D.; Bamlet, W.R.; Berg, C.D.; Boutron-Ruault, M.C.; Buring, J.E.; Bracci, P.M.; Canzian, F.; Clipp, S.; Cotterchio, M.; de Andrade, M.; Duell, E.J.; Gaziano, J.M.; Giovannucci, E.L.; Goggins, M.; Hallmans, G.; Hankinson, S.E.; Hassan, M.; Howard, B.; Hunter, D.J.; Hutchinson, A.; Jenab, M.; Kaaks, R.; Kooperberg, C.; Krogh, V.; Kurtz, R.C.; Lynch, S.M.; McWilliams, R.R.; Mendelsohn, J.B.; Michaud, D.S.; Parikh, H.; Patel, A.V.; Peeters, P.H.; Rajkovic, A.; Riboli, E.; Rodriguez, L.; Seminara, D.; Shu, X.O.; Thomas, G.; Tjønneland, A.; Tobias, G.S.; Trichopoulos, D.; Van Den Eeden, S.K.; Virtamo, J.; Wactawski-Wende, J.; Wang, Z.; Wolpin, B.M.; Yu, H.; Yu, K.; Zeleniuch-Jacquotte, A.; Fraumeni, J.F.; Jr, Hoover, R.N.; Hartge, P.; Chanock, S.J. A genome-wide association study identifies pancreatic cancer susceptibility loci on chromosomes 13q22.1, 1q32.1 and 5p15.33. *Nat. Genet.*, **2010**, *42*, 224-228.
- [60] Weber, M. [Profiles of DNA methylation in normal and cancer cells]. *Med Sci (Paris)*, **2008**, *24*, 731-734.
- [61] Robertson, K. D.; Uzvolgyi, E.; Liang, G.; Talmadge, C.; Sumegi, J.; Gonzales, F. A.; Jones, P.A. The human DNA methyltransferases (DNMTs) 1, 3a and 3b: coordinate mRNA expression in normal tissues and overexpression in tumors. *Nucleic Acids Res.*, **1999**, *27*, 2291-2298.
- [62] Peng, D. F.; Kanai, Y.; Sawada, M.; Ushijima, S.; Hiraoka, N.; Kosuge, T.; Hirohashi, S. Increased DNA methyltransferase 1 (DNMT1) protein expression in precancerous conditions and ductal carcinomas of the pancreas. *Cancer Sci.*, **2005**, *96*, 403-408.
- [63] Ueki, T.; Toyota, M.; Sohn, T.; Yeo, C. J.; Issa, J. P.; Hruban, R. H.; Goggins, M. Hypermethylation of multiple genes in pancreatic adenocarcinoma. *Cancer Res.*, **2000**, *60*, 1835-1839.
- [64] Sato, N.; Maitra, A.; Fukushima, N.; van Heek, N. T.; Matsubayashi, H.; Iacobuzio-Donahue, C. A.; Rosty, C.; Goggins, M. Frequent hypomethylation of multiple genes overexpressed in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Res.*, **2003**, *63*, 4158-4166.
- [65] Hervouet, E.; Vallette, F. M.; Cartron, P. F. Dnmt3/transcription factor interactions as crucial players in targeted DNA methylation. *Epigenetics*, **2009**, *4*, 487-499.
- [66] Ueki, T.; Toyota, M.; Skinner, H.; Walter, K. M.; Yeo, C. J.; Issa, J. P.; Hruban, R.H.; Goggins, M. Identification and characterization of differentially methylated CpG islands in pancreatic carcinoma. *Cancer Res.*, **2001**, *61*, 8540-8546.
- [67] Tan, A. C.; Jimeno, A.; Lin, S. H.; Wheelhouse, J.; Chan, F.; Solomon, A.; Rajeshkumar, N.V.; Rubio-Viqueira, B.; Hidalgo, M. Characterizing DNA methylation patterns in pancreatic cancer genome. *Mol. Oncol.*, **2009**, *3*, 425-438.
- [68] Omura, N.; Li, C. P.; Li, A.; Hong, S. M.; Walter, K.; Jimeno, A.; Hidalgo, M.; Goggins, M. Genome-wide profiling of methylated promoters in pancreatic adenocarcinoma. *Cancer Biol. Ther.*, **2008**, *7*, 1146-1156.
- [69] Klump, B.; Hsieh, C. J.; Nehls, O.; Dette, S.; Holzmann, K.; Kiesslich, R.; Jung, M.; Sinn, U.; Oter, M.; Porschen, R.; Gregor, M. Methylation status of p14ARF and p16INK4a as detected in pancreatic secretions. *Br. J. Cancer*, **2003**, *88*, 217-222.
- [70] Dammann, R.; Schagdarsurengin, U.; Liu, L.; Otto, N.; Gimm, O.; Dralle, H.; Boehm, B.O.; Pfeifer, G.P.; Hoang-Vu, C. Frequent RASSF1A promoter hypermethylation and K-ras mutations in pancreatic carcinoma. *Oncogene*, **2003**, *22*, 3806-3812.
- [71] Kuroki, T.; Tajima, Y.; Kanematsu, T. Role of hypermethylation on carcinogenesis in the pancreas. *Surg. Today*, **2004**, *34*, 981-986.
- [72] Sato, N.; Fukushima, N.; Hruban, R. H.; Goggins, M. CpG island methylation profile of pancreatic intraepithelial neoplasia. *Mod. Pathol.*, **2008**, *21*, 238-244.
- [73] Sato, N.; Goggins, M. Epigenetic alterations in intraductal papillary mucinous neoplasms of the pancreas. *J. Hepatobiliary Pancreat. Surg.*, **2006**, *13*, 280-285.
- [74] Hanoun, N.; Delpu, Y.; Suriawinata, A. A.; Bourmet, B.; Bureau, C.; Selves, J.; Tsongalis, G.J.; Dufresne, M.; Buscail, L.; Cordelier, P.; Torrisani, J. The silencing of MicroRNA 148a production by DNA hypermethylation is an early event in pancreatic carcinogenesis. *Clin. Chem.*, **2010**, *56*, 1107-1118.
- [75] Lee, K. H.; Lotterman, C.; Karikari, C.; Omura, N.; Feldmann, G.; Habbe, N.; Goggins, M.G.; Mendell, J.T.; Maitra, A. Epigenetic silencing of MicroRNA miR-107 regulates cyclin-dependent kinase 6 expression in pancreatic cancer. *Pancreatol.*, **2009**, *9*, 293-301.
- [76] Lodygin, D.; Tarasov, V.; Epanchintsev, A.; Berking, C.; Knyazeva, T.; Komer, H.; Knyazev, P.; Diebold, J.; Hermeking, H. Inactivation of miR-34a by aberrant CpG methylation in multiple types of cancer. *Cell Cycle*, **2008**, *7*, 2591-2600.
- [77] Li, A.; Omura, N.; Hong, S. M.; Vincent, A.; Walter, K.; Griffith, M.; Borges, M.; Goggins, M. Pancreatic cancers epigenetically silence SIP1 and hypomethylate and overexpress miR-200a/200b in association with elevated circulating miR-200a and miR-200b levels. *Cancer Res.*, **2010**, *70*, 5226-5237.
- [78] Ji, Q.; Hao, X.; Zhang, M.; Tang, W.; Yang, M.; Li, L.; Xiang, D.; Desano, J.T.; Bommer, G.T.; Fan, D.; Fearon, E.R.; Lawrence, T.S.; Xu, L. MicroRNA miR-34 inhibits human pancreatic cancer tumor-initiating cells. *PLoS One*, **2009**, *4*, e6816.
- [79] Mu, P.; Han, Y. C.; Betel, D.; Yao, E.; Squatrito, M.; Ogorodowski, P.; de Stanchina, E.; D'Andrea, A.; Sander, C.; Ventura, A. Genetic dissection of the miR-17-92 cluster of microRNAs in Myc-induced B-cell lymphomas. *Genes Dev.*, **2009**, *23*, 2806-2811.
- [80] Xiao, C.; Srinivasan, L.; Calado, D. P.; Patterson, H. C.; Zhang, B.; Wang, J.; Henderson, J.M.; Kutok, J.L.; Rajewsky, K. Lymphopro-

- liferative disease and autoimmunity in mice with increased miR-17-92 expression in lymphocytes. *Nat. Immunol.*, **2008**, *9*, 405-414.
- [81] Medina, P. P.; Nolde, M. Slack, F. J. OncomiR addiction in an *in vivo* model of microRNA-21-induced pre-B-cell lymphoma. *Nature*, **2010**, *467*, 86-90.
- [82] Costinean, S.; Zanesi, N.; Pekarsky, Y.; Tili, E.; Volinia, S.; Heerema, N.; Croce, C.M. Pre-B cell proliferation and lymphoblastic leukemia/high-grade lymphoma in E(mu)-miR155 transgenic mice. *Proc Natl. Acad. Sci. USA*, **2006**, *103*, 7024-7029.
- [83] Bourmet, B.; Souque, A.; Senesse, P.; Assenat, E.; Barthet, M.; Lesavre, N.; Aubert, A.; O'Toole, D.; Hammel, P.; Levy, P.; Ruzniewski, P.; Bouisson, M.; Escourrou, J.; Cordelier, P.; Buscail, L. Endoscopic ultrasound-guided fine-needle aspiration biopsy coupled with KRAS mutation assay to distinguish pancreatic cancer from pseudotumoral chronic pancreatitis. *Endoscopy*, **2009**, *41*, 552-557.
- [84] Hosoda, W.; Takagi, T.; Mizuno, N.; Shimizu, Y.; Sano, T.; Yamao, K.; Yatabe, Y. Diagnostic approach to pancreatic tumors with the specimens of endoscopic ultrasound-guided fine needle aspiration. *Pathol. Int.*, **2010**, *60*, 358-364.
- [85] Jang, J. Y.; Park, Y. C.; Song, Y. S.; Lee, S. E.; Hwang, D. W.; Lim, C. S.; Lee, H.E.; Kim, W.H.; Kim, S.W. Increased K-ras mutation and expression of S100A4 and MUC2 protein in the malignant intraductal papillary mucinous tumor of the pancreas. *J. Hepatobiliary Pancreat. Surg.*, **2009**, *16*, 668-674.
- [86] Liggett, T.; Melnikov, A.; Yi, Q. L.; Replogle, C.; Brand, R.; Kaul, K.; Talamonti, M.; Abrams, R.A.; Levenson, V. Differential methylation of cell-free circulating DNA among patients with pancreatic cancer versus chronic pancreatitis. *Cancer*, **2010**, *116*, 1674-1680.

Annexe 2 - Revue 2

« *DNA methylation and cancer diagnosis* »

Review

DNA Methylation and Cancer Diagnosis

Yannick Delpu^{1,2}, Pierre Cordelier^{1,2}, William C. Cho³ and Jérôme Torrisani^{1,2,*}

¹ Inserm UMR 1037, Centre de Recherches en Cancérologie de Toulouse, Toulouse, France

² Université de Toulouse, Toulouse, France.

³ Department of Clinical Oncology, Queen Elizabeth Hospital, Hong Kong; E-Mail: williamcscho@gmail.com (W.C.C.)

* Author to whom correspondence should be addressed; E-Mail: jerome.torrisani@inserm.fr (J.T.);

Tel.: +33-531-224-112; Fax: +33-561-322-403.

Received: 10 May 2013 / Accepted: / Published:

Abstract: DNA methylation is a major epigenetic modification that strongly participates in the physiological control of genome expression. DNA methylation patterns are largely modified in cancer cells and can therefore be used to distinguish cancer cells from normal tissues. This review describes the main technologies available for the detection and the discovery of aberrantly methylated DNA patterns. It also presents the different sources of biological samples suitable for DNA methylation studies. We discuss the interest and perspectives of the use of DNA methylation measurement for cancer diagnosis through examples of methylated genes commonly documented in the literature. The discussion leads to our consideration for why DNA methylation is not commonly used in clinical practice by indication the main requirements that constitute a reliable biomarker. Finally, we describe the main DNA methylation inhibitors currently used in clinical trials and those that exhibit promising results.

Keywords: DNA methylation; biomarkers; cancer diagnosis; DNA methylation inhibitors; clinical trials.

1. Introduction

1.1. DNA Methylation, a Physiological Process

Developmental processes and proper biological functions are tightly dependent on hierarchical and regulated gene expression patterns. Numerous molecular processes control gene expression. DNA methylation is a physiological epigenetic process that leads to long term-repression of gene expression¹. Like histone modifications, DNA methylation does not impact genomic DNA sequence itself, but adds a methyl (CH₃) group on cytosines of CG dinucleotides. This reaction is catalyzed by a DNA methyltransferase enzyme family composed of DNMT1, DNMT3a and DNMT3b¹. Briefly, this chemical modification affects gene expression through two major mechanisms. DNA methylation can directly interfere with the binding of transcription factors that are sensitive to methylated CpG¹. Alternatively, methylated cytosines are recognized by methyl binding domain (MBD) protein family that mediates the recruitment of chromatin remodeling enzymes such as histone deacetylases¹. Consequently, histone deacetylation leads to the condensation of the chromatin and to the silencing of the neighboring gene¹. Even though present all along the genome, CG dinucleotides are not equally interspaced and are frequently grouped in CpG islands (p for phosphate)¹. DNA regions targeted by DNA methylation are physiologically subject to long term silencing. They usually correspond to genes transiently expressed during development, subject to X chromosome inactivation, imprinted genes or vestigial repeated sequences². Approximately sixty percent of our genes harbor one or more CpG islands in their promoter and therefore can be potentially silenced by DNA methylation. Meanwhile, in normal cells only 5% of these promoters are methylated illustrating that the establishment of this epigenetic mark is not a predominant process. However, CpG islands are not exclusively located at gene promoter, many of them are located within gene body. Conversely, methylation of intragenic CG dinucleotides can increase transcription and/or activate an alternative promoter^{1,3}.

1.2. DNA Methyltransferase Family and Establishment of DNA Methylation Profiles

The first identified DNA methyltransferase DNMT1 is known as a *maintenance* DNMT⁴. It is responsible for the exact copying of the DNA methylation pattern on the neo-synthesized strand during DNA replication. Therefore it principally localizes to the DNA replication fork. Due to its importance in DNA replication, DNMT1 expression is tightly regulated during cell cycle by several mechanisms and maximal expression occurs during S phase⁴. Since its role is to ensure the inheritance of DNA methylation pattern through cell division, DNMT1 expression is maintained after development. On a transcriptional point of view, two transcript variants of DNMT1 mRNA were identified : a full-length form of 1616 amino acids, and an oocyte-specific variant that lacks the N-terminal 118 amino acids of the full-length form (DNMT1o) but both are enzymatically active⁴. DNMT1 is capable of *de novo* methylation but its affinity for unmethylated DNA is far lower than for hemi-methylated DNA. As an

illustration of the crucial role of DNMT1, the genetic loss of *DNMT1* gene in mice model is embryonic lethal ⁵.

The *de novo* DNA methyltransferases DNMT3a and DNMT3b are responsible for the establishment of DNA methylation patterns during development. They are highly expressed during embryogenesis ⁴. Similarly to DNMT1, DNMT3a and 3b expression is increased in S phase but they do not localize at the DNA replication fork ^{5,6}. Immuno-fluorescence study shows that both *de novo* DNMTs localize to heterochromatin ⁶. Further experiments demonstrate that DNMT3a and DNMT 3b are strongly associated to nucleosomes containing methylated DNA, and promotes propagation of DNA methylation through stabilization of those enzymes ^{7,8}. DNMT3a gene encodes at least two protein products, both enzymatically active but with variation on their localization in the nucleus. The *DNMT3b* gene encodes five isoforms: two are active and three inactive ⁴. Conversely to DNMT1, as development progresses both genes undergo tissue-specific repression such that their expression is scarcely detectable in adult tissues ⁹. *De novo* methylation is a crucial developmental process as *DNMT3b* knockout is lethal at embryonic stage of mouse development ^{9,10}. DNMT3a-deficient mice are *via* ble only 4 weeks after birth ⁹. An additional DNMT3-like enzyme (DNMT3L) was identified. It is highly similar to DNMT3a and 3b, but lacks the catalytic domain ¹¹. Interestingly, DNMT3L is expressed simultaneously to DNMT3a and DNMT3b, and despite its absence of enzymatic activity, it stimulates *de novo* methylation *via* its interaction with these enzymes ¹¹.

A last enzyme is associated to the DNMT family based on sequence homology. Whereas this enzyme is named DNMT2, it shows no DNA methyltransferase activity. Homozygous deletion of DNMT2 gene in mouse ES cells has no effect on the maintenance or the establishment of methylation, providing evidence that DNMT2 does not play a major role in global *de novo* or *de maintenance* methylation of CG sites in mammals ¹². Other studies demonstrate that DNMT2 methylates transfer RNAs ^{13,14,15}. Consequently, DNMT2 is now known as TRDMT1 (tRNA aspartic acid methyltransferase 1) by the HUGO gene nomenclature.

1.3. DNA Methylation Alterations in Cancers and Preneoplastic Lesions

Alteration of DNA methylation patterns is a hallmark of cancer ¹⁶. Numerous studies describe repression of tumor suppressor genes (TSG) involved in various cellular pathways (cell cycle, apoptosis or genome maintenance) during carcinogenesis by DNA hypermethylation of their promoters. Paradoxically, cancer cells exhibit a global genome hypomethylation that leads to genomic instability and re-expression of silenced genes ^{16,17}. Mechanisms underlying this paradox are still not clearly explained. Wild and Flanagan depict current knowledge on genome wide DNA hypomethylation associated with cancer ¹⁸. Briefly, two competing theories of “passive” *versus* “active” demethylation processes could explain this phenomenon. The former implies a disruption of the link between histone modifications and DNA methylation establishment, an aberrant localization of DNMT1 to DNA damage

sites or a metabolic imbalance favoring a decrease in the methyl group donor, S-adenosyl-methionine. Conversely, the latter theory relies on a class of enzymes harboring a demethylase activity. TET protein family (Ten Eleven Translocation proteins) is described to actively demethylate methyl-cytosines by their oxidization and their elimination through different mechanisms in physiological conditions¹⁹. Briefly, the TET enzyme family facilitates passive DNA demethylation by oxidizing methyl-cytosines to 5-hydroxymethylcytosines (5 hmC) leading to a considerable reduction in UHRF1 binding (ubiquitin-like containing PHD and RING finger domains) and in DNMT1 methyltransferase activity at the replication fork^{20,21}. A second mechanism involves the DNA repair pathway. Hydroxymethylcytosines are converted either by further oxidization or by deamination that leads to a nucleotide mismatch, which will be excised and replaced by a cytosine^{22,23}. Last, DNMT3a demonstrates methyltransferase activity in reducing conditions and conversely, dehydroxymethylation in oxidizing conditions that converts 5 hmC in cytosines²³.

Recent works report that induction of TET suppresses breast tumor growth, invasion and metastasis in mouse xenografts^{24,25}. Moreover, TET down-regulation in hepatocellular carcinoma correlates with a decreased level of 5 hmC and is associated with tumor size and poor overall survival²⁶. Taken together, these observations are controversial with a pro-oncogenic effect of TET mediated-DNA demethylation.

AID proteins (apolipoprotein B mRNA editing catalytic polypeptides) mediate deamination of cytosines to uracils. This chemical reaction leads to mutations in mRNAs essential for the generation of the vast repertoire of antibodies in mammals²⁷. AID proteins are also shown to play a role in active DNA demethylation, as down-regulation of AID in hetero-karyons blocks the rapid demethylation normally observed at the OCT4 and NANOG promoters²⁸. This strongly suggests that DNA demethylation mediated by AID is not a global effect but rather AID can target specific loci through unknown mechanisms. Moreover, remarkable works from Métivier and co-workers highlight a demethylase activity for DNMT3a and -3b in association with DNA glycosylase and base excision repair machinery. This demethylase activity is involved in cyclical methylation and transcription of pS2 gene promoter²⁹. Once again, this demethylation activity seems cyclical and does not explain the global and long term demethylation observed in cancer. Hence, in the absence of indisputable identification of the demethylation mechanisms leading to the global hypomethylation associated with cancer, current knowledge may favor slow and passive demethylation during carcinogenesis. Given the global rearrangement of the methylome, it is unlikely that all methylation changes play a causative role in carcinogenesis. Kalari and Pfeifer elegantly introduce the concept of “driver” and “passenger” DNA methylation alterations in cancer. Indeed, DNA hypermethylation of TSG promoters can be easily associated with a carcinogenic effect, and so be referred to as a “driver” alteration. Conversely, a particular chromatin environment predisposing a gene to DNA hypermethylation with no particular effect on cell transformation can reflect a “passenger” event³⁰.

If aberrant DNA hypermethylation has been described in cancers for a long time, such alterations in pre-cancerous lesions are now documented. This constitutes an interesting field

of investigation to fully understand key events of carcinogenesis. It is reported a DNMT1 over-expression in pre-cancerous lesions of the pancreas³¹. Early DNMT over-expression is also observed in several rodent models^{32,33}. Despite a moderate DNMTs over-expression in pre-neoplastic lesions, many studies measure changes in DNA methylation in early steps of various cancers. They constitute indirect proof that DNMT mis-regulation is an early event of carcinogenesis. Sato *et al.* reports that pancreatic cancer precursor lesions display aberrant DNA hypermethylation at early stages and the prevalence increases progressively during neoplastic progression³⁴. Similarly, we describe that the DNA region encoding the microRNA miR-148a is hypermethylated in early pancreatic cancer stages³⁵. DNA hypermethylation of *hMLH1* and *MGMT* is found in another type of pancreatic pre-cancerous lesions³⁶. Alteration in DNA methylation increases from normal gastric mucosa to pre-neoplastic lesions and then cancerous lesions of the stomach³⁷. *GSTP1* promoter hypermethylation is detectable as early as prostatic intraepithelial neoplasia³⁸.

1.4. Altered Expression of DNMTs in Cancers

Despite no evidence of clearly identified actors in DNA demethylation, alteration of global DNA methylation patterns in cancer is often associated with an over-expression of DNMTs as described in various tumors such as pancreas, colon, breast, acute and chronic leukemia^{39,40,41,42}. The mechanism by which DNMT over-expression leads to aberrant DNA methylation patterns remains unclear. Robertson *et al.* demonstrates that the exact degree of over-expression of DNMTs in tumors remains controversial but a low-level over-expression seems to be common⁴³. In addition, the mutation of TET2 in acute myeloid leukemia (AML) is associated with a decrease in 5 hmC content and, by the impairment of the demethylase pathway. This mutation could participate to the DNA hypermethylation observed in cancer⁴⁴. The mechanisms that explain DNMT over-expression are various. Esteller *et al.* observes in different cancer cell lines the duplication of the *DNMT3b* gene. In these cell lines, copy number correlates to increased mRNA and protein levels⁴⁵. Additionally, the same group describes that DNMT3b over-expression occurs by the stabilization of its mRNA in human colorectal carcinoma RKO cells⁴⁶. In addition to an increased amount of DNMTs several mechanisms are proposed to participate to the methylome rearrangement during carcinogenesis. Inappropriate timing in the expression of DNMTs during cell cycle could lead to the establishment of methylation marks.. Moreover, their aberrant localization may target uncommon DNA sequences or lead to abnormal protein-protein interaction⁴³.

Acute myeloid leukemia (AML) is known to be associated with frequent *DNMT3a* mutation. Measurements of mutation frequency of *DNMT3a* gene in AML reveal that 22% of AML patients display mutations predicting translational consequences. These mutations mainly occur at the amino acid R882. Interestingly, gene expression analysis does not show specific expression profiles in cells expressing *DNMT3a* mutants. To our knowledge, the exact functional consequences of such changes are not detailed but associate with a shorter median overall survival (12.3 months vs. 41.1 months)⁴⁷. Moreover, no mutation is found in

DNMT1, *DNMT3b* and *DNMT3L* genes suggesting a relative specificity of *DNMT3a* mutation for AML.

2. DNA Methylation Studies in Biological Samples

The discovery of alterations in DNA methylation in cancer cells is offering scientists an alternative field of investigation to differentiate tumor cells from normal cells. This is complementary to genetic and cytological analyses used to date to improve cancer diagnosis. A large panel of molecular approaches has been developed to study DNA methylation profiles from a variety of biological samples. They differ by the number of DNA regions studied, their sensitivity, reproducibility, resolution, duration, and cost. Here, we describe some of the most appropriate techniques that can be used for cancer diagnosis. We also describe the next generation technologies that will allow for the identification of new methylated DNA markers to further improve cancer diagnosis.

2.1 Most Common Approaches for DNA Methylation Studies

Almost forty years have passed since scientists are able to quantify 5-methylcytosine content in genomic DNA by HPLC (high-performance liquid chromatography)⁴⁸, HPCE (high-performance capillary electrophoresis)⁴⁹ or nearest-neighbor analysis⁵⁰. Although these approaches provide accurate percentages of methylated cytosines, they suffer in the lack of information on the location of methylated cytosines on the genome. Whereas global DNA hypomethylation is proposed as an useful biomarker for liver cancer diagnosis⁵¹, it seems difficult to implement these techniques for cancer diagnosis in clinical usage. The exact positioning of methylated cytosines became possible with the use of methylation-sensitivity restriction enzymes (MSRE) combined to polymerase chain reaction (PCR). This method requires an extremely small amount of starting DNA material; however, the resolution of methylation patterns is limited to the number of restriction sites in a given DNA region. Genome-wide implemented methods are proposed such as Restriction Landmark Genome Scanning (RLGS)⁵², amplification of inter-methylated sites (AIMS)⁵³ or methylation arbitrarily primed PCR (Ms-AC-PCR)⁵⁴ but hardly applicable for cancer diagnosis in clinical routine.

Sodium bisulfite treatment of genomic DNA revolutionized DNA methylation studies⁵⁵. It consists in a chemical reaction that modifies unmethylated cytosines into uraciles and does not affect methylated cytosines. DNA methylation patterns of specific DNA regions or the entire genome is obtained from bisulfited DNA using PCR-based or micro-array approaches. Modified DNA is amplified by PCR using dedicated PCR primers that confer sequence specificity and a high sensitivity. DNA bisulfite conversion has been used for the development of a large panel of different molecular approaches. As one of them, bisulfite mapping allows the determination of DNA methylation pattern for specific DNA regions spanning approximately 100 bp to 1 kb. Several sequencings for a given PCR product are required to obtain precise and quantitative description of DNA methylation patterns. This

classical technique is inexpensive, reproducible with high resolution. Even though this approach is poorly sensitive and time consuming, it is frequently used to finely map the precise methylation level of nucleotides. Methylation specific-PCR (MS-PCR) is a method that derives from the latter one in which two sets of PCR primers are specifically designed to amplify methylated and unmethylated DNA regions of interest ⁵⁶. The detection of PCR products is originally performed by gel electrophoresis. This technique is now replaced by Quantitative MS-PCR (qMS-PCR) in which PCR amplification is monitored in real time by the incorporation of fluorescent molecules. This improvement allows for precise quantification of DNA methylation levels of numerous specific regions and avoids the long electrophoresis step. Quantitative multiplex MS-PCR (QM-MS-PCR) and one step MS-PCR (OS-MS-PCR) ⁵⁷ are also available to co-amplify specific genes in tissues from different origins or to determine DNA methylation levels of a specific region without the DNA extraction procedure. Since they only provide the methylation status of few CpG sites (contained in PCR primers), qMS-PCR requires perfect knowledge of the most discriminative methylated regions present in cancer cells to design powerful primers diagnosis. As these approaches provide quantitative measurements of DNA methylation, it is necessary to define a cut-off DNA methylation value before declaring that a sample is positive ⁵⁶. Nevertheless, qMS-PCR techniques are simple, rapid, inexpensive, highly-sensitive and easily standardized. They are currently one of the most commonly used techniques for cancer diagnosis in clinical use. Methylation-sensitive high-resolution melting (MS-HRM) is based on the fact that nucleotide sequence of PCR products of bisulfite-treated DNA will differ depending on the methylation status of the DNA region of interest. The methylation level is determined by comparing the melting dissociation curves to standard PCR products of the same region containing known methylated CpG sites. Despite its high sensitivity, this method requires the acquisition of specific PCR apparatus and skilled operators. COBRA for Combined bisulfite restriction analysis uses the ability of bisulfite conversion to create new restriction enzyme sites or to maintain consensus sites of MSRE. After amplification, PCR products are digested with appropriate MSRE. The proportion of digested PCR products is compared to undigested PCR products by poly-acrylamide gel electrophoresis and image quantification software. This technique is reliably applied to DNA obtained from FFPE tissue sample ⁵⁸. Moreover, this approach allows for the assessment of DNA methylation of a large number of biological samples. This technique is, however, limited by the presence of restriction sites in the sequence of interest after bisulfite treatment. More recently, high throughput approaches have been developed. For instance, Methyl Light is a high throughput quantitative methylation assay that uses fluorescent-based real time PCR (TaqMan[®]) in combination to bisulfite treatment ⁵⁹. Also combined to bisulfite treatment pyro-sequencing is a quantitative DNA sequencing method in which light is emitted as a result of an enzymatic reaction representing each time a nucleotide is incorporated into the growing DNA chain ⁶⁰. The approaches are limited by a short length of studied DNA and require exclusive apparatus. However, both these quantitative techniques detect low amounts of methylated DNA in heterogeneous DNA

preparation. Easily standardized, rapid and inexpensive, these techniques are increasingly used for clinical purpose.

Beside the different approaches used for cancer diagnosis, several genome-wide technologies have recently been developed. Less applicable for clinical practice, these next-generation technologies are perfectly adapted for the discovery of new DNA methylation biomarkers. Classical chromatin immuno-precipitation followed by array hybridization (ChIP on chip) identified numerous aberrantly methylated genes in cancers. Basically, methylated DNA is purified using MBD protein domains or antibodies directed against 5-methylcytosine (methyl-DIP) and subsequently hybridized on genomic microarray⁶¹. Although these approaches allow for large scanning of the genome, they do not provide direct proof of DNA methylation. Validation analysis is often recommended to prove actual difference in methylation levels. More recently, next generation sequencing (NGS) technologies significantly increased the resolution level of DNA methylation profiles. For instance, ultra-deep sequencing using 454 sequencing apparatus (Roche) provides the methylation of 25 genes in more than 40 samples in a reduced amount of time⁶². NGS can also be adapted to immuno-precipitated DNA fragment (Methyl DNA Immuno-precipitation sequencing also called MeDIP seq). Ultimately NGS permits the sequencing of the entire genome after bisulfite conversion. Although this new approach requires bio-informatic expertise, whole genome bisulfite sequencing (WGBS) recently revealed new differentially DNA methylated regions in chronic lymphocytic leukemia cells⁶³. Beside these NGS approaches, high throughput single nucleotide polymorphism (SNP) genotyping systems are suitable for DNA methylation analysis from bisulfite-converted genomic DNA⁶⁴. For instance, the methylation analysis of 1500 CpG from 371 genes in 96 samples (Golden Gate® BeadArray-Illumina) allowed identifying a panel of adenocarcinoma-specific methylation markers. This technology was implemented and now allows for methylation analysis of approximately 450 000 CG sites spread along 99% of human genes (Infinium Human Methylation 450-Illumina). Using this approach, Fuks' group highlights the existence of previously unrecognized breast cancer groups therefore improving diagnosis of this cancer⁶⁵.

2.2. Variety of Biological Samples for DNA Methylation Studies

Due its capacity to resist extreme conditions, DNA can be obtained from a large panel of tissue samples or biological fluids. Moreover, high sensitive techniques (see above) can detect aberrantly methylated DNA from small amount of DNA or diluted into DNA from normal cells. Biological samples differ by their accessibility, enrichment in tumor cells and organ specificity. After surgery, solid tumor (primary tumors or metastasis) samples constitute the samples of choice for DNA methylation studies. They are enriched in tumor cells and provide significant amount of DNA. Archived samples with corresponding clinical annotations such formalin-fixed paraffin embedded (FFPE) tumor sections are also used to detect methylated DNA; though these samples are restricted to patients who are subject to surgery. DNA from solid tumors is obtained after biopsies or biopsy washing⁶⁶. They provide precious DNA

samples from patients who are not necessarily eligible for surgical resection. Cytological analyses are usually performed in parallel. Blood samples (plasma and serum) are commonly used in clinical research as potential sources of minimally invasive specimen acquisition for DNA methylation studies. They display a high uniformity of specimen collection and preparation in comparison to any other clinical samples. However, aberrant DNA methylation may originate in any organs. It is currently difficult to envisage how a blood positive screening assay would point the clinician toward the site of malignancy. While plasma and serum samples are used to target cell-free circulating DNA from solid tumors, white blood cells are particularly appropriate for leukemia. DNA for detection of methylation abnormalities can also be extracted from other sources of biological fluids. Indeed, DNA from detached tumor cells, and free floating DNA from dead tumor cells can be retrieved in small proportion in biological fluids. Numbers of those contain aberrantly methylated DNA from diverse tumor origin ⁶⁷. For instance, saliva rinses contain cells from oral mucosa is employed for methylation studies to assist in early oral tumor diagnosis ⁶⁸. Urine contains cancer cells from bladder, kidney and prostate origin. Sputum and bronchial washings are often used to improve the diagnosis of lung cancer ⁶⁹. Pancreatic juice obtained by ultrasound echo-endoscopy have shown their potential use of methylated DNA markers for the diagnosis of pancreatic cancer *versus* chronic pancreatitis ^{70,71}.

3. Altered DNA Methylation, Marks for Cancer Diagnosis

Challenges in the field of biomarkers for cancer diagnosis follow a process of validation in which two unconditional criteria are evaluated to establish the potential usefulness of a biomarker: sensitivity and specificity ⁷². Sensitivity is defined as the proportion of confirmed disease subjects who show positive detection of the marker whereas specificity refers to the proportion of patients, negative for the disease and tested negative for the biomarker. The ideal biomarker would display 100% of sensitivity and 100% of specificity. This would mean that no cancer patient would be negative for the test, and that no cancer free patient would be positive for this biomarker. As this biomarker does not exist yet, researchers face three choices:

- To improve existing tests using an existing biomarker
- To discover new biomarkers with high sensitivity and specificity
- To associate several biomarkers to compensate poor performance

Over the last two decades the potential use of DNA methylation marks as biomarkers for cancer diagnosis has been assessed. Although a lot remains to be done in their validation and their assessment of specificity and sensitivity, many alterations have arisen as potential markers. This section gives a rapid overview of the most common alterations in DNA methylation in cancer and their potential as diagnostic biomarkers. Our aim is not to give an exhaustive list of epigenetically altered genes but rather illustrate the comprehensive impact of such alterations on different functional groups of genes.

3.1. Cyclin Dependent Kinase Inhibitor, *P16 ink4a*

P16ink4a is a multiple tumor suppressor involved in cell cycle regulation. It inhibits the formation of an E2F–DB active transcriptional complex and promotes the formation of Rb–E2F repressive transcriptional complex. This results in the prevention E2F-dependent transcription and blocks cell cycle progression past the G₁/S restriction point⁷³. *P16ink4a* is found hypermethylated in numerous types of tumors including 27% of colorectal cancer with a sensitivity of 70% and a specificity of 100% from patient serum, in liver cancer with a sensitivity of 73% and in 24% of lung cancer^{73,74,75,76}.

3.2. O6-methylguanine-DNA-methyltransferase, *MGMT*

MGMT protein contributes to genome repair DNA by damage reversal. DNA repair occurs as a one-step reaction that leads to the transfer methyl or chloro-ethyl group to the active centre of the MGMT molecule. This results in restoration of guanine in the DNA and irreversible inactivation of MGMT. Therefore, MGMT is often referred to as a “suicide enzyme”⁷⁷. This protein plays a dual role in cancer: loss of expression enhances DNA damage while increased expression enhances the risk of cancer. Many cancers display high expression levels of MGMT responsible of chemo-resistance. Brain tumors are the most documented with an epigenetic repression of approximately 40% of patients⁷⁸. A similar observation is reported in 46% of colorectal tumor samples⁷⁹. Besides its potential as a diagnostic, it is shown that methylation of the *MGMT* promoter is associated with responsiveness to carmustine; and with an increase in overall survival and progression of disease⁷⁸.

3.3. Glutathione S-transferase Pi 1, *GSTP1*

GSTP1 participates to cell detoxification. GSTP1 eliminates exogenous compounds by the conjugation of glutathione⁸⁰. Numerous studies report altered expression of GSTP1 in cancers, and it is implicated in resistance to chemotherapy^{81,82,83}. Loss of GSTP1 expression by promoter hypermethylation is a major event in prostate cancer in which *GSTP1* is found hypermethylated in 73% of cases with a sensitivity of 73%, a specificity of 100%, positive predictive value (PPV) of 100% and a negative predictive value (NPV) of 78%⁸⁴. *GSTP1* hypermethylation is also reported in breast carcinogenesis and large B cell lymphoma^{85,86,81}.

3.4. MutL Homolog 1, *MLH1*

The *MLH1* gene encodes a protein involved in the DNA mismatch repair machinery. Insertion or deletion events and base mismatches result from DNA polymerase replication errors, recognized and corrected by the DNA mismatch repair pathway (MMR). This pathway consists of 3 major heterodimeric complexes, MutL homologue (MutL) α , MutS homologue (MutS) α , and MutS β . MLH1 is part of the MutL α complex and is responsible for the recruitment of the excision and repair machinery to the site of a non-complementary base

marked by either MutS α or MutS β ^{87,88}. The genomic region encoding *MLH1* is frequently hypermethylated in colon cancer with an high association with microsatellite instability (86% of cases)⁸⁹. The aberrant DNA methylation of this region is also found at lower frequency in endometrial cancer (37.5% of primary tumors and 5.6% of metastatic lesions investigated) and in ovarian cancer (8% of patients)^{90,91,92}.

3.5. Breast Cancer Type 1 Susceptibility Protein, *BRCA1*

BRCA1 is involved in DNA double-strand break repair by sensing and signaling DNA breaks. Through its interaction with numerous co-factors *BRAC1* participates, to double-strand break repair⁹³. *BRCA1* rapidly localizes at breakage sites marked with histone H2A-X and interacts with enzymes that alter chromatin and DNA structure making surrounding DNA more accessible to repair machinery. The silencing of the *BRCA1* gene by promoter DNA hypermethylation occurs in breast cancer (13%), but depending on cancer subtypes, *BRCA1* promoter hypermethylation is present in 55% of sporadic mucinous breast carcinomas and in 67% of medullary breast carcinomas^{92,94,95}. In ovarian cancer, *BRCA1* promoter is hypermethylated in 31% of sporadic ovarian carcinomas with loss of heterozygosity at *BRCA1* locus⁹⁴.

3.6. Septin 9, *SEPT9*

Septins are GTP binding proteins involved in numerous cellular functions such as cytokinesis, vesicle trafficking, as well as in microtubule and actin dynamics. Despite the exact role of septins is still matter of intensive work, their relationship with cancer is well established. *SEPT9* hypermethylation is found in colorectal and head and neck cancer patients^{96,97}. Moreover, carcinogenesis is associated with a change in *SEPT9* isoform expression which can be explained by the methylation of an alternative promoter in breast cancer⁹⁸. This illustrates the caution required when studying DNA methylation patterns, which can differ from a region of gene to another. Finally, a plasma-based *SEPT9* methylation-screening test displays a sensitivity of 72% and a 90% specificity in the detection of colorectal cancer patients⁹⁹.

3.7. MicroRNA Encoding Genes

MicroRNAs are small non-coding RNA that target messenger RNA (mRNA) and inhibit their translation into proteins. Since a single microRNA can target numerous mRNAs, alterations in their expression during carcinogenesis is a major event, as they can affect a broad range of cellular functions. Lu *et al.* demonstrates that the expression profile of microRNAs can classify human cancer. Interestingly, this study reports that most of microRNAs have low expression levels in tumors compared to normal tissues¹⁰⁰. High-throughput analyses of global microRNAs expression profiles are promising tools for cancer diagnosis as they quantify several hundreds of potential markers^{100,101}. Moreover, considering

the impact of microRNAs on cell regulation, the mechanisms responsible of their down-regulation are crucial in comprehending carcinogenesis. In addition to a global impairment of the maturation machinery of microRNAs, DNA methylation participates to the silencing of such molecules¹⁰². Saito *et al.* was the first to detail the relationship between miR-127 repression and DNA hypermethylation¹⁰³. Other groups describe this silencing by DNA of miR-9-1, miR-124a3, miR-148a, miR-152, and miR-663 in 34–86 % of cases of a breast cancer collection¹⁰⁴. Similarly, Wong *et al.* shows that miR-34a promoter is hypermethylated in 18% of multiple myeloma¹⁰⁵. We also show that miR-148a genomic sequence is hypermethylated in pancreatic cancer cells^{35,106}. This illustrates that similarly to protein encoding regions the silencing of non-coding RNA can be an indicator of cancer development, therefore unveiling miRNAs as remarkable source as diagnostic markers.

3.8. Hypomethylated Genes in Cancer

DNA demethylation associated with cancer occurs principally in long repetitive elements, and peri-centromeric regions¹⁸. For a long time, marker discovery process was dependent of the observation of a change in protein expression and the research of the mechanism involved. As DNA hypomethylated regions in cancer do not always correspond to protein encoding regions, their interest has been underestimated. S100 calcium-binding protein P (S100p) over-expression in pancreatic and prostate cancers occur by DNA hypomethylation^{107,108}. S100p stimulates cell proliferation and survival. Its hypomethylation is found in 100% of a small cohort of pancreatic cancer tissues¹⁰⁷. A lower frequency is found in prostate cancer, in which S100p is retrieved hypomethylated in 50% of samples¹⁰⁸. Long Interspaced Nucleotide Elements (LINE-1) is an ancestral repetitive element containing a high concentration of CpG islands, for which the methylation level is reported as a good indicator of the global methylation level in the genome. In their study, Ogino *et al.* reports that LINE-1 hypomethylation is associated with shorter survival among colon cancer patients¹⁰⁹.

3.9. Imprinted Genes

In contrast to bi-allelic expressed genes, imprinted genes show a parental-specific mono-allelic expression, as one other allele is repressed by DNA methylation. One interesting feature of gene imprinting is that repression is not gene-specific, but depends on the imprint on the surrounding genomic region. Up to date, ~130 imprinted genes are described, many control crucial functions during embryonic development¹¹⁰. As carcinogenesis globally impacts the DNA methylome, one could hypothesize a probable deregulation in genomic imprinting. It is reported that “loss of imprinting” of Insulin-like Growth Factor II (IGF2) and the *H19* large intergenic non-coding RNA coding regions is retrieved in 100% of chronic myeloid leukemia (CML), 80% of ovarian tumors, 70% of Wilms’ tumors, 66% of colorectal cancer, 56% of Barrett’s esophagus, 50% of renal-cell carcinomas, 50% of esophageal cancer, 47–85% of lung adenocarcinoma and 30% of meningioma¹¹¹. In accordance with other

hypomethylated genes in cancer, loss of imprinting impacts numerous types of cancer and represents a potential mark for further investigation.

4. DNA Methylation as Biomarkers

Since sensitivity and resolution in the approaches to study DNA methylation are greatly improved, profusion of methylation marks in most types of cancer is described in the literature^{112,113}. Frequently documented DNA methylation marks are often not specific of one cancer but mostly conserved among tumor types. Thus, it seems challenging to propose a single DNA methylation alteration as a biomarker for a certain type of cancer. A combination of methylation marks is more likely to discriminate various types of cancers and to compensate the lack of specificity of each mark taken independently. Meanwhile, the combination of different biomarkers leads to a better specificity but also to lower sensitivity.

4.1. In Cancer Diagnosis

As diagnostic tools exist for the vast majority of cancers, DNA methylation-based biomarkers have to overcome current limitations and meet a clear medical need for their approval (Figure 1). They should exhibit a greater sensitivity and specificity than existing diagnostic procedure or a better accessibility through minimal invasive approaches. Thus, the actual interest of DNA methylation marker is discrete concerning cancer for which reliable diagnostic markers already exist. However, DNA methylation markers are of great interest in cases where differential diagnosis is difficult using conventional diagnostic procedure. They can be used alone or in combination with other diagnostic methods. An illustration for the use of DNA methylation marker as a tool to differentiate cancer diagnosis, McCluskey *et al.* shows that the difference in *p16* gene hypermethylation distinguishes benign and malignant ovarian tumors and that distal promoter is methylated in 33% of low-malignant potential tumors compared to 5% of carcinomas¹¹⁴. Similarly, our group demonstrates that the level of methylation in the gene encoding the miR-148a is a potential diagnostic tool for the differential diagnosis between pancreatic cancer and chronic pancreatitis⁶⁶.

4.2. In Early Detection of Cancer and Screening of High Risk Population

The early detection of cancer in the absence of specific symptoms or screening large population cohorts represent a confounding issue in the field of cancer diagnosis (Figure 1). Both encounter the same issues regarding specificity and sensitivity as cancer diagnostic tools, but presents more prerequisites. Besides alterations have to occur early during carcinogenesis, a vast proportion of patients will obviously be negative for the screening, so the test performed will have to respect a high cost/effectiveness ratio, and will rely on non-invasively obtained tissues. In population screening procedure biomarkers with a high sensitivity will be privileged to discard the false positive patients. Several works have demonstrated the feasibility of cancer detection by DNA methylation detection using minimum invasive procedure. Fujiwara *et al.* determines that the DNA methylation profile of 5 genes, suitable for early detection of lung cancer patients. The study shows that when DNA hypermethylation of at least one gene is considered as positive, specificity and predictive values of methylation are 85% and 75%, respectively ¹¹⁵. Likewise, Müller *et al.* reports that SFRP2 is hypermethylated in fecal DNA of patients with colorectal cancer with a sensitivity of 77% and a specificity of 77% ¹¹⁶. Both studies demonstrate the feasibility of cancer diagnosis from easy-to-access samples with comfortable specificity and sensitivity, at least from a technological point of view.

4.3. As an Advanced Diagnostic Tool

At the frontier of cancer diagnosis, tumor profiling gives determinant information about the aggressiveness, chemo-sensitivity and invasion capacity (Figure 1). Similarly to cancer diagnosis, tumor sub-classification requires additional biomarkers (cytological, molecular) to determine the precise cellular origin and the mutational status of the tumor. DNA methylation patterns can serve as powerful tool for better resolutive classification of tumors. For instance, the use of high resolution DNA methylation based biomarkers (67,487 probes) in 49 acute lymphoblastic leukemia (ALL) patients can separate the different ALL subtypes and influence clinical outcome ¹¹⁷. Acute myeloid leukemia (AML) is referred as a heterogeneous disease displaying variability in the degree of commitment and differentiation of the cell lineage representing a critical issue toward the development of accurate clinical classification, risk stratification, and targeted therapy of this disease. Figueroa *et al.* classifies 344 patients into 16 groups based on the epigenetic profiles of 15 genes. Among these groups, five display an original methylation signature with distinct clinical outcomes ¹¹⁸.

Similarly to AML, gliomas are a heterogeneous group of intracranial neoplasia of glial origin that can be divided into different subtypes based on their cellular origin, and, into different grades according to cell density, nuclear appearances, pleomorphism, mitotic activity, vascular proliferation and regional necrosis. Genome wide-DNA methylation studies have permitted the identification of CpG island methylator phenotype (CIMP) ¹¹⁹. Uhlmann *et al.* established tissue as well as grade specific methylation profiles by the determination of the methylation level of 15 genes ¹²⁰. Another example is the identification by genome wide DNA

methylation approaches of two different CIMP groups (high and low) in colorectal patients¹²¹.

Beside tumor classification and identification, an interesting feature of DNA methylation profiles is the capacity to predict tumor response to treatments and to improve patient prognosis. Predictive epigenetic biomarkers will allow a personalized management of the patient based on their individual methylation profile. For instance, DNA hypermethylation of MGMT promoter in 40% of glioma patients is directly associated with the tumor resistance to conventional chemotherapy based on alkylating agents. Moreover, accumulation of normal cells in the tumor biases the assessment of MGMT expression in the tumor. MGMT methylation status seems to be a better indicator of its transcriptional activity. More importantly, it correlates with tumor regression and prolonged overall and disease-free survival⁷⁸.

Complexity and abundance of methylation marks revealed by genome-wide analysis open a new avenue of research towards the identification of novel biomarkers for cancer diagnosis. One could expect that the use of these approaches will lead to a “one-step diagnostic tool” informative on tumor presence, origin, sub-classification, grade, invasiveness, metastatic potential, chemo-sensitivity and relapse risk.

5. Principal Requirements to Develop Diagnostic Biomarkers

Despite the plethora of studies on potential methylated DNA markers for cancer diagnosis, the majority fails to meet clinical requirements. Many studies suffer defects in their design or their restricted size in patient sets; while most studies are abandoned in early validation steps. Here, we briefly describe some principal prerequisites for the elaboration of a reliable cancer diagnostic biomarker for clinical use.

5.1. Preclinical Requirements

The choice of tissue origin is determinant for further clinical use as early diagnosis or diagnostic biomarkers. The accessibility to biological samples is then a determinant criterion. Most studies that identify epigenetic biomarkers are conducted on resected primary tumors. These samples will not necessarily be suitable for early diagnosis in clinical routine since most tumor diagnoses are established from biopsies. Furthermore, epigenetic marks determined in the resected tissue will not always be present in easy-to-access body fluids. The less invasive the test is, the more suitable for clinical purpose it is. Then, researchers should favor biomarker identification studies from relatively easy-to-access biological samples to permit an easier translation towards clinical use.

The very first step of biomarker discovery is often a comparison between cancer and normal tissues. A vast majority of studies present results obtained from a limited number of control tissues that may not be representative of the actual DNA methylation status in the healthy population. The concept of healthy population raises another problem: the nature of the control tissue itself. As DNA methylation patterns vary depending on age, gender, or

different non-cancerous pathologies, one should be attentive to the proper definition of the control population chosen to be compared to the cancer population. Cancer free samples should be sex - and age- matched and all the essential epidemiological information should be available for the investigated cancer type to allow for proper adjustments. Researchers should ensure that DNA methylation pattern of a specific gene is different from a control free cancer population or related associated pathology. For solid tumors, a frequently used procedure to identify distinctive epigenetic marks is to compare resected tumor samples to adjacent “healthy” tissue. Unfortunately, patients that undergo surgery may harbor other alterations in resection margins due to inflammation, "driver" or "passenger" molecular alterations preceding cytological changes. The lack of control samples from healthy donors is a major limitation in biomarkers identification. In this context, studies conducted from serum or samples obtained from minimally invasive procedure should abrogate this problem as they give an easier access to samples from healthy donors.

5.2. Validation

The main barrier in biomarker validation is certainly the reproducibility of the results. This validation must follow basic rules¹²². Among all the different biases encountered during biomarker validation, over-fitting is one of the most substantial. Over-fitting occurs when a large number of variables is used to discriminate a small number of patients. Classically, a distinctive pattern might be independent of cancer itself, but representative of training set heterogeneity. This situation harmonizes with the use of high throughput technologies as microarrays or NGS. Then, intra-laboratory use of a large validation set, independent from the training set, is critical for the validation of the lead.

Many phase I pre-clinical studies (discovery, or proof-of-concept phase) propose that their lead can represent a new biomarker of interest for the diagnosis of a particular cancer. However, most of them do not compare their newly-identified biomarker to pre-existing diagnostic methods. The Food and Drug Administration (FDA) and other regulatory administrations request a lead to rejoin an unmet medical need, as a *sine qua non condition* order to be not redundant with an existing standardized method. Assessment of this criterion inevitably goes through the comparison of the lead with the gold standard method clinically used where lead has the obligation to bring an improvement such as performance (sensitivity/specificity), cost/effectiveness ratio, invasiveness. Once the interest of the lead is established, results have to succeed an inter-laboratory result validation using a different cohort. Lack in this validation procedure or insufficient performance can explain why most newly-identified epigenetic biomarkers do not cross the clinical barrier.

5.3. Clinical Requirements

The next step of clinical implementation for a new biomarker is the extension of the validation process described above to a larger cohort to further assess inter-individual variability in DNA methylation levels. This critical stage requires a standardization of DNA

methylation assessment as that extension may be multicentre. As discussed in the "Detection of Aberrantly Methylated DNA in Biological Samples" section, reproducibility of epigenetic biomarker detection should standardize specimen sampling, reception, storage and preparation. For example, as DNA methylation pattern is often heterogeneous among a same gene promoter, variations in technological approaches or location of analyzed promoter regions may generate different results. To date, several ready-to-use kits are available to analyze DNA methylation status of specific genes for cancer diagnosis in clinical use ¹²³. Such standardization in the processing of samples would be the cobblestone of results reproducibility among laboratories.

Last, concerning early detection biomarkers, an adequate follow-up for the cancer free samples used as the control population is necessary to ensure the absence of tumor development in the years following biomarker assessment. This consideration strengthens the robustness of the biomarker in detecting developing tumors at early step through the exclusion of false negative control patients.

6. Current Drugs/DNA Methylation Inhibitors and Clinical Trials

DNA Methylation Inhibitors

DNA methylation machinery is an attractive therapeutic target to reactivate aberrantly methylated TSG. DNA methylation inhibitors are classified as nucleosidic and non-nucleosidic inhibitors. Although many of them mediate inhibitory effects of DNA methylation in preclinical studies, only few of them are clinically used. We describe here the classical DNA methylation inhibitors as well as promising compounds that are, for some of them, currently tested in clinical trials.

6.1. Nucleosidic DNA Methylation Inhibitors

There exist three families of first generation nucleosidic inhibitors. They all require their incorporation in replicating DNA to be active *via* a covalent interaction with DNMTs. One of the main goals is to ideally target replicating tumor cells avoiding normal cells. By interfering with the copying of aberrant DNA methylation patterns, nucleosidic inhibitors aimed at erasing aberrant DNA hypermethylation.

6.1.1. Azacytidine

Azacytidine or 5-azacytidine (Vidaza®, Celgene) is a cytidine analog in which the carbon atom 5 is replaced by a nitrogen atom. After cell entry, azacytidine is converted into a triphosphorylated active form and then incorporated into DNA and RNA¹²⁴. This analog is recognized by the DNMTs as normal cytosine, unfortunately it creates an irreversible covalent link with the enzyme leading to a cellular DNMT depletion^{125,126}. Approved by the FDA, azacytidine is currently used for the treatment of AML and myelodysplastic syndrome (MDS)¹²⁷. This compound is unstable in aqueous solution and displays significant cytotoxic effects *in vitro* and *in vivo*^{128,125}. Clinical trials to test azacytidine effects on patients with relapsed or refractory myeloid malignancies (MM) are currently ongoing (ClinicalTrials.gov Identifier NCT00412919). Recent studies in xenografted mouse model demonstrates that low doses of azacytidine (and also decitabine, see below) have antitumor effects on solid tumors (breast, colon, lung)¹²⁹. Effects of low doses of azacytidine in combination with entinostat (HDAC inhibitor) have proven efficacy in patients with refractory advanced non-small cell lung cancer in a phase I/II study¹³⁰. A randomized phase II clinical trial for adjuvant combined epigenetic therapy with azacytidine and Entinostat (orally bioavailable histone deacetylase) in resected stage I non-small cell lung cancer (NCT01207726) is currently on-going. Similarly, a phase I/II clinical study of azacytidine, docetaxel and prednisone treatment of patients with metastatic prostate cancer previously treated with docetaxel is also being performed (NCT00503984). A prospective phase II study shows the safety and the efficacy of 5-days azacytidine treatment in patients with low-risk MDS¹³¹. Another phase II study demonstrates the feasibility of azacytidine treatment in AML elderly or frail patients¹³². A

recently published Phase III study reports azacytidine benefit on overall survival of patients with higher-risk MDS (NCT00071799) ¹³³.

6.1.2 Decitabine

Decitabine (Dacogen®, MGI Pharma) or 5-aza-2'-deoxycytidine is a desoxyribose analog of cytosine. Conversely to azacytidine that is incorporated in DNA and RNA, decitabine is only incorporated in DNA. This analog is also tri-phosphorylated to be active. It leads to DNMT depletion and genome hypomethylation. Toxic at high dose, decitabine is well tolerated at lower doses ¹³⁴. Recently, a study shows lower toxicity of a derivative of decitabine, the 2'-deoxy-5,6-dihydro-5-azacytidine at doses that induce similar DNA hypomethylation and gene reactivation ¹³⁵. Like azacytidine, decitabine is currently used for the treatment of AML and MDS ¹²⁸. Several clinical trials are now testing the effects of decitabine in combination with other drugs on solid tumors. Effects of decitabine and Peg-interferon are evaluating on patients with melanoma (NCT00791271). Decitabine in combination with temozolomide and panobinostat is being tested for the treatment of resistant metastatic melanoma (NCT00925132). A phase I/II trial is aiming at measuring the effects of tamoxifen following epigenetic regeneration of estrogen receptor using decitabine and LBH 589 in patients with triple negative metastatic breast cancer (NCT01194908). Other analogs like 5-fluoro-2'-deoxycytidine have been synthesized. It is evaluated in combination with tetrahydrouridine for head and neck neoplasm, lung neoplasm, urinary bladder and breast neoplasms (NCT00978250). Second generation analogs are also emerging. For instance, SGI-110 (Astex Pharmaceuticals), a dinucléotide “decitabine-p-deoxyguanosine” acts as a pro-drug of decitabine. It is described as an effective DNA methylation inhibitor *in vivo* retarding tumor growth ¹³⁶. It is now tested for the treatment of AML and MDS (NCT01261312).

6.1.3 Zebularine

Zebularine or 1-(β-D-ribofuranosyl)-1,2 dihydropyrimidin-2-one (Tocris Bioscience) is a nucleoside analog of cytidine. It is a transition state analog inhibitor of cytidine deaminase (CDA) by binding to its active site ¹³⁷. Besides CDA inhibitory effects, zebularine is demonstrated as a DNMT inhibitor that displays antitumor activity and little toxicity ¹³⁸. Zebularine is mostly studied for its therapeutic activity on AML ¹³⁹. Preclinical studies on Apc(min+) mouse model show that long-term oral administration of zebularine causes a gender-specific abrogation of intestinal tumors while causing a tissue-specific DNA demethylation ¹⁴⁰. A more recent study demonstrates that in Kasumi-1 AML cells *in vitro* model zebularine treatment leads to different gene profiles and no hypomethylation capacity when compared to decitabine and azacytidine ¹⁴¹. This study demonstrates that whereas they are known as DNA methylation inhibitors, the effects of these drugs are mediated by different mechanisms that probably overlap. Despite its promising tumor effect, to our knowledge, no there are no clinical trials using zebularine.

These three classes of first generation nucleoside show excellent results for the treatment of AML and MDS. However, it seems important to keep in mind that these inhibitors can also lead to the demethylation and re-expression of pro-metastatic genes ¹⁴². A need of more specific DNMT inhibitors and proper utilization of these drugs is required. Several second generation compounds were developed (ex: NPEOC-DAC , CP-4200, RX-3117, thio-cytidine derivatives, etc.). Up to now, despite promising preclinical results, no clinical trials have been initiated ¹⁴³.

6.2. Non-nucleoside DNA Methylation Inhibitors

Unlike nucleosidic inhibitors, the mechanism of action of non nucleosidic DNA methylation inhibitors does not imply their incorporation into DNA molecules. For some of them the actual mechanism that leads to DNA demethylation is unclear.

6.2.1 Hydralazine

Hydralazine belongs to hydrazinophthalazine class of drug. It functions as a smooth muscle relaxant. In 1988, Cornacchia *et al.* reports that hydralazine, a drug associated with a lupus-like autoimmune disease, inhibits DNA methylation and induces self-reactivity in cloned T cell lines ¹⁴⁴. A later study reveals that treatment with hydralazine reactivates methylated TSG such as p16ink4a in several cell lines ¹⁴⁵. A phase I study shows that hydralazine treatment of four patients with cervical cancer restores the expression of methylated TSG without affecting global DNA methylation ¹⁴⁶. However, the exact mechanism of DNA demethylating effects of hydralazine is still not understood. A comparative study of non nucleoside DNA methylation inhibitors even report an absence of effects on global and TSG demethylation ¹⁴⁷. Often used for the treatment of hypertension, the anti-tumor activity of hydralazine in combination with valproate acid is being tested in several clinical trials. For instance, a phase II trial is testing the effects of hydralazine and magnesium valproate treatment of patients with refractory solid tumors (NCT00404508). In other reported cases, the effects of hydralazine/valproate acid are evaluated in addition to conventional chemotherapies (NCT00404326).

6.2.2 Procainamide derivatives

Procaine is a well known local anesthetic that belongs to the amino ester group. Procainamide, a derivative of procaine, is commonly used for both supraventricular and ventricular arrhythmias ¹⁴⁸. These two drugs are demonstrated to interact to CpG rich DNA regions and leads to DNA demethylation of TSG such as RAR beta 2 gene ¹⁴⁹. Procainamide is also a specific inhibitor of DNMT1 ¹⁵⁰. It displays *in vitro* growth-inhibitory effects on MCF-7 cells. However, these results are contrary to another study demonstrating that procaine and its derivatives does not induce global DNA demethylation in several cell lines ¹⁵¹. Recently, six conjugates of procainamide were synthesized and showed potent inhibitory

effects of DNMT3A/3L complex and DNMT1¹⁵². Another procainamide derivative, IM25 was identified from a large screening effort. It exhibits high potency in GSTp1 DNA demethylation in MCF-7 breast cancer cell model¹⁵³. Despite these promising results, the compounds are not yet tested for their anti-tumor effects in clinical trials.

6.2.3 Flavonoids

Flavonoids form a wide family of plant secondary metabolites. They are the most important plant pigments for flower coloration. The most studied flavonoids in cancer are the (-) epigallocatechin-3-O-gallate (EGCG) and the genistein: components of green tea and soybean, respectively. A first study reveals their DNA methylation inhibitory effects on TSGs in esophageal squamous carcinoma cells¹⁵⁴. Although EGCG is described as a direct inhibitor of DNMTs, the exact mechanism of action and DNA methylation inhibitory effects are still subject to controversy^{155, 147,151,156}. Nevertheless, several clinical trials are currently testing flavonoids as potential anti-tumor therapy. For instance, a phase II study is evaluating the benefit of a genistein treatment in patients with prostate cancer a few months prior to radical prostatectomy (NCT01126879).

6.2.4 Other inhibitors

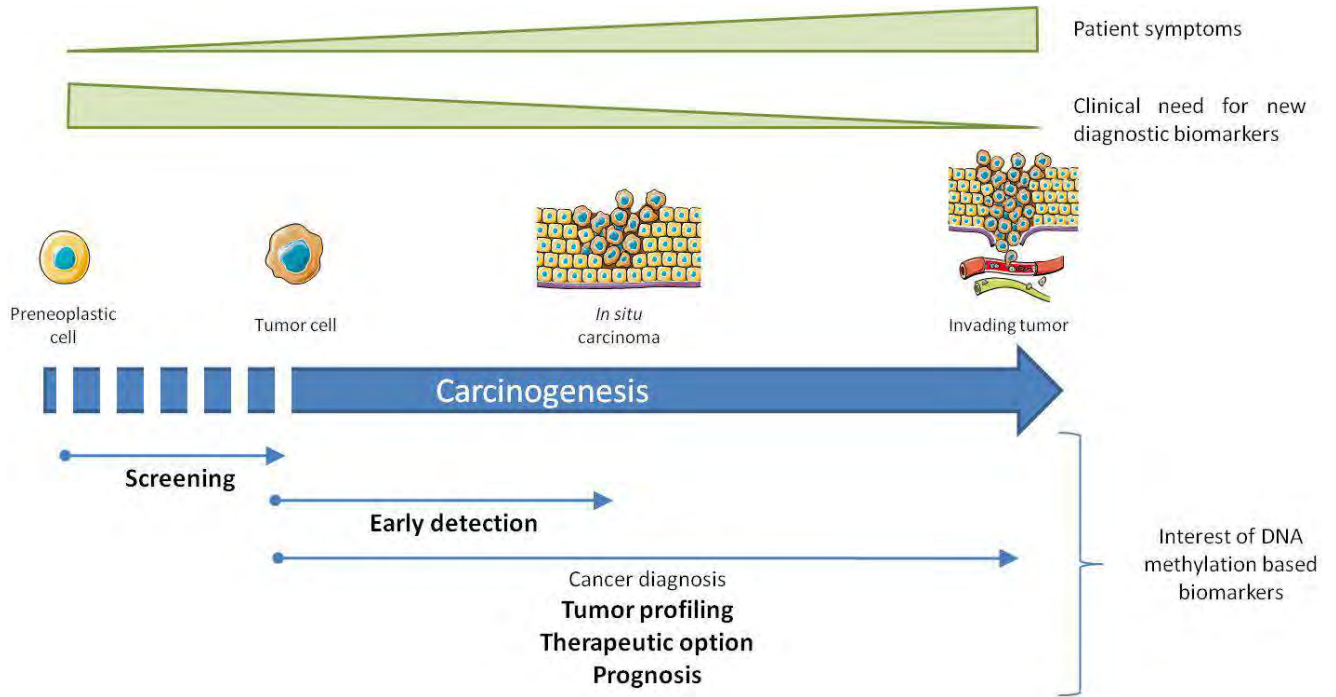
Several other compounds like curcumin and derivatives were reported as potential DNA methylation inhibitors. Others were synthesized RG108 (phthalimido-L-tryptophan), MG98 (DNMT1 antisense oligonucleotide), SGI-1027 (lipophilic quinoline)¹²⁴. MG98 toxicity was evaluated in several phase I clinical trials in patients with AML, MDS or advanced solid tumors^{157,158}. However, none of these inhibitors have entered clinical trials for anti-tumor therapy.

7. Conclusions

The accumulative interest for DNA methylation-based biomarkers for cancer diagnosis in the last two decades has been sensational. Discovery of original DNA methylation marks follows the constant technological improvement of DNA methylation studies, which can provide tremendous amount of data. We illustrate that most of the DNA methylation marks described in the literature are common among cancers and that few overcome the principal requirements for clinical contribution. Hence, despite the growing interest for DNA methylation biomarkers, one should stay attentive to basic clinical requirements to ensure their reliability. Accordingly, over fitting, use of large independent cohorts and standardization in DNA methylation level assessment have to be accounted for to propose a *bona fide* biomarkers suitable for clinical cancer diagnosis.

Acknowledgements: we thank Dr Dina ARVANITIS (Centre de Biologie du Développement, Toulouse) for the critical reading of the manuscript.

Figure 1. The interest of DNA methylation biomarker in cancer diagnosis. Thin arrows illustrates distinctive phases of carcinogenesis for which DNA methylation conveys improvement or an additional value to cancer diagnosis. The relative importance of DNA methylation based biomarkers regarding clinical need is bolded (high interest) or not (modest interest).



References

1. Bird, A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev.* **16**, 6–21 (2002).
2. Gopalakrishnan, S., Van Emburgh, B. O. & Robertson, K. D. DNA methylation in development and human disease. *Mutat. Res.* **647**, 30–38 (2008).
3. Jones, P. A. Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond. *Nat. Rev. Genet.* **13**, 484–492 (2012).
4. Chen, T. & Li, E. Structure and function of eukaryotic DNA methyltransferases. *Curr. Top. Dev. Biol.* **60**, 55–89 (2004).
5. Kinney, S. R. M. & Pradhan, S. Regulation of expression and activity of DNA (cytosine-5) methyltransferases in mammalian cells. *Prog Mol Biol Transl Sci* **101**, 311–333 (2011).
6. Bachman, K. E., Rountree, M. R. & Baylin, S. B. Dnmt3a and Dnmt3b are transcriptional repressors that exhibit unique localization properties to heterochromatin. *J. Biol. Chem.* **276**, 32282–32287 (2001).
7. Jeong, S. *et al.* Selective anchoring of DNA methyltransferases 3A and 3B to nucleosomes containing methylated DNA. *Mol. Cell. Biol.* **29**, 5366–5376 (2009).
8. Sharma, S., De Carvalho, D. D., Jeong, S., Jones, P. A. & Liang, G. Nucleosomes containing methylated DNA stabilize DNA methyltransferases 3A/3B and ensure faithful epigenetic inheritance. *PLoS Genet.* **7**, e1001286 (2011).
9. Okano, M., Bell, D. W., Haber, D. A. & Li, E. DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for *de novo* methylation and mammalian development. *Cell* **99**, 247–257 (1999).
10. Li, E., Bestor, T. H. & Jaenisch, R. Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. *Cell* **69**, 915–926 (1992).
11. Chedin, F., Lieber, M. R. & Hsieh, C. L. The DNA methyltransferase-like protein DNMT3L stimulates *de novo* methylation by Dnmt3a. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 16916–21 (2002).
12. Okano, M., Xie, S. & Li, E. Dnmt2 is not required for *de novo* and maintenance methylation of viral DNA in embryonic stem cells. *Nucleic Acids Res.* **26**, 2536–2540 (1998).
13. Goll, M. G. *et al.* Methylation of tRNA^{Asp} by the DNA Methyltransferase Homolog Dnmt2. *Science* **311**, 395–398 (2006).
14. Tuorto, F. *et al.* RNA cytosine methylation by Dnmt2 and NSun2 promotes tRNA stability and protein synthesis. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **19**, 900–905 (2012).

15. Jurkowski, T. P., Shanmugam, R., Helm, M. & Jeltsch, A. Mapping the tRNA binding site on the surface of human DNMT2 methyltransferase. *Biochemistry* **51**, 4438–4444 (2012).
16. Jones, P. A. & Baylin, S. B. The Epigenomics of Cancer. *Cell* **128**, 683–692 (2007).
17. Berdasco, M. & Esteller, M. Aberrant epigenetic landscape in cancer: how cellular identity goes awry. *Dev. Cell* **19**, 698–711 (2010).
18. Wild, L. & Flanagan, J. M. Genome-wide hypomethylation in cancer may be a passive consequence of transformation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer* **1806**, 50–57 (2010).
19. Pastor, W. A., Aravind, L. & Rao, A. TETonic shift: biological roles of TET proteins in DNA demethylation and transcription. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **14**, 341–356 (2013).
20. Hashimoto, H. *et al.* Recognition and potential mechanisms for replication and erasure of cytosine hydroxymethylation. *Nucleic Acids Res.* **40**, 4841–4849 (2012).
21. Valinluck, V. & Sowers, L. C. Endogenous cytosine damage products alter the site selectivity of human DNA maintenance methyltransferase DNMT1. *Cancer Res.* **67**, 946–950 (2007).
22. He, Y.-F. *et al.* Tet-mediated formation of 5-carboxylcytosine and its excision by TDG in mammalian DNA. *Science* **333**, 1303–1307 (2011).
23. Song, C.-X. *et al.* Sensitive and specific single-molecule sequencing of 5-hydroxymethylcytosine. *Nat. Methods* **9**, 75–77 (2012).
24. Sun, M. *et al.* HMGA2/TET1/HOXA9 signaling pathway regulates breast cancer growth and metastasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **110**, 9920–9925 (2013).
25. Hsu, C.-H. *et al.* TET1 suppresses cancer invasion by activating the tissue inhibitors of metalloproteinases. *Cell Rep* **2**, 568–579 (2012).
26. Liu, C. *et al.* Decrease of 5-Hydroxymethylcytosine Is Associated with Progression of Hepatocellular Carcinoma through Downregulation of TET1. *PLoS ONE* **8**, e62828 (2013).
27. Maul, R. W. & Gearhart, P. J. AID and somatic hypermutation. *Adv. Immunol.* **105**, 159–191 (2010).
28. Bhutani, N. *et al.* Reprogramming towards pluripotency requires AID-dependent DNA demethylation. *Nature* **463**, 1042–1047 (2010).
29. Métivier, R. *et al.* Cyclical DNA methylation of a transcriptionally active promoter. *Nature* **452**, 45–50 (2008).

30. Kalari, S. & Pfeifer, G. P. Identification of driver and passenger DNA methylation in cancer by epigenomic analysis. *Adv Genet* **70**, 277–308 (2010).
31. Peng, D. F. *et al.* Increased DNA methyltransferase 1 (DNMT1) protein expression in precancerous conditions and ductal carcinomas of the pancreas. *Cancer Sci* **96**, 403–8 (2005).
32. Belinsky, S. A., Nikula, K. J., Baylin, S. B. & Issa, J. P. Increased cytosine DNA-methyltransferase activity is target-cell-specific and an early event in lung cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 4045–4050 (1996).
33. Lopatina, N. G., Vanyushin, B. F., Cronin, G. M. & Poirier, L. A. Elevated expression and altered pattern of activity of DNA methyltransferase in liver tumors of rats fed methyl-deficient diets. *Carcinogenesis* **19**, 1777–1781 (1998).
34. Sato, N., Fukushima, N., Hruban, R. H. & Goggins, M. CpG island methylation profile of pancreatic intraepithelial neoplasia. *Mod Pathol* **21**, 238–244 (2007).
35. Hanoun, N. *et al.* The silencing of microRNA 148a production by DNA hypermethylation is an early event in pancreatic carcinogenesis. *Clin. Chem.* **56**, 1107–1118 (2010).
36. House, M. G., Guo, M., Iacobuzio-Donahue, C. & Herman, J. G. Molecular progression of promoter methylation in intraductal papillary mucinous neoplasms (IPMN) of the pancreas. *Carcinogenesis* **24**, 193–198 (2003).
37. Lee, J.-H. *et al.* Frequent CpG island methylation in precursor lesions and early gastric adenocarcinomas. *Oncogene* **23**, 4646–4654 (2004).
38. Brooks, J. D. *et al.* CG island methylation changes near the GSTP1 gene in prostatic intraepithelial neoplasia. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **7**, 531–536 (1998).
39. Robertson, K. D. *et al.* The human DNA methyltransferases (DNMTs) 1, 3a and 3b: coordinate mRNA expression in normal tissues and overexpression in tumors. *Nucleic Acids Res* **27**, 2291–8 (1999).
40. el-Deiry, W. S. *et al.* High expression of the DNA methyltransferase gene characterizes human neoplastic cells and progression stages of colon cancer. *PNAS* **88**, 3470–3474 (1991).
41. Girault, I., Tozlu, S., Lidereau, R. & Bièche, I. Expression Analysis of DNA Methyltransferases 1, 3A, and 3B in Sporadic Breast Carcinomas. *Clin Cancer Res* **9**, 4415–4422 (2003).
42. Mizuno, S. *et al.* Expression of DNA methyltransferases DNMT1,3A, and 3B in normal hematopoiesis and in acute and chronic myelogenous leukemia. *Blood* **97**, 1172–1179 (2001).

43. Robertson, K. D. DNA methylation, methyltransferases, and cancer. *Oncogene* **20**, 3139–3155 (2001).
44. Gaidzik, V. I. *et al.* TET2 Mutations in Acute Myeloid Leukemia (AML): Results From a Comprehensive Genetic and Clinical Analysis of the AML Study Group. *JCO* **30**, 1350–1357 (2012).
45. Simó-Riudalbas, L., Melo, S. A. & Esteller, M. DNMT3B gene amplification predicts resistance to DNA demethylating drugs. *Genes Chromosomes Cancer* **50**, 527–534 (2011).
46. Lopez de Silanes, I. *et al.* The RNA-binding protein HuR regulates DNA methylation through stabilization of DNMT3b mRNA. *Nucleic Acids Research* **37**, 2658–2671 (2009).
47. Ley, T. J. *et al.* DNMT3A mutations in acute myeloid leukemia. *N. Engl. J. Med.* **363**, 2424–2433 (2010).
48. Singer, J., Stellwagen, R. H., Roberts-Ems, J. & Riggs, A. D. 5-Methylcytosine content of rat hepatoma DNA substituted with bromodeoxyuridine. *J. Biol. Chem.* **252**, 5509–5513 (1977).
49. Fraga, M. F., Rodríguez, R. & Cañal, M. J. Rapid quantification of DNA methylation by high performance capillary electrophoresis. *Electrophoresis* **21**, 2990–2994 (2000).
50. Ramsahoye, B. H. Nearest-neighbor analysis. *Methods Mol. Biol.* **200**, 9–15 (2002).
51. Guerrero-Preston, R. *et al.* Global DNA hypomethylation in liver cancer cases and controls: a phase I preclinical biomarker development study. *Epigenetics* **2**, 223–226 (2007).
52. Costello, J. F., Smiraglia, D. J. & Plass, C. Restriction landmark genome scanning. *Methods* **27**, 144–149 (2002).
53. Frigola, J., Ribas, M., Risques, R.-A. & Peinado, M. A. Methylome profiling of cancer cells by amplification of inter-methylated sites (AIMS). *Nucleic Acids Res.* **30**, e28 (2002).
54. Liang, G. *et al.* Cooperativity between DNA methyltransferases in the maintenance methylation of repetitive elements. *Mol. Cell. Biol.* **22**, 480–491 (2002).
55. Frommer, M. *et al.* A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **89**, 1827–1831 (1992).
56. Herman, J. G., Graff, J. R., Myöhänen, S., Nelkin, B. D. & Baylin, S. B. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **93**, 9821–9826 (1996).

57. Yamamoto, N. *et al.* Detection of aberrant promoter methylation of GSTP1, RASSF1A, and RAR α 2 in serum DNA of patients with breast cancer by a newly established one-step methylation-specific PCR assay. *Breast Cancer Res. Treat.* **132**, 165–173 (2012).
58. Xiong, Z. & Laird, P. W. COBRA: a sensitive and quantitative DNA methylation assay. *Nucleic Acids Res.* **25**, 2532–2534 (1997).
59. Eads, C. A. *et al.* MethyLight: a high-throughput assay to measure DNA methylation. *Nucleic Acids Res.* **28**, E32 (2000).
60. Tost, J. & Gut, I. G. DNA methylation analysis by pyrosequencing. *Nat Protoc* **2**, 2265–2275 (2007).
61. Zhang, X. *et al.* Genome-wide high-resolution mapping and functional analysis of DNA methylation in arabidopsis. *Cell* **126**, 1189–1201 (2006).
62. Taylor, K. H. *et al.* Ultradeep bisulfite sequencing analysis of DNA methylation patterns in multiple gene promoters by 454 sequencing. *Cancer Res.* **67**, 8511–8518 (2007).
63. Kulis, M. *et al.* Epigenomic analysis detects widespread gene-body DNA hypomethylation in chronic lymphocytic leukemia. *Nat. Genet.* **44**, 1236–1242 (2012).
64. Bibikova, M. *et al.* High-throughput DNA methylation profiling using universal bead arrays. *Genome Res.* **16**, 383–393 (2006).
65. Dedeurwaerder, S. *et al.* DNA methylation profiling reveals a predominant immune component in breast cancers. *EMBO Mol Med* **3**, 726–741 (2011).
66. Hanoun, N. *et al.* The silencing of microRNA 148a production by DNA hypermethylation is an early event in pancreatic carcinogenesis. *Clin. Chem.* **56**, 1107–1118 (2010).
67. Liloglou, T. & Field, J. K. Detection of DNA methylation changes in body fluids. *Adv. Genet.* **71**, 177–207 (2010).
68. Carvalho, A. L. *et al.* Detection of promoter hypermethylation in salivary rinses as a biomarker for head and neck squamous cell carcinoma surveillance. *Clin. Cancer Res.* **17**, 4782–4789 (2011).
69. Anglim, P. P., Alonzo, T. A. & Laird-Offringa, I. A. DNA methylation-based biomarkers for early detection of non-small cell lung cancer: an update. *Mol. Cancer* **7**, 81 (2008).
70. Yan, L. *et al.* Molecular analysis to detect pancreatic ductal adenocarcinoma in high-risk groups. *Gastroenterology* **128**, 2124–2130 (2005).

71. Matsubayashi, H. *et al.* DNA methylation alterations in the pancreatic juice of patients with suspected pancreatic disease. *Cancer Res.* **66**, 1208–1217 (2006).
72. Wagner, P. D., Verma, M. & Srivastava, S. Challenges for biomarkers in cancer detection. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1022**, 9–16 (2004).
73. Rocco, J. W. & Sidransky, D. p16(MTS-1/CDKN2/INK4a) in cancer progression. *Exp. Cell Res.* **264**, 42–55 (2001).
74. Zou, H.-Z. *et al.* Detection of Aberrant p16 Methylation in the Serum of Colorectal Cancer Patients. *Clin Cancer Res* **8**, 188–191 (2002).
75. Wong, I. H. N. *et al.* Detection of Aberrant p16 Methylation in the Plasma and Serum of Liver Cancer Patients. *Cancer Res* **59**, 71–73 (1999).
76. Belinsky, S. A. *et al.* Aberrant methylation of p16INK4a is an early event in lung cancer and a potential biomarker for early diagnosis. *PNAS* **95**, 11891–11896 (1998).
77. Kaina, B., Margison, G. P. & Christmann, M. Targeting O 6-methylguanine-DNA methyltransferase with specific inhibitors as a strategy in cancer therapy. *Cell. Mol. Life Sci.* **67**, 3663–3681 (2010).
78. Esteller, M. *et al.* Inactivation of the DNA-repair gene MGMT and the clinical response of gliomas to alkylating agents. *N. Engl. J. Med.* **343**, 1350–1354 (2000).
79. Shen, L. *et al.* MGMT Promoter Methylation and Field Defect in Sporadic Colorectal Cancer. *JNCI J Natl Cancer Inst* **97**, 1330–1338 (2005).
80. Townsend, D. M. & Tew, K. D. The role of glutathione-S-transferase in anti-cancer drug resistance. *Oncogene* **22**, 7369–7375 (2003).
81. Nakamichi, I. *et al.* Correlation between promoter hypermethylation of GSTP1 and response to chemotherapy in diffuse large B cell lymphoma. *Ann. Hematol.* **86**, 557–564 (2007).
82. Miyake, T. *et al.* GSTP1 expression predicts poor pathological complete response to neoadjuvant chemotherapy in ER-negative breast cancer. *Cancer Sci.* **103**, 913–920 (2012).
83. Zhang, Y. *et al.* GSTP1 determines cis-platinum cytotoxicity in gastric adenocarcinoma MGC803 cells: regulation by promoter methylation and extracellular regulated kinase signaling. *Anticancer Drugs* **20**, 208–214 (2009).
84. Harden, S. V., Guo, Z., Epstein, J. I. & Sidransky, D. Quantitative Gstp1 Methylation Clearly Distinguishes Benign Prostatic Tissue And Limited Prostate Adenocarcinoma. *The Journal of Urology* **169**, 1138–1142 (2003).

85. Saxena, A. *et al.* GSTP1 methylation and polymorphism increase the risk of breast cancer and the effects of diet and lifestyle in breast cancer patients. *Exp Ther Med* **4**, 1097–1103 (2012).
86. Hashad, D. I., Hashad, M. M. E. I., Talaat, I. M. & Ibrahim, M. A. Role of glutathione-S-transferase P1 hypermethylation in molecular detection of prostate cancer. *Genet Test Mol Biomarkers* **15**, 667–670 (2011).
87. Fukui, K. DNA Mismatch Repair in Eukaryotes and Bacteria. *Journal of Nucleic Acids* **2010**, 1–16 (2010).
88. Kantelinen, J. *et al.* MutSbeta exceeds MutSalpha in dinucleotide loop repair. *Br. J. Cancer* **102**, 1068–1073 (2010).
89. Menigatti, M. *et al.* Methylation pattern of different regions of the MLH1 promoter and silencing of gene expression in hereditary and sporadic colorectal cancer. *Genes Chromosomes Cancer* **31**, 357–361 (2001).
90. Bischoff, J. *et al.* hMLH1 promoter hypermethylation and MSI status in human endometrial carcinomas with and without metastases. *Clin. Exp. Metastasis* **29**, 889–900 (2012).
91. Ozdemir, F., Altinisik, J., Karateke, A., Coksuer, H. & Buyru, N. Methylation of tumor suppressor genes in ovarian cancer. *Exp Ther Med* **4**, 1092–1096 (2012).
92. Esteller, M., Corn, P. G., Baylin, S. B. & Herman, J. G. A Gene Hypermethylation Profile of Human Cancer. *Cancer Res* **61**, 3225–3229 (2001).
93. Venkitaraman, A. R. Cancer susceptibility and the functions of BRCA1 and BRCA2. *Cell* **108**, 171–182 (2002).
94. Esteller, M. *et al.* Promoter Hypermethylation and BRCA1 Inactivation in Sporadic Breast and Ovarian Tumors. *JNCI J Natl Cancer Inst* **92**, 564–569 (2000).
95. Dobrovic, A. & Simpfendorfer, D. Methylation of the BRCA1 Gene in Sporadic Breast Cancer. *Cancer Res* **57**, 3347–3350 (1997).
96. Lofton-Day, C. *et al.* DNA Methylation Biomarkers for Blood-Based Colorectal Cancer Screening. *Clinical Chemistry* **54**, 414–423 (2008).
97. Bennett, K. L. *et al.* Frequently Methylated Tumor Suppressor Genes in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Cancer Res* **68**, 4494–4499 (2008).
98. Connolly, D. *et al.* Septin 9 isoform expression, localization and epigenetic changes during human and mouse breast cancer progression. *Breast Cancer Research* **13**, R76 (2011).

99. Grützmann, R. *et al.* Sensitive detection of colorectal cancer in peripheral blood by septin 9 DNA methylation assay. *PLoS ONE* **3**, e3759 (2008).
100. Lu, J. *et al.* MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature* **435**, 834–838 (2005).
101. Iorio, M. V. *et al.* MicroRNA Signatures in Human Ovarian Cancer. *Cancer Res* **67**, 8699–8707 (2007).
102. Weber, B., Stresmann, C., Brueckner, B. & Lyko, F. Methylation of human microRNA genes in normal and neoplastic cells. *Cell Cycle* **6**, 1001–1005 (2007).
103. Saito, Y. *et al.* Specific activation of microRNA-127 with downregulation of the proto-oncogene BCL6 by chromatin-modifying drugs in human cancer cells. *Cancer Cell* **9**, 435–443 (2006).
104. Lehmann, U. *et al.* Epigenetic inactivation of microRNA gene hsa-mir-9-1 in human breast cancer. *The Journal of Pathology* **214**, 17–24 (2008).
105. Wong, K. Y., Huang, X. & Chim, C. S. DNA methylation of microRNA genes in multiple myeloma. *Carcinogenesis* **33**, 1629–1638 (2012).
106. Cordelier, P. & Torrisani, J. in *MicroRNAs in Cancer Translational Research* (Cho, W. C. S.) 287–307 (Springer Netherlands, 2011). at <http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-94-007-0298-1_13>
107. Sato, N., Fukushima, N., Matsubayashi, H. & Goggins, M. Identification of maspin and S100P as novel hypomethylation targets in pancreatic cancer using global gene expression profiling. *Oncogene* **23**, 1531–1538 (2004).
108. Wang, Q. *et al.* Hypomethylation of WNT5A, CRIP1 and S100P in prostate cancer. *Oncogene* **26**, 6560–6565 (2007).
109. Ogino, S. *et al.* A Cohort Study of Tumoral LINE-1 Hypomethylation and Prognosis in Colon Cancer. *JNCI J Natl Cancer Inst* **100**, 1734–1738 (2008).
110. Koerner, M. V. & Barlow, D. P. Genomic imprinting—an epigenetic gene-regulatory model. *Current Opinion in Genetics & Development* **20**, 164–170 (2010).
111. Jelinic, P. & Shaw, P. Loss of imprinting and cancer. *J. Pathol.* **211**, 261–268 (2007).
112. Mulero-Navarro, S. & Esteller, M. Epigenetic biomarkers for human cancer: The time is now. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* **68**, 1–11 (2008).
113. Esteller, M., Corn, P. G., Baylin, S. B. & Herman, J. G. A Gene Hypermethylation Profile of Human Cancer. *Cancer Res* **61**, 3225–3229 (2001).

114. McCluskey, L. L. *et al.* Differences in p16 Gene Methylation and Expression in Benign and Malignant Ovarian Tumors. *Gynecologic Oncology* **72**, 87–92 (1999).
115. Fujiwara, K. *et al.* Identification of Epigenetic Aberrant Promoter Methylation in Serum DNA Is Useful for Early Detection of Lung Cancer. *Clin Cancer Res* **11**, 1219–1225 (2005).
116. Müller, H. M. *et al.* Methylation changes in faecal DNA: a marker for colorectal cancer screening? *The Lancet* **363**, 1283–1285 (2004).
117. Stumpel, D. J. P. M. *et al.* Specific promoter methylation identifies different subgroups of MLL-rearranged infant acute lymphoblastic leukemia, influences clinical outcome, and provides therapeutic options. *Blood* **114**, 5490–5498 (2009).
118. Figueroa, M. E. *et al.* DNA Methylation Signatures Identify Biologically Distinct Subtypes in Acute Myeloid Leukemia. *Cancer Cell* **17**, 13–27 (2010).
119. Noushmehr, H. *et al.* Identification of a CpG island methylator phenotype that defines a distinct subgroup of glioma. *Cancer Cell* **17**, 510–522 (2010).
120. Uhlmann, K. *et al.* Distinct methylation profiles of glioma subtypes. *International Journal of Cancer* **106**, 52–59 (2003).
121. Hinoue, T. *et al.* Genome-scale analysis of aberrant DNA methylation in colorectal cancer. *Genome Res.* **22**, 271–282 (2012).
122. Ransohoff, D. F. Rules of evidence for cancer molecular-marker discovery and validation. *Nat. Rev. Cancer* **4**, 309–314 (2004).
123. Mikeska, T., Bock, C., Do, H. & Dobrovic, A. DNA methylation biomarkers in cancer: progress towards clinical implementation. *Expert Review of Molecular Diagnostics* **12**, 473–487 (2012).
124. Gros, C. *et al.* DNA methylation inhibitors in cancer: recent and future approaches. *Biochimie* **94**, 2280–2296 (2012).
125. Santi, D. V., Norment, A. & Garrett, C. E. Covalent bond formation between a DNA-cytosine methyltransferase and DNA containing 5-azacytosine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **81**, 6993–6997 (1984).
126. Cheng, J. C. *et al.* Preferential response of cancer cells to zebularine. *Cancer Cell* **6**, 151–158 (2004).
127. Lübbert, M. DNA methylation inhibitors in the treatment of leukemias, myelodysplastic syndromes and hemoglobinopathies: clinical results and possible mechanisms of action. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **249**, 135–164 (2000).

128. Robak, T. New nucleoside analogs for patients with hematological malignancies. *Expert Opin Investig Drugs* **20**, 343–359 (2011).
129. Tsai, H.-C. *et al.* Transient low doses of DNA-demethylating agents exert durable antitumor effects on hematological and epithelial tumor cells. *Cancer Cell* **21**, 430–446 (2012).
130. Juergens, R. A. *et al.* Combination epigenetic therapy has efficacy in patients with refractory advanced non-small cell lung cancer. *Cancer Discov* **1**, 598–607 (2011).
131. Fili, C. *et al.* Prospective Phase II Study on 5-Days Azacitidine for Treatment of Symptomatic and/or Erythropoietin Unresponsive Patients with Low/INT-1–Risk Myelodysplastic Syndromes. *Clin Cancer Res* **19**, 3297–3308 (2013).
132. Passweg, J. R. *et al.* Azacytidine for acute myeloid leukemia in elderly or frail patients: a phase II trial (SAKK 30/07). *Leuk. Lymphoma* (2013). doi:10.3109/10428194.2013.790540
133. Gore, S. D. *et al.* A multivariate analysis of the relationship between response and survival among patients with higher-risk myelodysplastic syndromes treated within azacitidine or conventional care regimens in the randomized AZA-001 trial. *Haematologica* (2013). doi:10.3324/haematol.2012.074831
134. Bryan, J., Kantarjian, H., Garcia-Manero, G. & Jabbour, E. Pharmacokinetic evaluation of decitabine for the treatment of leukemia. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* **7**, 661–672 (2011).
135. Matoušová, M. *et al.* 2'-deoxy-5,6-dihydro-5-azacytidine - a less toxic alternative of 2'-deoxy-5-azacytidine: a comparative study of hypomethylating potential. *Epigenetics* **6**, 769–776 (2011).
136. Chuang, J. C. *et al.* S110, a 5-Aza-2'-deoxycytidine-containing dinucleotide, is an effective DNA methylation inhibitor in vivo and can reduce tumor growth. *Mol. Cancer Ther.* **9**, 1443–1450 (2010).
137. Schroeder, G. K., Zhou, L., Snider, M. J., Chen, X. & Wolfenden, R. Flight of a cytidine deaminase complex with an imperfect transition state analogue inhibitor: mass spectrometric evidence for the presence of a trapped water molecule. *Biochemistry* **51**, 6476–6486 (2012).
138. Zhou, L. *et al.* Zebularine: a novel DNA methylation inhibitor that forms a covalent complex with DNA methyltransferases. *J. Mol. Biol.* **321**, 591–599 (2002).
139. Scott, S. A. *et al.* Zebularine inhibits human acute myeloid leukemia cell growth in vitro in association with p15INK4B demethylation and reexpression. *Exp. Hematol.* **35**, 263–273 (2007).

140. Yoo, C. B. *et al.* Long-term epigenetic therapy with oral zebularine has minimal side effects and prevents intestinal tumors in mice. *Cancer Prev Res (Phila)* **1**, 233–240 (2008).
141. Flotho, C. *et al.* The DNA methyltransferase inhibitors azacitidine, decitabine and zebularine exert differential effects on cancer gene expression in acute myeloid leukemia cells. *Leukemia* **23**, 1019–1028 (2009).
142. Chik, F. & Szyf, M. Effects of specific DNMT gene depletion on cancer cell transformation and breast cancer cell invasion; toward selective DNMT inhibitors. *Carcinogenesis* **32**, 224–232 (2011).
143. Fahy, J., Jeltsch, A. & Arimondo, P. B. DNA methyltransferase inhibitors in cancer: a chemical and therapeutic patent overview and selected clinical studies. *Expert Opin Ther Pat* **22**, 1427–1442 (2012).
144. Cornacchia, E. *et al.* Hydralazine and procainamide inhibit T cell DNA methylation and induce autoreactivity. *J. Immunol.* **140**, 2197–2200 (1988).
145. Segura-Pacheco, B. *et al.* Reactivation of tumor suppressor genes by the cardiovascular drugs hydralazine and procainamide and their potential use in cancer therapy. *Clin. Cancer Res.* **9**, 1596–1603 (2003).
146. Zambrano, P. *et al.* A phase I study of hydralazine to demethylate and reactivate the expression of tumor suppressor genes. *BMC Cancer* **5**, 44 (2005).
147. Chuang, J. C. *et al.* Comparison of biological effects of non-nucleoside DNA methylation inhibitors versus 5-aza-2'-deoxycytidine. *Mol. Cancer Ther.* **4**, 1515–1520 (2005).
148. Fenster, P. E., Comess, K. A., Marsh, R., Katzenberg, C. & Hager, W. D. Conversion of atrial fibrillation to sinus rhythm by acute intravenous procainamide infusion. *Am. Heart J.* **106**, 501–504 (1983).
149. Villar-Garea, A., Fraga, M. F., Espada, J. & Esteller, M. Procaine is a DNA-demethylating agent with growth-inhibitory effects in human cancer cells. *Cancer Res.* **63**, 4984–4989 (2003).
150. Lee, B. H., Yegnasubramanian, S., Lin, X. & Nelson, W. G. Procainamide is a specific inhibitor of DNA methyltransferase 1. *J. Biol. Chem.* **280**, 40749–40756 (2005).
151. Stresemann, C., Brueckner, B., Musch, T., Stopper, H. & Lyko, F. Functional diversity of DNA methyltransferase inhibitors in human cancer cell lines. *Cancer Res.* **66**, 2794–2800 (2006).
152. Halby, L. *et al.* Rapid synthesis of new DNMT inhibitors derivatives of procainamide. *Chembiochem* **13**, 157–165 (2012).

153. Lin, Y.-S. *et al.* Identification of novel DNA methylation inhibitors *via* a two-component reporter gene system. *J. Biomed. Sci.* **18**, 3 (2011).
154. Fang, M. Z. *et al.* Reversal of hypermethylation and reactivation of p16INK4a, RARbeta, and MGMT genes by genistein and other isoflavones from soy. *Clin. Cancer Res.* **11**, 7033–7041 (2005).
155. Lee, W. J., Shim, J.-Y. & Zhu, B. T. Mechanisms for the inhibition of DNA methyltransferases by tea catechins and bioflavonoids. *Mol. Pharmacol.* **68**, 1018–1030 (2005).
156. Wang, Y., Li, Y., Liu, X. & Cho, W. C. Genetic And Epigenetic Studies For Determining Molecular Targets Of Natural Product Anticancer Agents. *Curr Cancer Drug Targets* (2013).
157. Plummer, R. *et al.* Phase I study of MG98, an oligonucleotide antisense inhibitor of human DNA methyltransferase 1, given as a 7-day infusion in patients with advanced solid tumors. *Clin. Cancer Res.* **15**, 3177–3183 (2009).
158. Klisovic, R. B. *et al.* A phase I biological study of MG98, an oligodeoxynucleotide antisense to DNA methyltransferase 1, in patients with high-risk myelodysplasia and acute myeloid leukemia. *Clin. Cancer Res.* **14**, 2444–2449 (2008).

© 2013 by the authors; licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution license (<http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>).

Annexe 3 - Article 4

***« miR-219-1-3p is a negative regulator of the mucin
MUC4 expression and is a tumor suppressor in
pancreatic cancer »***

(Article Soumis)

**miR-219-1-3p is a negative regulator of the mucin MUC4 expression and
is a tumor suppressor in pancreatic cancer**

Fatima Lahdaoui^{1,2,3}, Yannick Delpu^{4,5}, Audrey Vincent^{1,2,3}, Florence Renaud^{1,2,3}, Mathieu
Messenger^{1,2,3}, Belinda Duchêne^{1,2,3}, Emmanuelle Leteurre^{1,2,3}, Christophe Mariette^{1,2,3},
Jérôme Torrisani^{4,5}, Nicolas Jonckheere^{1,2,3} and Isabelle Van Seuningen^{1,2,3}

1 Inserm, UMR837, Jean Pierre Aubert Research Center (JPARC), Team 5 “Mucins,
epithelial differentiation and carcinogenesis”, rue Polonovski, 59045 Lille Cedex, France

2 Université Lille Nord de France, Lille, France

3 Centre Hospitalier Régional et Universitaire de Lille, Lille, France

4 Inserm, UMR 1037, Cancer Research Center of Toulouse (CRCT), 1 avenue Jean Poulhès,
31432 Toulouse cedex 4, France

5 Paul Sabatier University, Toulouse, France

Running title: MUC4 regulation by miR-219-1-3p in pancreatic cancer

Corresponding author: Dr Isabelle Van Seuningen, Inserm UMR837/JPARC, rue
Polonovski, 59045 Lille Cedex, France, Phone: +33 6 31 52 90 30, Fax: +33 3 20 53 85 62,
E-Mail: isabelle.vanseuningen@inserm.fr

Financial support: Fatima Lahdaoui is a recipient of a PhD fellowship of la Ligue Nationale
Contre le Cancer. This work is supported by a grant from la Ligue Nationale Contre le Cancer
(Equipe Labellisée Ligue 2013, IVS). Isabelle Van Seuningen is the recipient of a “Contrat
Hospitalier de Recherche Translationnelle” (AVIESAN/CHRT).

Conflict of interest: Authors declare no conflict of interest.

Abstract

Pancreatic Ductal Adenocarcinoma (PDAC) is among the most lethal cancers in the world with one of the worst outcome. The oncogenic mucin MUC4 is neo-expressed in the early stages of pancreatic carcinogenesis and strongly over-expressed in adenocarcinoma. This aberrant expression is associated with a poor prognosis. Previously, it has been shown in PDAC-derived cells that MUC4 is regulated by epigenetic mechanisms however its regulation by microRNAs (miRNAs) in PDAC is largely unknown. Using *in silico* studies, we have identified miR-219-1-3p as a potential regulator of MUC4 for which nothing was known in pancreatic carcinogenesis. We found that miR-219-1-3p expression was down-regulated in several PDAC-derived cell lines and in human PDAC tissues. We show that miR-219-1-3p negatively regulates MUC4 mucin expression *via* its direct binding to *MUC4* 3'-UTR. MiR-219-1-3p overexpression (transient and stable) induced a decrease of cell proliferation *via* a decrease of cyclin D1 expression, and a decrease of Akt and Erk pathway activation. MiR-219-1-3p overexpression also decreased cell migration. Furthermore, miR-219-1-3p expression was found to be conversely correlated with Muc4 expression in early pancreatic intraepithelial neoplasia (PanIN) lesions of *Pdx1-Cre;LSL-Kras^{G12D}* mice. *In vivo*, miR-219-1-3p injection in xenografted pancreatic tumors in mice decreased their growth and inhibited MUC4 expression. Altogether, these results identify miR-219-1-3p as a new negative regulator of MUC4 oncomucin that possesses tumor suppressor activity in PDAC.

Introduction

Pancreatic cancer is the fourth leading cause of death by cancer in western countries. With a survival rate of six months and a five-year survival about 5%, pancreatic cancer is characterized by a poor prognosis due to a late diagnosis and the lack of efficient treatment [1]. Pancreatic Ductal Adenocarcinoma (PDAC) is by far the most frequent pancreatic cancer since it represents approximately 90 % of pancreatic tumors. PDAC develops from non-invasive precursor lesions. Histologically three different types of precursor lesions have been described. Among them, Pancreatic Intraepithelial Neoplasia (PanIN) lesions are the most common [2].

The membrane-bound mucin MUC4, which is not expressed in healthy pancreas, is neoexpressed in early PanIN lesions. MUC4 is involved in pancreatic carcinogenesis (proliferation, migration, invasion and chemoresistance) [3-5], its expression correlates with the disease advancement [6] and it is the membrane partner of oncogenic receptor ErbB2 [3]. As such this oncomucin appears as a good target to slow down pancreatic tumorigenesis.

MUC4 gene is located on the chromosome 3q29, a chromosomal region characterized by a high CpG content. Our previous studies on *MUC4* epigenetic regulation have shown that *MUC4* 5'-UTR is hypermethylated in the human PDAC cell line Panc-1 which does not express MUC4 whereas this region is hypomethylated in the PDAC cell line Capan-1 which expresses a high level of MUC4 [7]. Furthermore, histone deacetylation is also involved in the repression of *MUC4* in PDAC cells [7, 8]. From these results, a model for *MUC4* epigenetic regulation was proposed [7]. Recently it was reported that *MUC4* could also be regulated by non-coding RNAs, notably by microRNAs (miRNAs). In HPAF, Panc10.05 and Colo357 PDAC cell lines, *MUC4* 3'-UTR was shown to be directly targeted by miR-150 [9]. MiRNAs are small non-coding RNA of 18-25 nt length which are conserved throughout evolution. They post-transcriptionally regulate gene expression by triggering either cleavage or

translation inhibition of their target mRNAs. [10]. miRNAs are involved in the regulation of cellular development, proliferation, differentiation, apoptosis and carcinogenesis. In many cancers, miRNAs are aberrantly expressed and either mediate the oncogenic process or have a tumor suppressor effect depending on their mRNA target [11].

To date, the molecular mechanisms responsible for the induction of MUC4 expression in the early stages of pancreatic carcinogenesis are still largely unknown. In this context we aimed at identifying miRNAs that both regulate the expression of the oncogenic mucin MUC4 and possess a tumor suppressor activity. In this report, we have identified miR-219-1-3p as a new negative regulator of MUC4 mucin expression in the early steps of pancreatic carcinogenesis, which is downregulated in pancreatic tumor tissues and that possesses tumor suppressive activity. MiR-219-1-3p appears thus as a good target to slow down pancreatic tumorigenesis.

Materials and methods

Cell culture

Human pancreatic ductal epithelial cells (HPDE) were obtained from Dr M.S. Tsao (UHN, Toronto, Canada) [12, 13]. BxPC-3 and MIA PaCa-2 pancreatic cancer cells were purchased from ATCC and were cultured as in [14]. Capan-1, Capan-2 (ATCC) and Panc-1 (ECACC) pancreatic cancer cells were grown as previously described [15]. Upon thawing, all cell lines are systematically tested for the mucin (MUC1, MUC4, MUC5AC) pattern of expression as well as ErbB2 as previously described [3, 5, 8, 16]. Cells are also tested for *Kras* mutations by pyrosequencing (PyroMark™Q96 *KRAS* 2.0 test, Qiagen). The data is indicated in the supplemental table I.

Human Samples

Paired human PDAC and their corresponding non tumoral tissues were collected from surgical resections of 22 patients with PDAC from 2006 to 2009 in Lille University Hospital. Signed informed consent was obtained from all patients.

miRNA target prediction

To identify miRNA potentially targeting *MUC4* 3'-UTR, Microcosm (www.ebi.ac.uk/enright-srv/microcosm) and MiRanda (<http://www.microma.org>) databases were used. The mature miRNA sequence was confirmed with miRBase (<http://microma.sanger.ac.uk/>).

Establishment of miR-219-1-3p over-expressing stable cell lines

Capan-1 LV-miR-neg and Capan-2 LV-miR-219 stable cell lines were obtained as previously described [17] using the forward 5'-TGCTGAGAGTTGAGTCTGGACGTCCCGGTTTTGGCCACTGACTGACCGGGACGTCAGTCAACTCT-3' and reverse 5'-CCTGAGAGTTGACTGGACGTCCCGGTCAGTCAGTGGCCAAAACCGGGACGTCCAGACTCAACTCTC-3' oligonucleotides.

Cell transfection

Cells were transfected with pre-miR-219-1-3p or anti-miR-219-1-3p by the reverse transfection method using the siPORTTM *NeoFX* transfection reagent (Ambion). Cells transfected with the siPORTTM *NeoFX* transfection reagent (untreated) or a scramble sequence were examined in parallel as controls. Cells were subjected to RNA or protein extraction 48h post transfection.

pGL3-*MUC4*-3'-UTR cloning and luciferase reporter assays

The *MUC4* 3'-UTR was amplified from Capan-2 genomic DNA using the following primers: *MUC4_3'-UTR_F*: 5'-CGCTCTAGAGGGCCAGGTTCTCCTATTTC-3' and *MUC4_3'-UTR_R*: 5'-CGCTCTAGAGGGCCACCAGAAGAAAATCAA-3' before cloning into pGL3 Promoter vector (Promega). To generate pGL3-*MUC4*-site#1_mut miR-219-1-3p binding site #1 ACCTCAAGACTCACCTC was mutated to ACCTCAAGAAGAACCTC and the miR-219-1-3p binding site #2 TTCAAATTA ACTCT was mutated to TTCAAATTGGCGAT (pGL3-*MUC4*-site#2_mut) using the Quick-Change XL Site-Directed Mutagenesis[®] kit (Stratagene). Luciferase activity was measured following co-transfection with 1 µg of pGL3-*MUC4*-3'UTR reporter plasmid in the presence of pre-miR-219-1-3p precursor (9 nM) or anti-miR-219-1-3p (18 nM) (Ambion). Luciferase activity and protein assays were performed as described in [5].

Biotin pull-down assay

Capan-2 cells (1×10^6) were transfected in triplicate with 3'-biotinylated miR-219-1-3p or 3'-biotinylated scramble miRNA (Dharmacon) at 100 nM final as described above. Biotin pull-down assay was performed as previously described [18]. RNA was directly extracted from the beads (pulled-down RNA) or from the input RNA using the miRNeasy Mini kit (Qiagen). Extracted RNA was subjected to cDNA synthesis as previously described [19]. qPCR was performed using the SsoFast Evagreen[®] Supermix kit (Bio-Rad) following manufacturer's

protocol using the CFX96 real-time PCR system (Bio-Rad). Primers used were: MUC4_F, GCCCAAGCTACAGTGTGACTCA; MUC4_R, ATGGTGCCGTTGTAATTTGTTGT; GAPDH_F, CCACATCGCTCAGACACCAT; GAPDH_R, CCAGGCGCCAATACG. The *MUC4* mRNA levels were normalized to the mRNA level of *GAPDH* in the miR-219-1-3p pull down and then normalized to the amount in the input to obtain the enrichment ratio. This was calculated using the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. Three independent experiments were carried out.

RNA isolation and qRT-PCR

Total RNA including miRNAs was extracted using miRNeasy Mini Kit (Qiagen). One μg of RNA was reverse transcribed with the QuantiMiR Reverse Transcription Kit (System Biosciences). qRT-PCR was carried out using *Sso Fast EVA Green*[®] Supermix (Bio-Rad) and *CFX96* Detection System (Bio-Rad). Expression levels were calculated using the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. The miR-219-1-3p expression level was normalized against U6 snRNA and was assayed in triplicate in three independent experiments.

Cell proliferation and migration assays

Capan-1, Capan-2 and BxPC-3 cells were transfected with pre-miR-219-1-3p or scramble miRNA and then seeded at 10^5 cells/well in 6-well plates. Cells were counted at 24, 48 and 72 h post-transfection using Countess[®] Automated Cell Counter (Life Technologies). Cells were transfected during 24 h, 5×10^5 cells were then plated into migration chambers (BD Biosciences). Each experiment was assayed in triplicate in at least three independent experiments.

Immunoblotting

Cell lysis, westernblotting, immunostaining and protein assay were carried out as described before [20]. Phospho-Erk1/2 (Thr202/Tyr204) (clone 20G11, 1/500), Erk1/2 (clone I37F5, 1/500), phospho-Akt (Ser473) (clone D9E, 1/1000), Akt (clone C67E7, dilution 1/1000), and cyclin D1 (clone DCS6, dilution 1/500) antibodies, all from Cell Signaling Technology,

MUC4 antibody (clone 8G7,1/500) (Santa Cruz Biotechnology) and β -actin antibody (A5441, 1/5000) (Sigma-Aldrich). The membranes were then incubated with peroxidase-conjugated secondary antibodies (Sigma-Aldrich). The signal was detected using LAS 4000 apparatus (Fujifilm).

***Pdx1-Cre;LSL-Kras^{G12D}* mouse model**

Pdx1-Cre mice were obtained from the Mouse Models of Human Cancer Consortium (MMHCC, USA). *LStopL-Kras^{G12D}* mice were obtained from Dr D. Tuveson (Cambridge Research Institute, England) [21]. All procedures were in accordance with the guideline of animal care committee (Comité Ethique Expérimentation Animale Nord Pas-de-Calais, #AF042008). *LSL-Kras^{G12D}* (*Kras^{WT}*) and *Pdx1-Cre* mice were maintained as heterozygous lines and crossed to obtain *Kras^{G12D}* (*Pdx1-Cre;LSL-Kras^{G12D}*) mice. Mice were sacrificed at 9 months of age. Two pathologists scored independently the PanIN grade as PanIN-1 and PanIN-2. Tail snips, harvested from offsprings of *LSL-Kras^{G12D}* and *Pdx1-Cre* mice, were digested overnight, and genomic DNA was extracted using the Nucleospin Tissue kit (Macherey Nagel). The *Cre* and *Kras^{G12D}* alleles were identified by PCR.

Subcutaneous xenografts

Capan-2 (3×10^6 cells in 100 μ l Matrigel) cells were injected subcutaneously into the flank of eight-week-old male Severe Combined Immunodeficient (SCID) mice (CB17, Charles Rivers) to generate a tumor. Once palpable tumors developed (250 mm³), 20 μ g of pcDNA6.2-miR-219 or pcDNA6.2-miR-neg vector complexed with linear polymer of ethyleneimine (polyethylenimine PEI, ExGen 500, Euromedex) in 5% (w/v) glucose were injected in the tumors. Six mice were used per group. Tumor size was monitored by measuring the length (l) and the width (L) twice a week and tumor volume was calculated with the formula ($l^2 \times L$). All procedures were in accordance with the guideline of animal care committee (Comité Ethique Expérimentation Animale Nord Pas-de-Calais, #122012).

Immunohistochemistry

Tumor tissues were fixed in formalin and embedded in paraffin. Tissue sections (5 μ m) were stained with hematoxylin and eosin. Immunostaining with primary antibodies for human MUC4 (8G7, Santa Cruz Biotechnology) or mouse Muc4 (1G8) was performed as described previously [22, 23]. The slides were scored independently by two pathologists. Total score was calculated by multiplying the intensity score and percentage score.

miRNA *in situ* hybridization

In situ hybridization for miR-219-1-3p was performed in the formalin-fixed and paraffin-embedded mouse pancreatic tissue specimens by using the MiRCURY LNA microRNA ISH Optimization Kit (Exiqon) according to the manufacturer's protocol. The miR-219-1-3p locked nucleic acid sequence is 5'-DIG- CGGGACGTCCAGACTCAACTCT -3'-DIG. The slides were then counterstained with nuclear fast red and mounted with mounting medium (Vector Laboratories).

Statistical analyses

All statistical analyses were carried out using the Graphpad Prism 4.0 software. Unless indicated, differences between groups were analysed using the Student's *t*-test or Anova test. Data were shown as mean \pm SEM and considered significant when $p < 0.05$ *, $p < 0.01$ ** or $p < 0.001$ ***.

Results

Identification of two putative miR-219-1-3p binding sites in the *MUC4* 3'-UTR

Using bioinformatic algorithms, we searched miRNAs putative binding sites in human *MUC4* 3'-UTR. Several miRNAs came out and miR-219-1-3p became of particular interest since, at that time, no target gene had been experimentally validated for this miRNA and nothing was known about its biological role in pancreatic carcinogenesis. Two miR-219-1-3p putative binding sites were identified covering the nucleotides 19-40 (site #1) and 356-372 (site #2) of *MUC4* 3'-UTR (Figure 1A). Sequence alignment of human miR-219-1-3p among different species revealed that it is fully conserved across species (Figure 1A).

miR-219-1-3p is downregulated in human PDAC cell lines and tissues

To validate the potential of miR-219-1-3p in pancreatic cancer, its expression was studied both in PDAC cultured cells and human PDAC tissues by qRT-PCR. Our results indicate that miR-219-1-3p expression was reduced in all five PDAC cell lines (Capan-1, Capan-2, BxPC-3, Panc-1 and MIA PaCa-2) compared with normal human pancreatic ductal cells (HPDE) (Figure 1B). We also determined miR-219-1-3p expression in twenty-two paired human PDAC tissues and their corresponding non tumoral adjacent tissues. Significant down-regulation of miR-219-1-3p was observed in 19 out of 22 PDAC tissues (Wilcoxon signed-rank test, $p=0.0164$) (Figure 1C).

MUC4 is a direct target of miR-219-1-3p

To study *MUC4* regulation by miR-219-1-3p, Capan-1, Capan-2 and BxPC-3 cell lines were transiently transfected with miR-219-1-3p mimics or with a scrambled miRNA (Supplementary Figure S1A). Over-expression of miR-219-1-3p led to a marked reduction of *MUC4* protein level in the three cell lines compared to the scramble (Figure 2A, left panel).

Conversely, inhibition of miR-219-1-3p in Capan-2 and BxPC-3 cells, using anti-miR-219-1-3p oligonucleotides (Supplementary Figure S1B), led to an increase of MUC4 protein expression (Figure 2A, right panel).

To determine whether miR-219-1-3p regulates MUC4 expression by directly interacting with the *MUC4* mRNA, we then used an affinity-based approach in which biotinylated miR-219-1-3p or scramble miRNAs were transfected into Capan-2 cells. Using qRT-PCR, we show a significant enrichment of *MUC4* mRNA (5.28 fold, $p=0.0011$) in the miR-219-1-3p pull-down compared to the scramble (Figure 2B).

To functionally validate this interaction, we cloned the 3'-UTR of human *MUC4* downstream of the luciferase reporter gene (pGL3-*MUC4*-3'UTR). As shown in figure 2C, miR-219-1-3p overexpression led to a significant decrease of pGL3-*MUC4*-3'UTR luciferase activity both in Capan-1 ($p<0.001$) and BxPC-3 ($p<0.05$) cell lines compared to cells transfected with scramble miRNAs. The mutation of both miR-219-1-3p binding sites (site #1 mut or site #2 mut) restored normal luciferase activity of the 3'-UTR of *MUC4* (Figure 3C). When cells were transfected with anti-miR-219-1-3p, pGL3-*MUC4*-3'UTR luciferase activity significantly increased ($p<0.01$) in both cell lines compared to the scramble miR. No effect was observed on mutated forms pGL3-*MUC4*-site#1_mut or pGL3-*MUC4*-site#2_mut (Figure 2D). Altogether these results indicate that miR-219-1-3p inhibits MUC4 expression through a direct interaction within its 3'-UTR.

miR-219-1-3p inhibits proliferation and migration of PDAC cells *in vitro*

Since MUC4 is directly targeted by miR-219-1-3p, we investigated whether miR-219-1-3p was also able to interfere with proliferative and migrating properties of pancreatic cancer cells. Capan-1 ($p<0.001$), Capan-2 ($p<0.05$) and BxPC-3 ($p<0.01$) cell growth was significantly slowed-down 72 h post-transfection in the presence of miR-219-1-3p mimics

compared to scramble miRNA (Figure 3A) whereas inhibition of endogenous miR-219-1-3p by anti-miR-219-1-3p led to a significant increase of cell proliferation both in Capan-2 ($p<0.01$) and BxPC-3 ($p<0.05$) cells respectively at 48h and 72h post-transfection (Figure 3B). To further determine whether miR-219-1-3p expression could be associated with progression of pancreatic cancer, we evaluated its effect on the cell migrating behaviour. As shown in Figure 3C, miR-219-1-3p over-expression significantly reduced migration of Capan-1 and Capan-2 cells ($p<0.01$). Taken together, these data show that miR-219-1-3p modulates biological properties of PDAC cells by inhibiting both their proliferation and their migration.

miR-219-1-3p biological activities impair signalling pathways associated with cell cycle, cell proliferation and cell survival

To decipher the molecular mechanisms related to the decreased proliferation observed in PDAC cells transiently over-expressing miR-219-1-3p, we assessed the expression of cyclin D1 cell cycle marker and the activation of Akt and Erk signaling pathways. Our results indicate that miR-219-1-3p overexpression induces a strong decrease of cyclin D1 expression in the three cell lines (Figure 3D). Furthermore, the phosphorylation levels of Akt and Erk were also decreased in miR-219-1-3p-transfected cells compared with scramble-transfected cells. These results indicate that miR-219-1-3p reduces PDAC cell proliferation by inhibiting cell cycle progression, and proliferation- and survival-associated signalling pathway activation.

To further demonstrate the biological activities of miR-219-1-3p, we generated two pancreatic stable cell lines over-expressing miR-219-1-3p. Successful and significant over-expression of miR-219-1-3p in Capan-1 (Capan-1 LV miR-219, 6.34 fold, $p<0.001$) and in Capan-2 (Capan-2 LV miR-219, 12.68 fold, $p<0.001$) cells was confirmed by qRT-PCR

(Supplementary Figure S1C). Over-expression of miR-219-1-3p (i) inhibited MUC4 protein expression by 60% in Capan-1 cells and by 80% in Capan-2 cells (Figure 4A), (ii) significantly slowed-down the proliferation of Capan-1 at 96h ($p<0.05$) and of Capan-2 as early as 72h ($p<0.001$) that sustained until 96h ($p<0.001$) (Figure 4B) and (iii) reduced their migrating capacity (Capan-1, $p<0.001$ and Capan-2 $p<0.01$) (Figure 4C). Stable over-expression of miR-219-1-3p led to a decrease of cyclin D1 expression and a decrease of both Erk and Akt (Capan-2) activation (Figure 4D). Taken together, these results indicate that stable over-expression of miR-219-1-3p in PDAC cells led to the same biological effects (decreased proliferation and decreased migration) as those observed in transiently transfected cells.

miR-219-1-3p inhibits pancreatic tumor progression *in vivo*

To further assess the tumor suppressive activity of miR-219-1-3p *in vivo*, a xenograft tumor model was established with Capan-2 cells in SCID mice. As shown in figure 5A, intratumoral injection of miR-219-1-3p led to a significant decrease ($p<0.05$) of the tumor volume 7 days post-injection that further decreased at 11 days post-injection ($p<0.05$). Measurement of the expression of miR-219-1-3p and MUC4 in these tumors confirmed the high expression of miR-219-1-3p in tumors (Figure 5B) and the converse correlation with MUC4 that was no longer expressed in miR-219-1-3p positive tumors when compared with controls (Figure 5C). Thus, these results confirm the tumor suppressor activity of miR-219-1-3p on PDAC cell growth and the converse correlation between miR-219-1-3p and MUC4 expression in pancreatic tumors.

Muc4 expression is conversely correlated to miR-219-1-3p expression in early PanIN lesions

To establish a correlation between MUC4 and miR-219-1-3p expression early in the development of pancreatic cancer, their expression was studied in the pancreas of the *Pdx1-Cre;LStopL-Kras^{G12D}* preclinical mouse model of pancreatic cancer. We found that miR-219-1-3p was strongly expressed in normal acinar cells ($Kras^{WT}$) (Figure 6A). In PanINs lesions ($Kras^{G12D}$), miR-219-1-3p expression was strongly decreased, was observed in ductal neoplastic cells, and was conversely correlated to that of Muc4. Immunohistochemistry and qRT-PCR were then used to measure Muc4 and miR-219-1-3p expression levels in PanINs lesions. In mouse PanIN lesions ($Kras^{G12D}$), miR-219-1-3p expression was significantly decreased ($p < 0.001$) when compared to normal pancreatic tissue ($Kras^{WT}$) (Figure 6B). We then calculated a score that established that PanINs lesions with a high miR-219-1-3p expression level had a low Muc4 expression and *vice-versa* in low miR-219-1-3p expressing tissues, Muc4 was high (Figure 6C). In conclusion, Muc4 over-expression in mouse PanIN lesions is associated with miR-219-1-3p loss of expression suggesting, in addition to the data obtained in xenograft studies, that the up-regulation of Muc4 in early PanINs lesions may result from the repression of miR-219-1-3p.

Discussion

In this study, we have identified miR-219-1-3p as a novel negative regulator of MUC4 mucin expression in PDAC cells as early as in PanIN1/2 neoplastic lesions. Moreover, we show that miR-219-1-3p inhibits pancreatic cancer cell proliferation and migration both *in vitro* and *in vivo*. MiR-219-1-3p appears thus as a good target to (1) reduce pancreatic cancer cell proliferation and (2) inhibit expression of oncogenic MUC4 mucin.

MUC4 is an actor of pancreatic tumorigenesis as it contributes to tumor progression by inducing cell proliferation, survival and migration [3, 24, 25]. Moreover neo-expression of MUC4 in the early stages of pancreatic carcinogenesis confers to this mucin a potential interest as a therapeutic target in pancreatic cancer [6, 26]. Although molecular mechanisms responsible for the induction of MUC4 expression in cancer are not well-defined, it is known that MUC4 may be regulated at the transcriptional level *via* the epidermal growth factor [15] and transforming growth factor β [8, 27] pathways among others [28] and at the epigenetic level *via* DNA methylation and histone modifications [7]. Recently, miRNAs were shown to be involved in posttranscriptional regulation of MUC4 [9]. In the present study using complementary approaches (stable and transient transfections *in vitro* and *in vivo* models) we demonstrate that MUC4 is a functional target of miR-219-1-3p. We showed that miR-219-1-3p inhibits MUC4 expression at the protein level, that miR-219-1-3p directly interacts with *MUC4* mRNA and that miR-219-1-3p exerts its repressive effect by binding to the two nucleotidic sites in the *MUC4* 3'-UTR. We showed that overexpression of miR-219-1-3p inhibits cell proliferation and reduces migration of PDAC cells. MUC4 is known to be involved in Akt and MAPK survival signalling pathways and cell cycle progression regulation [3]. Inhibition of cell proliferation by miR-219-1-3p prompted us to study MUC4 downstream survival signalling pathways in the context of its regulation by miR-219-1-3p. We found that cyclin D1 expression decreased concomitantly to the inhibition of activation of Akt and

MAPK signalling pathways. Since, increasing evidence indicate that miRNAs influence cellular behaviour through the regulation of multiple target genes, we searched the putative targets of miR-219-1-3p using an *in silico* approach. From this, two putative targets, CDK1 and ICAM-1, were identified that promote cell proliferation and migration, respectively. However, pull-down experiments did not allow us to validate these targets in pancreatic cancer cells (data not shown). Therefore, this indicates that miR-219-1-3p may act as a tumor suppressor in PDAC development mainly by targeting the oncogenic mucin MUC4 and by affecting MUC4 signalling. In agreement with this observation, we found in the *Pdx1-Cre;LSL-Kras^{G12D}* mouse model that miR-219-1-3p expression was conversely correlated to the expression of Muc4. Moreover, in the three human PDAC tissues in which miR-219-1-3p was overexpressed, MUC4 neo-expression was not observed (data not shown). Hence, MUC4 regulation by miR-219-1-3p expression seems to be a conserved mechanism between these two species.

MIR219-1 was initially described as a brain-specific miRNA as a clock and light regulated gene playing a role in regulating the length of the circadian cycle [29] and a key regulator of oligodendrocyte differentiation [30, 31]. Down-regulation of miR-219-1-3p in PDAC cell lines and PDAC tissues, found in this report, suggests a new tumor suppressive function for this miRNA in pancreatic cancer. To determine the mechanisms underlying miR-219-1-3p downregulation, we searched for the genomic region containing *MIR219-1* gene using the UCSC Genome Browser and we observed that *MIR219-1* gene is located within a CpG island. 5-aza-2'-deoxycytidine treatment of pancreatic cancer cells was used to determine whether DNA hypermethylation could impair miR-219-1-3p expression. Our unpublished results indicate that inhibition of DNA methylation indeed leads to up-regulation of miR-219-1-3p expression, suggesting that aberrant DNA methylation is associated with miR-219-1-3p silencing in PDAC cells (data not shown). Another mechanism which could control miR-219-

1-3p expression is genetic alteration. The majority of miRNAs are located in cancer-associated genomic regions such as common breakpoint regions, fragile sites, minimal regions of loss of heterozygosity and amplification [32]. By genomic sequence analysis Xu *et al.* mapped the *MIR219-1* gene to chromosome 6p21.32 [33]. Genome-wide copy number analysis in PDAC enabled the identification of the 6p region as a region of high frequency loss [34, 35] suggesting that the chromosomal region in which lies *MIR219-1* may be the subject of genetic alterations. Therefore, epigenetic and/or genetic mechanisms may also be responsible for *MIR219-1* silencing in PDAC, which is another argument to propose miR-219-1-3p as a good tumor suppressor candidate.

As we were studying MUC4 regulation by miR-219-1-3p, several studies proposed miRNAs signatures of pancreatic cancer [36-38]. In the most recent study Schultz *et al.* performed a miRNA profiling array using for the first time non micro-dissected human tissues in order to discover new miRNA differentially expressed in pancreatic tissues, including stromal and cancer cells, comparing pancreatic adenocarcinoma to normal pancreas [39]. Among the miRNAs that were down-regulated in PDAC compared to normal tissues, miR-219-1-3p emerged as one of the most relevant, confirming the interest of studying the biological role of this miRNA for which nothing was known in pancreatic carcinogenesis. However, to date, a very small number of studies explored miRNAs expression alterations in PanIN lesions [40-42]. Our analysis of miR-219-1-3p expression in genetically engineered mice *Kras*^{G12D}-driven pancreatic cancer model allowed us to show that miR-219-1-3p down-regulation is an early event of pancreatic carcinogenesis as miR-219-1-3p expression is lost in the pre-neoplastic precursor lesions PanINs.

Based on these observations, the early miR-219-1-3p repression and the resulting increased expression of the transmembrane mucin MUC4 may represent two key events that favor pancreatic tumor progression. It is therefore tempting to speculate that induction of MUC4

expression in the early steps of pancreatic carcinogenesis is epigenetically regulated by DNA methylation at two levels (1) directly on its 5'-UTR [7] and (2) *via* repression of its inhibitor miR-219-1-3p (this report). Hence, identification of these two mechanisms regulating MUC4 expression in pancreatic cancer gives new insight to develop a novel therapeutic approach targeting MUC4 that would combine miRNA and methylated gene-specific reactivation using artificial transcription factors [43].

In summary, our findings indicate that miR-219-1-3p is a good tumor-suppressor candidate inhibiting both MUC4 expression and MUC4 downstream signalling pathways, highlighting the therapeutic potential of miR-219-1-3p in pancreatic cancer.

Acknowledgments

We thank D. Tuveson (Cambridge Research Institute, England) for the kind gift of *LStopL-Kras^{G12D}* mouse model, Dr M. S. Tsao (University Health Network, Toronto, Canada) for the kind gift of HPDE cells, M.H. Gevaert and R. Siminsky (Department of Histology, Faculty of Medicine, University of Lille 2) for their technical help, Dr C. Cauffiez (EA4483, University of Lille 2) and Dr M. Perrais (Inserm UMR837, team 5, Lille) for the *in situ* hybridization studies, the technical platform IFR114/IMPRT for luciferase measurements (A.S Drucbert) and the Biopathology Center (Centre Hospitalier Régional et Universitaire de Lille, oncogenetic department) for Kras mutation studies by pyrosequencing (Dr M.-P. Buisine).

References

- 1 Vincent A, Herman J, Schulick R, Hruban RH and Goggins M. Pancreatic cancer. *Lancet* 2011;378:607-20.
- 2 Hruban RH, Maitra A and Goggins M. Update on pancreatic intraepithelial neoplasia. *Int J Clin Exp Pathol* 2008;1:306-16.
- 3 Jonckheere N, Skrypek N, Merlin J, Dessein AF, Dumont P, Leteurtre E, et al. The Mucin MUC4 and Its Membrane Partner ErbB2 Regulate Biological Properties of Human CAPAN-2 Pancreatic Cancer Cells via Different Signalling Pathways. *PLoS One* 2012;7:e32232.
- 4 Jonckheere N and Van Seuning I. The membrane-bound mucins: From cell signalling to transcriptional regulation and expression in epithelial cancers. *Biochimie* 2010;92:1-11.
- 5 Skrypek N, Duchene B, Hebbar M, Leteurtre E, van Seuning I and Jonckheere N. The MUC4 mucin mediates gemcitabine resistance of human pancreatic cancer cells via the Concentrative Nucleoside Transporter family. *Oncogene* 2013;32:1714-1723.
- 6 Swartz MJ, Batra SK, Varshney GC, Hollingsworth MA, Yeo CJ, Cameron JL, et al. MUC4 expression increases progressively in pancreatic intraepithelial neoplasia. *Am J Clin Pathol* 2002;117:791-6.
- 7 Vincent A, Ducourouble MP and Van Seuning I. Epigenetic regulation of the human mucin gene MUC4 in epithelial cancer cell lines involves both DNA methylation and histone modifications mediated by DNA methyltransferases and histone deacetylases. *Faseb J* 2008;22:3035-45.
- 8 Jonckheere N, Perrais M, Mariette C, Batra SK, Aubert JP, Pigny P, et al. A role for human MUC4 mucin gene, the ErbB2 ligand, as a target of TGF-beta in pancreatic carcinogenesis. *Oncogene* 2004;23:5729-38.
- 9 Srivastava SK, Bhardwaj A, Singh S, Arora S, Wang B, Grizzle WE, et al. MicroRNA-150 directly targets MUC4 and suppresses growth and malignant behavior of pancreatic cancer cells. *Carcinogenesis* 2011;32:1832-9.
- 10 Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 2004;116:281-97.
- 11 Calin GA and Croce CM. MicroRNA signatures in human cancers. *Nat Rev Cancer* 2006;6:857-66.
- 12 Furukawa T, Duguid WP, Rosenberg L, Viallet J, Galloway DA and Tsao MS. Long-term culture and immortalization of epithelial cells from normal adult human pancreatic ducts transfected by the E6E7 gene of human papilloma virus 16. *Am J Pathol* 1996;148:1763-70.
- 13 Ouyang H, Mou L, Luk C, Liu N, Karaskova J, Squire J, et al. Immortal human pancreatic duct epithelial cell lines with near normal genotype and phenotype. *Am J Pathol* 2000;157:1623-31.
- 14 Torrisani J, Bouisson M, Puente E, Capella G, Laurent-Puig P, Berger A, et al. Transcription of SST2 somatostatin receptor gene in human pancreatic cancer cells is altered by single nucleotide promoter polymorphism. *Gastroenterology* 2001;120:200-9.
- 15 Perrais M, Pigny P, Ducourouble MP, Petitprez D, Porchet N, Aubert JP, et al. Characterization of human mucin gene MUC4 promoter: importance of growth factors and proinflammatory cytokines for its regulation in pancreatic cancer cells. *J Biol Chem* 2001;276:30923-33.
- 16 Perrais M, Pigny P, Copin MC, Aubert JP and Van Seuning I. Induction of MUC2 and MUC5AC mucins by factors of the epidermal growth factor (EGF) family is mediated by EGF receptor/Ras/Raf/extracellular signal-regulated kinase cascade and Sp1. *J Biol Chem* 2002;277:32258-67.

-
- 17 Torrisani J, Bournet B, du Rieu MC, Bouisson M, Souque A, Escourrou J, et al. let-7 MicroRNA transfer in pancreatic cancer-derived cells inhibits in vitro cell proliferation but fails to alter tumor progression. *Hum Gene Ther* 2009;20:831-44.
 - 18 Lal A, Thomas MP, Altschuler G, Navarro F, O'Day E, Li XL, et al. Capture of microRNA-bound mRNAs identifies the tumor suppressor miR-34a as a regulator of growth factor signaling. *PLoS Genet* 2011;7:e1002363.
 - 19 Van Seuning I, Perrais M, Pigny P, Porchet N and Aubert JP. Sequence of the 5'-flanking region and promoter activity of the human mucin gene MUC5B in different phenotypes of colon cancer cells. *Biochem J* 2000;348 Pt 3:675-86.
 - 20 Piessen G, Jonckheere N, Vincent A, Hemon B, Ducourouble MP, Copin MC, et al. Regulation of the human mucin MUC4 by taurodeoxycholic and taurochenodeoxycholic bile acids in oesophageal cancer cells is mediated by hepatocyte nuclear factor Ialpha. *Biochem J* 2007;402:81-91.
 - 21 Olive KP and Tuveson DA. The use of targeted mouse models for preclinical testing of novel cancer therapeutics. *Clin Cancer Res* 2006;12:5277-87.
 - 22 Jonckheere N, Vincent A, Perrais M, Ducourouble MP, Male AK, Aubert JP, et al. The human mucin MUC4 is transcriptionally regulated by caudal-related homeobox, hepatocyte nuclear factors, forkhead box A, and GATA endodermal transcription factors in epithelial cancer cells. *J Biol Chem* 2007;282:22638-50.
 - 23 van der Sluis M, Melis MH, Jonckheere N, Ducourouble MP, Buller HA, Renes I, et al. The murine Muc2 mucin gene is transcriptionally regulated by the zinc-finger GATA-4 transcription factor in intestinal cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;325:952-60.
 - 24 Chaturvedi P, Singh AP, Moniaux N, Senapati S, Chakraborty S, Meza JL, et al. MUC4 mucin potentiates pancreatic tumor cell proliferation, survival, and invasive properties and interferes with its interaction to extracellular matrix proteins. *Mol Cancer Res* 2007;5:309-20.
 - 25 Jonckheere N and Van Seuning I. The membrane-bound mucins: how large O-glycoproteins play key roles in epithelial cancers and hold promise as biological tools for gene-based and immunotherapies. *Crit Rev Oncog* 2008;14:177-96.
 - 26 Jonckheere N, Skrypek N and van Seuning I. Mucins and pancreatic cancer. *Cancers* 2010;2:1794-1812.
 - 27 Andrianifahanana M, Agrawal A, Singh AP, Moniaux N, van Seuning I, Aubert JP, et al. Synergistic induction of the MUC4 mucin gene by interferon-gamma and retinoic acid in human pancreatic tumour cells involves a reprogramming of signalling pathways. *Oncogene* 2005;24:6143-54.
 - 28 Singh AP, Chauhan SC, Andrianifahanana M, Moniaux N, Meza JL, Copin MC, et al. MUC4 expression is regulated by cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in pancreatic adenocarcinoma cells via transcriptional and post-translational mechanisms. *Oncogene* 2007;26:30-41.
 - 29 Cheng HY, Papp JW, Varlamova O, Dziema H, Russell B, Curfman JP, et al. microRNA modulation of circadian-clock period and entrainment. *Neuron* 2007;54:813-29.
 - 30 Dugas JC, Cuellar TL, Scholze A, Ason B, Ibrahim A, Emery B, et al. Dicer1 and miR-219 Are required for normal oligodendrocyte differentiation and myelination. *Neuron* 2010;65:597-611.
 - 31 Zhao X, He X, Han X, Yu Y, Ye F, Chen Y, et al. MicroRNA-mediated control of oligodendrocyte differentiation. *Neuron* 2010;65:612-26.
 - 32 Calin GA, Sevignani C, Dumitru CD, Hyslop T, Noch E, Yendamuri S, et al. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:2999-3004.

-
- 33 Xu S, Witmer PD, Lumayag S, Kovacs B and Valle D. MicroRNA (miRNA) transcriptome of mouse retina and identification of a sensory organ-specific miRNA cluster. *J Biol Chem* 2007;282:25053-66.
- 34 Lin M, Cai D and Luo M. Identification of chromosomal imbalances in pancreatic carcinoma using comparative genomic hybridization. *Chin Med J (Engl)* 2003;116:1156-60.
- 35 Mahlamaki EH, Barlund M, Tanner M, Gorunova L, Hoglund M, Karhu R, et al. Frequent amplification of 8q24, 11q, 17q, and 20q-specific genes in pancreatic cancer. *Genes Chromosomes Cancer* 2002;35:353-8.
- 36 Bloomston M, Frankel WL, Petrocca F, Volinia S, Alder H, Hagan JP, et al. MicroRNA expression patterns to differentiate pancreatic adenocarcinoma from normal pancreas and chronic pancreatitis. *JAMA* 2007;297:1901-8.
- 37 Lee EJ, Gusev Y, Jiang J, Nuovo GJ, Lerner MR, Frankel WL, et al. Expression profiling identifies microRNA signature in pancreatic cancer. *Int J Cancer* 2007;120:1046-54.
- 38 Szafranska AE, Davison TS, John J, Cannon T, Sipos B, Maghnoij A, et al. MicroRNA expression alterations are linked to tumorigenesis and non-neoplastic processes in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Oncogene* 2007;26:4442-52.
- 39 Schultz NA, Werner J, Willenbrock H, Roslind A, Giese N, Horn T, et al. MicroRNA expression profiles associated with pancreatic adenocarcinoma and ampullary adenocarcinoma. *Mod Pathol* 2012;25:1609-22.
- 40 du Rieu MC, Torrisani J, Selves J, Al Saati T, Souque A, Dufresne M, et al. MicroRNA-21 is induced early in pancreatic ductal adenocarcinoma precursor lesions. *Clin Chem* 2010;56:603-12.
- 41 LaConti JJ, Shivapurkar N, Preet A, Deslattes Mays A, Peran I, Kim SE, et al. Tissue and serum microRNAs in the Kras(G12D) transgenic animal model and in patients with pancreatic cancer. *PLoS One* 2011;6:e20687.
- 42 Yu J, Li A, Hong SM, Hruban RH and Goggins M. MicroRNA alterations of pancreatic intraepithelial neoplasias. *Clin Cancer Res* 2012;18:981-92.
- 43 Zhang B, Xiang S, Zhong Q, Yin Y, Gu L and Deng D. The p16-specific reactivation and inhibition of cell migration through demethylation of CpG islands by engineered transcription factors. *Hum Gene Ther* 2012;23:1071-81.

Figure legends

Figure 1. miR-219-1-3p is downregulated in pancreatic cancer cell lines and PDAC tissues.

(A) Identification of two putative miR-219-1-3p binding sequences in the *MUC4* 3'-UTR at nucleotides 19-40 (site #1) and 356-372 (site #2). Alignment of the hsa-miR-219-1-3p seed region in different species (human Hs, mouse Mm, rat Rn and chimpanzee Ptr) demonstrates conservation across species. (B) MiR-219-1-3p expression was determined by qRT-PCR in five pancreatic cancer cell lines and compared to the HPDE cells (arbitrarily set to 1). (C) qRT-PCR analysis of miR-219-1-3p expression in 22 paired human pancreatic cancers and their corresponding healthy tissues. Results are expressed using $2^{-\Delta C_t}$ method ($\Delta C_t = C_t \text{ miR-219-1-3p} - C_t \text{ U6}$). MiR-219-1-3p expression in PDAC tissues and non tumoral pancreatic tissues were compared using the Wilcoxon signed-rank test ($p < 0.05$ *).

Figure 2. miR-219-1-3p directly inhibits the expression of MUC4 through its 3'-UTR. (A)

Western-blotting analysis of MUC4 and β -actin expression in Capan-1, Capan-2 and BxPC-3 cells not transfected (untreated) or transfected with either scramble pre-miRNA (scramble) or pre-miR-219-1-3p (miR-219-1-3p) (left panel) and Capan-2 and BxPC-3 cells transfected with anti-miR scramble or anti-miR-219-1-3p (right panel). (B) Biotinylated miR-219-1-3p or scramble miRNAs were transfected in Capan-2 cells. Enrichment of *MUC4* mRNA was assessed by qRT-PCR. The MUC4/GAPDH ratio was calculated and normalized to the input. (C, D) Cells were cotransfected with a reporter plasmid containing either the wild-type (WT) or mutant versions in binding site #1 (site #1 mut) or binding site #2 (site #2 mut) of pGL3-*MUC4*-3'-UTR in the presence of pre-miR-219-1-3p or scramble pre-miRNA (C) or in the presence of anti-miR-219-1-3p or scramble anti-miRNA (D). Luciferase activity in (C) scramble miR- or (D) scramble anti-miR-transfected cells was arbitrarily set to 1. Data are

reported as mean \pm SEM for three independent experiments ($p < 0.05$ *, $p < 0.01$ ** or $p < 0.001$ ***).

Figure 3. miR-219-1-3p inhibits pancreatic cancer cell proliferation and migration. (A) Overexpression of miR-219-1-3p inhibits proliferation of Capan-1, Capan-2 and BxPC-3 cells. (B) Inhibition of miR-219-1-3p increases proliferation of Capan-2 and BxPC-3 cells. (C) Capan-1, Capan-2 and BxPC-3 cells were transfected with pre-miR-219-1-3p or scramble pre-miRNA for 24 h. Results are expressed as average migrating cell number per field. Data are reported as mean \pm SEM for three independent experiments ($p < 0.05$ *, $p < 0.01$ ** or $p < 0.001$ ***). (D) MiR-219-1-3p inhibits proliferation and signaling pathways downstream of MUC4. Western-blotting analysis of cyclin D1, p-Akt, Akt, p-Erk and Erk levels in Capan-1, Capan-2 and BxPC-3 cells after miR-219-1-3p transfection. β -actin serves as the loading control.

Figure 4. Characterization of stable miR-219-1-3p expressing cell lines. (A) Western-blotting analysis of MUC4 and β -actin expression in Capan-1 LV miR-219, Capan-2 LV miR-219 and their controls Capan-1 LV miR-Neg and Capan-2 LV miR-Neg. (B) Proliferation and (C) migration properties of Capan-1 LV miR-219 and Capan-2 LV miR-219 cells compared to their controls (LV miR-Neg). Data are reported as mean \pm SEM for three independent experiments ($p < 0.05$ *, $p < 0.01$ ** or $p < 0.001$ ***). (D) Western-blot analysis of cyclin D1 and Akt and Erk signaling pathways.

Figure 5. miR-219-1-3p inhibits pancreatic tumor cell growth *in vivo*. (A) Capan-2 cells were xenografted subcutaneously into SCID mice and the established tumors (11 days) were then treated with either pcDNA6.2-miR-neg or pcDNA6.2-miR-219 vectors. Tumor growth was

measured for 11 days after injection and tumor volume was calculated ($p < 0.05$ *). Results are expressed as means of tumor volume. (B) Expression of miR-219-1-3p in the xenografted tumors was evaluated by qRT-PCR ($p < 0.001$ ***). (C) Expression of MUC4 in the xenografted tumors was measured by immunohistochemistry.

Figure 6. miR-219-1-3p expression is conversely correlated to Muc4 expression in early pancreatic PanIN lesions. (A) Hematoxylin and eosin staining (left panel), MUC4 IHC (middle panel) and miR-219-1-3p ISH (right panel) in mice tissues. (B) Expression of miR-219-1-3p in PanINs ($Kras^{G12D}$) and normal pancreas ($Kras^{WT}$) by qRT-PCR. Data were normalized to U6 expression and expressed as $2^{-\Delta Ct}$ ($p < 0.001$ ***). (C) Correlation analysis between miR-219-1-3p expression and Muc4 expression. Statistical analyses were performed using Pearson's correlation coefficient ($r = -0.2$, $p > 0.05$).

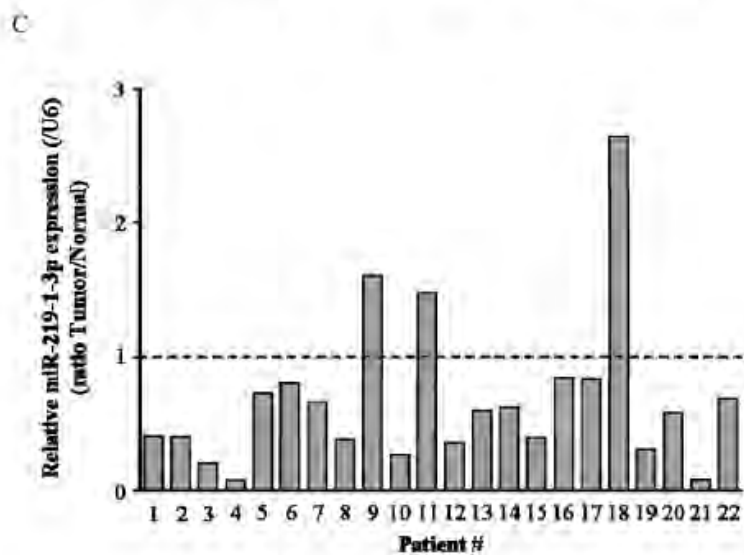
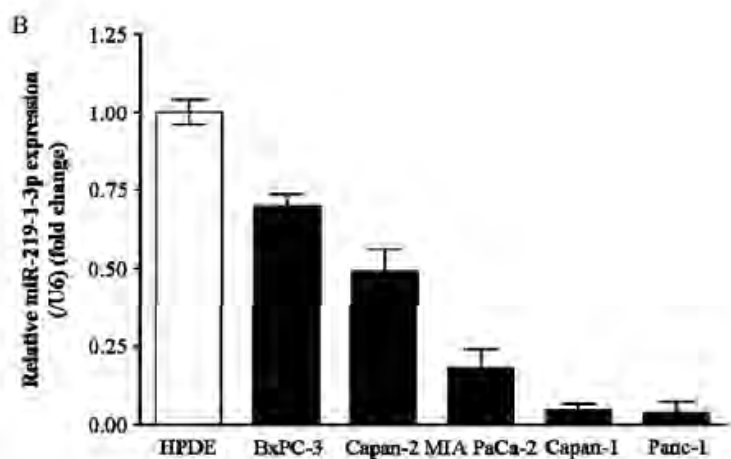
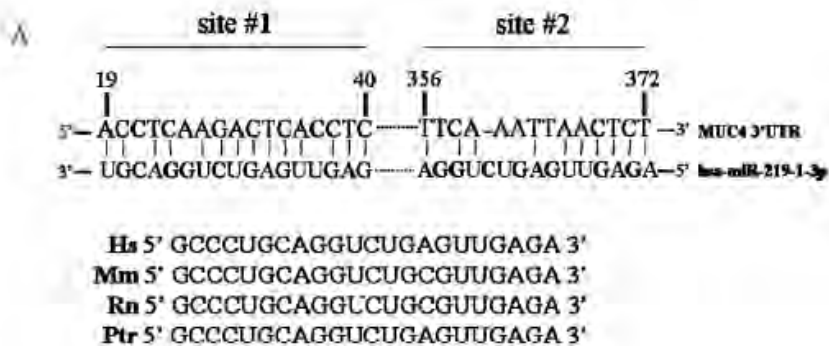


Figure 1

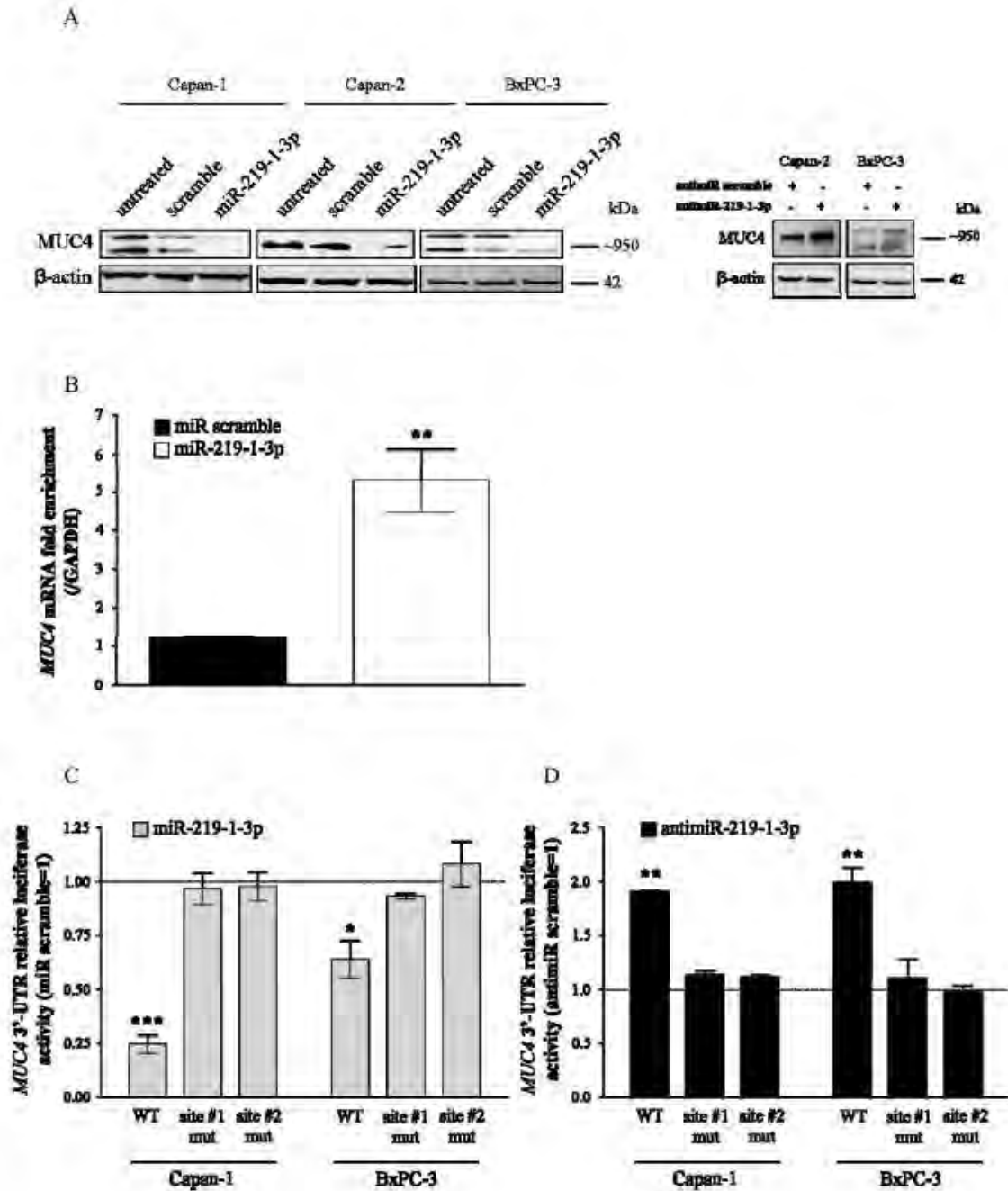


Figure 2

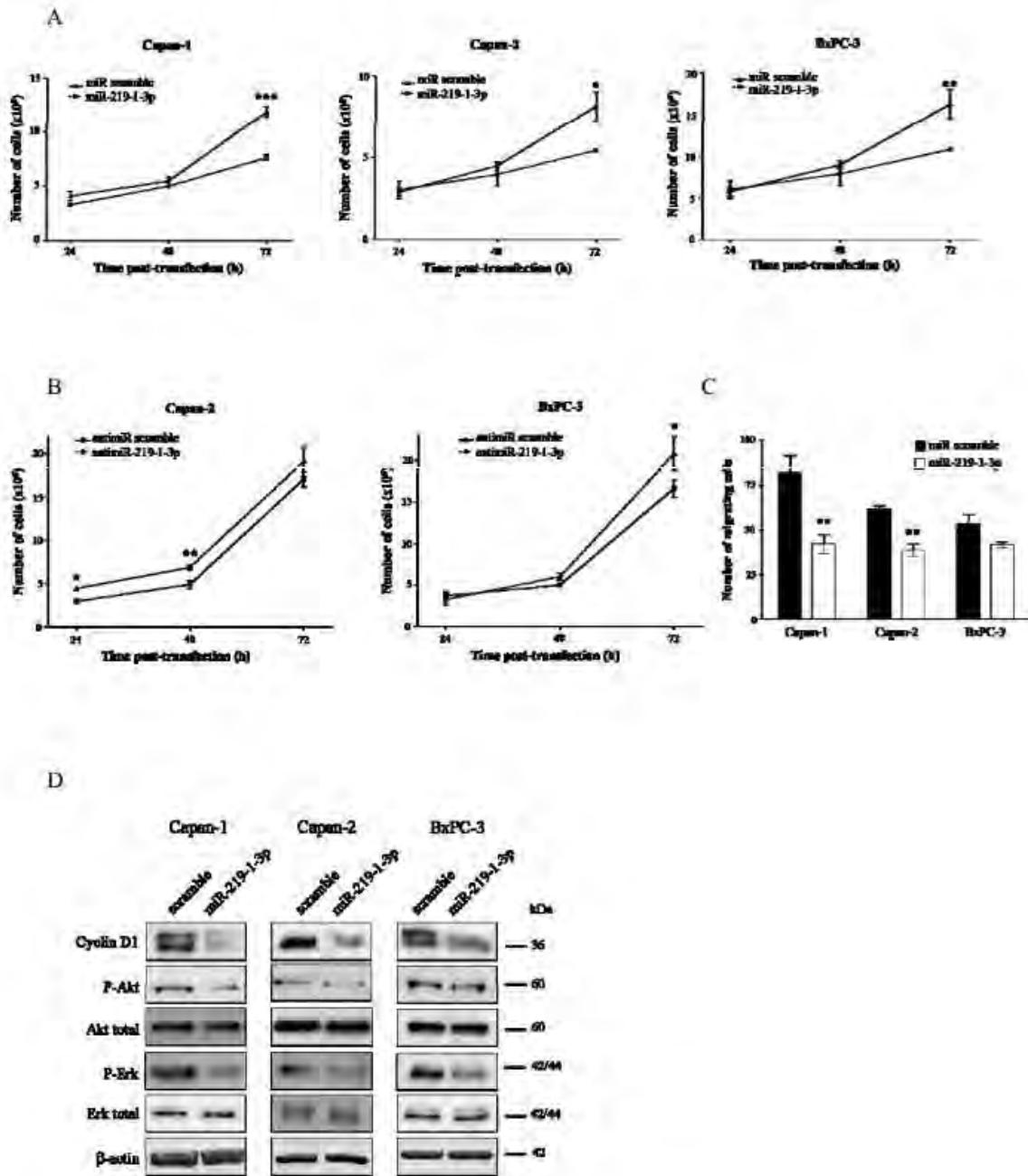


Figure 3

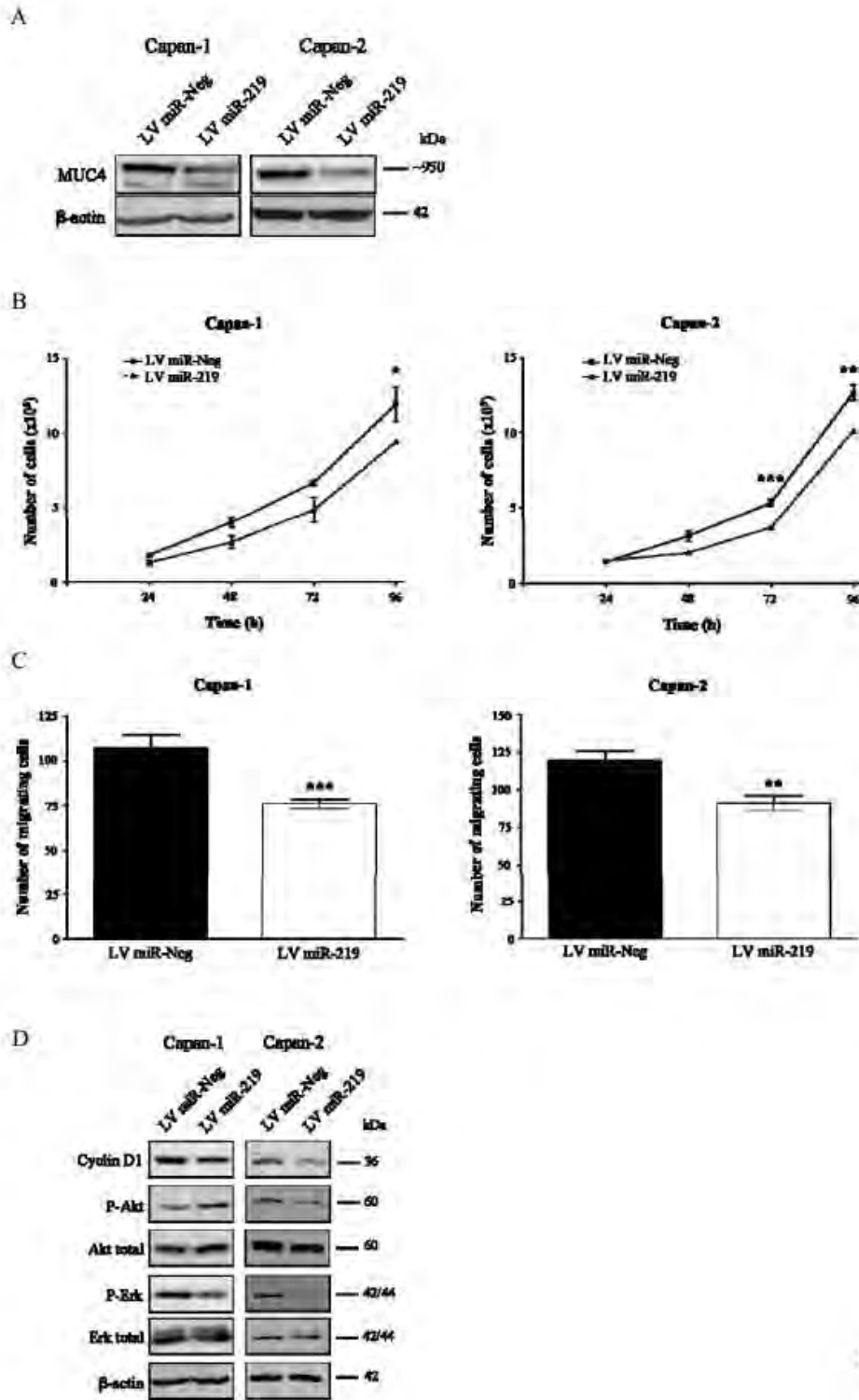


Figure 4

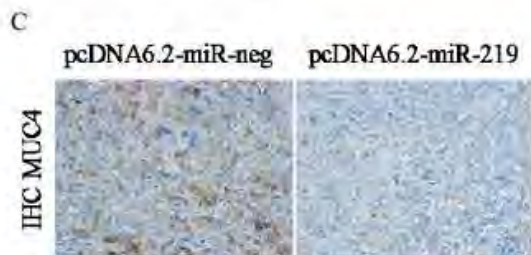
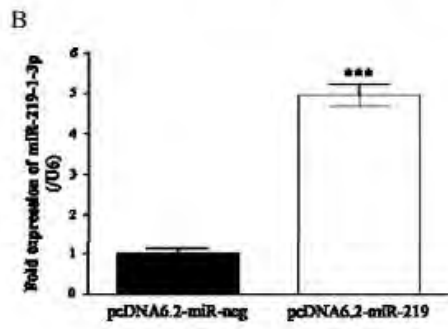
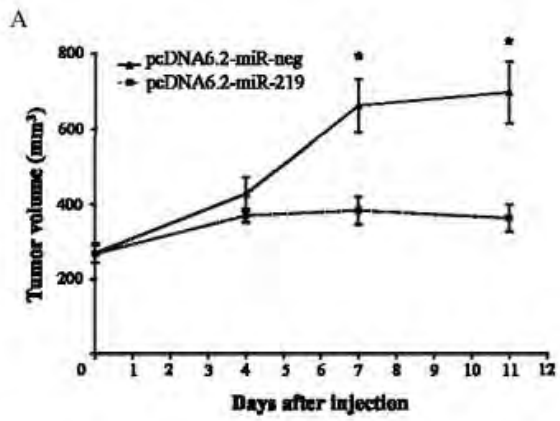


Figure 5

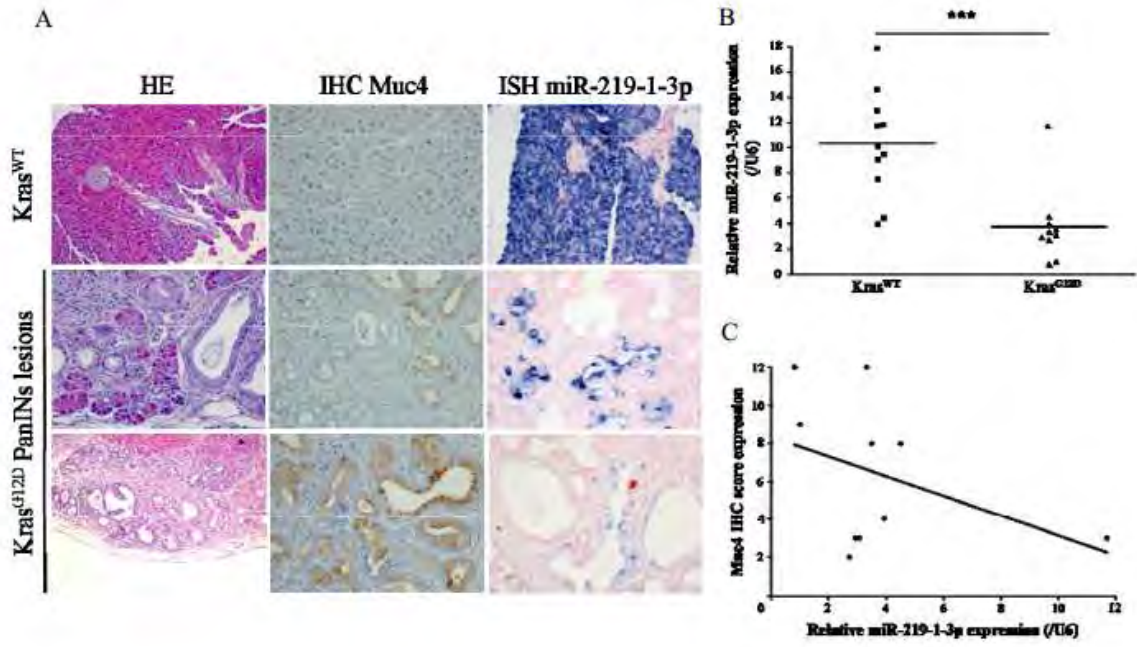
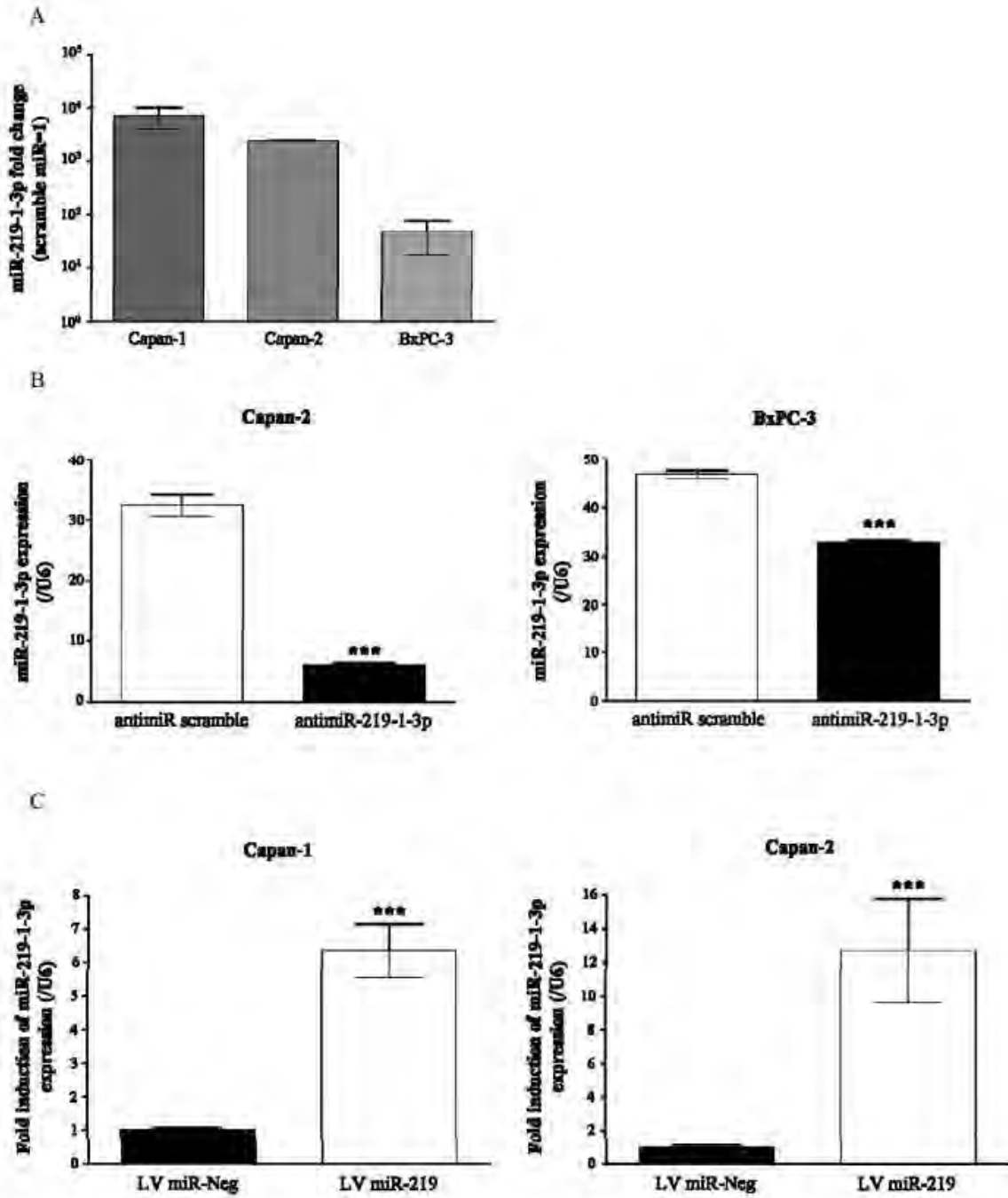


Figure 6



Supplemental Figure S1

	HPDE	Capan-1	Capan-2	BxPC-3	Panc-1	MIA PaCa-2
KRAS mutation	WT	MUT	MUT	WT	MUT	MUT
MUC1	+	+	+	+	+	+
MUC4	-	+	+	+	-	-
MUC5AC	+	-	-	-	-	+
ErbB2	+	+	+	+	+	+

Supplemental Table1

Supplemental figure legends

Figure S1. (A) miR-219-1-3p fold change after miR-219-1-3p transient transfection in Capan-1, Capan-2 and BxPC-3 cell lines compared to cells transfected with scramble miRNA (arbitrary unit = 1). (B) miR-219-1-3p expression after anti-miR-219-1-3p or scramble anti-miR transient transfection in Capan-2 and BxPC-3 cell lines. (C) miR-219-1-3p induction in Capan-1 and Capan-2 cell lines stably over-expressing miR-219-1-3p (LV miR-219) compared with control cells (LV miR-Neg). Values represent the mean of three independent experiments. Expression of miR-219-1-3p has been calculated using $2^{-\Delta C_t}$ method. MiR-219-1-3p expression level was normalized to that of U6. (p<0.001 ***).

Table S1. Characterization of human pancreatic cell lines. *KRAS* mutation (codon 12) was detected by pyrosequencing. Mucin (MUC1, MUC4 and MUC5AC) and ErbB2 expression was determined by RT-PCR and/or immunoblotting. ND: not determined; WT: wild type; MUT: mutated; - not expressed; + expressed.

VII. Références bibliographiques

1. Holliday R (2006) Epigenetics: a historical overview. *Epigenetics Off J Dna Methylation Soc* 1: 76–80.
2. Ernst J, Kellis M (2010) Discovery and characterization of chromatin states for systematic annotation of the human genome. *Nat Biotechnol* 28: 817–825. doi:10.1038/nbt.1662.
3. Kim JK, Samaranyake M, Pradhan S (2009) Epigenetic mechanisms in mammals. *Cell Mol Life Sci* 66: 596–612. doi:10.1007/s00018-008-8432-4.
4. Luger K, Dechassa ML, Tremethick DJ (2012) New insights into nucleosome and chromatin structure: an ordered state or a disordered affair? *Nat Rev Mol Cell Biol* 13: 436–447. doi:10.1038/nrm3382.
5. Strahl BD, Allis CD (2000) The language of covalent histone modifications. *Nature* 403: 41–45. doi:10.1038/47412.
6. Rando OJ (2012) Combinatorial complexity in chromatin structure and function: revisiting the histone code. *Curr Opin Genet Dev* 22: 148–155. doi:10.1016/j.gde.2012.02.013.
7. Francis NJ, Kingston RE (2001) Mechanisms of transcriptional memory. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2: 409–421. doi:10.1038/35073039.
8. Ng K, Pullirsch D, Leeb M, Wutz A (2007) Xist and the order of silencing. *EMBO Rep* 8: 34–39. doi:10.1038/sj.embor.7400871.
9. Zinshteyn B, Nishikura K (2009) Adenosine-to-inosine RNA editing. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med* 1: 202–209. doi:10.1002/wsbm.10.
10. Wyatt GR (1951) Recognition and estimation of 5-methylcytosine in nucleic acids. *Biochem J* 48: 581–584.
11. Griffith JS, Mahler HR (1969) DNA ticketing theory of memory. *Nature* 223: 580–582.
12. Holliday R, Pugh JE (1975) DNA modification mechanisms and gene activity during development. *Science* 187: 226–232.
13. Riggs AD (1975) X inactivation, differentiation, and DNA methylation. *Cytogenet Cell Genet* 14: 9–25.
14. Bird A (2002) DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev* 16: 6–21. doi:10.1101/gad.947102.
15. Ramsahoye BH, Biniszkiwicz D, Lyko F, Clark V, Bird AP, et al. (2000) Non-CpG methylation is prevalent in embryonic stem cells and may be mediated by DNA methyltransferase 3a. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 5237–5242.

16. Ehrlich M, Gama-Sosa MA, Huang LH, Midgett RM, Kuo KC, et al. (1982) Amount and distribution of 5-methylcytosine in human DNA from different types of tissues of cells. *Nucleic Acids Res* 10: 2709.
17. Takai D, Jones PA (2002) Comprehensive analysis of CpG islands in human chromosomes 21 and 22. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 3740–3745. doi:10.1073/pnas.052410099.
18. Gardiner-Garden M, Frommer M (1987) CpG islands in vertebrate genomes. *J Mol Biol* 196: 261–282.
19. Wang Y, Leung FCC (2004) An evaluation of new criteria for CpG islands in the human genome as gene markers. *Bioinforma Oxf Engl* 20: 1170–1177. doi:10.1093/bioinformatics/bth059.
20. Weber M, Hellmann I, Stadler MB, Ramos L, Pääbo S, et al. (2007) Distribution, silencing potential and evolutionary impact of promoter DNA methylation in the human genome. *Nat Genet* 39: 457–466. doi:10.1038/ng1990.
21. Illingworth R, Kerr A, Desousa D, Jørgensen H, Ellis P, et al. (2008) A novel CpG island set identifies tissue-specific methylation at developmental gene loci. *Plos Biol* 6: e22. doi:10.1371/journal.pbio.0060022.
22. Bird A, Taggart M, Frommer M, Miller OJ, Macleod D (1985) A fraction of the mouse genome that is derived from islands of nonmethylated, CpG-rich DNA. *Cell* 40: 91–99.
23. Gama-Sosa MA, Midgett RM, Slagel VA, Githens S, Kuo KC, et al. (1983) Tissue-specific differences in DNA methylation in various mammals. *Biochim Biophys Acta* 740: 212–219.
24. Bourc'his D, Bestor TH (2004) Meiotic catastrophe and retrotransposon reactivation in male germ cells lacking Dnmt3L. *Nature* 431: 96–99. doi:10.1038/nature02886.
25. Yoder JA, Walsh CP, Bestor TH (1997) Cytosine methylation and the ecology of intragenomic parasites. *Trends Genet Tigr* 13: 335–340.
26. Jones PA (2012) Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond. *Nat Rev Genet* 13: 484–492. doi:10.1038/nrg3230.
27. Santi DV, Garrett CE, Barr PJ (1983) On the mechanism of inhibition of DNA-cytosine methyltransferases by cytosine analogs. *Cell* 33: 9–10.
28. Bestor TH (2000) The DNA methyltransferases of mammals. *Hum Mol Genet* 9: 2395–2402.
29. Siedlecki P, Zielenkiewicz P (2006) Mammalian DNA methyltransferases. *Acta Biochim Pol* 53: 245–256.

30. Chen T, Li E (2004) Structure and function of eukaryotic DNA methyltransferases. *Curr Top Dev Biol* 60: 55–89. doi:10.1016/S0070-2153(04)60003-2.
31. Bachman KE, Rountree MR, Baylin SB (2001) Dnmt3a and Dnmt3b are transcriptional repressors that exhibit unique localization properties to heterochromatin. *J Biol Chem* 276: 32282–32287. doi:10.1074/jbc.M104661200.
32. Chen T, Ueda Y, Xie S, Li E (2002) A novel Dnmt3a isoform produced from an alternative promoter localizes to euchromatin and its expression correlates with active de novo methylation. *J Biol Chem* 277: 38746–38754. doi:10.1074/jbc.M205312200.
33. Okano M, Xie S, Li E (1998) Cloning and characterization of a family of novel mammalian DNA (cytosine-5) methyltransferases. *Nat Genet* 19: 219–220. doi:10.1038/890.
34. Chen T, Ueda Y, Dodge JE, Wang Z, Li E (2003) Establishment and maintenance of genomic methylation patterns in mouse embryonic stem cells by Dnmt3a and Dnmt3b. *Mol Cell Biol* 23: 5594–5605.
35. Aoki A, Suetake I, Miyagawa J, Fujio T, Chijiwa T, et al. (2001) Enzymatic properties of de novo-type mouse DNA (cytosine-5) methyltransferases. *Nucleic Acids Res* 29: 3506–3512.
36. Hsieh CL (1999) In vivo activity of murine de novo methyltransferases, Dnmt3a and Dnmt3b. *Mol Cell Biol* 19: 8211–8218.
37. Saito Y, Kanai Y, Sakamoto M, Saito H, Ishii H, et al. (2002) Overexpression of a splice variant of DNA methyltransferase 3b, DNMT3b4, associated with DNA hypomethylation on pericentromeric satellite regions during human hepatocarcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 10060–10065. doi:10.1073/pnas.152121799.
38. Emburgh BOV, Robertson KD (2011) Modulation of Dnmt3b function in vitro by interactions with Dnmt3L, Dnmt3a and Dnmt3b splice variants. *Nucleic Acids Res.* Available: <http://nar.oxfordjournals.org/content/early/2011/03/04/nar.gkr116>.
39. Fuks F, Burgers WA, Godin N, Kasai M, Kouzarides T (2001) Dnmt3a binds deacetylases and is recruited by a sequence-specific repressor to silence transcription. *Embo J* 20: 2536–2544. doi:10.1093/emboj/20.10.2536.
40. Ling Y, Sankpal UT, Robertson AK, McNally JG, Karpova T, et al. (2004) Modification of de novo DNA methyltransferase 3a (Dnmt3a) by SUMO-1 modulates its interaction with histone deacetylases (HDACs) and its capacity to repress transcription. *Nucleic Acids Res* 32: 598–610. doi:10.1093/nar/gkh195.

41. Jeong S, Liang G, Sharma S, Lin JC, Choi SH, et al. (2009) Selective anchoring of DNA methyltransferases 3A and 3B to nucleosomes containing methylated DNA. *Mol Cell Biol* 29: 5366–5376. doi:10.1128/MCB.00484-09.
42. Sharma S, De Carvalho DD, Jeong S, Jones PA, Liang G (2011) Nucleosomes containing methylated DNA stabilize DNA methyltransferases 3A/3B and ensure faithful epigenetic inheritance. *Plos Genet* 7: e1001286. doi:10.1371/journal.pgen.1001286.
43. Aapola U, Kawasaki K, Scott HS, Ollila J, Vihinen M, et al. (2000) Isolation and initial characterization of a novel zinc finger gene, DNMT3L, on 21q22.3, related to the cytosine-5-methyltransferase 3 gene family. *Genomics* 65: 293–298. doi:10.1006/geno.2000.6168.
44. Hata K, Okano M, Lei H, Li E (2002) Dnmt3L cooperates with the Dnmt3 family of de novo DNA methyltransferases to establish maternal imprints in mice. *Dev Camb Engl* 129: 1983–1993.
45. Chen Z-X, Mann JR, Hsieh C-L, Riggs AD, Chédin F (2005) Physical and functional interactions between the human DNMT3L protein and members of the de novo methyltransferase family. *J Cell Biochem* 95: 902–917. doi:10.1002/jcb.20447.
46. Cheng X, Blumenthal RM (2008) Mammalian DNA Methyltransferases: A Structural Perspective. *Structure* 16: 341–350. doi:10.1016/j.str.2008.01.004.
47. Chen T, Tsujimoto N, Li E (2004) The PWWP Domain of Dnmt3a and Dnmt3b Is Required for Directing DNA Methylation to the Major Satellite Repeats at Pericentric Heterochromatin. *Mol Cell Biol* 24: 9048–9058. doi:10.1128/MCB.24.20.9048-9058.2004.
48. Takebayashi S, Tamura T, Matsuoka C, Okano M (2007) Major and Essential Role for the DNA Methylation Mark in Mouse Embryogenesis and Stable Association of DNMT1 with Newly Replicated Regions. *Mol Cell Biol* 27: 8243–8258. doi:10.1128/MCB.00899-07.
49. Ooi SKT, Qiu C, Bernstein E, Li K, Jia D, et al. (2007) DNMT3L connects unmethylated lysine 4 of histone H3 to de novo methylation of DNA. *Nature* 448: 714–717. doi:10.1038/nature05987.
50. Bestor TH (1988) Cloning of a mammalian DNA methyltransferase. *Gene* 74: 9–12.
51. Li E, Bestor TH, Jaenisch R (1992) Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. *Cell* 69: 915–926.
52. Pradhan S, Bacolla A, Wells RD, Roberts RJ (1999) Recombinant human DNA (cytosine-5) methyltransferase. I. Expression, purification, and comparison of de novo and maintenance methylation. *J Biol Chem* 274: 33002–33010.

53. McCabe MT, Davis JN, Day ML (2005) Regulation of DNA methyltransferase 1 by the pRb/E2F1 pathway. *Cancer Res* 65: 3624–3632. doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-2158.
54. Lin R-K, Wu C-Y, Chang J-W, Juan L-J, Hsu H-S, et al. (2010) Dysregulation of p53/Sp1 control leads to DNA methyltransferase-1 overexpression in lung cancer. *Cancer Res* 70: 5807–5817. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-4161.
55. Peterson EJ, Böglér O, Taylor SM (2003) p53-mediated repression of DNA methyltransferase 1 expression by specific DNA binding. *Cancer Res* 63: 6579–6582.
56. Torrisani J, Unterberger A, Tendulkar SR, Shikimi K, Szyf M (2007) AUF1 cell cycle variations define genomic DNA methylation by regulation of DNMT1 mRNA stability. *Mol Cell Biol* 27: 395–410. doi:10.1128/MCB.01236-06.
57. Tucker KL, Talbot D, Lee MA, Leonhardt H, Jaenisch R (1996) Complementation of methylation deficiency in embryonic stem cells by a DNA methyltransferase minigene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 12920–12925.
58. Yoder JA, Yen RW, Vertino PM, Bestor TH, Baylin SB (1996) New 5' regions of the murine and human genes for DNA (cytosine-5)-methyltransferase. *J Biol Chem* 271: 31092–31097.
59. Mertineit C, Yoder JA, Taketo T, Laird DW, Trasler JM, et al. (1998) Sex-specific exons control DNA methyltransferase in mammalian germ cells. *Dev Camb Engl* 125: 889–897.
60. Robertson KD, Keyomarsi K, Gonzales FA, Velicescu M, Jones PA (2000) Differential mRNA expression of the human DNA methyltransferases (DNMTs) 1, 3a and 3b during the G(0)/G(1) to S phase transition in normal and tumor cells. *Nucleic Acids Res* 28: 2108–2113.
61. Szyf M, Bozovic V, Tanigawa G (1991) Growth regulation of mouse DNA methyltransferase gene expression. *J Biol Chem* 266: 10027–10030.
62. Leonhardt H, Page AW, Weier HU, Bestor TH (1992) A targeting sequence directs DNA methyltransferase to sites of DNA replication in mammalian nuclei. *Cell* 71: 865–873.
63. Kinney SRM, Pradhan S (2011) Regulation of expression and activity of DNA (cytosine-5) methyltransferases in mammalian cells. *Prog Mol Biol Transl Sci* 101: 311–333. doi:10.1016/B978-0-12-387685-0.00009-3.
64. Okano M, Xie S, Li E (1998) Dnmt2 is not required for de novo and maintenance methylation of viral DNA in embryonic stem cells. *Nucleic Acids Res* 26: 2536–2540.
65. Goll MG, Kirpekar F, Maggert KA, Yoder JA, Hsieh C-L, et al. (2006) Methylation of tRNA^{Asp} by the DNA Methyltransferase Homolog Dnmt2. *Science* 311: 395–398. doi:10.1126/science.1120976.

66. Tuorto F, Liebers R, Musch T, Schaefer M, Hofmann S, et al. (2012) RNA cytosine methylation by Dnmt2 and NSun2 promotes tRNA stability and protein synthesis. *Nat Struct Mol Biol* 19: 900–905. doi:10.1038/nsmb.2357.
67. Jurkowski TP, Shanmugam R, Helm M, Jeltsch A (2012) Mapping the tRNA binding site on the surface of human DNMT2 methyltransferase. *Biochemistry (Mosc)* 51: 4438–4444. doi:10.1021/bi3002659.
68. Riggs AD, Xiong Z, Wang L, LeBon JM (1998) Methylation dynamics, epigenetic fidelity and X chromosome structure. *Novartis Found Symp* 214: 214–225; discussion 225–232.
69. Jones PA, Liang G (2009) Rethinking how DNA methylation patterns are maintained. *Nat Rev Genet* 10: 805–811. doi:10.1038/nrg2651.
70. Rhee I, Jair K-W, Yen R-WC, Lengauer C, Herman JG, et al. (2000) CpG methylation is maintained in human cancer cells lacking DNMT1. *Nature* 404: 1003–1007. doi:10.1038/35010000.
71. Liang G, Chan MF, Tomigahara Y, Tsai YC, Gonzales FA, et al. (2002) Cooperativity between DNA methyltransferases in the maintenance methylation of repetitive elements. *Mol Cell Biol* 22: 480–491.
72. Parry L, Clarke AR (2011) The Roles of the Methyl-CpG Binding Proteins in Cancer. *Genes Cancer* 2: 618–630. doi:10.1177/1947601911418499.
73. Meehan R, Antequera F, Lewis J, MacLeod D, McKay S, et al. (1990) A Nuclear Protein that Binds Preferentially to Methylated DNA in vitro May Play a Role in the Inaccessibility of Methylated CpGs in Mammalian Nuclei. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 326: 199–205. doi:10.1098/rstb.1990.0004.
74. Hung M-S, Shen C-KJ (2003) Eukaryotic Methyl-CpG-Binding Domain Proteins and Chromatin Modification. *Eukaryot Cell* 2: 841–846. doi:10.1128/EC.2.5.841-846.2003.
75. Bogdanović O, Veenstra GJC (2009) DNA methylation and methyl-CpG binding proteins: developmental requirements and function. *Chromosoma* 118: 549–565. doi:10.1007/s00412-009-0221-9.
76. Ichimura T, Watanabe S, Sakamoto Y, Aoto T, Fujita N, et al. (2005) Transcriptional repression and heterochromatin formation by MBD1 and MCAF/AM family proteins. *J Biol Chem* 280: 13928–13935. doi:10.1074/jbc.M413654200.
77. Groner AC, Meylan S, Ciuffi A, Zangger N, Ambrosini G, et al. (2010) KRAB-zinc finger proteins and KAP1 can mediate long-range transcriptional repression through heterochromatin spreading. *Plos Genet* 6: e1000869. doi:10.1371/journal.pgen.1000869.
78. Gao H, Yu Z, Bi D, Jiang L, Cui Y, et al. (2007) Akt/PKB interacts with the histone H3 methyltransferase SETDB1 and coordinates to silence gene expression. *Mol Cell Biochem* 305: 35–44. doi:10.1007/s11010-007-9525-3.

79. Li H, Rauch T, Chen Z-X, Szabó PE, Riggs AD, et al. (2006) The Histone Methyltransferase SETDB1 and the DNA Methyltransferase DNMT3A Interact Directly and Localize to Promoters Silenced in Cancer Cells. *J Biol Chem* 281: 19489–19500. doi:10.1074/jbc.M513249200.
80. Santoro R, Li J, Grummt I (2002) The nucleolar remodeling complex NoRC mediates heterochromatin formation and silencing of ribosomal gene transcription. *Nat Genet* 32: 393–396. doi:10.1038/ng1010.
81. Nan X, Ng HH, Johnson CA, Laherty CD, Turner BM, et al. (1998) Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. *Nature* 393: 386–389. doi:10.1038/30764.
82. Kokura K, Kaul SC, Wadhwa R, Nomura T, Khan MM, et al. (2001) The Ski Protein Family Is Required for MeCP2-mediated Transcriptional Repression. *J Biol Chem* 276: 34115–34121. doi:10.1074/jbc.M105747200.
83. Jones PL, Veenstra GJ, Wade PA, Vermaak D, Kass SU, et al. (1998) Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription. *Nat Genet* 19: 187–191. doi:10.1038/561.
84. Chahrour M, Jung SY, Shaw C, Zhou X, Wong STC, et al. (2008) MeCP2, a key contributor to neurological disease, activates and represses transcription. *Science* 320: 1224–1229. doi:10.1126/science.1153252.
85. Fujita N, Watanabe S, Ichimura T, Tsuruzoe S, Shinkai Y, et al. (2003) Methyl-CpG binding domain 1 (MBD1) interacts with the Suv39h1-HP1 heterochromatic complex for DNA methylation-based transcriptional repression. *J Biol Chem* 278: 24132–24138. doi:10.1074/jbc.M302283200.
86. Sarraf SA, Stancheva I (2004) Methyl-CpG binding protein MBD1 couples histone H3 methylation at lysine 9 by SETDB1 to DNA replication and chromatin assembly. *Mol Cell* 15: 595–605. doi:10.1016/j.molcel.2004.06.043.
87. Saito M, Ishikawa F (2002) The mCpG-binding domain of human MBD3 does not bind to mCpG but interacts with NuRD/Mi2 components HDAC1 and MTA2. *J Biol Chem* 277: 35434–35439. doi:10.1074/jbc.M203455200.
88. Gunther K, Rust M, Leers J, Boettger T, Scharfe M, et al. (2013) Differential roles for MBD2 and MBD3 at methylated CpG islands, active promoters and binding to exon sequences. *Nucleic Acids Res* 41: 3010–3021. doi:10.1093/nar/gkt035.
89. Kondo E, Gu Z, Horii A, Fukushige S (2005) The thymine DNA glycosylase MBD4 represses transcription and is associated with methylated p16(INK4a) and hMLH1 genes. *Mol Cell Biol* 25: 4388–4396. doi:10.1128/MCB.25.11.4388-4396.2005.
90. Hendrich B, Tweedie S (2003) The methyl-CpG binding domain and the evolving role of DNA methylation in animals. *Trends Genet* 19: 269–277. doi:10.1016/S0168-9525(03)00080-5.

91. Unoki M, Nishidate T, Nakamura Y (2004) ICBP90, an E2F-1 target, recruits HDAC1 and binds to methyl-CpG through its SRA domain. *Oncogene* 23: 7601–7610. doi:10.1038/sj.onc.1208053.
92. Jeanblanc M, Mousli M, Hopfner R, Bathami K, Martinet N, et al. (2005) The retinoblastoma gene and its product are targeted by ICBP90: a key mechanism in the G1/S transition during the cell cycle. *Oncogene* 24: 7337–7345. doi:10.1038/sj.onc.1208878.
93. Sharif J, Muto M, Takebayashi S, Suetake I, Iwamatsu A, et al. (2007) The SRA protein Np95 mediates epigenetic inheritance by recruiting Dnmt1 to methylated DNA. *Nature* 450: 908–912. doi:10.1038/nature06397.
94. Bostick M, Kim JK, Estève P-O, Clark A, Pradhan S, et al. (2007) UHRF1 plays a role in maintaining DNA methylation in mammalian cells. *Science* 317: 1760–1764. doi:10.1126/science.1147939.
95. Mori T, Ikeda DD, Yamaguchi Y, Unoki M, NIRF Project (2012) NIRF/UHRF2 occupies a central position in the cell cycle network and allows coupling with the epigenetic landscape. *Febs Lett* 586: 1570–1583. doi:10.1016/j.febslet.2012.04.038.
96. Yoon H-G, Chan DW, Reynolds AB, Qin J, Wong J (2003) N-CoR mediates DNA methylation-dependent repression through a methyl CpG binding protein Kaiso. *Mol Cell* 12: 723–734.
97. Schultz DC, Ayyanathan K, Negorev D, Maul GG, Rauscher FJ 3rd (2002) SETDB1: a novel KAP-1-associated histone H3, lysine 9-specific methyltransferase that contributes to HP1-mediated silencing of euchromatic genes by KRAB zinc-finger proteins. *Genes Dev* 16: 919–932. doi:10.1101/gad.973302.
98. Falandry C, Fourel G, Galy V, Ristriani T, Horard B, et al. (2010) CLLD8/KMT1F is a lysine methyltransferase that is important for chromosome segregation. *J Biol Chem* 285: 20234–20241. doi:10.1074/jbc.M109.052399.
99. Urrutia R (2003) KRAB-containing zinc-finger repressor proteins. *Genome Biol* 4: 231. doi:10.1186/gb-2003-4-10-231.
100. Jones MH, Hamana N, Nezu J i, Shimane M (2000) A novel family of bromodomain genes. *Genomics* 63: 40–45. doi:10.1006/geno.1999.6071.
101. Zhou Y, Santoro R, Grummt I (2002) The chromatin remodeling complex NoRC targets HDAC1 to the ribosomal gene promoter and represses RNA polymerase I transcription. *Embo J* 21: 4632–4640.
102. Strohner R, Nemeth A, Jansa P, Hofmann-Rohrer U, Santoro R, et al. (2001) NoRC--a novel member of mammalian ISWI-containing chromatin remodeling machines. *Embo J* 20: 4892–4900. doi:10.1093/emboj/20.17.4892.

103. Strohner R, Németh A, Nightingale KP, Grummt I, Becker PB, et al. (2004) Recruitment of the nucleolar remodeling complex NoRC establishes ribosomal DNA silencing in chromatin. *Mol Cell Biol* 24: 1791–1798.
104. Tudor M, Akbarian S, Chen RZ, Jaenisch R (2002) Transcriptional profiling of a mouse model for Rett syndrome reveals subtle transcriptional changes in the brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 15536–15541. doi:10.1073/pnas.242566899.
105. Traynor J, Agarwal P, Lazzeroni L, Francke U (2002) Gene expression patterns vary in clonal cell cultures from Rett syndrome females with eight different MECP2 mutations. *Bmc Med Genet* 3: 12.
106. Nakao M, Matsui S, Yamamoto S, Okumura K, Shirakawa M, et al. (2001) Regulation of transcription and chromatin by methyl-CpG binding protein MBD1. *Brain Dev* 23 Suppl 1: S174–176.
107. Hendrich B, Bird A (1998) Identification and characterization of a family of mammalian methyl-CpG binding proteins. *Mol Cell Biol* 18: 6538–6547.
108. Reynolds N, Salmon-Divon M, Dvinge H, Hynes-Allen A, Balasooriya G, et al. (2012) NuRD-mediated deacetylation of H3K27 facilitates recruitment of Polycomb Repressive Complex 2 to direct gene repression. *Embo J* 31: 593–605. doi:10.1038/emboj.2011.431.
109. Hendrich B, Hardeland U, Ng HH, Jiricny J, Bird A (1999) The thymine glycosylase MBD4 can bind to the product of deamination at methylated CpG sites. *Nature* 401: 301–304. doi:10.1038/45843.
110. Roloff TC, Ropers HH, Nuber UA (2003) Comparative study of methyl-CpG-binding domain proteins. *Bmc Genomics* 4: 1.
111. Laget S, Joulie M, Le Masson F, Sasai N, Christians E, et al. (2010) The Human Proteins MBD5 and MBD6 Associate with Heterochromatin but They Do Not Bind Methylated DNA. *Plos One* 5. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2917364/>. Accessed 9 May 2013.
112. Chung BHY, Stavropoulos J, Marshall CR, Weksberg R, Scherer SW, et al. (2011) 2q23 de novo microdeletion involving the MBD5 gene in a patient with developmental delay, postnatal microcephaly and distinct facial features. *Am J Med Genet A* 155A: 424–429. doi:10.1002/ajmg.a.33821.
113. Mori T, Li Y, Hata H, Ono K, Kochi H (2002) NIRF, a novel RING finger protein, is involved in cell-cycle regulation. *Biochem Biophys Res Commun* 296: 530–536.
114. Prokhortchouk A, Hendrich B, Jørgensen H, Ruzov A, Wilm M, et al. (2001) The p120 catenin partner Kaiso is a DNA methylation-dependent transcriptional repressor. *Genes Dev* 15: 1613–1618. doi:10.1101/gad.198501.

115. Fillion GJP, Zhenilo S, Salozhin S, Yamada D, Prokhortchouk E, et al. (2006) A family of human zinc finger proteins that bind methylated DNA and repress transcription. *Mol Cell Biol* 26: 169–181. doi:10.1128/MCB.26.1.169-181.2006.
116. Daniel JM, Spring CM, Crawford HC, Reynolds AB, Baig A (2002) The p120(ctn)-binding partner Kaiso is a bi-modal DNA-binding protein that recognizes both a sequence-specific consensus and methylated CpG dinucleotides. *Nucleic Acids Res* 30: 2911–2919.
117. Tsumura A, Hayakawa T, Kumaki Y, Takebayashi S, Sakaue M, et al. (2006) Maintenance of self-renewal ability of mouse embryonic stem cells in the absence of DNA methyltransferases Dnmt1, Dnmt3a and Dnmt3b. *Genes Cells Devoted Mol Cell Mech* 11: 805–814. doi:10.1111/j.1365-2443.2006.00984.x.
118. Hackett JA, Surani MA (2013) DNA methylation dynamics during the mammalian life cycle. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 368: 20110328. doi:10.1098/rstb.2011.0328.
119. Wossidlo M, Nakamura T, Lepikhov K, Marques CJ, Zakhartchenko V, et al. (2011) 5-Hydroxymethylcytosine in the mammalian zygote is linked with epigenetic reprogramming. *Nat Commun* 2: 241. doi:10.1038/ncomms1240.
120. Mayer W, Niveleau A, Walter J, Fundele R, Haaf T (2000) Demethylation of the zygotic paternal genome. *Nature* 403: 501–502. doi:10.1038/35000654.
121. Oswald J, Engemann S, Lane N, Mayer W, Olek A, et al. (2000) Active demethylation of the paternal genome in the mouse zygote. *Curr Biol* 10: 475–478.
122. Borgel J, Guibert S, Li Y, Chiba H, Schübeler D, et al. (2010) Targets and dynamics of promoter DNA methylation during early mouse development. *Nat Genet* 42: 1093–1100. doi:10.1038/ng.708.
123. Mohn F, Weber M, Rebhan M, Roloff TC, Richter J, et al. (2008) Lineage-specific polycomb targets and de novo DNA methylation define restriction and potential of neuronal progenitors. *Mol Cell* 30: 755–766. doi:10.1016/j.molcel.2008.05.007.
124. Ciccone DN, Su H, Hevi S, Gay F, Lei H, et al. (2009) KDM1B is a histone H3K4 demethylase required to establish maternal genomic imprints. *Nature* 461: 415–418. doi:10.1038/nature08315.
125. Stadler MB, Murr R, Burger L, Ivanek R, Lienert F, et al. (2011) DNA-binding factors shape the mouse methylome at distal regulatory regions. *Nature* 480: 490–495. doi:10.1038/nature10716.
126. Chotalia M, Smallwood SA, Ruf N, Dawson C, Lucifero D, et al. (2009) Transcription is required for establishment of germline methylation marks at imprinted genes. *Genes Dev* 23: 105–117. doi:10.1101/gad.495809.
127. Gopalakrishnan S, Sullivan BA, Trazzi S, Della Valle G, Robertson KD (2009) DNMT3B interacts with constitutive centromere protein CENP-C to modulate

- DNA methylation and the histone code at centromeric regions. *Hum Mol Genet* 18: 3178–3193. doi:10.1093/hmg/ddp256.
128. Koerner MV, Barlow DP (2010) Genomic imprinting—an epigenetic gene-regulatory model. *Curr Opin Genet Dev* 20: 164–170. doi:10.1016/j.gde.2010.01.009.
 129. Renfree MB, Hore TA, Shaw G, Graves JAM, Pask AJ (2009) Evolution of genomic imprinting: insights from marsupials and monotremes. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 10: 241–262. doi:10.1146/annurev-genom-082908-150026.
 130. Paulsen M, El-Maarri O, Engemann S, Strödicke M, Franck O, et al. (2000) Sequence conservation and variability of imprinting in the Beckwith-Wiedemann syndrome gene cluster in human and mouse. *Hum Mol Genet* 9: 1829–1841.
 131. Neumann B, Kubicka P, Barlow DP (1995) Characteristics of imprinted genes. *Nat Genet* 9: 12–13. doi:10.1038/ng0195-12.
 132. Feil R, Walter J, Allen ND, Reik W (1994) Developmental control of allelic methylation in the imprinted mouse *Igf2* and *H19* genes. *Dev Camb Engl* 120: 2933–2943.
 133. Mohandas T, Sparkes RS, Shapiro LJ (1981) Reactivation of an inactive human X chromosome: evidence for X inactivation by DNA methylation. *Science* 211: 393–396.
 134. Beard C, Li E, Jaenisch R (1995) Loss of methylation activates *Xist* in somatic but not in embryonic cells. *Genes Dev* 9: 2325–2334. doi:10.1101/gad.9.19.2325.
 135. Panning B, Jaenisch R (1996) DNA hypomethylation can activate *Xist* expression and silence X-linked genes. *Genes Dev* 10: 1991–2002. doi:10.1101/gad.10.16.1991.
 136. Sado T, Okano M, Li E, Sasaki H (2004) De novo DNA methylation is dispensable for the initiation and propagation of X chromosome inactivation. *Dev Camb Engl* 131: 975–982. doi:10.1242/dev.00995.
 137. Maunakea AK, Nagarajan RP, Bilenky M, Ballinger TJ, D'Souza C, et al. (2010) Conserved role of intragenic DNA methylation in regulating alternative promoters. *Nature* 466: 253–257. doi:10.1038/nature09165.
 138. Laurent L, Wong E, Li G, Huynh T, Tzirigos A, et al. (2010) Dynamic changes in the human methylome during differentiation. *Genome Res* 20: 320–331. doi:10.1101/gr.101907.109.
 139. Kangaspeska S, Stride B, Métivier R, Polycarpou-Schwarz M, Ibberson D, et al. (2008) Transient cyclical methylation of promoter DNA. *Nature* 452: 112–115. doi:10.1038/nature06640.

140. Métivier R, Gallais R, Tiffocche C, Le Péron C, Jurkowska RZ, et al. (2008) Cyclical DNA methylation of a transcriptionally active promoter. *Nature* 452: 45–50. doi:10.1038/nature06544.
141. Selbach M, Schwanhäusser B, Thierfelder N, Fang Z, Khanin R, et al. (2008) Widespread changes in protein synthesis induced by microRNAs. *Nature* 455: 58–63. doi:10.1038/nature07228.
142. Lim LP, Lau NC, Garrett-Engle P, Grimson A, Schelter JM, et al. (2005) Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. *Nature* 433: 769–773. doi:10.1038/nature03315.
143. Bartel DP (2009) MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* 136: 215–233. doi:10.1016/j.cell.2009.01.002.
144. Olena AF, Patton JG (2010) Genomic organization of microRNAs. *J Cell Physiol* 222: 540–545. doi:10.1002/jcp.21993.
145. Rodriguez A, Griffiths-Jones S, Ashurst JL, Bradley A (2004) Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. *Genome Res* 14: 1902–1910. doi:10.1101/gr.2722704.
146. Griffiths-Jones S, Saini HK, van Dongen S, Enright AJ (2008) miRBase: tools for microRNA genomics. *Nucleic Acids Res* 36: D154–158. doi:10.1093/nar/gkm952.
147. Yuan X, Liu C, Yang P, He S, Liao Q, et al. (2009) Clustered microRNAs' coordination in regulating protein-protein interaction network. *Bmc Syst Biol* 3: 65. doi:10.1186/1752-0509-3-65.
148. Lee Y, Kim M, Han J, Yeom K-H, Lee S, et al. (2004) MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *Embo J* 23: 4051–4060. doi:10.1038/sj.emboj.7600385.
149. Borchert GM, Lanier W, Davidson BL (2006) RNA polymerase III transcribes human microRNAs. *Nat Struct Mol Biol* 13: 1097–1101. doi:10.1038/nsmb1167.
150. Bartel DP (2004) MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 116: 281–297.
151. Han J, Lee Y, Yeom K-H, Nam J-W, Heo I, et al. (2006) Molecular basis for the recognition of primary microRNAs by the Drosha-DGCR8 complex. *Cell* 125: 887–901. doi:10.1016/j.cell.2006.03.043.
152. Lund E, Güttinger S, Calado A, Dahlberg JE, Kutay U (2004) Nuclear Export of MicroRNA Precursors. *Science* 303: 95–98. doi:10.1126/science.1090599.
153. Lee Y, Ahn C, Han J, Choi H, Kim J, et al. (2003) The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* 425: 415–419. doi:10.1038/nature01957.

154. Chendrimada TP, Gregory RI, Kumaraswamy E, Norman J, Cooch N, et al. (2005) TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. *Nature* 436: 740–744. doi:10.1038/nature03868.
155. Lee Y, Hur I, Park S-Y, Kim Y-K, Suh MR, et al. (2006) The role of PACT in the RNA silencing pathway. *Embo J* 25: 522–532. doi:10.1038/sj.emboj.7600942.
156. Salzman DW, Shubert-Coleman J, Furneaux H (2007) P68 RNA helicase unwinds the human let-7 microRNA precursor duplex and is required for let-7-directed silencing of gene expression. *J Biol Chem* 282: 32773–32779. doi:10.1074/jbc.M705054200.
157. Robb GB, Rana TM (2007) RNA helicase A interacts with RISC in human cells and functions in RISC loading. *Mol Cell* 26: 523–537. doi:10.1016/j.molcel.2007.04.016.
158. Schwarz DS, Hutvagner G, Du T, Xu Z, Aronin N, et al. (2003) Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell* 115: 199–208.
159. Höck J, Meister G (2008) The Argonaute protein family. *Genome Biol* 9: 210. doi:10.1186/gb-2008-9-2-210.
160. Pillai RS, Artus CG, Filipowicz W (2004) Tethering of human Ago proteins to mRNA mimics the miRNA-mediated repression of protein synthesis. *Rna New York N* 10: 1518–1525. doi:10.1261/rna.7131604.
161. Fabian MR, Sonenberg N (2012) The mechanics of miRNA-mediated gene silencing: a look under the hood of miRISC. *Nat Struct Mol Biol* 19: 586–593. doi:10.1038/nsmb.2296.
162. Huntzinger E, Izaurralde E (2011) Gene silencing by microRNAs: contributions of translational repression and mRNA decay. *Nat Rev Genet* 12: 99–110. doi:10.1038/nrg2936.
163. Baek D, Villén J, Shin C, Camargo FD, Gygi SP, et al. (2008) The impact of microRNAs on protein output. *Nature* 455: 64–71. doi:10.1038/nature07242.
164. Hendrickson DG, Hogan DJ, McCullough HL, Myers JW, Herschlag D, et al. (2009) Concordant regulation of translation and mRNA abundance for hundreds of targets of a human microRNA. *Plos Biol* 7: e1000238. doi:10.1371/journal.pbio.1000238.
165. Guo H, Ingolia NT, Weissman JS, Bartel DP (2010) Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels. *Nature* 466: 835–840. doi:10.1038/nature09267.
166. Vrba L, Garbe JC, Stampfer MR, Futscher BW (2011) Epigenetic regulation of normal human mammary cell type-specific miRNAs. *Genome Res* 21: 2026–2037. doi:10.1101/gr.123935.111.

167. Choi MR, In Y-H, Park J, Park T, Jung KH, et al. (2012) Genome-scale DNA methylation pattern profiling of human bone marrow mesenchymal stem cells in long-term culture. *Exp Mol Med* 44: 503–512. doi:10.3858/emm.2012.44.8.057.
168. Noguer-Dance M, Abu-Amero S, Al-Khtib M, Lefèvre A, Coullin P, et al. (2010) The primate-specific microRNA gene cluster (C19MC) is imprinted in the placenta. *Hum Mol Genet* 19: 3566–3582. doi:10.1093/hmg/ddq272.
169. Sato F, Tsuchiya S, Meltzer SJ, Shimizu K (2011) MicroRNAs and epigenetics. *Febs J* 278: 1598–1609. doi:10.1111/j.1742-4658.2011.08089.x.
170. Wei X, Xiang T, Ren G, Tan C, Liu R, et al. (2013) miR-101 is down-regulated by the hepatitis B virus x protein and induces aberrant DNA methylation by targeting DNA methyltransferase 3A. *Cell Signal* 25: 439–446. doi:10.1016/j.cellsig.2012.10.013.
171. Huang J, Wang Y, Guo Y, Sun S (2010) Down-regulated microRNA-152 induces aberrant DNA methylation in hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma by targeting DNA methyltransferase 1. *Hepatology* 52: 60–70. doi:10.1002/hep.23660.
172. Garzon R, Liu S, Fabbri M, Liu Z, Heaphy CEA, et al. (2009) MicroRNA-29b induces global DNA hypomethylation and tumor suppressor gene reexpression in acute myeloid leukemia by targeting directly DNMT3A and 3B and indirectly DNMT1. *Blood* 113: 6411–6418. doi:10.1182/blood-2008-07-170589.
173. Pan W, Zhu S, Yuan M, Cui H, Wang L, et al. (2010) MicroRNA-21 and microRNA-148a contribute to DNA hypomethylation in lupus CD4+ T cells by directly and indirectly targeting DNA methyltransferase 1. *J Immunol* 184: 6773–6781. doi:10.4049/jimmunol.0904060.
174. Zhao S, Wang Y, Liang Y, Zhao M, Long H, et al. (2011) MicroRNA-126 regulates DNA methylation in CD4+ T cells and contributes to systemic lupus erythematosus by targeting DNA methyltransferase 1. *Arthritis Rheum* 63: 1376–1386. doi:10.1002/art.30196.
175. Takada S, Berezikov E, Choi YL, Yamashita Y, Mano H (2009) Potential role of miR-29b in modulation of Dnmt3a and Dnmt3b expression in primordial germ cells of female mouse embryos. *Rna* 15: 1507–1514. doi:10.1261/rna.1418309.
176. Braconi C, Huang N, Patel T (n.d.) MicroRNA-dependent regulation of DNA methyltransferase-1 and tumor suppressor gene expression by interleukin-6 in human malignant cholangiocytes. *Hepatology* 51: 881–890.
177. Zhu A, Xia J, Zuo J, Jin S, Zhou H, et al. (2012) MicroRNA-148a is silenced by hypermethylation and interacts with DNA methyltransferase 1 in gastric cancer. *Med Oncol Northwood Lond Engl* 29: 2701–2709. doi:10.1007/s12032-011-0134-3.

178. Ng EKO, Tsang WP, Ng SSM, Jin HC, Yu J, et al. (2009) MicroRNA-143 targets DNA methyltransferases 3A in colorectal cancer. *Br J Cancer* 101: 699–706. doi:10.1038/sj.bjc.6605195.
179. Duursma AM, Kedde M, Schrier M, le Sage C, Agami R (2008) miR-148 targets human DNMT3b protein coding region. *Rna* 14: 872–877.
180. Ji W, Yang L, Yuan J, Yang L, Zhang M, et al. (2013) MicroRNA-152 targets DNA methyltransferase 1 in NiS-transformed cells via a feedback mechanism. *Carcinogenesis* 34: 446–453. doi:10.1093/carcin/bgs343.
181. Xiang Y, Ma N, Wang D, Zhang Y, Zhou J, et al. (2013) MiR-152 and miR-185 co-contribute to ovarian cancer cells cisplatin sensitivity by targeting DNMT1 directly: a novel epigenetic therapy independent of decitabine. *Oncogene*. doi:10.1038/onc.2012.575.
182. Qi L, Hongjuan H, Ning G, Zhengbin H, Yanjiang X, et al. (2013) miR-370 is stage-specifically expressed during mouse embryonic development and regulates Dnmt3a. *Febs Lett* 587: 775–781. doi:10.1016/j.febslet.2013.01.070.
183. Wang H, Wu J, Meng X, Ying X, Zuo Y, et al. (2011) MicroRNA-342 inhibits colorectal cancer cell proliferation and invasion by directly targeting DNA methyltransferase 1. *Carcinogenesis* 32: 1033–1042. doi:10.1093/carcin/bgr081.
184. Weng Z, Wang D, Zhao W, Song M, You F, et al. (2011) microRNA-450a targets DNA methyltransferase 3a in hepatocellular carcinoma. *Exp Ther Med* 2: 951–955. doi:10.3892/etm.2011.288.
185. Ehrlich M (2003) The ICF syndrome, a DNA methyltransferase 3B deficiency and immunodeficiency disease. *Clin Immunol* 109: 17–28. doi:10.1016/S1521-6616(03)00201-8.
186. Guerrero-Bosagna C, Savenkova M, Haque MM, Nilsson E, Skinner MK (2013) Environmentally Induced Epigenetic Transgenerational Inheritance of Altered Sertoli Cell Transcriptome and Epigenome: Molecular Etiology of Male Infertility. *Plos One* 8: e59922. doi:10.1371/journal.pone.0059922.
187. You YH, Pfeifer GP (2001) Similarities in sunlight-induced mutational spectra of CpG-methylated transgenes and the p53 gene in skin cancer point to an important role of 5-methylcytosine residues in solar UV mutagenesis. *J Mol Biol* 305: 389–399. doi:10.1006/jmbi.2000.4322.
188. Labonté B, Suderman M, Maussion G, Lopez JP, Navarro-Sánchez L, et al. (2013) Genome-Wide Methylation Changes in the Brains of Suicide Completers. *Am J Psychiatry*. doi:10.1176/appi.ajp.2012.12050627.
189. Weaver ICG, Cervoni N, Champagne FA, D'Alessio AC, Sharma S, et al. (2004) Epigenetic programming by maternal behavior. *Nat Neurosci* 7: 847–854. doi:10.1038/nn1276.

190. Klengel T, Mehta D, Anacker C, Rex-Haffner M, Pruessner JC, et al. (2013) Allele-specific FKBP5 DNA demethylation mediates gene-childhood trauma interactions. *Nat Neurosci* 16: 33–41. doi:10.1038/nn.3275.
191. D'Alessio AC, Weaver ICG, Szyf M (2007) Acetylation-induced transcription is required for active DNA demethylation in methylation-silenced genes. *Mol Cell Biol* 27: 7462–7474. doi:10.1128/MCB.01120-07.
192. Jones PA, Baylin SB (2007) The Epigenomics of Cancer. *Cell* 128: 683–692. doi:10.1016/j.cell.2007.01.029.
193. Berdasco M, Esteller M (2010) Aberrant epigenetic landscape in cancer: how cellular identity goes awry. *Dev Cell* 19: 698–711. doi:10.1016/j.devcel.2010.10.005.
194. Wild L, Flanagan JM (2010) Genome-wide hypomethylation in cancer may be a passive consequence of transformation. *Biochim Biophys Acta Bba - Rev Cancer* 1806: 50–57. doi:10.1016/j.bbcan.2010.03.003.
195. Pastor WA, Aravind L, Rao A (2013) TETonic shift: biological roles of TET proteins in DNA demethylation and transcription. *Nat Rev Mol Cell Biol* 14: 341–356. doi:10.1038/nrm3589.
196. Hashimoto H, Liu Y, Upadhyay AK, Chang Y, Howerton SB, et al. (2012) Recognition and potential mechanisms for replication and erasure of cytosine hydroxymethylation. *Nucleic Acids Res* 40: 4841–4849. doi:10.1093/nar/gks155.
197. Valinluck V, Sowers LC (2007) Endogenous cytosine damage products alter the site selectivity of human DNA maintenance methyltransferase DNMT1. *Cancer Res* 67: 946–950. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-3123.
198. He Y-F, Li B-Z, Li Z, Liu P, Wang Y, et al. (2011) Tet-mediated formation of 5-carboxylcytosine and its excision by TDG in mammalian DNA. *Science* 333: 1303–1307. doi:10.1126/science.1210944.
199. Song C-X, Clark TA, Lu X-Y, Kislyuk A, Dai Q, et al. (2012) Sensitive and specific single-molecule sequencing of 5-hydroxymethylcytosine. *Nat Methods* 9: 75–77. doi:10.1038/nmeth.1779.
200. Sun M, Song C-X, Huang H, Frankenberger CA, Sankarasharma D, et al. (2013) HMGA2/TET1/HOXA9 signaling pathway regulates breast cancer growth and metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110: 9920–9925. doi:10.1073/pnas.1305172110.
201. Hsu C-H, Peng K-L, Kang M-L, Chen Y-R, Yang Y-C, et al. (2012) TET1 suppresses cancer invasion by activating the tissue inhibitors of metalloproteinases. *Cell Reports* 2: 568–579. doi:10.1016/j.celrep.2012.08.030.
202. Liu C, Liu L, Chen X, Shen J, Shan J, et al. (2013) Decrease of 5-Hydroxymethylcytosine Is Associated with Progression of Hepatocellular

- Carcinoma through Downregulation of TET1. *Plos One* 8: e62828. doi:10.1371/journal.pone.0062828.
203. Maul RW, Gearhart PJ (2010) AID and somatic hypermutation. *Adv Immunol* 105: 159–191. doi:10.1016/S0065-2776(10)05006-6.
 204. Bhutani N, Brady JJ, Damian M, Sacco A, Corbel SY, et al. (2010) Reprogramming towards pluripotency requires AID-dependent DNA demethylation. *Nature* 463: 1042–1047. doi:10.1038/nature08752.
 205. Fritz EL, Rosenberg BR, Lay K, Mihailović A, Tuschl T, et al. (2013) A comprehensive analysis of the effects of the deaminase AID on the transcriptome and methylome of activated B cells. *Nat Immunol* 14: 749–755. doi:10.1038/ni.2616.
 206. Nabel CS, Jia H, Ye Y, Shen L, Goldschmidt HL, et al. (2012) AID/APOBEC deaminases disfavor modified cytosines implicated in DNA demethylation. *Nat Chem Biol* 8: 751–758. doi:10.1038/nchembio.1042.
 207. Kalari S, Pfeifer GP (2010) Identification of driver and passenger DNA methylation in cancer by epigenomic analysis. *Adv Genet* 70: 277–308. doi:10.1016/B978-0-12-380866-0.60010-1.
 208. Robertson KD, Uzvolgyi E, Liang G, Talmadge C, Sumegi J, et al. (1999) The human DNA methyltransferases (DNMTs) 1, 3a and 3b: coordinate mRNA expression in normal tissues and overexpression in tumors. *Nucleic Acids Res* 27: 2291–2298.
 209. el-Deiry WS, Nelkin BD, Celano P, Yen RW, Falco JP, et al. (1991) High expression of the DNA methyltransferase gene characterizes human neoplastic cells and progression stages of colon cancer. *Proc Natl Acad Sci* 88: 3470–3474. doi:10.1073/pnas.88.8.3470.
 210. Girault I, Tozlu S, Lidereau R, Bièche I (2003) Expression Analysis of DNA Methyltransferases 1, 3A, and 3B in Sporadic Breast Carcinomas. *Clin Cancer Res* 9: 4415–4422.
 211. Mizuno S, Chijiwa T, Okamura T, Akashi K, Fukumaki Y, et al. (2001) Expression of DNA methyltransferases DNMT1,3A, and 3B in normal hematopoiesis and in acute and chronic myelogenous leukemia. *Blood* 97: 1172–1179. doi:10.1182/blood.V97.5.1172.
 212. Robertson KD (2001) DNA methylation, methyltransferases, and cancer. *Oncogene* 20: 3139–3155. doi:10.1038/sj.onc.1204341.
 213. Simó-Riudalbas L, Melo SA, Esteller M (2011) DNMT3B gene amplification predicts resistance to DNA demethylating drugs. *Genes Chromosomes Cancer* 50: 527–534. doi:10.1002/gcc.20877.
 214. Lopez de Silanes I, Gorospe M, Taniguchi H, Abdelmohsen K, Srikantan S, et al. (2009) The RNA-binding protein HuR regulates DNA methylation through

- stabilization of DNMT3b mRNA. *Nucleic Acids Res* 37: 2658–2671. doi:10.1093/nar/gkp123.
215. Ley TJ, Ding L, Walter MJ, McLellan MD, Lamprecht T, et al. (2010) DNMT3A mutations in acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 363: 2424–2433. doi:10.1056/NEJMoa1005143.
 216. Santi DV, Norment A, Garrett CE (1984) Covalent bond formation between a DNA-cytosine methyltransferase and DNA containing 5-azacytosine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81: 6993–6997.
 217. Cheng JC, Yoo CB, Weisenberger DJ, Chuang J, Wozniak C, et al. (2004) Preferential response of cancer cells to zebularine. *Cancer Cell* 6: 151–158. doi:10.1016/j.ccr.2004.06.023.
 218. Bryan J, Kantarjian H, Garcia-Manero G, Jabbour E (2011) Pharmacokinetic evaluation of decitabine for the treatment of leukemia. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 7: 661–672. doi:10.1517/17425255.2011.575062.
 219. Schroeder GK, Zhou L, Snider MJ, Chen X, Wolfenden R (2012) Flight of a cytidine deaminase complex with an imperfect transition state analogue inhibitor: mass spectrometric evidence for the presence of a trapped water molecule. *Biochemistry (Mosc)* 51: 6476–6486. doi:10.1021/bi300516u.
 220. Cornacchia E, Golbus J, Maybaum J, Strahler J, Hanash S, et al. (1988) Hydralazine and procainamide inhibit T cell DNA methylation and induce autoreactivity. *J Immunol Baltim Md* 1950 140: 2197–2200.
 221. Fenster PE, Comess KA, Marsh R, Katzenberg C, Hager WD (1983) Conversion of atrial fibrillation to sinus rhythm by acute intravenous procainamide infusion. *Am Heart J* 106: 501–504.
 222. Fang MZ, Chen D, Sun Y, Jin Z, Christman JK, et al. (2005) Reversal of hypermethylation and reactivation of p16INK4a, RARbeta, and MGMT genes by genistein and other isoflavones from soy. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res* 11: 7033–7041. doi:10.1158/1078-0432.CCR-05-0406.
 223. Rocco JW, Sidransky D (2001) p16(MTS-1/CDKN2/INK4a) in cancer progression. *Exp Cell Res* 264: 42–55. doi:10.1006/excr.2000.5149.
 224. Zou H-Z, Yu B-M, Wang Z-W, Sun J-Y, Cang H, et al. (2002) Detection of Aberrant p16 Methylation in the Serum of Colorectal Cancer Patients. *Clin Cancer Res* 8: 188–191.
 225. Wong IHN, Lo YMD, Zhang J, Liew C-T, Ng MHL, et al. (1999) Detection of Aberrant p16 Methylation in the Plasma and Serum of Liver Cancer Patients. *Cancer Res* 59: 71–73.
 226. Belinsky SA, Nikula KJ, Palmisano WA, Michels R, Saccomanno G, et al. (1998) Aberrant methylation of p16INK4a is an early event in lung cancer and a potential biomarker for early diagnosis. *Proc Natl Acad Sci* 95: 11891–11896. doi:10.1073/pnas.95.20.11891.

227. Kaina B, Margison GP, Christmann M (2010) Targeting O 6-methylguanine-DNA methyltransferase with specific inhibitors as a strategy in cancer therapy. *Cell Mol Life Sci* 67: 3663–3681. doi:10.1007/s00018-010-0491-7.
228. Esteller M, Garcia-Foncillas J, Andion E, Goodman SN, Hidalgo OF, et al. (2000) Inactivation of the DNA-repair gene MGMT and the clinical response of gliomas to alkylating agents. *N Engl J Med* 343: 1350–1354. doi:10.1056/NEJM200011093431901.
229. Shen L, Kondo Y, Rosner GL, Xiao L, Hernandez NS, et al. (2005) MGMT Promoter Methylation and Field Defect in Sporadic Colorectal Cancer. *J Natl Cancer Inst* 97: 1330–1338. doi:10.1093/jnci/dji275.
230. Townsend DM, Tew KD (2003) The role of glutathione-S-transferase in anti-cancer drug resistance. *Oncogene* 22: 7369–7375. doi:10.1038/sj.onc.1206940.
231. Nakamichi I, Tomita Y, Zhang B, Sugiyama H, Kanakura Y, et al. (2007) Correlation between promoter hypermethylation of GSTP1 and response to chemotherapy in diffuse large B cell lymphoma. *Ann Hematol* 86: 557–564. doi:10.1007/s00277-007-0299-1.
232. Miyake T, Nakayama T, Naoi Y, Yamamoto N, Otani Y, et al. (2012) GSTP1 expression predicts poor pathological complete response to neoadjuvant chemotherapy in ER-negative breast cancer. *Cancer Sci* 103: 913–920. doi:10.1111/j.1349-7006.2012.02231.x.
233. Zhang Y, Qu X, Jing W, Hu X, Yang X, et al. (2009) GSTP1 determines cis-platinum cytotoxicity in gastric adenocarcinoma MGC803 cells: regulation by promoter methylation and extracellular regulated kinase signaling. *Anticancer Drugs* 20: 208–214. doi:10.1097/CAD.0b013e328322fbaa.
234. Harden SV, Guo Z, Epstein JI, Sidransky D (2003) Quantitative Gstp1 Methylation Clearly Distinguishes Benign Prostatic Tissue And Limited Prostate Adenocarcinoma. *J Urol* 169: 1138–1142. doi:10.1097/01.ju.0000049627.90307.4d.
235. Saxena A, Dhillon VS, Shahid M, Khalil HS, Rani M, et al. (2012) GSTP1 methylation and polymorphism increase the risk of breast cancer and the effects of diet and lifestyle in breast cancer patients. *Exp Ther Med* 4: 1097–1103. doi:10.3892/etm.2012.710.
236. Hashad DI, Hashad MMEI, Talaat IM, Ibrahim MA (2011) Role of glutathione-S-transferase P1 hypermethylation in molecular detection of prostate cancer. *Genet Test Mol Biomarkers* 15: 667–670. doi:10.1089/gtmb.2010.0262.
237. Fukui K (2010) DNA Mismatch Repair in Eukaryotes and Bacteria. *J Nucleic Acids* 2010: 1–16. doi:10.4061/2010/260512.

238. Kantelinen J, Kansikas M, Korhonen MK, Ollila S, Heinimann K, et al. (2010) MutSbeta exceeds MutSalpha in dinucleotide loop repair. *Br J Cancer* 102: 1068–1073. doi:10.1038/sj.bjc.6605531.
239. Menigatti M, Di Gregorio C, Borghi F, Sala E, Scarselli A, et al. (2001) Methylation pattern of different regions of the MLH1 promoter and silencing of gene expression in hereditary and sporadic colorectal cancer. *Genes Chromosomes Cancer* 31: 357–361. doi:10.1002/gcc.1154.
240. Bischoff J, Ignatov A, Semczuk A, Schwarzenau C, Ignatov T, et al. (2012) hMLH1 promoter hypermethylation and MSI status in human endometrial carcinomas with and without metastases. *Clin Exp Metastasis* 29: 889–900. doi:10.1007/s10585-012-9478-0.
241. Ozdemir F, Altinisik J, Karateke A, Coksuer H, Buyru N (2012) Methylation of tumor suppressor genes in ovarian cancer. *Exp Ther Med* 4: 1092–1096. doi:10.3892/etm.2012.715.
242. Esteller M, Corn PG, Baylin SB, Herman JG (2001) A Gene Hypermethylation Profile of Human Cancer. *Cancer Res* 61: 3225–3229.
243. Venkitaraman AR (2002) Cancer susceptibility and the functions of BRCA1 and BRCA2. *Cell* 108: 171–182.
244. Esteller M, Silva JM, Dominguez G, Bonilla F, Matias-Guiu X, et al. (2000) Promoter Hypermethylation and BRCA1 Inactivation in Sporadic Breast and Ovarian Tumors. *J Natl Cancer Inst* 92: 564–569. doi:10.1093/jnci/92.7.564.
245. Dobrovic A, Simpfendorfer D (1997) Methylation of the BRCA1 Gene in Sporadic Breast Cancer. *Cancer Res* 57: 3347–3350.
246. Sato N, Fukushima N, Matsubayashi H, Goggins M (2004) Identification of maspin and S100P as novel hypomethylation targets in pancreatic cancer using global gene expression profiling. *Oncogene* 23: 1531–1538. doi:10.1038/sj.onc.1207269.
247. Wang Q, Williamson M, Bott S, Brookman-Amissah N, Freeman A, et al. (2007) Hypomethylation of WNT5A, CRIP1 and S100P in prostate cancer. *Oncogene* 26: 6560–6565. doi:10.1038/sj.onc.1210472.
248. Ogino S, Noshio K, Kirkner GJ, Kawasaki T, Chan AT, et al. (2008) A Cohort Study of Tumoral LINE-1 Hypomethylation and Prognosis in Colon Cancer. *J Natl Cancer Inst* 100: 1734–1738. doi:10.1093/jnci/djn359.
249. Jelinic P, Shaw P (2007) Loss of imprinting and cancer. *J Pathol* 211: 261–268. doi:10.1002/path.2116.
250. Mulero-Navarro S, Esteller M (2008) Epigenetic biomarkers for human cancer: The time is now. *Crit Rev Oncol Hematol* 68: 1–11. doi:10.1016/j.critrevonc.2008.03.001.

251. Esteller M, Corn PG, Baylin SB, Herman JG (2001) A Gene Hypermethylation Profile of Human Cancer. *Cancer Res* 61: 3225–3229.
252. McCluskey LL, Chen C, Delgadillo E, Felix JC, Muderspach LI, et al. (1999) Differences in p16 Gene Methylation and Expression in Benign and Malignant Ovarian Tumors. *Gynecol Oncol* 72: 87–92. doi:10.1006/gyno.1998.5235.
253. Hanoun N, Delpu Y, Suriawinata AA, Bournet B, Bureau C, et al. (2010) The silencing of microRNA 148a production by DNA hypermethylation is an early event in pancreatic carcinogenesis. *Clin Chem* 56: 1107–1118. doi:10.1373/clinchem.2010.144709.
254. Fujiwara K, Fujimoto N, Tabata M, Nishii K, Matsuo K, et al. (2005) Identification of Epigenetic Aberrant Promoter Methylation in Serum DNA Is Useful for Early Detection of Lung Cancer. *Clin Cancer Res* 11: 1219–1225.
255. Stumpel DJPM, Schneider P, van Roon EHJ, Boer JM, de Lorenzo P, et al. (2009) Specific promoter methylation identifies different subgroups of MLL-rearranged infant acute lymphoblastic leukemia, influences clinical outcome, and provides therapeutic options. *Blood* 114: 5490–5498. doi:10.1182/blood-2009-06-227660.
256. Figueroa ME, Lugthart S, Li Y, Erpelinck-Verschueren C, Deng X, et al. (2010) DNA Methylation Signatures Identify Biologically Distinct Subtypes in Acute Myeloid Leukemia. *Cancer Cell* 17: 13–27. doi:10.1016/j.ccr.2009.11.020.
257. Karube Y, Tanaka H, Osada H, Tomida S, Tatematsu Y, et al. (2005) Reduced expression of Dicer associated with poor prognosis in lung cancer patients. *Cancer Sci* 96: 111–115. doi:10.1111/j.1349-7006.2005.00015.x.
258. Khoshnaw SM, Rakha EA, Abdel-Fatah TM, Nolan CC, Hodi Z, et al. (2012) Loss of Dicer expression is associated with breast cancer progression and recurrence. *Breast Cancer Res Treat* 135: 403–413. doi:10.1007/s10549-012-2169-3.
259. Lu J, Getz G, Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Lamb J, et al. (2005) MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature* 435: 834–838. doi:10.1038/nature03702.
260. Li W, Liu M, Feng Y, Xu Y-F, Che J-P, et al. (2013) Evaluation of Argonaute protein as a predictive marker for human clear cell renal cell carcinoma. *Int J Clin Exp Pathol* 6: 1086–1094.
261. Sand M, Skrygan M, Georgas D, Arenz C, Gambichler T, et al. (2012) Expression levels of the microRNA maturing microprocessor complex component DGCR8 and the RNA-induced silencing complex (RISC) components argonaute-1, argonaute-2, PACT, TARBP1, and TARBP2 in epithelial skin cancer. *Mol Carcinog* 51: 916–922. doi:10.1002/mc.20861.
262. Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, Bichi R, Zupo S, et al. (2002) Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at

- 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 15524–15529.
263. Johnson SM, Grosshans H, Shingara J, Byrom M, Jarvis R, et al. (2005) RAS is regulated by the let-7 microRNA family. *Cell* 120: 635–647. doi:10.1016/j.cell.2005.01.014.
 264. Cimmino A, Calin GA, Fabbri M, Iorio MV, Ferracin M, et al. (2005) miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 13944–13949. doi:10.1073/pnas.0506654102.
 265. Du Rieu MC, Torrisani J, Selves J, Al Saati T, Souque A, et al. (2010) MicroRNA-21 is induced early in pancreatic ductal adenocarcinoma precursor lesions. *Clin Chem* 56: 603–612. doi:10.1373/clinchem.2009.137364.
 266. Medina PP, Nolde M, Slack FJ (2010) OncomiR addiction in an in vivo model of microRNA-21-induced pre-B-cell lymphoma. *Nature* 467: 86–90. doi:10.1038/nature09284.
 267. Schramedei K, Mörbt N, Pfeifer G, Läuter J, Rosolowski M, et al. (2011) MicroRNA-21 targets tumor suppressor genes ANP32A and SMARCA4. *Oncogene* 30: 2975–2985.
 268. Krichevsky AM, Gabriely G (2009) miR-21: a small multi-faceted RNA. *J Cell Mol Med* 13: 39–53.
 269. Hwang J-H, Voortman J, Giovannetti E, Steinberg SM, Leon LG, et al. (2010) Identification of microRNA-21 as a biomarker for chemoresistance and clinical outcome following adjuvant therapy in resectable pancreatic cancer. *Plos One* 5: e10630. doi:10.1371/journal.pone.0010630.
 270. Ryu JK, Hong S-M, Karikari CA, Hruban RH, Goggins MG, et al. (2010) Aberrant MicroRNA-155 expression is an early event in the multistep progression of pancreatic adenocarcinoma. *Pancreatol Off J Int Assoc Pancreatol* 10: 66–73. doi:10.1159/000231984.
 271. Kong W, Yang H, He L, Zhao JJ, Coppola D, et al. (2008) MicroRNA-155 is regulated by the transforming growth factor beta/Smad pathway and contributes to epithelial cell plasticity by targeting RhoA. *Mol Cell Biol* 28: 6773–6784.
 272. Kluiver J, Poppema S, de Jong D, Blokzijl T, Harms G, et al. (2005) BIC and miR-155 are highly expressed in Hodgkin, primary mediastinal and diffuse large B cell lymphomas. *J Pathol* 207: 243–249. doi:10.1002/path.1825.
 273. Weber B, Stresemann C, Brueckner B, Lyko F (2007) Methylation of human microRNA genes in normal and neoplastic cells. *Cell Cycle Georget Tex* 6: 1001–1005.
 274. Saito Y, Liang G, Egger G, Friedman JM, Chuang JC, et al. (2006) Specific activation of microRNA-127 with downregulation of the proto-oncogene BCL6

- by chromatin-modifying drugs in human cancer cells. *Cancer Cell* 9: 435–443. doi:10.1016/j.ccr.2006.04.020.
275. Lehmann U, Hasemeier B, Christgen M, Müller M, Römermann D, et al. (2008) Epigenetic inactivation of microRNA gene hsa-mir-9-1 in human breast cancer. *J Pathol* 214: 17–24. doi:10.1002/path.2251.
 276. Wong KY, Huang X, Chim CS (2012) DNA methylation of microRNA genes in multiple myeloma. *Carcinogenesis* 33: 1629–1638. doi:10.1093/carcin/bgs212.
 277. Siegel R, Naishadham D, Jemal A (2012) Cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin* 62: 10–29.
 278. Koorstra JB, Hustinx SR, Offerhaus GJ, Maitra A (2008) Pancreatic carcinogenesis. *Pancreatology* 8: 110–125.
 279. Ghaneh P, Costello E, Neoptolemos JP (2007) Biology and management of pancreatic cancer. *Gut* 56: 1134–1152.
 280. Brat DJ, Lillemoe KD, Yeo CJ, Warfield PB, Hruban RH (1998) Progression of pancreatic intraductal neoplasias to infiltrating adenocarcinoma of the pancreas. *Am J Surg Pathol* 22: 163–169.
 281. Hruban RH, Maitra A, Goggins M (2008) Update on pancreatic intraepithelial neoplasia. *Int J Clin Exp Pathol* 1: 306–316.
 282. Sipos B, Frank S, Gress T, Hahn S, Kloppel G (2009) Pancreatic intraepithelial neoplasia revisited and updated. *Pancreatology* 9: 45–54.
 283. Yamaguchi K, Yokohata K, Noshiro H, Chijiwa K, Tanaka M (2000) Mucinous cystic neoplasm of the pancreas or intraductal papillary-mucinous tumour of the pancreas. *Eur J Surg* 166: 141–148.
 284. Andea A, Sarkar F, Adsay VN (2003) Clinicopathological correlates of pancreatic intraepithelial neoplasia: a comparative analysis of 82 cases with and 152 cases without pancreatic ductal adenocarcinoma. *Mod Pathol* 16: 996–1006.
 285. Terhune PG, Phifer DM, Tosteson TD, Longnecker DS (1998) K-ras mutation in focal proliferative lesions of human pancreas. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 7: 515–521.
 286. Hingorani SR, Petricoin EF, Maitra A, Rajapakse V, King C, et al. (2003) Preinvasive and invasive ductal pancreatic cancer and its early detection in the mouse. *Cancer Cell* 4: 437–450.
 287. Habbe N, Shi G, Meguid RA, Fendrich V, Esni F, et al. (2008) Spontaneous induction of murine pancreatic intraepithelial neoplasia (mPanIN) by acinar cell targeting of oncogenic Kras in adult mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 18913–18918.

288. Vincent A, Herman J, Schulick R, Hruban RH, Goggins M (2004) Pancreatic cancer. *Lancet* 363: 1049–1057. doi:10.1016/S0140-6736(04)15841-8.
289. Roggin KK, Chennat J, Oto A, Noffsinger A, Briggs A, et al. (2010) Pancreatic cystic neoplasm. *Curr Probl Surg* 47: 459–510. doi:10.1067/j.cpsurg.2010.02.002.
290. Schonleben F, Qiu W, Bruckman KC, Ciau NT, Li X, et al. (2007) BRAF and KRAS gene mutations in intraductal papillary mucinous neoplasm/carcinoma (IPMN/IPMC) of the pancreas. *Cancer Lett* 249: 242–248.
291. Yonezawa S, Higashi M, Yamada N, Goto M (2008) Precursor lesions of pancreatic cancer. *Gut Liver* 2: 137–154.
292. Hruban RH, Adsay NV (2009) Molecular classification of neoplasms of the pancreas. *Hum Pathol* 40: 612–623.
293. Tanaka M, Chari S, Adsay V, Fernandez-del Castillo C, Falconi M, et al. (2006) International consensus guidelines for management of intraductal papillary mucinous neoplasms and mucinous cystic neoplasms of the pancreas. *Pancreatology* 6: 17–32.
294. Maire F, Hammel P, Terris B, Paye F, Scoazec JY, et al. (2002) Prognosis of malignant intraductal papillary mucinous tumours of the pancreas after surgical resection. Comparison with pancreatic ductal adenocarcinoma. *Gut* 51: 717–722.
295. Siveke JT, Einwachter H, Sipos B, Lubeseder-Martellato C, Kloppel G, et al. (2007) Concomitant pancreatic activation of Kras(G12D) and Tgfa results in cystic papillary neoplasms reminiscent of human IPMN. *Cancer Cell* 12: 266–279.
296. Delpu Y, Hanoun N, Lulka H, Sicard F, Selves J, et al. (2011) Genetic and Epigenetic Alterations in Pancreatic Carcinogenesis. *Curr Genomics* 12: 15–24. doi:10.2174/138920211794520132.
297. Wilentz RE, Albores-Saavedra J, Hruban RH (2000) Mucinous cystic neoplasms of the pancreas. *Semin Diagn Pathol* 17: 31–42.
298. Hruban RH, Maitra A, Kern SE, Goggins M (2007) Precursors to pancreatic cancer. *Gastroenterol Clin North Am* 36: 831–49, vi.
299. Izeradjene K, Combs C, Best M, Gopinathan A, Wagner A, et al. (2007) Kras(G12D) and Smad4/Dpc4 haploinsufficiency cooperate to induce mucinous cystic neoplasms and invasive adenocarcinoma of the pancreas. *Cancer Cell* 11: 229–243.
300. Jensen JN, Cameron E, Garay MV, Starkey TW, Gianani R, et al. (2005) Recapitulation of elements of embryonic development in adult mouse pancreatic regeneration. *Gastroenterology* 128: 728–741.

301. Sergeant G, Vankelecom H, Gremeaux L, Topal B (2009) Role of cancer stem cells in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Nat Rev Clin Oncol* 6: 580–586.
302. Bhagwandin VJ, Shay JW (2009) Pancreatic cancer stem cells: fact or fiction? *Biochim Biophys Acta* 1792: 248–259.
303. Lee CJ, Dosch J, Simeone DM (2008) Pancreatic cancer stem cells. *J Clin Oncol* 26: 2806–2812.
304. Hermann PC, Mueller MT, Heeschen C (2009) Pancreatic cancer stem cells--insights and perspectives. *Expert Opin Biol Ther* 9: 1271–1278.
305. Simeone DM (2008) Pancreatic cancer stem cells: implications for the treatment of pancreatic cancer. *Clin Cancer Res* 14: 5646–5648.
306. Li C, Heidt DG, Dalerba P, Burant CF, Zhang L, et al. (2007) Identification of pancreatic cancer stem cells. *Cancer Res* 67: 1030–1037.
307. Zhou J, Wang CY, Liu T, Wu B, Zhou F, et al. (2008) Persistence of side population cells with high drug efflux capacity in pancreatic cancer. *World J Gastroenterol* 14: 925–930.
308. Iovanna JL, Lechene de la Porte P, Dagorn JC (1992) Expression of genes associated with dedifferentiation and cell proliferation during pancreatic regeneration following acute pancreatitis. *Pancreas* 7: 712–718.
309. Ueki T, Toyota M, Skinner H, Walter KM, Yeo CJ, et al. (2001) Identification and characterization of differentially methylated CpG islands in pancreatic carcinoma. *Cancer Res* 61: 8540–8546.
310. Tan AC, Jimeno A, Lin SH, Wheelhouse J, Chan F, et al. (2009) Characterizing DNA methylation patterns in pancreatic cancer genome. *Mol Oncol* 3: 425–438.
311. Omura N, Li CP, Li A, Hong SM, Walter K, et al. (2008) Genome-wide profiling of methylated promoters in pancreatic adenocarcinoma. *Cancer Biol Ther* 7: 1146–1156.
312. Klump B, Hsieh CJ, Nehls O, Dette S, Holzmann K, et al. (2003) Methylation status of p14ARF and p16INK4a as detected in pancreatic secretions. *Br J Cancer* 88: 217–222.
313. Dammann R, Schagdarsurengin U, Liu L, Otto N, Gimm O, et al. (2003) Frequent RASSF1A promoter hypermethylation and K-ras mutations in pancreatic carcinoma. *Oncogene* 22: 3806–3812.
314. Kuroki T, Tajima Y, Kanematsu T (2004) Role of hypermethylation on carcinogenesis in the pancreas. *Surg Today* 34: 981–986.
315. Sato N, Fukushima N, Hruban RH, Goggins M (2008) CpG island methylation profile of pancreatic intraepithelial neoplasia. *Mod Pathol* 21: 238–244.

316. Sato N, Goggins M (2006) Epigenetic alterations in intraductal papillary mucinous neoplasms of the pancreas. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 13: 280–285.
317. Peng DF, Kanai Y, Sawada M, Ushijima S, Hiraoka N, et al. (2005) Increased DNA methyltransferase 1 (DNMT1) protein expression in precancerous conditions and ductal carcinomas of the pancreas. *Cancer Sci* 96: 403–408.
318. Lee EJ, Gusev Y, Jiang J, Nuovo GJ, Lerner MR, et al. (2007) Expression profiling identifies microRNA signature in pancreatic cancer. *Int J Cancer J Int Cancer* 120: 1046–1054. doi:10.1002/ijc.22394.
319. Szafranska AE, Davison TS, John J, Cannon T, Sipos B, et al. (2007) MicroRNA expression alterations are linked to tumorigenesis and non-neoplastic processes in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Oncogene* 26: 4442–4452.
320. Bloomston M, Frankel WL, Petrocca F, Volinia S, Alder H, et al. (2007) MicroRNA expression patterns to differentiate pancreatic adenocarcinoma from normal pancreas and chronic pancreatitis. *Jama* 297: 1901–1908.
321. Zhang H, Li Y, Huang Q, Ren X, Hu H, et al. (2011) MiR-148a promotes apoptosis by targeting Bcl-2 in colorectal cancer. *Cell Death Differ* 18: 1702–1710.
322. Hummel R, Watson DI, Smith C, Kist J, Michael MZ, et al. (2011) Mir-148a improves response to chemotherapy in sensitive and resistant oesophageal adenocarcinoma and squamous cell carcinoma cells. *J Gastrointest Surg Off J Soc Surg Aliment Tract* 15: 429–438.
323. Guo S-L, Peng Z, Yang X, Fan K-J, Ye H, et al. (2011) miR-148a Promoted Cell Proliferation by Targeting p27 in Gastric Cancer Cells. *Int J Biol Sci* 7: 567–574.
324. Zheng B, Liang L, Wang C, Huang S, Cao X, et al. (2011) MicroRNA-148a suppresses tumor cell invasion and metastasis by downregulating ROCK1 in gastric cancer. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res* 17: 7574–7583.
325. Liffers S-T, Munding JB, Vogt M, Kuhlmann JD, Verdoodt B, et al. (2011) MicroRNA-148a is down-regulated in human pancreatic ductal adenocarcinomas and regulates cell survival by targeting CDC25B. *Lab Invest J Tech Methods Pathol* 91: 1472–1479. doi:10.1038/labinvest.2011.99.
326. Vernejoul F, Ghenassia L, Souque A, Lulka H, Drocourt D, et al. (2006) Gene therapy based on gemcitabine chemosensitization suppresses pancreatic tumor growth. *Mol Ther* 14: 758–767.
327. Sicard F, Gayral M, Lulka H, Buscail L, Cordelier P (2013) Targeting miR-21 for the Therapy of Pancreatic Cancer. *Mol Ther J Am Soc Gene Ther* 21: 986–994. doi:10.1038/mt.2013.35.

328. Ravet E, Lulka H, Gross F, Casteilla L, Buscail L, et al. (2010) Using lentiviral vectors for efficient pancreatic cancer gene therapy. *Cancer Gene Ther* 17: 315–324. doi:10.1038/cgt.2009.79.
329. Lujambio A, Calin GA, Villanueva A, Ropero S, Sanchez-Cespedes M, et al. (2008) A microRNA DNA methylation signature for human cancer metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 13556–13561.
330. Fujita Y, Kojima K, Ohhashi R, Hamada N, Nozawa Y, et al. (2010) MiR-148a attenuates paclitaxel resistance of hormone-refractory, drug-resistant prostate cancer PC3 cells by regulating MSK1 expression. *J Biol Chem* 285: 19076–19084. doi:10.1074/jbc.M109.079525.
331. Yuan K, Lian Z, Sun B, Clayton MM, Ng IOL, et al. (2012) Role of miR-148a in hepatitis B associated hepatocellular carcinoma. *Plos One* 7: e35331.
332. Muniyappa MK, Dowling P, Henry M, Meleady P, Doolan P, et al. (2009) MiRNA-29a regulates the expression of numerous proteins and reduces the invasiveness and proliferation of human carcinoma cell lines. *Eur J Cancer* 45: 3104–3118.
333. Peng DF, Kanai Y, Sawada M, Ushijima S, Hiraoka N, et al. (2006) DNA methylation of multiple tumor-related genes in association with overexpression of DNA methyltransferase 1 (DNMT1) during multistage carcinogenesis of the pancreas. *Carcinogenesis* 27: 1160–1168.
334. Peng DF, Kanai Y, Sawada M, Ushijima S, Hiraoka N, et al. (2005) Increased DNA methyltransferase 1 (DNMT1) protein expression in precancerous conditions and ductal carcinomas of the pancreas. *Cancer Sci* 96: 403–408.
335. MacLeod AR, Rouleau J, Szyf M (1995) Regulation of DNA methylation by the Ras signaling pathway. *J Biol Chem* 270: 11327–11337.
336. Detich N, Ramchandani S, Szyf M (2001) A Conserved 3'-Untranslated Element Mediates Growth Regulation of DNA Methyltransferase 1 and Inhibits Its Transforming Activity. *J Biol Chem* 276: 24881–24890. doi:10.1074/jbc.M103056200.
337. Slack A, Cervoni N, Pinar M, Szyf M (1999) DNA Methyltransferase Is a Downstream Effector of Cellular Transformation Triggered by Simian Virus 40 Large T Antigen. *J Biol Chem* 274: 10105–10112. doi:10.1074/jbc.274.15.10105.
338. Wu J, Issa JP, Herman J, Bassett DE, Nelkin BD, et al. (1993) Expression of an exogenous eukaryotic DNA methyltransferase gene induces transformation of NIH 3T3 cells. *Proc Natl Acad Sci* 90: 8891–8895.
339. Linhart HG, Lin H, Yamada Y, Moran E, Steine EJ, et al. (2007) Dnmt3b promotes tumorigenesis in vivo by gene-specific de novo methylation and transcriptional silencing. *Genes Dev* 21: 3110–3122. doi:10.1101/gad.1594007.

340. Su LK, Kinzler KW, Vogelstein B, Preisinger AC, Moser AR, et al. (1992) Multiple intestinal neoplasia caused by a mutation in the murine homolog of the APC gene. *Science* 256: 668–670. doi:10.1126/science.1350108.
341. Fan H, Liu D, Qiu X, Qiao F, Wu Q, et al. (2010) A functional polymorphism in the DNA methyltransferase-3A promoter modifies the susceptibility in gastric cancer but not in esophageal carcinoma. *Bmc Med* 8: 12. doi:10.1186/1741-7015-8-12.
342. Gao Q, Steine EJ, Barrasa MI, Hockemeyer D, Pawlak M, et al. (2011) Deletion of the de novo DNA methyltransferase Dnmt3a promotes lung tumor progression. *Proc Natl Acad Sci* 108: 18061–18066. doi:10.1073/pnas.1114946108.
343. Shen J, Wang S, Zhang Y-J, Wu H-C, Kibriya MG, et al. (2013) Exploring genome-wide DNA methylation profiles altered in hepatocellular carcinoma using Infinium HumanMethylation 450 BeadChips. *Epigenetics Off J Dna Methylation Soc* 8: 34–43. doi:10.4161/epi.23062.
344. Lillycrop KA, Burdge GC (2011) Epigenetic changes in early life and future risk of obesity. *Int J Obes* 35: 72–83. doi:10.1038/ijo.2010.122.

VIII. Remerciements personnels et prix spécial du public

S'il y doit y avoir une partie qui n'appartient qu'à moi dans ce manuscrit, j'en prends les dernières pages. Une fois la solennité de ces travaux essorée il me reste à chaudement remercier ceux qui ont ENORMEMENT comptés pour moi.

Par où commencer ? Par le plus proche, c'est-à-dire au bureau derrière moi, MARION : merci pour ta fraîcheur et ta bonne humeur. Te rencontrer aura été un vrai plaisir, même si tu fais du poney et que tu écoutes une musique morte en 1988. Tout ce que je dis sur ton style vestimentaire est faux je te rassure. Merci à Alix, que je découvre à peine. Mais le fait qu'elle ne m'ait pas encore étripé montre qu'elle a une patience à toute épreuve. Merci aussi à Flavie, la dame au KFC, pleine de bons conseils et de bonne humeur, et qui m'a nourri à grands coups de sablés pendant près d'un an.

Un très très très gros big up à David et Charline dont la gentillesse, la bonne humeur, la gentillesse et... la bonne humeur ont été garants de ma santé mentale ces derniers mois. Merci à Romain, petit chiot sautant partout, parce que malgré ses côtés relous il est gentil au fond... Merci à Florent, pour s'être coupé les cheveux, et nos discussions comics décontractantes. Un énorme merci à Alex et Nico, pour leur contribution sans précédent aux insultes et adjectifs qualificatifs référant aux engins agricoles. Je pourrais maintenant dire que j'ai les bases mais pas les bonnes...

Merci à Camille, Mounira et Carline, les trois faces de la même pièce (si si). On a bien rigolé et je vous souhaite de bonnes choses pour la suite.

Merci à Claude pour son côté mentor et à Anne pour son côté mentos, parce qu'il est cool, et qu'elle est fraîche. J'ai apprécié ces mois passés avec vous et j'espère ne pas vous perdre. Salut aussi à Audren, que j'aurai peut-être le plaisir de croiser à Laroque. Restes propre Audren.

Merci à Julien, Tessa, Sarha, Oliver, Magaly et Pauline pour leur accueil, leur gentillesse, leur soutien (et leur relecture).

On arrive au gros du lourd, Philippe. Tu me suis depuis presque dix ans, en fait je ne sais pas trop qui suit l'autre. Tu as été d'une grande aide, par ton oreille attentive et tes conseils précieux. Tu es un peu le père Fouras, mais en jeune. Les bons choix sont ceux sur lesquels on se retourne, à la fin. Merci à ma famille (maintenant élargie), qui a su m'encourager et qui a rendu tout cela possible.

Je finirais en remerciant Laura. On n'a pas la vie de tout le monde, et on la façonne à coups de marteau. On la raconte à la bourrasque, au kilomètre de nage en eaux vives, mais avec toi je n'ai pas peur.

Résumé

Le cancer du pancréas est la quatrième cause de décès par cancer dans les pays occidentaux. Ce cancer implique des changements dans les profils de méthylation de l'ADN ainsi que la surexpression des enzymes responsables de sa mise en place : les méthyltransférases de l'ADN. Cependant, le rôle exact joué par ces protéines dans la carcinogénèse restent à être prouvés. Nous avons d'abord cherché à déterminer l'évolution des profils de méthylation de l'ADN à travers l'étude de l'expression d'un microARN particulier: miR-148a. Nous avons confirmé la répression de miR-148a par la hyperméthylation dans plusieurs lignées cellulaires dérivées de cancer du pancréas ainsi que dans des échantillons de tumeurs humaines, et nous avons montré l'utilité de cette marque pour le diagnostic différentiel entre cancer du pancréas et pancréatite chronique. Nous avons de plus évalué le potentiel thérapeutique de miR-148a par transfert de gènes in vitro et in vivo. Nous n'avons observé aucun changement significatif dans le comportement des cellules/tumeurs surexprimant miR-148a. Ceci indique que sa répression est une altération mineure accompagnant la cancérogenèse plutôt qu'un phénomène crucial du développement tumoral. Nous avons enfin élargi notre étude pour déterminer si la seule surexpression de méthyltransférases de l'ADN est capable de transformer des cellules pancréatiques normales. Nous avons observé que la surexpression stable de ces protéines affecte considérablement le comportement des cellules in vitro, ainsi que leur profil de méthylation et d'expression génique. Ces résultats suggèrent fortement que la méthylation de l'ADN facilite la carcinogénèse, mais n'est pas suffisante pour déclencher la formation de tumeurs. Ces travaux contribuent à une meilleure compréhension de la carcinogénèse pancréatique, du rôle joué par la méthylation de l'ADN, et ouvrent de nouveaux horizons concernant le rôle potentiellement oncogène de la méthylation de l'ADN.

Mots clé : Pancréas, Cancer, Méthylation de l'ADN, DNMT, MicroARNs

Pancreatic cancer is the fourth leading cause of cancer death in Western countries. This cancer involves changes in DNA methylation patterns and overexpression of enzymes responsible for its implementation : the DNA methyltransferases. However, the exact role of these proteins in carcinogenesis remains to be proven. We first aimed to determine the changing in the DNA methylation pattern through the study of the expression of a specific microRNA : miR-148a. We confirmed the repression of miR- 148a by DNA hypermethylation in several cell lines derived from pancreatic cancer as well as in human tumor samples, and we shown the usefulness of this mark in the differential diagnosis between pancreatic cancer and chronic pancreatitis. We also evaluated the therapeutic potential of miR- 148a gene transfer in vitro and in vivo. We observed no significant changes in the behavior of cells / tumors overexpressing miR-148a. This indicates that its repression is a minor alteration accompanying carcinogenesis rather than a crucial phenomenon of tumor development. Finally, we extended our study to determine whether the single overexpression of DNA methyltransferases can transform normal pancreatic cells. We observed that the stable overexpression of these proteins significantly affects the behavior of cells in vitro, their methylation patterns and gene expression. These results strongly suggest that DNA methylation facilitates carcinogenesis, but is not sufficient to trigger the formation of tumors. This work contributes to a better understanding of pancreatic carcinogenesis, the role of DNA methylation and open new horizons for the potential oncogenic role of DNA methylation.

Key words : Pancreas, Cancer, DNA methylation, DNMT, MicroRNAs