



**ANALYSE GLOBALE DES ALTÉRATIONS ABBERANTES  
DE LA METHYLATION DE L'ADN DANS LE CANCER DE  
L'OVAIRE**

**Thèse**

**Mamadou Kéita**

**Doctorat en biologie cellulaire et moléculaire**  
Philosophiae Doctor (Ph.D.)

Québec, Canada

© Mamadou Keita, 2013



## Résumé

Le cancer de l’ovaire représente 4% de tous les cancers chez la femme et est la première cause de décès parmi les tumeurs gynécologiques en occident. Le cancer épithélial de l’ovaire (CEO) représente 90% de toutes les tumeurs de l’ovaire. Malgré les avancées médicales et chirurgicales, le taux de survie à long terme demeure décevant en raison de la nature asymptomatique de la maladie. Le traitement repose sur la chirurgie cytoréductive suivie de la chimiothérapie combinant les dérivés de platine et de taxanes avec un taux de réponse de plus de 80%. Cependant, la des patientes font une récurrence par l’émergence de la résistance à ces drogues conventionnelles. Les bases moléculaires du déclenchement et de la progression du cancer de l’ovaire sont encore méconnues.

Au cours d’un cancer, l’hyperméthylation des îlots CpG de certains promoteurs géniques conduit souvent à l’inactivation des gènes suppresseurs de tumeur. Parallèlement, l’hypométhylation des îlots CpG de certains promoteurs est également impliquée dans la réactivation des proto-oncogènes et des gènes pro-métastatiques. La technologie des micropuces à ADN est grandement utilisée au niveau de la recherche sur le cancer, y compris celles portant sur les mécanismes et les biomarqueurs associés à la progression et à la chimiorésistance dans les cancers ovariens.

Dans ce travail de thèse, nous avons évalué le profil de méthylation aberrante dans les différents grades des tumeurs de CEO de type séreux par rapport aux tissus normaux de l’ovaire, et dans les cellules primaires post-chimiothérapeutiques par rapport aux cellules primaires pré-chimiothérapeutiques de l’ovaire de deux patientes. Nos résultats ont montré que l’hyperméthylation est un événement très précoce de la carcinogenèse avec suppression des gènes ayant un rôle protecteur. Alors que l’hypométhylation massive est associée à la phase avancée de la maladie avec la surexpression des gènes impliqués dans l’invasion et la

métastase. Découlant de ces études, *RUNX1* et *RUNX2* ont été identifiés comme des gènes hypométhylés dans les cellules post-chimiothérapeutiques. Les études fonctionnelles ont montré que ces deux gènes sont associés à la prolifération, la migration et l'invasion cellulaire dans le CEO. Cependant, ces effets similaires sont exercés par des mécanismes moléculaires différents.

## Abstract

Ovarian cancer accounts for 4% of all cancers in women and is the leading cause of death among Gynecologic tumours in the western countries. The epithelial ovarian cancer (EOC), which represents 90% of all ovarian tumors. Despite advances in medical and surgical treatment, long term survival rate remains disappointing due to the asymptomatic nature of the disease. The treatment uses cytoreductive surgery followed by chemotherapy combining derivatives of platinum and taxanes with a response rate of over 80%. However, the most part of the patients have a recurrence by the emergence of resistance to these conventional drugs. The molecular basis of the initiation and progression of ovarian cancer are still unknown.

During cancer, hypermethylation of gene promoter CpG islands often leads to inactivation of some tumor suppressor genes. At the same time, CpG islands hypomethylation is also associated to reactivation of proto-oncogenes and pro-metastatic genes. The microarray technology has been successfully used in cancer research, including studies on mechanisms and biomarkers linked to ovarian cancer progression and chemoresistance.

In this study, we have evaluated the aberrant DNA methylation profile in tumour grades of serous type EOC compared to normal ovarian tissue, and primary cells culture prior to and post chemotherapy (CT) treatment from 2 EOC patients. Our results showed that hypermethylation is an early event in carcinogenesis with down-regulation of genes having a protective role. While massive hypomethylation is associated with advanced serous EOC with upregulation of genes involved in cell invasion and metastasis. From these studies, we identified *RUNX1* and *RUNX2* as hypomethylated genes in post-chemotherapy primary cells culture.

Subsequent functional analyses pointed to RUNX1 and RUNX2 association with EOC cell proliferation (including cell cycle control for RUNX1), migration and invasion.

However, RUNX1 and RUNX2 display overlapping functions in EOC dissemination, these nevertheless employ distinct molecular mechanisms, specific for each gene. Our data are indicative of strong oncogenic potential of both transcription factors in EOC progression.

# Table des matières

<b>Résumé</b>	<b>iii</b>
<b>Abstract</b>	<b>v</b>
<b>Liste des abréviations</b>	<b>xix</b>
<b>Remerciements</b>	<b>xxi</b>
<b>Avant-propos</b>	<b>xxiii</b>
<b>1. Introduction générale</b>	<b>1</b>
1.1- Le cancer épithélial de l’ovaire (CEO)	1
1.1.1- L’incidence du cancer de l’ovaire	1
1.1.2 Facteurs de risque du cancer de l’ovaire	1
1.1.3- Les types de tumeurs de l’ovaire	3
1.1.3.1 Tumeurs d’origine stromale ou des cordons sexuels	3
1.1.3.2 Tumeurs d’origine germinale	4
1.1.3.3 Tumeurs d’origine épithéliale	4
1.1.4- Les types histopathologiques du CEO	4
1.1.4.1 Séreux	5
1.1.4.2 Mucineux	7
1.1.4.3 Endométrioïdes	8
1.1.4.4 Cellules claires	8
1.1.5 Stades et progression de la maladie	10
1.1.6- Le grade de la tumeur	11
1.1.7- Potentiel de malignité du CEO	12
1.1.7.1- Les tumeurs bénignes (BOV)	13
1.1.7.2 Les tumeurs borderlines ou à faible potentiel de malignité (LMP)	13
1.1.7.3 Les tumeurs invasives (TOV)	14
1.1.8- L’origine du cancer épithélial de l’ovaire	15
1.1.8.1- L’hypothèse de l’origine épithéliale	15
1.1.8.2- L’hypothèse d’un continuum entre les tumeurs BOV, LMP et TOV	17
1.1.8.3- L’hypothèse de l’origine des trompes de Fallope	18
1.1.9- Au niveau clinique	19
1.1.9.1- Symptômes	20
1.1.9.2- Détection	20
1.1.9.2.1- Le marqueur CA125	21
1.1.9.2.1- Le marqueur HE4 (human epididymis protein 4)	21
1.1.9.3- Traitement	22
1.2 Épigénétique et cancer	23
1.2.1 Émergence de l’épigénétique	23
1.2.2 Régulation des micro-ARN (miARNs)	27
1.2.3 Modifications de la chromatine	31

1.2.4 Méthylation aberrante de l'ADN	33
1.2.4.1 Mécanismes de méthylation de la cytosine	33
1.2.4.2 - Rôle de la méthylation dans le développement	36
1.2.4.3 - Mécanismes impliqués dans le cancer	37
1.2.4.3.1- Vers un nouveau biomarqueur	38
1.2.4.3.2- La thérapie épigénétique	40
1.2.4.3.2.1- L'épigénétique et la prédiction de la réponse au traitement	40
1.2.4.3.2.2- Les inhibiteurs de la méthylation de l'ADN (DNMTi)	42
1.2.4.3.2.3- Les inhibiteurs de la déacétylation des histones (HDACi)	44
1.2.4.4- Méthylation dans le CEO	46
1.2.4.4.1- L'hyperméthylation des gènes suppresseurs de tumeur	46
1.2.4.4.2- L'hypométhylation des oncogènes	47
1.2.4.4.3- Vers un marqueur associé au CEO	49
1.2.4.4.3.1- Marqueurs précoces de diagnostic	49
1.2.4.4.3.2- Marqueurs de pronostic	50
1.2.4.4.3.3- Marqueurs de prédiction à la chimiothérapie	52
1.2.4.4.4- La thérapie épigénétique dans le CEO	53
1.2.5.1- Analyse par digestion enzymatique et Southern Blot	55
1.2.5.2- Conversion au bisulfite	57
1.2.5.2.1 PCR spécifique à la méthylation (MSP)	58
1.2.5.2.2 Conversion au bisulfite suivi du séquençage (BSP)	60
1.2.5.2.3 Conversion au bisulfite suivi du pyroséquençage	61
1.2.5.3- Immunoprécipitation de l'ADN méthylé (MeDIP)	62
1.2.5.3.1- Immunoprécipitation de l'ADN méthylé et analyse sur puce (MeDIP-Chip)	62
1.2.5.3.2- Immunoprécipitation de l'ADN méthylé et séquençage (MeDIP-Seq)	63
1.3- Les facteurs de transcription <i>RUNX</i>	65
1.4- Problématique, hypothèse et objectifs générales du projet	67
<b>2. Global methylation profiling in serous ovarian cancer is indicative for distinct aberrant DNA methylation signatures associated with tumor aggressiveness and disease progression</b>	<b>71</b>
2.1 Mise en contexte et objectifs de l'article et contributions des auteurs	72
2.2. Résumé en français	75
2.3 Manuscrit original de l'article (anglais)	77
2.3 Manuscrit original de l'article (anglais)	77
2.3.1 ABSTRACT	78
2.3.2 INTRODUCTION	79
2.3.3. MATERIALS AND METHODS	81
2.3.3.1 Cell cultures	81
2.3.3.2 Patients and Tissue specimens	81
2.3.3.3 MeDIP, Agilent CpG island microarrays and data analysis	82
2.3.3.4 Bisulfite sequencing PCR (BSP) analysis	83



2.3.3.5 Semi-quantitative RT-PCR (sqRT-PCR)	83
2.3.4 RESULTS	84
2.3.4.1 Aberrant DNA hypermethylation is common for all serous EOC tumor subtypes and is representative for developmental regulatory genes	84
2.3.4.2 Aberrant DNA hypomethylation correlates with tumor malignancy grade	86
2.3.5 DISCUSSION	88
2.3.6 ACKNOWLEDGMENTS	92
2.3.7 REFERENCES	93
2.3.8 FIGURE LEGENDS	99
2.3.8 FIGURE LEGENDS	99
2.3.9. TABLES	105
2.3.10. SUPPLEMENTAL FIGURES	107
<b>3. The RUNX1 transcription factor is expressed in serous epithelial ovarian carcinoma and contributes to cell proliferation, migration and invasion</b>	<b>109</b>
3.1 Mise en contexte et objectifs de l'article et contributions des auteurs	110
3.2. Résumé en français	112
3.3 Manuscrit original de l'article (anglais)	115
3.3.1. ABSTRACT	116
3.3.2. INTRODUCTION	117
3.3.3. RESULTS	120
3.3.3.1 RUNX1 gene exhibits specific hypomethylation in serous EOC omental metastases, compared to primary serous EOC tumors	120
3.3.3.2 Analysis of RUNX1 expression in serous EOC tumors by immunohistochemistry (IHC)	121
3.3.3.3 Phenotype analysis of RUNX1 suppression in EOC cells: possible implications in EOC cell proliferation, cell cycle control, migration and invasion	122
3.3.3.4 Molecular mechanisms of RUNX1 action in EOC cells	123
3.3.3.5 Validation of microarray findings with semi-quantitative RT-PCR (sqRT-PCR).	126
3.3.4. DISCUSSION	127
3.3.5. PATIENTS AND METHODS	133
3.3.5.1 Patients and Tissue specimens	133
3.3.5.2 Cell cultures	133
3.3.5.3 Bisulfite sequencing PCR (BSP) analysis	134
3.3.5.4 Tissue microarrays (TMAs) construction and IHC	134
3.3.5.5 Short Hairpin RNA (shRNA) – mediated RUNX1 knockdown in SKOV3 cells	135
3.3.5.6 Western Blot Analysis	136

3.3.5.7 Cell proliferation assay using impedance measurement with the xCELLigence system	136
3.3.5.8 Colony formation assay	137
3.3.5.9 Cell migration and invasion assays	137
3.3.5.10 Flow cytometry	138
3.3.5.11 MTT (cytotoxicity) assay	138
3.3.5.12 Gene expression profiling and data analysis	139
3.3.5.13 Semi-quantitative duplex RT-PCR (sqRT-PCR)	140
3.3.6. ACKNOWLEDGEMENTS	141
3.3.7. REFERENCES	142
3.3.8. FIGURE LEGENDS	154
3.3.9. TABLES	164
<b>4. Inhibition of RUNX2 transcriptional activity blocks the proliferation, migration and invasion of epithelial ovarian carcinoma cells</b>	<b>169</b>
4.1 Mise en contexte et objectifs de l'article et contributions des auteurs	170
4.2. Résumé en français	172
4.3 Manuscrit original de l'article (anglais)	175
4.3.1. ABSTRACT	176
4.3.2. INTRODUCTION	177
4.3.3. RESULTS	181
4.3.3.1 Analysis of RUNX2 protein expression and DNA methylation status in serous EOC tumors	181
4.3.3.2 Phenotype analysis of RUNX2 suppression in EOC cells: possible implications in EOC cell proliferation, migration and invasion	182
4.3.3.3 Molecular mechanisms of RUNX2 action in EOC cells	183
4.3.3.4 Validation of microarray findings with semi-quantitative RT-PCR (sqRT-PCR)	185
4.3.3.5 RUNX1 and RUNX2 use distinct molecular mechanisms to promote ovarian cancer cell proliferation, migration and invasion	186
4.3.4. DISCUSSION	188
4.3.5. PATIENTS AND METHODS	193
4.3.5.1 Patients and Tissue specimens	193
4.3.5.2 Cell cultures	193
4.3.5.3 Bisulfite sequencing PCR (BSP) analysis	194
4.3.5.4 Tissue microarrays (TMAs) construction and IHC	194
4.3.5.5 Short Hairpin RNA (shRNA) – mediated RUNX1 knockdown in SKOV3 cells	195
4.3.5.6 Western Blot Analysis	196
4.3.5.7 Cell proliferation assay using impedance measurement with the xCELLigence system	196
4.3.5.8 Colony formation assay	197

4.3.5.9 Cell migration and invasion assays	197
4.3.5.10 Flow cytometry	198
4.3.5.11 MTT (cytotoxicity) assay	198
4.3.5.12 Gene expression profiling and data analysis	199
4.3.5.13 Semi-quantitative duplex RT-PCR (sqRT-PCR)	199
4.3.6. ACKNOWLEDGEMENTS	201
4.3.7. REFERENCES	202
4.3.8. FIGURE LEGENDS	213
4.3.9. TABLES	225
<b>5. Discussion</b>	<b>229</b>
5.1. L'hyperméthylation aberrante de l'ADN est associée à tous les grades/stades des tumeurs séreuses du CEO et cible préférentiellement les gènes de développement.	230
5.2. L'hypométhylation aberrante de l'ADN est associée à la phase avancée de la maladie.	232
5.3. Le profilage de la méthylation aberrante de l'ADN dans le CEO a permis l'identification de nouveaux gènes méthylés comme biomarqueurs potentiels de la progression tumorale.	234
5.4. L'expression de RUNX1 dans les tumeurs ovariennes est associée à la prolifération avec arrêt du cycle cellulaire en phase G1, à l'invasion et à la métastase.	235
5.5. La signature moléculaire de la suppression de RUNX1 dans les cellules du CEO est associée à la surexpression des gènes impliqués dans l'apoptose et la régulation du cycle cellulaire et à la sous-expression des gènes de la voie PI3K-AKT et NOTCH.	237
5.6. L'expression de RUNX2 dans les tumeurs ovariennes est associée à la prolifération, à l'invasion et à la métastase.	240
5.7. La suppression de RUNX2 dans les cellules du CEO induit la surexpression des gènes associés à la morphologie cellulaire et à l'apoptose avec la sous-expression des gènes impliqués dans le métabolisme, la croissance et la prolifération cellulaire.	241
5.8. RUNX2 et RUNX1 induisent des phénotypes cellulaires similaires par des mécanismes moléculaires différents.	244
<b>6- Conclusions et Perspectives</b>	<b>247</b>
<b>7- Bibliographie</b>	<b>251</b>



## Liste des tableaux

<b>Tableau 1.1</b> Stades de développement des tumeurs ovariennes classifiées selon le système FIGO .....	11
<b>Tableau 1.2</b> La sensibilité et la spécificité de HE4 et CA 125 pour différencier le cancer de l’ovaire des autres maladies bénignes de l’ovaire .....	22
<b>Tableau 1.3</b> Les altérations épigénétiques dans les maladies non-cancéreuses.....	25
<b>Tableau 1.4</b> Potentiels biomarqueurs épigénétiques de divers cancers.....	40
<b>Tableau 1.5</b> Statuts de méthylation des gènes comme prédicateurs de la réponse aux drogues dans certains types de cancers et lignées cellulaires cancéreuses.....	42
<b>Tableau 1.6</b> Les inhibiteurs de l’ADN méthyltransférases (DNMTs).....	43
<b>Tableau 1.7</b> les différentes classes de molécules HDACs.....	44
<b>Tableau 1.8</b> Les inhibiteurs de HDACs et sirtuines en développement clinique.....	45
<b>Tableau 2.1</b> Numbers of aberrantly methylated CpG islands and genes in serous ovarian tumors, compared to normal ovarian tissue.....	105
<b>Tableau 2.2</b> Functional characterization of hypomethylated genes in poorly-differentiated (grade 3) EOC tumors <sup>a</sup> .....	106
<b>Tableau 3.1</b> Patients’ characteristics.....	164
<b>Tableau 3.2</b> Selected differentially expressed gene groups in SKOV3 cells upon RUNX1 knockdown.....	165
<b>Tableau 3.3</b> Semi-quantitative RT-PCR validation of microarray data.....	168

<b>Tableau 4.1</b> Patients' characteristics.....	225
<b>Tableau 4.2</b> Selected differentially expressed gene groups in SKOV3 cells upon RUNX2 knock-down.....	225
<b>Tableau 4.3</b> Semi-quantitative RT-PCR validation of microarray data.....	227

## Liste des figures

<b>Figure 1.1</b> Coupes histologiques des quatre principaux types histopathologiques du cancer épithélial de l’ovaire.....	5
<b>Figure 1.2</b> Modèle de développement des tumeurs de haut grade du cancer épithéliale de type séreux.....	19
<b>Figure 1.3</b> Une interaction mutuelle se fait entre les types différents d'informations épigénétiques.....	27
<b>Figure 1.4</b> La voie de biosynthèse de miRNA du noyau au cytoplasme.....	29
<b>Figure 1.5</b> Schémas du contrôle épigénétique de la transcription des gènes par les altérations de la méthylation de l'ADN et les modifications de statut de la chromatine.....	33
<b>Figure 1.6</b> Représentation schématique des voies biochimiques de la méthylation des cytosines, déméthylation et mutagenèse des cytosines en 5-méthylcytosine.....	35
<b>Figure 1.7</b> Statut de méthylation des cellules versus cellules cancéreuses.....	38
<b>Figure 1.8</b> Résensibilisation des tumeurs ovariennes chimiorésistantes au carboplatine en pharmacothérapie épigénétique.....	55
<b>Figure 1.9</b> Représentation schématique de l’analyse de la méthylation de l’ADN par Southern Blot .....	57
<b>Figure 1.10</b> Diagramme schématique de la réaction de conversion par le bisulfite.....	58
<b>Figure 1.11</b> Représentation schématique de l’analyse de la méthylation de l’ADN par MSP après conversion au bisulfite.....	60

<b>Figure 1.12</b> Représentation schématique de l'analyse de la méthylation de l'ADN par la technique MeDIP.....	64
<b>Figure 2.1</b> Venn diagram and functional analyses of common and distinct aberrantly methylated genes in BL, G1;SIII/IV, G3;S1 and G3;SIII/IV serous EOC tumors compared to normal ovarian tissue samples.....	101
<b>Figure 2.2</b> BSP analysis of the methylation status of selected hypermethylated genes in serous EOC tumors compared to normal tissue samples.....	102
<b>Figure 2.3</b> BSP analysis of the methylation status of selected hypomethylated genes in serous EOC tumors compared to normal tissue samples.....	103
<b>Figure 2.4</b> Characterization of DNA hypomethylation in PCCs derived from matched tumor samples obtained prior to, and post-CT treatment from two serous EOC patients with advanced (G3;SIII/IV) disease.....	104
<b>Figure 2.5</b> (Supplemental figure). BSP analysis of the methylation status of selected homeobox genes in G3;SIII/IV serous EOC tumors compared to normal tissue samples.....	107
<b>Figure 2.6</b> (Supplemental figure). Schematic presentation of the chromosomal distribution of the DNA hypermethylated sites identified in all serous EOC tumor subtypes by our MeDIP-array experiments, and the localization of the H3K27me3 repressive marks in human ES cells.....	108
<b>Figure 3.1</b> BSP analysis of the methylation status of RUNX1 in grade 3 primary serous EOC tumors compared to omental metastases.....	157
<b>Figure 3.2</b> Analysis of RUNX1 expression in serous EOC tumors by IHC.....	158
<b>Figure 3.3</b> Analysis of RUNX1 expression in SKOV3 cells.....	159
<b>Figure 3.4</b> ShRNA-mediated knockdown of the RUNX1 expression in SKOV3 cells..	160



<b>Figure 3.5</b> Effect of RUNX1 knockdown on SKOV3 cell migration and invasion.....	161
<b>Figure 3.6</b> Functional analysis for a dataset of differentially expressed genes ( $\geq 2$ -fold) following RUNX1 suppression in SKOV3 cells.....	162
<b>Figure 3.7</b> Network analysis of dynamic gene expression in SKOV3 cells based on the 2-fold common gene expression list obtained following shRNA-mediated RUNX1 knockdown.....	163
<b>Figure 4.1</b> Analysis of RUNX2 expression in serous EOC tumors by IHC.....	217
<b>Figure 4.2</b> BSP analysis of the methylation status of RUNX2 in grade 3 primary serous EOC tumors compared to omental metastases.....	218
<b>Figure 4.3</b> ShRNA-mediated knockdown of the RUNX2 expression in SKOV3 cells..	219
<b>Figure 4.4</b> Effect of RUNX1 knockdown on SKOV3 cell proliferation and colony formation.....	220
<b>Figure 4.5</b> Effect of RUNX2 knockdown on SKOV3 cell migration and invasion.....	221
<b>Figure 4.6</b> Functional analysis for a dataset of differentially expressed genes ( $\geq 2$ -fold) following RUNX2 suppression in SKOV3 cells.....	222
<b>Figure 4.7</b> Network analysis of dynamic gene expression in SKOV3 cells based on the 2-fold common gene expression list obtained following shRNA-mediated RUNX2 knockdown.....	223
<b>Figure 4.8</b> Comparison of common and distinct gene expressions across the various differentially-expressed gene groups upon RUNX1 and RUNX2 knockdown in SKOV3 cells.....	224
<b>Figure 4.9</b> (Supplemental figure)Genomic structure of the RUNX2 gene, isoforms a, b and c. The CpG island (CpG 60) containing the analyzed 12 putative CpG methylation targets is indicated with arrow.....	228



## Liste des abréviations

ADN	Acide désoxyribonucléique
ARN	Acide ribonucléique
ATCC	<i>American type culture collection</i>
BER	<i>Base excision repair</i>
BOV	Benign ovarian tumor (tumeur ovarienne bénigne)
BRCA1	Breast cancer 1 gene (gène du cancer du sein 1)
BRCA2	Breast cancer 2 gene (gène du cancer du sein 2)
CA125	Cancer antigen 125 (antigène de cancer 125)
CEO/EOC	Cancer ovarien épithéliale/ <i>epithelial ovarian cancer</i>
CT	Chimiothérapie
CTP	Cytosine triphosphate
Cy-3	Cyanine-3
Cy-5	Cyanine-5
dCTP	Deoxycytosine triphosphate
DMEM	<i>Dubelco's modified eagle medium</i>
DMSO	Diméthylsulphoxyde
dNTP	Deoxynucléotides triphosphate
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
FACS :	<i>fluorescence activated cell sorter</i>
FBS	<i>Fetal bovine serum</i>
FIGO	Fédération international de gynécologie et d'obstétrique
GTP	Guanine triphosphate
h	Heure
HDAC:	déacétylases d'histones
IPA :	<i>Ingenuity Pathways Analysis</i>
LMP	<i>Low malignant potential tumor; borderline tumor</i> (tumeur à faible potentiel de malignité)
µg	Microgramme
µM	Micromolaire
MDR	<i>Multidrug resistance</i>
mg	Milligramme
ml	Millilitre
mM	Millimolaire
MMR	<i>Mismatch repair</i>
MTT	<i>3-(4,5-Dimethylthiazol-2-Yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide</i>
NER	<i>Nucleotide excision repair</i>
OMS	Organisation mondiale de la santé
OSE	<i>Ovarian surface epithelium</i>
PBS	<i>Phosphate buffer saline</i>
PCR	<i>Polymerise chain reaction</i>
PFS	<i>Progression-free survival</i>
RT	<i>Reverse transcriptase</i>
RUNX	<i>Runt-related transcription factor</i>

sq  
TOV

Semi-quantitatif  
Tumeur ovarienne invasive (*invasive ovarian tumor*)

## Remerciements

Tout d'abord, je dois remercier profondément mon directeur de recherche Dr Dimtcho Batchvarov. Merci de m'avoir permis de réaliser ce projet de thèse enrichissant, mais aussi pour votre accueil, votre support et votre confiance. Je le remercie aussi de m'avoir transmis toutes ces connaissances dans le domaine du cancer et de la génomique. Ces connaissances seront très utiles durant ma carrière.

Une pensée va également à Magdalena Bachvarova, une professionnelle de recherche ayant été l'un des piliers de l'accomplissement de ce travail. Merci également à tous les autres membres du laboratoire actuels ou anciens, Zhi-Qiang Wang, Jean-François Pelletier, Kether Guerreo, Pierre-Luc Mercier, Xuan Bich Trinh et Sabina Cisa. Ce fut un plaisir immense de travailler avec chacun d'entre vous.

Un gros merci à toute l'équipe en gynécologie-oncologie de l'Hôtel-Dieu de Québec pour leurs connaissances et leur aide. Merci aussi à Chantal Morin pour la lecture des lames de TMA. J'aimerais aussi remercier des amis qui, eux-aussi, ont été très présent durant ce parcours de mon séjour Québécois: Hawa Sissoko, Oumar Samassekou, Nadia Rhéaume, René Fortin et Nathalie Bastien.

Enfin, je remercie mon entourage familial qui a fortement contribué à cette réussite de long parcours et qui m'a remonté le moral durant les moments difficiles et qui n'ont jamais cessé de croire en moi. Il s'agit de mon père Feu Nianfou Keita, de ma grand-mère Feu Saniba Coulibaly et de ma mère Kany Coulibaly. Mes pensées aussi à mes frères et sœurs.

Merci à tous les membres du Centre de recherche de l'hôtel Dieu de Québec, ainsi que du programme de biologie cellulaire moléculaire pour cette expérience très enrichissante et stimulante.



## **Avant-propos**

### **Information sur les publications**

Les informations sur les publications et la contribution de l'étudiant à ces publications seront décrites au début de chacun des chapitres correspondants.

### **Chapitre 2**

Global methylation profiling in serous ovarian cancer is indicative for distinct aberrant DNA methylation signatures associated with tumor aggressiveness and disease progression

### **Chapitre 3**

The RUNX1 transcription factor is expressed in serous epithelial ovarian carcinoma and contributes to cell proliferation, migration and invasion

### **Chapitre 4**

Inhibition of RUNX2 transcriptional activity blocks the proliferation, migration and invasion of epithelial ovarian carcinoma cells





# **1. Introduction générale**

## **1.1- Le cancer épithélial de l'ovaire (CEO)**

### **1.1.1- L'incidence du cancer de l'ovaire**

Le cancer est une cause majeure de décès dans le monde en raison de sa nature asymptomatique. Selon la Société Canadienne de Cancer (SCC), le cancer de l'ovaire est la tumeur gynécologique dont le taux de mortalité est le plus élevé et est la cinquième cause de décès dus au cancer après le cancer des poumons, du sein, du colorectum et du pancréas (SCC, 2012). Il a été d'ailleurs estimé 2600 nouveaux cas en 2012 avec 1750 décès (SCC, 2012). Au Canada, le cancer de l'ovaire occupe le septième rang des cancers qui affectent le plus les femmes après le cancer du sein, des poumons, du colorectum, de l'utérus, de la thyroïde et du lymphome non hodgkinien (SCC, 2012). La probabilité de développer le cancer de l'ovaire au cours de la vie est d'environ 1 sur 69 et la probabilité d'en mourir est de 1 sur 92 (SCC, 2012). Comme pour le Canada, les autres pays développés suivent les mêmes tendances. Aux États-Unis, selon la Société Américaine de Cancer (SAC), 21990 nouveaux cas et 15450 décès ont été enregistrés en 2012 (SAC, 2012). Environ 70% des femmes diagnostiquées d'un cancer de l'ovaire mourront de la maladie (SCC, 2012; SAC, 2012).

### **1.1.2 Facteurs de risque du cancer de l'ovaire**

Certains facteurs susceptibles d'influer sur la fréquence de l'avènement de l'ovulation peuvent modifier le risque de développer le cancer de l'ovaire. Il a été démontré que la grossesse diminue le risque, et que ce risque diminue avec chaque grossesse ultérieure

(Whittemore, 1994). Dans le même ordre d'idée, l'utilisation de contraceptifs oraux pendant une période d'au moins cinq années consécutives est liée à la réduction du risque de cancer de l'ovaire de 20% (Beral et al., 2008). De façon inverse, la nulliparité a été associée à un risque accru (Cetin et al., 2008). D'autres facteurs chirurgicaux comme l'hystérectomie prophylactique ou la ligature des trompes, peuvent réduire le risque de développer un cancer de l'ovaire (Hankinson et al., 1993). La salpingo-ovariectomie prophylactique peut réduire le risque de cancer de l'ovaire de 80 à 95 % et peut être recommandée pour les femmes à haut risque de développer la maladie (Gadducci et al., 2010).

Enfin, l'hérédité constitue également un risque majeur. Elle est impliquée dans 5 à 15% des cas (Lynch et al., 2009; Prat et al., 2005). Le plus important facteur de risque de développer un cancer de l'ovaire est une historique familiale de la maladie (Holschneider and Berek, 2000). Par exemple, la mère d'une femme atteinte du cancer des ovaires a un risque relatif de 4,6 de développer le cancer de l'ovaire (Ziogas et al., 2000). Les personnes diagnostiquées pour le cancer héréditaire du sein avec la mutation des gènes *BRCA1* (17 q 21) ou *BRCA2* (13q12.3) sont très susceptibles de développer le cancer de l'ovaire. Environ 90% des cancers ovariens d'origine héréditaire sont attribués à la mutation dans les gènes *BRCA1/2* (Lynch et al., 2009). Les mutations germinales de *BRCA1* et *BRCA2* confèrent respectivement un risque de 50 % et 20 % pour le cancer de l'ovaire (King et al., 2003). Environ 10 à 15 % des cancers de l'ovaire héréditaires se produisent dans le contexte du syndrome de Lynch aussi appelé cancer colorectal héréditaire sans polypose (HNPCC), dus à des mutations des gènes *MLH1* (3p21.3), *MSH2* (2 p 21), *MSH6* (2 p 16) ou *PSM2* (7p22.2) (Lynch et al., 2009).

Cependant, les cancers héréditaires de l'ovaire ne constituent que 5-15 % des cas, l'étiologie génétique de la plupart des cancers de l'ovaire n'est pas connue.

### **1.1.3- Les types de tumeurs de l'ovaire**

La plupart des cancers ovariens se développent à partir de quatre catégories de cellules à savoir les cellules épithéliales, les cellules du stroma et du cordon sexuel et les cellules germinales.

#### **1.1.3.1 Tumeurs d'origine stromale ou des cordons sexuels**

Les tumeurs dites stromales ou des cordons sexuels comptent pour environ 5% de toutes les tumeurs de l'ovaire (Reed et al., 2010). Les tumeurs ovariennes stromales se développent à partir des cellules des tissus conjonctifs qui maintiennent l'ovaire ensemble et ceux qui produisent les hormones féminines, les œstrogènes et la progestérone. Les types les plus fréquents chez cette classe rare de tumeurs de l'ovaire sont les tumeurs de la granulosa-thèque et les tumeurs à cellules de Sertoli-Leydig. Les tumeurs d'origine stromale ou des cordons sexuels peuvent être associées à une production hormonale menant au développement de phénotypes masculins ou féminins chez les patientes atteintes. De ce groupe, les tumeurs des cellules de la granulosa sont les plus potentiellement malignes et se développent très souvent chez les jeunes femmes de moins de 20 ans (Reed et al., 2010). Ces tumeurs sont généralement indolores, unilatérales et confinées aux ovaires et ont un bon pronostic à long terme (Reed et al., 2010).

### **1.1.3.2 Tumeurs d'origine germinale**

Ces tumeurs comptent pour environ 5% de toutes les tumeurs de l'ovaire et se développent à partir des cellules qui produisent les ovules (Reed et al., 2010). Plus de 75% de ces tumeurs sont diagnostiquées chez les jeunes femmes de moins de 25 ans (Gallion et al., 1983). Le sous-type de tumeurs de cellules germinales le plus fréquent est le kyste dermoïde ou tératome mature. Ces tumeurs sont généralement bénignes et confinées aux ovaires (Reed et al., 2010; Templeman et al., 2000).

La plupart des tumeurs stromales et du cordon sexuel, ainsi que des tumeurs germinales étant confinées aux ovaires, le traitement chirurgical est souvent associé à un bon pronostic (Reed et al., 2010).

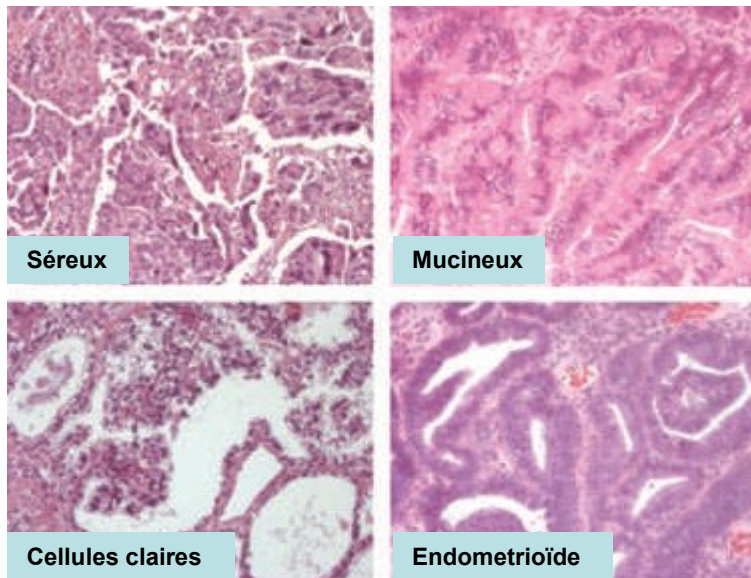
### **1.1.3.3 Tumeurs d'origine épithéliale**

Les tumeurs épithéliales dérivent des cellules de la surface épithéliale de l'ovaire (SEO). Elles représentent environ 90% de toutes les tumeurs de l'ovaire (Chen et al., 2003). Puisque mon projet de doctorat a porté sur ce type de tumeurs ovariennes, les sections suivantes le décriront plus en détails.

### **1.1.4- Les types histopathologiques du CEO**

Les cancers épithéliaux, qui représentent 90% des cancers des ovaires, peuvent être classifiés en fonction du type cellulaire qui les compose en sous-type séreux, mucineux, endométrioïdes et cellules claires (Bast et al., 2009) (**Figure 1.1**). En plus de leur

apparence, ces sous-types sont considérés comme des maladies différentes. Des études comparatives d'hybridation génomiques ont montré que ces tumeurs diffèrent par des caractéristiques génétiques moléculaires (Tapper et al., 1997) avec distincts profils protéiques (Kobel et al., 2008).



**Figure 1. 1 Coupes histologiques des quatre principaux types histopathologiques du cancer épithélial de l'ovaire (Bast et al., 2009).**

#### 1.1.4.1 Séreux

Les tumeurs séreuses sont appelées ainsi puisqu'elles sont formées de cellules ayant l'architecture de la paroi interne des trompes de Fallope (Chen et al., 2003) (**Figure 1.1**). Ce type histopathologique est le plus fréquent et est retrouvé en clinique dans environ 50% des CEO malins (Russell, 1979). Environ 50-60% des tumeurs de type séreux sont bénignes et donc sous forme de kystes, 15% à faible potentiel de malignité ou borderlines et 30% malignes (Chen et al., 2003; Russell, 1979). Récemment, il a été proposé une subdivision des tumeurs ovariennes séreuses en carcinomes ovariens séreux de bas grade (COSBG) et

carcinomes ovariens séreux de haut grade (COSHG). Des évidences soutiennent l'hypothèse que ces tumeurs constituent deux entités distinctes avec absence de progression de COSBG à COSHG (Shih Ie and Kurman, 2004). Les tumeurs COSHG constituent environ 90% des carcinomes séreux (Kurman and Shih Ie, 2008) avec des mutations germinales de *BRCA1* (Press et al., 2008). Ces tumeurs présentent plusieurs aberrations chromosomiques comparativement aux tumeurs COSBG (Singer et al., 2002). Les tumeurs COSHG comportent dans 80% des cas une mutation dans le gène suppresseur de tumeur *TP53* (17p13.1). Par contre, les mutations de *TP53* dans les tumeurs COSBG sont rares (Salani et al., 2008). En plus de la mutation de *TP53*, les tumeurs COSHG comportent l'inactivation de *BRCA1* dans 50% des cas, soit par mutation germinale ou somatique, ou par méthylation du promoteur (Press et al., 2008). Les mutations apparaissant dans les gènes *KRAS* (12p12.1) et *BRAF* (7q34) sont plus caractéristiques des COSBG et des tumeurs séreuses borderlines (Singer et al., 2003). Ces mutations apparaissent très rarement dans les tumeurs séreuses de haut grade (Mayr et al., 2006; Sieben et al., 2004; Singer et al., 2003). Contrairement aux tumeurs de haut grade, les tumeurs de bas grade surviennent généralement chez les femmes moins âgées (43 versus 61 ans) avec un meilleur taux de survie (81 versus 24 mois) (Gershenson et al., 2006). Les patientes avec bas grade ont une réponse initiale faible à la chimiothérapie par rapport aux patientes avec haut grade. Cependant, ces dernières font des rechutes plus fréquemment (Shih Ie and Kurman, 2004). La survie à 5 ans des patientes avec un stade I de la maladie est de 76%, diminuant à 56% en présence d'un stade II, à 25% avec un stade III et chutant drastiquement à 9% avec un stade IV de la maladie (Chen et al., 2003).

#### 1.1.4.2 Mucineux

Les tumeurs dites mucineuses sont plutôt composées de cellules ressemblant à celles de l'épithélium endocervical et intestinal (Chen et al., 2003). Ces cellules sont caractérisées par une abondante quantité de mucus (mucine) intracytoplasmique (**Figure 1.1**). Les tumeurs mucineuses comptent pour approximativement 5-10% des cancers de l'ovaire (Russell, 1979). Elles peuvent être sous forme bénignes (80%), à faible potentiel de malignité (14%) ou malignes (5%) (Chen et al., 2003; Russell, 1979). Il existe un continuum lésionnel entre les différentes tumeurs mucineuses, contrairement aux tumeurs séreuses. Les tumeurs mucineuses sont caractérisées par leur grande hétérogénéité. Ainsi, du point de vue histopathologique, les tumeurs mucineuses ovariennes sont les néoplasmes ovariens les plus difficiles à interpréter. En présence d'une tumeur mucineuse d'aspect inhabituel dans l'ovaire, il est souvent difficile de faire la distinction entre une lésion primitive et une métastase d'origine gastro-intestinale, pancréato-biliaire ou endocervicale (Yemelyanova et al., 2008). La caractéristique génétique moléculaire de ces tumeurs est la mutation dans le gène *KRAS* dans plus de 68% des cas (Cuatrecasas et al., 1997; Mandai et al., 1998; Sieben et al., 2004). Récemment, il a été établi que la cigarette est un facteur de risque pour développer les tumeurs de type mucineux contrairement aux autres sous-types (Gram et al., 2012). Les patientes diagnostiquées avec une tumeur mucineuse ont généralement un pronostic favorable, car plus de 80% de ces patientes sont diagnostiquées au stade I et plus de 80% ont un taux de survie de 5 ans (Chen et al., 2003; Hoerl and Hart, 1998).

#### **1.1.4.3 Endométrioïdes**

Les tumeurs épithéliales dites endométrioïdes sont formées de cellules ayant l'aspect de celles qui recouvrent la paroi de l'utérus, plus précisément de l'endomètre (**Figure 1.1**) (Chen et al., 2003; Rosen et al., 2009). Elles représentent environ 10% des tumeurs de l'ovaire. Les tumeurs bénignes de ce type histopathologique sont plutôt rares et surtout unilatérales. Ces tumeurs peuvent aussi être retrouvées sous forme borderline dans 20% des cas et sont aussi souvent unilatérales (Chen et al., 2003; Jordan et al., 2006; Russell, 1979). À l'opposé et dans près de 80% des cas, les tumeurs endométrioïdes peuvent être malignes et environ 13-28% d'entre elles sont bilatérales. La caractéristique génétique moléculaire de ces tumeurs est l'altération de la voie de la  $\beta$ -caténine (*CTNNB1*, 3p21). La mutation ou la surexpression de la  $\beta$ -caténine apparaît respectivement chez 38% et 85% des patientes (Moreno-Bueno et al., 2001). La mutation de *PTEN* (10q23.3) est trouvée dans 20% de cancers endométrioïdes (Kolasa et al., 2006; Obata et al., 1998). Dans environ 90%, les mutations dans *TP53* ont été rapportées dans les carcinomes endométrioïdes de haut grade, alors que les carcinomes de bas grade enregistrent 60% de mutation du gène *PTEN* (Kolasa et al., 2006; Okuda et al., 2003).

Il est à noter que les tumeurs endométrioïdes malignes sont considérées comme ayant un meilleur pronostic que les tumeurs malignes séreuses et mucineuses (Chen et al., 2003; Soslow, 2008).

#### **1.1.4.4 Cellules claires**

Les tumeurs à cellules claires sont caractérisées par des cellules polygonales ayant un cytoplasme riche en glycogène et contenant des quantités variées de lipides (**Figure 1.1**) (Kaku et al., 2003). Elles représentent environ 5-10% des tumeurs ovariennes (Chen et al.,



2003; Rosen et al., 2009). Les tumeurs bénignes et borderlines à cellules claires sont assez rares, la majorité des tumeurs de ce type histopathologique étant malignes (Russell, 1979). Ces tumeurs ont une caractéristique raciale, puisqu'elles sont très fréquentes chez les femmes orientales. Contrairement aux autres sous-types, les mutations de *TP53* (Ho et al., 2001; Okuda et al., 2003), de *KRAS* et *BRAF* sont rares (Mayr et al., 2006) dans les carcinomes à cellules claires. L'instabilité microsatellite a été observée dans 20-40% des carcinomes à cellules claires (Cai et al., 2004; Ueda et al., 2005). Récemment, les mutations du gène *ARID1A* (1p35.3) ont été rapportées dans 60% des cas (Jones et al., 2010). Les taux de survie à 5 ans des patientes ayant une tumeur à cellules claires sont beaucoup moins bons que les autres types histopathologiques, dû entre autre au fait que c'est le type le plus résistant à la chimiothérapie (Cannistra, 2004).

De plus en plus, plusieurs évidences montrent que les différents sous-types histologiques du CEO constituent des maladies distinctes avec différentes étiologies par l'expression différentielle des gènes *HOXA* (Cheng et al., 2005; Naora, 2005). Ces gènes de développement localisés sur le chromosome 7 sont impliqués dans la différenciation des organes du tractus reproducteur (Taylor et al., 1997). L'expression ectopique de *HOXA9*, *HOXA10* et *HOXA11* induit la transformation spontanée des cellules de la surface épithéliale de l'ovaire chez la souris, ressemblant respectivement au carcinome ovarien de type séreux, endométrioïde et mucineux (Cheng et al., 2005). Ces résultats suggèrent que les différents sous-types du CEO se développeraient dans les cellules de la surface épithéliale de l'ovaire suite à une activation inappropriée des gènes impliqués dans le développement du tractus reproducteur (Cheng et al., 2005).

### **1.1.5 Stades et progression de la maladie**

Le stade de la tumeur réfère à la taille de la tumeur et à son degré de propagation dans l'organisme. Les cancers des ovaires peuvent disséminer dans le péritoine et les cavités abdominales. Cette dissémination peut se faire par les ascites, un liquide contenant des cellules cancéreuses, des lymphocytes et des cellules mésothéliales (Provencher et al., 1993; Puiffé et al., 2007). Les stades de la maladie sont définis par le degré de propagation de la tumeur primaire aux organes locaux. Ce système de classification a été établi par la Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique (FIGO) (FIGO, 1986) comme présenté sur le tableau I. Le stade étant un facteur pronostique significatif, les taux de survie de cinq ans pour les stades I, II, III et IV de la maladie étant respectivement 93 %, 70 %, 37 % et 25 % (Trimble, 1999). Concernant la détection précoce, seulement 25% des cas sont diagnostiqués au stade I alors que la majorité, diagnostiquée au stade tardif est associée à une issue défavorable (Bast, 2003).

L'une des caractéristiques du cancer de l'ovaire est l'envahissement des organes locaux à partir des cellules cancéreuses se trouvant en suspension dans l'ascite produite lors du développement de ce cancer. Ce mode de dispersion qui prédomine lors du développement des métastases du cancer ovarien est appelé dissémination cellulaire transcolomique et entraîne la formation des implants métastatiques (Lengyel, 2010; Shield et al., 2009).

**Tableau 1.1 Stades de développement des tumeurs ovariennes classifiées selon le système FIGO (FIGO, 1986).**

STADES	DESCRIPTIONS
1	Croissance limitée aux ovaires
1A	Croissance limitée aux ovaires, sans ascite. Aucune tumeur sur la surface externe de l'ovaire. Capsule intacte
1B	Croissance limitée sur les deux ovaires, sans ascites. Aucune tumeur sur la surface externe de l'ovaire. Capsule intact
1C	Tumeurs de stade 1A ou 1B, mais avec des tumeurs sur la surface d'un ou des deux ovaires ou présentant une capsule rompue
2	Croissance tumorale impliquant un ou les deux ovaires avec la présence d'extensions pelviennes.
2A	Extensions et/ou métastases sur l'utérus ou les trompes de Fallope
2B	Extensions et/ou métastases sur d'autres tissus pelviens
2C	Tumeurs de stade 2A ou 2B, mais avec des tumeurs sur la surface d'un ou des deux ovaires ou présentant une capsule rompue ou la présence d'ascites contenant des cellules cancéreuses
3	Tumeurs impliquant un ou deux ovaires et/ou présence de nodules rétropéritonéales ou inguinales.
3A	Croissance tumorale impliquant des implants confinés à la région pelvienne
3B	Présence d'implants abdominaux
3C	Présence d'implants abdominaux plus grands que 2 cm de diamètre
4	Croissance tumorale impliquant un ou deux ovaires avec présence de métastases à distance.

### 1.1.6- Le grade de la tumeur

Le grade de la tumeur se base sur la vitesse de croissance et le degré de différenciation de la cellule, c'est-à-dire la différence entre les cellules cancéreuses et les cellules normales en

termes d'apparence et de fonction (AJCC, 2002). Les grades de la maladie sont catégorisés en grade 1, grade 2 et grade 3 qui sont respectivement bien, modérément et peu différenciés (Chen et al., 2003)(AJCC, 2002).

Cependant, contrairement à d'autres types de cancer, les cellules cancéreuses du CEO présentent un profil de différenciation plus spécialisé que les cellules normales de la surface épithéliale de l'ovaire qui semblent être à l'origine de la maladie (Auersperg et al., 2001).

Il a été proposé récemment un deuxième type de classification en fonction des grades permettant de classer les tumeurs soit en bas grade ou en haut grade (Shih Ie and Kurman, 2004). Les tumeurs de bas grade sont caractérisées par une atypie nucléaire minimale et un index mitotique faible, alors que les tumeurs de haut grade sont caractérisées par une atypie nucléaire et un index mitotique très élevé (Shih Ie and Kurman, 2004). La classification des grades, basée sur l'architecture des cellules, l'atypie nucléaire et l'index mitotique (Shimizu et al., 1998) permet d'obtenir des valeurs pronostiques. Cependant, les difficultés liées à sa reproductibilité limitent son application en clinique (Mayr and Diebold, 2000).

### **1.1.7- Potentiel de malignité du CEO**

La Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique (FIGO) et l'Organisation Mondiale de la Santé ont proposé que le cancer de l'ovaire soit davantage classifié en trois catégories dont les tumeurs bénignes (BOV), les tumeurs borderlines ou à faible potentiel de malignité (LMP) et les tumeurs invasives (TOV) (FIGO, 1971; Serov, 1973).

#### **1.1.7.1- Les tumeurs bénignes (BOV)**

Les tumeurs bénignes constituent 60% des CEO (Russell, 1979). Sur le plan histologique, ces tumeurs montrent une prolifération des cellules de la surface épithéliale de l'ovaire sans stratification et ne présentent pas de cellules atypiques (anormales). Ces tumeurs sont non-invasives et sont généralement retrouvées sous la forme de masses kystiques (fibromes) et cystadénomes (Chen et al., 2003; Russell, 1979). La majorité des tumeurs épithéliales bénignes sont de sous-type séreux ou mucineux, alors que celles des autres sous-types sont très rares (Chen et al., 2003; Jordan et al., 2006; Russell, 1979). Les tumeurs épithéliales bénignes sont traitées avec succès par ablation chirurgicale (Chen et al., 2003).

#### **1.1.7.2 Les tumeurs borderlines ou à faible potentiel de malignité (LMP)**

Environ 15% des CEO sont des tumeurs borderlines ou à faible potentiel de malignité (Skirnisdottir et al., 2008). Ces tumeurs ne sont ni bénignes, ni malignes. Elles présentent une activité mitotique et une atypie nucléaire élevées que les tumeurs bénignes. Cependant, contrairement aux tumeurs invasives, il y a absence d'envahissement du tissu conjonctif adjacent ou d'invasion stromale (FIGO, 1971; Scully, 1999). La majorité des tumeurs LMP sont de sous-types séreux (environ 55%) ou mucineux (40%), les autres sous-types représentant moins de 5% (Kaern et al., 1993; Zanetta et al., 2001). Les tumeurs borderlines sont souvent limitées aux ovaires et environ 80% des patients avec LMP sont diagnostiquées au stade I de la maladie (Kaern et al., 1993; Zanetta et al., 2001). Les tumeurs LMP sont généralement associées à un bon pronostic avec un taux élevé de survie de 10 ans au stade I (99%), II (98%), III (96%) et IV (77%) (Trimble et al., 2002). Le taux

de survie des femmes diagnostiquées au stade précoce de la maladie avoisine 100%. De ce faite, la chirurgie conservatrice, avec préservation d'au moins une partie de l'ovaire et de l'utérus pour assurer la fertilité est pratiquée dans ces cas (Kaern et al., 1993; Trimble et al., 2002). Malgré un bon pronostic, environ 15% des tumeurs LMP peuvent récidiver. Les femmes avec des tumeurs LMP diagnostiquées au stade avancé de la maladie semblent présenter plus de récurrences que celles ayant eu une chirurgie conservatrice (Massad et al., 1991; Zanetta et al., 2001). Cependant, 7-15% des tumeurs LMP peuvent récidiver et sont souvent associées avec de l'aneuploïdie (nombre anormal de chromosomes), un index mitotique élevé et/ou la présence de microinvasion (Ouellet et al., 2005). Les tumeurs borderlines peuvent présenter des lésions à distance ou extraovariennes. Ces lésions caractéristiques ne sont pas appelées métastases, mais plutôt implants péritonéaux. Les implants péritonéaux des tumeurs LMP séreuses ont été classés comme étant invasifs (22% des cas) ou non-invasifs (78% des cas). Les implants non-invasifs sont associés à la survie à long terme des patientes. À l'opposé, 50% des patientes présentant des implants invasifs récidivent et leur taux de survie à 10 ans est de 33% (Dietel and Hauptmann, 2000; Jones, 2006).

### **1.1.7.3 Les tumeurs invasives (TOV)**

Les tumeurs invasives constituent approximativement 30% des CEO (Russell, 1979). Ces tumeurs présentent une prolifération épithéliale avec stratification, en plus d'avoir beaucoup d'atypies cellulaires et un index mitotique élevé. Mais la caractéristique propre aux tumeurs invasives est la présence d'invasion stromale destructive. Ces tumeurs sont aussi souvent composées de larges zones nécrotiques, hémorragiques, inflammatoires et

solides. Elles touchent essentiellement les femmes en péri-ménopause et après la ménopause. La majorité des tumeurs invasives sont détectées à un stade avancé (III-IV) de la maladie. Le taux de survie à 5 ans d'une tumeur invasive séreuse de stade III est seulement 15-30% (Chen et al., 2003; Dietel and Hauptmann, 2000). A noter que les différents stades de la maladie sont présentés en détails dans le tableau la section 1.1.5.

### **1.1.8- L'origine du cancer épithélial de l'ovaire**

Les cellules à l'origine du cancer de l'ovaire et les mécanismes par lesquels la maladie se développe ont été décrits dans la littérature à travers plusieurs hypothèses.

#### **1.1.8.1- L'hypothèse de l'origine épithéliale**

Au cours de la progression néoplasique, la simple couche épithéliale subie des changements de différenciation qui résultent en la perte des caractéristiques stromales et en l'acquisition de caractéristiques de l'épithélium des canaux de Müller. Ces canaux de Müller étant à l'origine des trompes de Fallope, de l'endomètre et du col de l'utérus, sont ainsi directement impliqués dans la classification des différents types histopathologiques qui ont été décrits à la section 1.1.4 (Ahmed et al., 2007; Colombo et al., 2006; Feeley and Wells, 2001). Il a été aussi suggéré que la transformation des cellules en CEO pourrait s'expliquer par la théorie de l'ovulation incessante, l'exposition aux gonadotrophines et l'inflammation. Selon Fathala, une ovulation incessante serait la cause de plusieurs désordres génomiques qui mèneraient au développement du cancer ovarien (Fathalla, 1971). Lors de l'ovulation, la surface épithéliale de l'ovaire se rompt pour éjecter l'ovule et

doit donc rapidement se réparer par la suite. La prolifération rapide des cellules de la surface épithéliale favoriserait des aberrations génétiques dans le génome qui mèneraient à la transformation néoplasique (Hoglund et al., 2003). La plupart des carcinomes ovariens ont des aberrations chromosomiques complexes allant de chromosomes uniques jusqu'à la présence de trisomies et de tétrasomies (Hoglund et al., 2003). La théorie de Fathala est supportée par des études ayant montré une incidence élevée du cancer de l'ovaire chez les poules qui ovulent (Fredrickson, 1987). Cette même théorie pourrait également expliquer la diminution du risque de développer la maladie par l'usage de contraceptifs oraux et la parité. La théorie des gonadotrophines postule que l'augmentation des gonadotrophines hypophysaires induisant l'ovulation pourrait induire la transformation des cellules de la surface épithéliale de l'ovaire (Cramer and Welch, 1983). Cette théorie pouvant s'appliquer aux cellules de la surface épithéliale de l'ovaire exposées à des concentrations élevées de gonadotrophines dans les kystes d'inclusion. La théorie de l'inflammation propose que les réactions inflammatoires, induites suite à l'ovulation, exposent les cellules de la surface épithéliale de l'ovaire aux stress oxydatifs, cytokines et aux dommages cellulaires entraînant des effets mutagéniques (Ness and Cottreau, 1999). Cette théorie pourrait expliquer la diminution du risque du cancer de l'ovaire après légalisation des trompes et hystérotomie. Ces procédures permettant de réduire l'exposition des cellules aux facteurs environnementaux, initiateurs de l'inflammation (Ness and Cottreau, 1999). Comme d'autres cancers, la transformation des cellules précurseurs en cellules du CEO se fait par sélection clonale des cellules ayant accumulé plusieurs mutations (Jacobs et al., 1992; Pejovic et al., 1991; Vogelstein and Kinzler, 1993).



### 1.1.8.2- L'hypothèse d'un continuum entre les tumeurs BOV, LMP et TOV

Un sujet très controversé dans le domaine du cancer de l'ovaire est de savoir si les tumeurs bénignes, borderlines et invasives sont en fait des étapes de progression du cancer de l'ovaire suivant un continuum, ou si elles sont tout simplement des entités qui surviennent de façons distinctes. Des analyses moléculaires et protéiques de tumeurs suggèrent deux pathogénèses différentes, principalement pour les tumeurs séreuses. En 2004, il a été proposé de classer les CEOs en deux catégories; les tumeurs de type I ou de type II (Shih Ie and Kurman, 2004). Le prototype de tumeur de type I est constitué de carcinomes ovariens séreux de bas-grade (G1) (COSBGs), alors que celui de type II comprend les carcinomes ovariens séreux de haut-grade (G2-3) (COSHGs). Les COSHG et les COSBGs constituent des maladies différentes avec absence de continuum de progression de la maladie. Cette notion est supportée par des analyses de gènes individuels ayant montré une fréquence très faible des mutations *KRAS* et *BRAF* dans les COSHG, alors qu'elles sont présentes à des fréquences élevées dans des COSBG (Singer et al., 2003). Cela suggère que les COSHG proviennent rarement des COSBGs (Mayr et al., 2006; Sieben et al., 2004; Singer et al., 2003). Les COSBGs et les LMPs ayant en commun des fréquences élevées de *KRAS* et *BRAF*, il a été proposé que les COSBGs se développeraient suite à des lésions bénignes qui progressent ensuite en tumeurs LMP (Shih Ie and Kurman, 2004).

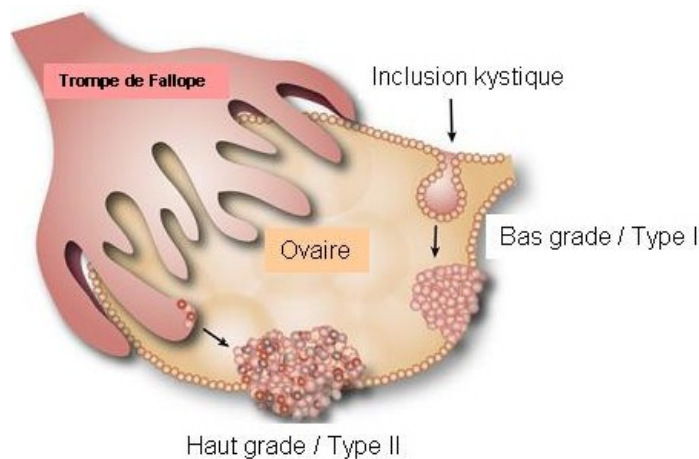
La catégorie de type I regroupe aussi les sous-types mucineux, endométrioïdes et dans une moindre mesure les cellules claires (Shih Ie and Kurman, 2004). Les tumeurs mucineuses semblent plutôt se développer en suivant un continuum, c'est-à-dire à partir d'une tumeur bénigne, pour devenir ensuite une tumeur LMP et enfin une tumeur TOV (Shih Ie and Kurman, 2004). Plusieurs études ont montré pour ce type de cancer, que la fréquence des

mutations de KRAS augmente de BOV à LMP et à TOV (Ichikawa et al., 1994; Mok et al., 1993; Rosen et al., 2009). Les tumeurs endométrioïdes semblent évoluer en continuum de la forme bénigne à LMP, alors que la forme TOV progresserait de façon indépendante (Oliva et al., 2006). Les études moléculaires soutiennent que dans ce type de tumeur, les mutations de la  $\beta$ -caténine sont plus fréquentes dans les formes LMPs (90%) et de bas grade (60%), alors qu'elles sont rares dans les tumeurs de haut grade (3%) (Oliva et al., 2006). Quant aux tumeurs à cellules claires, les mécanismes moléculaires se rapportant au modèle de progression ne sont pas encore assez connus, cependant, il a été suggéré que ces tumeurs se développeraient par des mécanismes indépendants (Kurman and Shih Ie, 2008; Shih Ie and Kurman, 2004).

### **1.1.8.3- L'hypothèse de l'origine des trompes de Fallope**

L'utilisation récente de la salpingo-ovariectomie bilatérale prophylactique chez les femmes porteuses de mutations *BRCA1/2* a permis de comprendre l'origine des tumeurs de type II dont les COSHG. Ces tumeurs ne semblent pas se développer à partir des lésions bénignes ou LMP, mais plutôt des cellules abritant des mutations de *TP53*. L'examen des trompes de Fallope retirées lors des chirurgies prophylactiques a montré la présence de petites lésions précancéreuses avec des foyers de coloration intense de p53, appelés "signature de p53" (Lee et al., 2007). Par ailleurs, la région distale des trompes utérines (le pavillon), qui est la région située à proximité des ovaires, semble être le site d'initiation (**Figure 1.2**). Ces signatures de *p53* sont d'ailleurs plus fréquentes dans les cellules épithéliales des trompes de Fallope contenant également des carcinomes intra-épithéliale tubaire (TICs) dans près de 100% des échantillons (Lee et al., 2007). De plus, des

carcinomes ovariens associés aux TICs avaient des mutations de *TP53* identiques (Lee et al., 2007). Il a été proposé que des mutations de *BRCA1* exacerbent la réparation de l'ADN et prédisposent des cellules à l'instabilité génétique, donnant lieu à la signature de p53 et aux TICs, qui peuvent ensuite évoluer vers le COSHG (Kurman and Shih Ie, 2008). Les CEO avec la mutation *BRCA1* possèdent les mêmes caractéristiques que le COSHG, telles que des mutations fréquentes de *TP53* et ainsi pourraient se développer suivant des voies semblables (Kurman and Shih Ie, 2008; Press et al., 2008). Ainsi, l'altération de *TP53/p53* ou de *BRCA1* peut être un événement précoce dans la pathogenèse des COSHG (Landen et al., 2008).



**Figure 1.2 : Modèle de développement des tumeurs de haut grade du cancer épithéliale de type séreux.** Les tumeurs de bas grade se développeraient à partir des inclusions kystiques de l'ovaire, alors que celles des hauts grades ont pour origine la trompe de Fallope.

### 1.1.9- Au niveau clinique

Comme décrit dans la section 1.1.7, le cancer de l'ovaire est une maladie silencieuse très souvent diagnostiquée au stade avancé avec une issue défavorable.

### **1.1.9.1- Symptômes**

Les symptômes des carcinomes ovariens sont non spécifiques. Les symptômes les plus fréquents sont la distension abdominale, l'urination fréquente, les ballonnements, la constipation, les nausées, l'anorexie ou une sensation de satiété précoce reliée à l'implication des ascites, de l'intestin et de l'épiploon (Goff et al., 2007; Olson et al., 2001). Contrairement au cancer du sein ou le cancer du col utérin, aucun programme de dépistage n'est disponible pour la détection du cancer de l'ovaire. De ce faite, la surveillance médicale pour les symptômes demeure la plus importante (2002). Une autre difficulté dans le dépistage du cancer des ovaires est que la nature de la progression de la maladie est en grande partie inconnue (Menon and Jacobs, 2000). En plus de la présentation des symptômes, la présence d'une masse pelvienne palpable détectée par l'examen pelvien peut également être indicative de cancer de l'ovaire (Cannistra, 2004). Si le cancer de l'ovaire est suspecté, une échographie transvaginale peut être effectuée pour un examen plus approfondi de la région pelvienne (Cannistra, 2004).

### **1.1.9.2- Détection**

Au cours des deux dernières décennies, des efforts ont été menés pour découvrir de nouveaux marqueurs sériques pour le diagnostic précoce du cancer de l'ovaire (Lokshin, 2012). Toutefois, le CA 125 découvert il y a 30 ans demeure toujours le meilleur marqueur des cancers de l'ovaire (Cramer et al., 2011). Un nouveau marqueur de cancer de l'ovaire, la protéine HE4, est également offert dans certains laboratoires cliniques.

#### **1.1.9.2.1- Le marqueur CA125**

La glycoprotéine CA 125 a été découverte en 1981 par Liber Al avec un anticorps monoclonal de souris (125 OC) produit par l'immunisation de souris avec une lignée de cellules de cancer de l'ovaire séreuse (Bast et al., 1981). Le CA125 a une valeur seuil de référence de 35 U/mL. Il a été démontré que cette protéine est élevée dans plus de 80% des cas de ce type de cancer. Il a été d'ailleurs établi que l'augmentation ou la diminution du taux sanguin de CA125 corrèle avec la progression ou la régression de la maladie (Bast et al., 1983). Cependant, les niveaux de CA-125 peuvent également être élevés en raison de maladies inflammatoires pelviennes, de l'adénomyose, de l'endométriose, de la grossesse, de la menstruation et des kystes de l'ovaire (Barney et al., 2008). Le CA 125 seul n'est donc pas un test de diagnostic courant utile pour le dépistage du cancer de l'ovaire en raison de sa spécificité limitée, mais il est utile pour surveiller la réponse au traitement et pour détecter la récurrence de la maladie (Lutz et al., 2011).

#### **1.1.9.2.1- Le marqueur HE4 (human epididymis protein 4)**

La glycoprotéine HE4 est un autre marqueur de cancer de l'ovaire intensément étudié ces dernières années. Les fonctions exactes de HE4 n'ont pas été caractérisées. HE4 est surexprimé dans 93 % des cas de cancer de sous-type séreux, 100 % d'endométrioides et 50 % à cellules claires, mais pas dans le sous-type mucineux ou le cancer ovarien à cellules germinales (Drapkin et al., 2005). Par rapport au CA 125, HE4 est moins souvent surexprimés dans certaines maladies ovariennes bénignes, telles que l'endométriose (Moore et al., 2012; Ono et al., 2000; Welsh et al., 2001). Bien que plusieurs études ont montré que

HE4 est un marqueur plus spécifique de cancer de l'ovaire que CA 125 (**table 2**), l'utilisation clinique de HE4 dans la différenciation du cancer de l'ovaire à d'autres maladies gynécologiques bénignes continue d'être évaluée.

**Tableau 1.2. La sensibilité et la spécificité de HE4 et CA 125 pour différencier le cancer de l'ovaire des autres maladies bénignes de l'ovaire.**

Sensibilité		Spécificité	Pathologies	Références
HE4	CA125			
67%	40%	96%	Cancer de l'ovaire versus maladies bénignes de l'ovaire	Hellstrom et al., 2003
72,90%	43,3%	95%	Cancer de l'ovaire versus maladies bénignes de l'ovaire	Moore et al., 2008
71,40%	64,30%	95%	Cancer de l'ovaire versus l'endométriiose ovarienne	Huhtinen et al., 2009
75,60%	65,30%	95%	Cancer de l'ovaire versus maladies gynécologiques bénignes	Shah et al., 2009

### 1.1.9.3- Traitement

Le traitement du cancer ovarien consiste à une chirurgie cytoréductrice suivie d'une chimiothérapie. La chirurgie permet d'établir une bonne stadification du cancer (bas et haut risque) afin de déterminer le traitement subséquent le mieux adapté que possible. La chirurgie cytoréductrice implique l'hystérectomie (ablation de l'utérus), la salpingo-oophorectomie bilatérale (ablation des trompes de Fallope et des ovaires) ou l'enlèvement si possible des implants (Cannistra, 2004). Le but de la chirurgie cytoréductrice consiste à enlever le plus de la tumeur que possible.

Après la chirurgie, les patients subissent souvent une chimiothérapie qui consiste à une combinaison de dérivés platine et taxane, tels que le carboplatine et le paclitaxel (Cannistra, 2004). Les dérivés platine sont des agents alkylants qui ont comme mécanisme d'action

commun la liaison à l'ADN. Ces agents forment des liaisons intrabins avec l'ADN. Il en résulte une inhibition de la réplication de l'ADN, une inhibition de la transcription de l'ARN, un arrêt du cycle cellulaire dans la phase G2 et une induction des mécanismes de l'apoptose (Ho et al., 2003). Les dérivés taxanes agissent sur les cellules en division active en se liant de façon définitive aux sous-unités  $\beta$ -tubuline et par conséquent, en stabilisant les microtubules. Cette liaison de la drogue aux microtubules empêche le mouvement dynamique normal des microtubules conduisant à l'arrêt mitotique et, éventuellement, la mort cellulaire (Van et al., 1999). Plus de 80 % des patients répondent au traitement (Agarwal and Kaye, 2003). Malgré cette bonne réponse initiale, la majorité des patients à un stade avancé feront une rechute. La maladie récurrente n'est souvent pas guérissable, et la prise en charge se fait dans une large mesure de façon palliative (Cannistra, 2004).

## **1.2 Épigénétique et cancer**

### **1.2.1 Émergence de l'épigénétique**

L'importance du principe épigénétique est mise en évidence du fait que toutes les cellules d'un organisme vivant partagent un génome identique. Cependant, elles n'ont pas toutes la même morphologie et ne contribuent pas aux mêmes fonctions biologiques. Cette hétérogénéité est le fruit d'une expression différente du génome en fonction du type cellulaire. La machinerie qui se met en place pour réguler cette expression fait appel à des mécanismes moléculaires complexes appartenant au domaine de l'épigénétique.

Le terme "épigénétique" a été introduit pour la première fois par Conrad Waddington en 1942 (Waddington, 2012) pour décrire la discipline de la biologie qui étudie "les interactions des gènes avec leur environnement pour définir le phénotype des êtres". De nos jours, le terme "épigénétique" peut être défini comme l'étude des changements héréditaires dans la fonction des gènes sans altération de la séquence d'ADN (le code génétique). La génétique, telle qu'elle a été pratiquée pendant de nombreuses années, se focalisant sur les modifications de la structure primaire de l'ADN, comme les mutations, n'a effectivement pas suffi à élucider certains des mystères du vivant. C'est en s'intéressant aux mécanismes intervenant "au-dessus" de l'ADN (selon l'étymologie du préfixe "épi") que les chercheurs ont pu comprendre et expliquer certaines pathologies non cancéreuses (**tableau 1.3**)(Heyn and Esteller, 2012) mais aussi le cancer (Egger et al., 2004; Feinberg et al., 2006; Jones and Baylin, 2002).

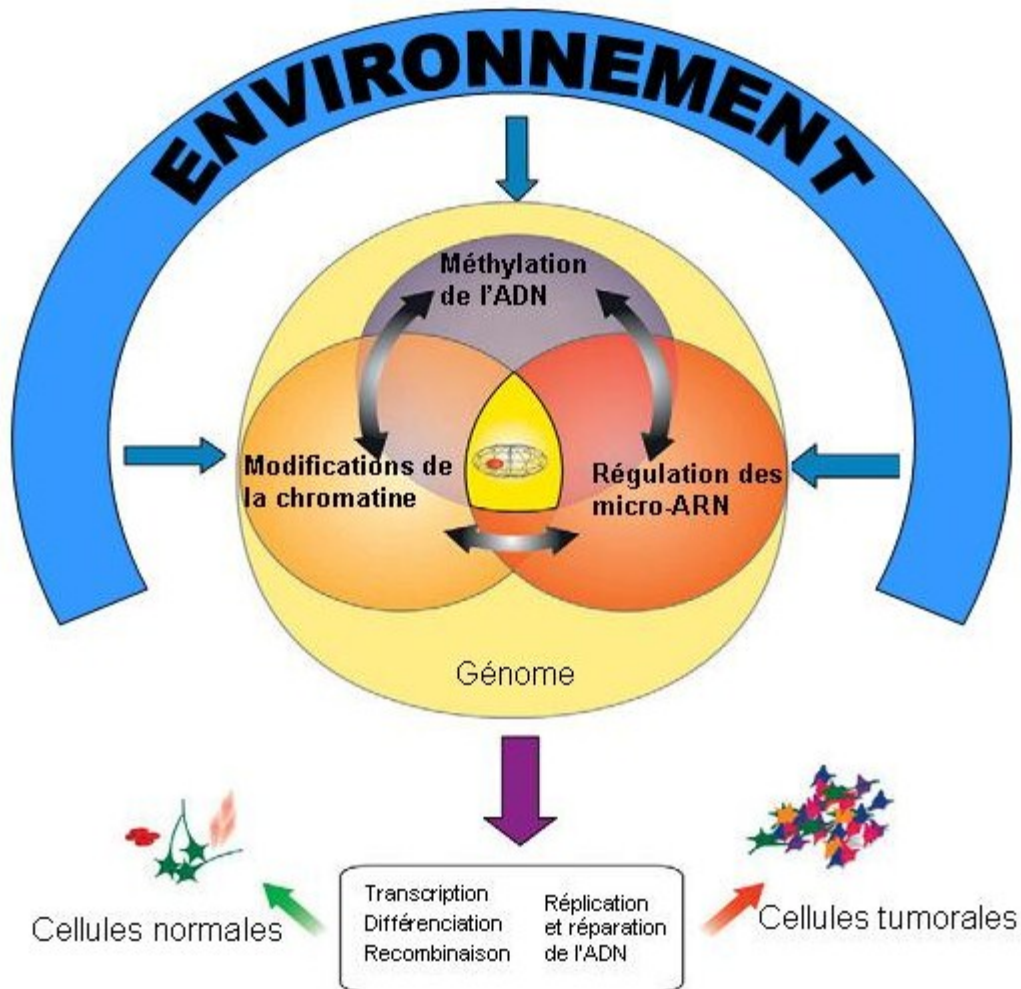


**Tableau 1.3. Les altérations épigénétiques dans les maladies non-cancéreuses.**

Modification épigénétique	Maladie	Altération
Méthylation de l'ADN	Maladie d'Alzheimer	Hyperméthylation (NEP)
	Syndrome Angelman	Défaut d'empreinte (15q11.2-q13)
	Athérosclérose	Méthylation aberrante
	Syndrome ATRX	Méthylation aberrante (répétitions sub-télomériques)
	Diabète de type I	Méthylation aberrante
	Sclérose multiple	Hypométhylation (PADI2)
	Arthrite rhumatoïde	Méthylation aberrante (DR3 et L1)
Modification d'histone	Lupus érythémateux systémique	Hypométhylation (PRF1, CD70, CD154 et AIM2)
	Maladie d'Alzheimer	Phosphorylation aberrante
	Athérosclérose	Hyperméthylation de H4K20, déacétylation de H4
	Diabète de type I	Méthylation aberrante (CTLA4 et IL-6)
	Syndrome X fragile	Liaison aberrante de l'histone (FMR1)
	Maladie de Huntington	Méthylation et acétylation aberrantes
	Maladie de Parkinson	Méthylation et acétylation aberrantes
Lupus érythémateux systémique	Phosphorylation aberrante (cibles de NF-kB)	

Les mécanismes épigénétiques majeurs incluent les modifications post-traductionnelles des queues d'histones, l'expression des micro-ARNs (20-22 nucléotides) et la méthylation de l'ADN (Herceg and Ushijima, 2010) (**figure 1.3**). Ces différents types de modifications épigénétiques sont intimement liés et interagissent très souvent pour renforcer de façon régulée les différents processus cellulaires. Les mécanismes épigénétiques sont essentiels

pour le développement embryonnaire, la différenciation cellulaire, la protection contre des génomes viraux et semblent importants pour l'intégration de signaux endogènes et environnementaux pendant la vie d'un organisme (Feinberg et al., 2006; Herceg, 2007; Jaenisch and Bird, 2003). Les modifications des queues d'histones par méthylation, acétylation ou phosphorylation entraînent, au niveau de la chromatine l'adoption d'un état ouvert (euchromatine) ou fermé (hétérochromatine) (Bannister and Kouzarides, 2011). L'expression des micro-ARNs non-codants module l'expression des gènes par interaction directe avec les ARNm (Khraiwesh et al., 2010; Saxena and Carninci, 2011). Enfin, l'une des modifications épigénétiques étudiées avec un intérêt croissant est la méthylation de l'ADN; elle fera l'objet des travaux présentés tout au long de ce manuscrit. Contrairement aux altérations génétiques, tous ces mécanismes épigénétiques sont réversibles et les modifications qui en résultent sont transmises entre générations de cellules somatiques après leur division.

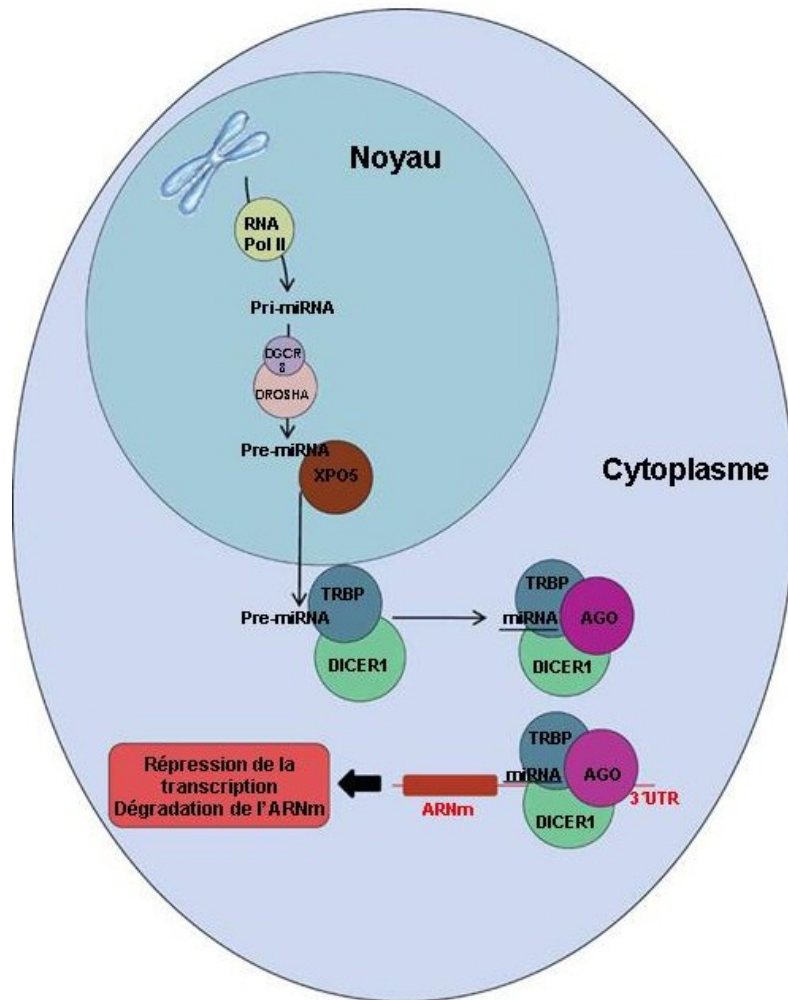


**Figure 1.3 - Une interaction mutuelle se fait entre les types différents d'informations épigénétiques.** Les mécanismes épigénétiques régulent plusieurs processus cellulaires directement ou indirectement et jouent des rôles critiques dans les réponses cellulaires aux stimuli environnementaux et endogènes (Herceg and Ushijima, 2010).

### 1.2.2 Régulation des micro-ARN (miARNs)

La classe la plus largement étudiée des ARNs non codants (ncRNA) est celle des microARNs (miARN), qui sont de petits ncRNAs de 22 nucléotides. Les miARNs sont impliqués dans la répression génique post-traductionnelle en contrôlant la traduction des ARNm en protéines. Les miARNs participent à la régulation de tous les processus cellulaires en régulant l'expression d'environ 60 % des gènes codant pour les protéines

(Friedman et al., 2009). Comme l'ARNm, les miARNs sont principalement transcrits par l'ARN polymérase II (RNA pol II), bien que la synthèse des miRNA qui résident près des gènes codant pour les ARNt et les séquences Alu est connue se produire par l'ARN polymérase III (Borchert et al., 2006). L'ARN polymérase II synthétise un transcrit primaire appelé pri-miARN. Ce transcrit primaire est traité par un microprocesseur Drosha, une protéine de la ribonucléase-III (Lee et al., 2003), en collaboration avec son co-facteur, la protéine DGCR8 (DiGeorge Syndrome Critical Region Gene-8), responsable de l'ancrage du pri-miARN dans le complexe (Han et al., 2006). Le traitement du pri-miARN produit une molécule de 70 nucléotides nommé pre-miRNA, qui migre vers le cytoplasme en utilisant la protéine d'exportation nucléaire appelée Exportin-5 (XPO5) (Yi et al., 2003). Le pré-miARN est relâché dans le cytoplasme de façon dépendante du GTP et est traité dans un complexe composé de la protéine Dicer (une protéine de la ribonucléase-III) et de la protéine de liaison à l'ARN double-brin TRBP, pour produire le miRNA fonctionnel de 22 nucléotides de long (Hutvagner et al., 2001). Ces miARNs fonctionnels sont ensuite chargés dans le complexe RISC (RNA-induced silencing) composé de Dicer, de TRPB et de la protéine complexe Argonaute (Ago) pour cibler les ARNm par complémentarité des séquences au niveau de la région 3' non transcrite (Lai, 2002). La voie de biosynthèse de miRNA est résumée dans la **Figure 1.4**.



**Figure 1.4: La voie de biosynthèse de miRNA du noyau au cytoplasme (Lopez-Serra and Esteller, 2012).**

Comme avec les gènes classiques, les miARNs peuvent être soumis à des altérations génétiques et épigénétiques. Ces altérations modifient leur profil d'expression et altèrent les mécanismes qu'ils régulent. Les anomalies chromosomiques (délétions, translocations, altérations du nombre de copies), les mutations dans l'ADN et la dérégulation épigénétique des miARNs ou des gènes impliqués dans leur biogenèse ont été décrits dans la progression

tumorale (Paroo et al., 2009). Le rôle des miARNs dans la maladie a été mis en évidence par leur profil d'expression aberrante dans les tumeurs humaines, puis par des études fonctionnelles *in vitro* et *in vivo* de cellules transformées et des modèles d'organisme. La première association entre les miRNAs et le développement du cancer a été décrite dans la leucémie lymphoïde chronique avec la délétion chromosomique 13q14. Cette suppression dérègle miR-15 et miR-16 (Calin et al., 2002). La plupart des cibles de ces deux miARNs sont des oncogènes et gènes suppresseurs de tumeur (Wt1 et Rab8B) et sont impliquées dans la croissance, le cycle cellulaire (par exemple, Anxa2 et Cdc2) et l'apoptose (Grp78 et Bcl2) (Calin et al., 2008). De plus, les miARNs sont fréquemment localisés dans les régions fragiles des chromosomes comme cela a été montré dans le cancer de l'ovaire, du sein et dans les mélanomes (Calin et al., 2004; Zhang et al., 2006).

Cependant, l'une des causes les plus fréquentes de la perte d'expression des miARNs suppresseurs de tumeur est l'hyperméthylation des îlots CpG de leur transcrite primaire (Huang et al., 2009; Lujambio et al., 2008; Saito et al., 2006). Par exemple la répression de miR-34 en raison de l'hyperméthylation de l'ADN de son promoteur ou l'inactivation de p53 modifie la voie Notch (Pang et al., 2010), qui est impliquée dans la promotion, l'invasion et l'apoptose des cellules cancéreuses (Bin Hafeez et al., 2009). L'une des cibles de miR-34 est SIRT1, un oncogène qui diminue la capacité de p53 de promouvoir l'arrêt du cycle cellulaire par désacétylation de la protéine. Le profil de l'expression altérée de cette famille de miRNA a été décrit dans le cancer gastrique (Tsai et al., 2011), ovarien (Corney et al., 2010) et colorectal (Lujambio et al., 2008).

### 1.2.3 Modifications de la chromatine

L'organisation dynamique de la chromatine est modulée par plusieurs modifications chimiques notamment l'acétylation et la méthylation. L'acétylation des histones, catalysée par les histones acétylases (HATs), est associée aux gènes transcrits activement (**Figure 1.5**). Elle permet le décompactage de la chromatine pour donner l'accès aux facteurs de transcription et aux polymérase (Marks et al., 2001). L'hyperacétylation de la lysine 9 de l'histone H3 (H3K9) et la méthylation de sa lysine 4 (H3K4) contribuent à la forme euchromatine. Cette conformation ouverte de la chromatine permet aux facteurs de transcription d'accéder au promoteur du gène pour débiter la transcription. Par contre, l'hypoacétylation des histones qui est catalysée par les histones deacétylases (HDACs) est associée aux gènes réprimés (Marks et al., 2001). Ceci provoque la compaction de la chromatine et rend la transcription impossible. Dans cette forme transcriptionnellement inactive de la chromatine ou hétérochromatine, H3K4 est deméthylée tandis que H3K9, H3K27 et H4K20 sont méthylées (Bannister and Kouzarides, 2011).

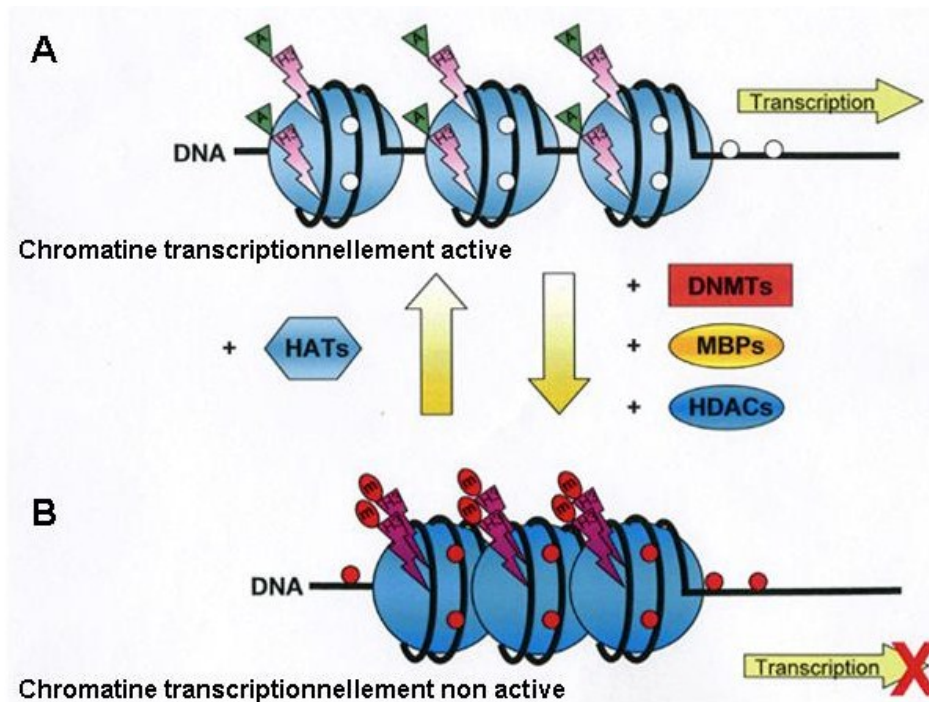
La méthylation de l'ADN intervient dans la régulation de l'expression des gènes de façon conjointe à ces mécanismes. Chez l'humain, il existe environ 45000 îlots CpG occupant 1 à 2% du génome (Gardiner-Garden and Frommer, 1987; Lister et al., 2009), et ceux-ci sont présents dans au moins un des promoteurs de 70% des gènes humains (Illingworth and Bird, 2009). Leur état non-méthylé engendre le maintien d'une structure ouverte de la chromatine permettant ainsi une potentielle transcription (Antequera, 2003). Une minorité de promoteurs peut en revanche être associée à des îlots CpG méthylés et est ainsi reconnue par des protéines MBD (Methyl-Binding Domain) possédant des domaines de liaison à l'ADN méthylé qui empêchent alors la potentielle liaison de facteurs activateurs de

transcription et la reconnaissance des séquences consensus. Un processus coopératif semble lier la déacétylation d'histones et la méthylation d'ADN pour favoriser la répression de l'expression génique (Fuks et al., 2003). Il a été démontré que les protéines MBPs liant la méthylcytosine peuvent recruter les HDACs (histones déacétylases) et les enzymes qui méthylent les histones (méthyltransférases d'histones) conduisant à la compaction de la chromatine par désacétylation et méthylation des histones (Fuks et al., 2003; Joulie et al., 2010). En outre, il a été montré que les méthyltransférases d'ADN peuvent directement lier les HDACs (Rountree et al., 2001).

Par ailleurs, la méthylation de l'ADN contribue à la stabilité du génome en stabilisant les éléments répétés qui le compose en grande majorité et qui ont longtemps été considérés seulement comme de l'ADN parasite (Slotkin and Martienssen, 2007). Il a été observé que 38% des cytosines méthylées étaient localisées dans les éléments répétés et les régions centromériques et sous-télomériques (Serre et al., 2010). La méthylation des séquences répétées empêche leur transcription ainsi que leur transposition tandis que leur hypométhylation favorise les réarrangements chromosomiques influençant ainsi l'intégrité du génome et pouvant mener à des pathologies diverses, notamment des cancers (Horard et al., 2009).

Cette régulation est contrôlée de façon spécifique à un tissu au cours du développement et est ensuite maintenue tout au long de la vie d'un individu.





**Figure 1.5: Schémas du contrôle épigénétique de la transcription des gènes par les altérations de la méthylation de l'ADN et les modifications de statut de la chromatine.**

A: ADN transcriptionnellement actif avec une structure de la chromatine ouverte avec des nucléosomes largement espacés (cercles bleus lumineux). Ceci est associé à des résidus de CpG non méthylés sur l'ADN (cercles blancs) avec des niveaux accrus d'acétylation (triangles verts) des résidus de lysine de l'histone H3 (flèches roses clair). B: la chromatine en conformation transcriptionnellement répressive avec des GpC méthylés sur l'ADN (cercles rouges), des nucléosomes compactés (cercles bleus foncés), des histones déacétylées (flèches roses foncés) et la méthylation des résidus de lysine spécifique de l'histone H3 (ovales rouges) (Lindsey et al., 2005).

## 1.2.4 Méthylation aberrante de l'ADN

### 1.2.4.1 Mécanismes de méthylation de la cytosine

Chez le mammifère, la méthylation de l'ADN est l'une des principales modifications épigénétiques consistant en l'addition covalente d'un groupement méthyl (CH<sub>3</sub>) à une position 5 d'une cytosine (C) suivi d'un résidu guanine (G) ou CpG (**Figure 1.6**). Ces

dinucléotides CpGs sont peu fréquents dans le génome, dû à leur haut potentiel de mutation en TpG par désamination (Fryxell and Moon, 2005; Pfeifer, 2006). Les 5-méthylcytosines représentent seulement 1% de toutes les bases composant le génome des mammifères mais occupent la majorité des CpGs (70 à 80%) (Bird, 2002). Les dinucléotides CpG sont peu fréquents dans le génome des mammifères sauf dans des petites régions d'approximativement 1000 paires de bases appelées « îlots » CpG avec une teneur de plus de 50 % de CG (Gardiner-Garden and Frommer, 1987). La plus grande partie des îlots CpG sont retrouvés dans la région promotrice de presque la moitié des gènes. Dans les cellules souches embryonnaires, environ 25% des 5-méthylcytosines peuvent se trouver dans des trinucléotides CpHpG ou CpHpH (ou H est A, C ou T) (Lister et al., 2009; Meissner et al., 2005). Chez les plantes, les cytosines présentés dans le contexte CpNpG ou CpA peuvent également porter cette modification. L'ensemble des bases méthylées du génome constitue le méthylome. L'addition d'un groupement méthyle sur une cytosine de façon covalente est catalysée par des ADN méthyltransférases (DNMTs) (Klose and Bird, 2006). Ceci est réalisé en présence du donneur universel de groupements méthyles: la S-adénosyl- L-méthionine (SAM). La SAM est synthétisée à partir de la méthionine et de la choline et de d'autres co-facteurs (acide folique ou vitamine B12). La réaction de méthylation des cytosines est alors réalisée par transfert du groupement méthyle sur la base de l'ADN et libère la S-adénosylhomocystéine (SAH) (**Figure 1.6**). Les ADN méthyltransférases identifiées sont les DNMT1, DNMT2, DNMT3A et DNMT3B. La DNMT1 est l'enzyme responsable du maintien de la méthylation après la réplication de l'ADN en intervenant au niveau de la phase S du cycle cellulaire. Les méthyltransférases DNMT3A et B réalisent une méthylation *de novo* en permettant l'ajout de groupements méthyles sur les deux brins de l'ADN non-méthylé (voir Figure 1.5 B). La DNMT2 ne possède qu'une faible activité

catalytique *in vitro* (Klose and Bird, 2006). Une autre base méthylée, la 5-hydroxyméthylcytosine a été découverte dans le génome des mammifères. Cette base présente en très faible quantité à travers le génome représente la forme oxydée de la 5-méthylcytosine par des enzymes de la famille TET (Ten-Eleven Translocation) (Tahiliani et al., 2009). Elle constitue alors un intermédiaire dans le processus de déméthylation de l'ADN (Ficz et al., 2011; Williams et al., 2012). Jusqu'à présent, la plupart des techniques utilisées pour étudier la méthylation ont échoué à la différencier d'une 5-méthylcytosine (Song and He, 2011).

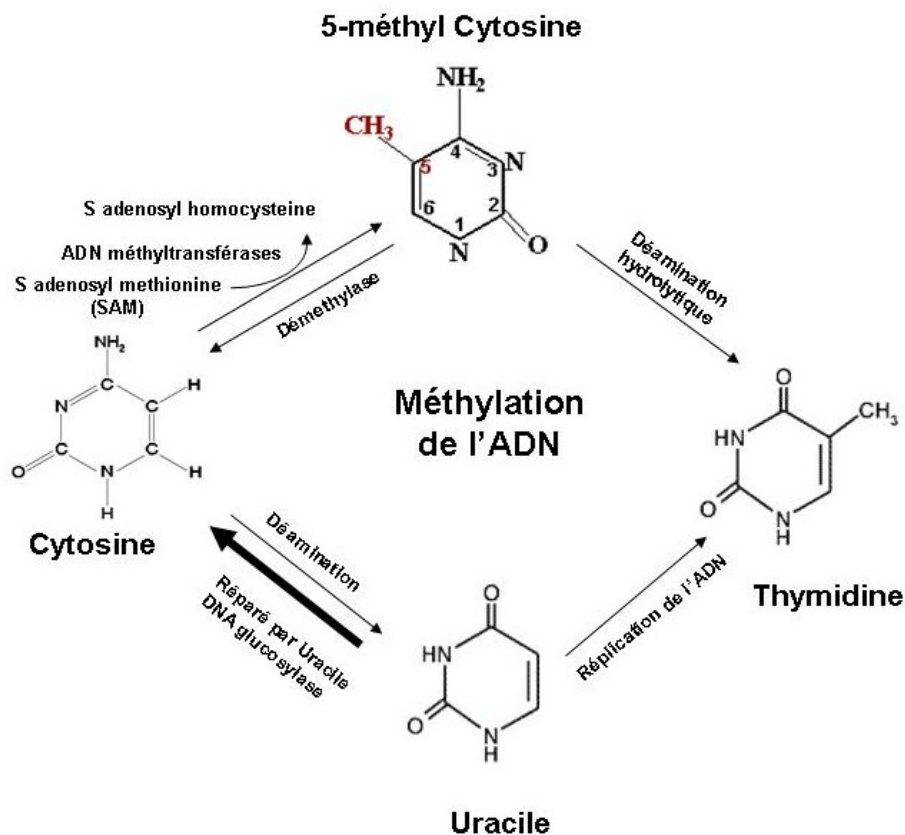


Figure 1.6: Représentation schématisée des voies biochimiques de la méthylation des cytosines, déméthylation et mutagenèse des cytosines en 5-méthylcytosine.

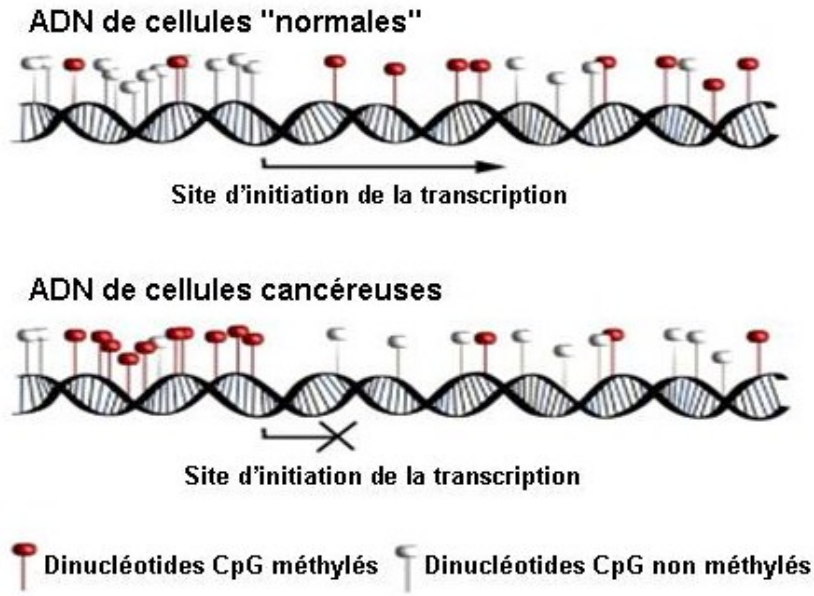
#### 1.2.4.2 - Rôle de la méthylation dans le développement

Chez la plupart des mammifères, les génomes paternel et maternel subissent la reprogrammation épigénétique au cours du développement (Reik et al., 2001). Chez l'embryon, quelques heures après la fécondation, le génome paternel est activement déméthylé, alors que le génome maternel est déméthylé passivement par un mécanisme dépendant de la réplication. Ces vagues de déméthylation de génome initieraient probablement la différenciation cellulaire. Le rôle actif des facteurs épigénétiques dans le contrôle de la différenciation a été démontré par l'induction d'une différenciation cellulaire spontanée après traitement avec des agents de déméthylation (Berdasco and Esteller, 2011). Lors de l'implantation de l'embryon, les niveaux de méthylation sont ensuite restaurés par des mécanismes *de novo* ; un dysfonctionnement des DNMTs est alors létal pour l'embryon. Après implantation de l'embryon a lieu une deuxième vague de reprogrammation où la méthylation des cellules germinales primordiales disparaît sur les gènes (Senner, 2011). En fonction du sexe, la méthylation sera rétablie sur l'un ou l'autre des loci maternel ou paternel; à la naissance chez le male ou bien plus tard dans les ovocytes matures chez la femelle. Ce dernier mécanisme joue également un rôle dans le phénomène d'empreinte parentale (Abramowitz and Bartolomei, 2012). Les génomes d'origine maternelle et paternelle sont nécessaires au développement, mais sont fonctionnellement différents. Il existe des gènes pour lesquels seule une copie s'exprime tandis que l'autre reste silencieuse sous régulation de la méthylation. L'absence de la copie d'intérêt conduira alors à de nombreuses maladies comme le syndrome de Prader-Willi caractérisé par une hypotonie infantile sévère, une obésité morbide et des troubles du comportement et de l'apprentissage (Cassidy et al., 2012). Chez les mammifères femelles,

l'un des deux chromosomes X est inactif dans son intégralité. Ceci permet de contrebalancer le déséquilibre existant avec le génome des males au niveau des allosomes, leur chromosome Y ne comportant que très peu de gènes, afin que tous deux ne disposent que d'un seul chromosome X actif.

#### **1.2.4.3 - Mécanismes impliqués dans le cancer**

Le cancer est caractérisé par deux événements épigénétiques majeurs et indépendants à savoir l'hypométhylation globale et l'hyperméthylation ciblée (Jones and Baylin, 2002, 2007; Sharma et al., 2010; Sincic and Herceg, 2011) (**Figure 1.7**). L' hypométhylation génomique globale, contribuant à l'instabilité génomique et ponctuellement à l'activation transcriptionnelle d'oncogènes, semble être un événement précoce de la tumorigénèse, y compris dans des lésions pré-malignes (Pufulete et al., 2003; Suter et al., 2004). Cependant, un doute subsiste encore quant au fait que l'hypométhylation soit une cause des cancers ou l'une de leurs conséquences en tant qu'effet secondaire du développement tumoral (Herceg and Vaissiere, 2011).



**Figure 1.7 Statut de méthylation des cellules versus cellules cancéreuses.** Contrairement aux cellules normales, les cellules cancéreuses présentent une distribution altérée des 5'-méthylcytosines, en particulier avec une hyperméthylation de l'îlot CpG associé au promoteur, entraînant l'inactivation du gène suppresseur de tumeur. La méthylation globale est également perdue (Barton et al., 2008).

Parallèlement à l'hypométhylation, l'hyperméthylation des îlots CpG du promoteur conduit souvent à l'inactivation des gènes suppresseurs de tumeur impliqués dans plusieurs voies de signalisation comme la réparation de l'ADN (*MGMT*, *MLH1*, *DAPK*), la régulation du cycle cellulaire (*CDKN2A*), l'apoptose (*RASSF1A*, *CASP8*), le métabolisme du carcinogène, la réponse hormonale et l'adhérence cellulaire (Baylin et al., 2001; Esteller, 2007; Momparler, 2003).

#### 1.2.4.3.1- Vers un nouveau biomarqueur

La répression épigénétique d'une série de gènes par hyperméthylation est maintenant identifiée comme un événement fréquent et précoce lors de la pathogénie de beaucoup de

cancers; de telles modifications étant des biomarqueurs potentiels pour l'identification des individus à risque (Baylin et al., 2001). Par conséquent, l'hyperméthylation spécifique de cancer peut servir d'indice pour découvrir des biomarqueurs spécifiques pour le diagnostic de la maladie (**Tableau 1.4**). La détection précoce de la tumeur est essentielle pour un traitement efficace. Cette détection pourrait se faire par des méthodes non invasives comme l'analyse de sang, des selles, de l'urine et de la salive. L'ADN de la tumeur peut être libéré dans des liquides biologiques soit directement à partir des cellules de la tumeur d'origine ou à partir des cellules nécrotiques englouties par les macrophages ou à partir de l'ADN libre des cellules lysées. L'usage diagnostique de la méthylation de l'ADN est plus facile à mettre en œuvre comparé à celui des marques d'histone en raison de la variation de la spécificité des anticorps utilisés. En effet, les modifications d'histone sont moins stables et plus dynamiques (Berdasco and Esteller, 2010; Feinberg, 2007).

Selon le type tumoral, certains gènes se trouveront plus ou moins méthylés. L'hyperméthylation de *MGMT* et *p16* est associée aux tumeurs du poumon, de la tête et du cou tandis que celle de *GSTP1* est caractéristique des tumeurs du foie ou de la prostate. De plus, la combinaison de l'hyperméthylation de *GSTP1*, *APC*, *RASSF1*, *PTGS2* et *MDR1* résulte à la fois en 100% de sensibilité et 100% de spécificité pour la détection du cancer de la prostate (Yegnasubramanian et al., 2004) (**Tableau 1.4**). La liste de ces gènes pouvant être considérés comme de nouveaux biomarqueurs des cancers n'est pas exhaustive et n'a cesse de s'allonger grâce à des travaux tels que le Human Epigenome Project (2008). Il s'avère désormais concevable et urgent d'étudier plusieurs types de tumeurs en cherchant à établir des profils de méthylation qui soient propres à chacun (Esteller et al., 2001; Kulis and Esteller, 2010).

**Tableau 1.4: Potentiels biomarqueurs épigénétiques de divers cancers** (Heyn and Esteller, 2012)

Types de cancers	Gènes biomarqueurs	Fluide/tissu utilisés	Sensibilité (combinaison)	spécificité (combinaison)
<b>Prostate</b>	<i>APC, RASSF1, GSTP1, PTGS2, MDR1</i>	Biopsie	100%	100%
	<i>GSTP1, APC, PTGS2</i>	Biopsie	71-91%	93-100%
	<i>GSTP1, TIG1</i>	Biopsie	93%	85%
<b>Colorectal</b>	<i>APC, RASSF2, MGMT, WIF1</i>	Plasma	87%	92%
	<i>TFPI2</i>	Selles	76-89%	
<b>Glioblastome</b>	<i>MGMT</i>	Sérum	95%	60%
<b>Poumon</b>	<i>CDKN2A (p16), RASSF1, CDH13, GSTP1</i>	Sérum	73%	
<b>Tête et cou</b>	<i>MGMT, CDKN2A (p16), DAPK1</i>	Salive	65%	
	<i>HOXA9</i>	Salive	75%	53%

#### 1.2.4.3.2- La thérapie épigénétique

##### 1.2.4.3.2.1- L'épigénétique et la prédiction de la réponse au traitement

La méthylation altérée de l'ADN des gènes qui interviennent dans le transport, l'absorption, la distribution, le métabolisme et l'excrétion des médicaments (drogues) a été montrée ou suggérée de prédire la réponse aux traitements, principalement dans le domaine de la thérapie du cancer (Ivanov et al., 2012) (**tableau 1.5**). Ces gènes peuvent être liées soit à des mécanismes de réparation de l'ADN (*MLH1, MGMT, BRCA1 / 2*), à l'apoptose (*BNIP3 et TP73*), ou à une activité suppressive de la tumeur (*VHL, WRN, CHFR et PCDH10*). Il a été montré que le statut de méthylation de ces gènes corrélait avec la sévérité ou la progression de la maladie, ce qui pourrait prédire indirectement la réponse au médicament



(Ivanov et al., 2012) . Par exemple, le gène du syndrome de Werner (WRN), une hélicase de la famille RecQ, est important pour le maintien de la stabilité génomique. Ce gène a été proposé de posséder une activité suppressive de tumeur, et des mutations de ce gène ont été reliées à une augmentation de l'incidence du cancer. L'hyperméthylation du gène *WRN* mène à la perte de l'expression du gène; ceci est souvent observé dans les types divers de tumeurs sporadiques. Agrelo et al. ont montré que l'hyperméthylation de *WRN* dans des tumeurs colorectales corrèle fortement avec la réponse au traitement par l'irinotécan, un inhibiteur de la topoisomérase (Agrelo et al., 2006). D'autres résultats dans le **tableau 1.5** montrent que les biomarqueurs pharmacoépigenétiques peuvent également impliquer des gènes codant pour des cibles thérapeutiques ou modulateurs de la réponse aux médicaments.

**Table 1.5: Statuts de méthylation des gènes comme prédicateurs de la réponse aux drogues dans certains types de cancers et lignées cellulaires cancéreuses (Ivanov et al., 2012)**

<b>Drogues</b>	<b>Gènes (hyperméthylation)</b>	<b>Types de cancers ou lignées cellulaires cancéreuses</b>	<b>Réponse prédictive</b>
<b>5-aza-CdR</b>	<i>GSTP1</i>	Cellules cancéreuses de la prostate	Corrélation de la méthylation avec l'efficacité de 5-Aza
<b>Calcitriol</b>	<i>VDR</i>	Cancer du sein	Resistance
<b>Cisplatine</b>	<i>IGFBP-3</i>	Cancer du poumon	Resistance
	<i>TP73</i>	Cellules cancéreuses NCI-60	Sensibilité
	<i>TGM2</i>	Cellules cancéreuses du poumon	Hypersensibilité
	<i>GPX3</i>	Cancer du cou et la tête	Resistance
<b>Paclitaxel</b>	<i>CHFR</i>	Carcinome des cellules squameuses orales	Hypersensibilité
<b>Olaparib</b>	<i>BRCA1/2</i>	Cancer de l'ovaire	Sensibilité
<b>Irinotecan</b>	<i>WRN</i>	Cancer colorectal	Sensibilité
<b>Imatinib</b>	<i>OSCP1</i>	Leucémie myéloïde chronique	Resistance
<b>5-Fluorouracil</b>	<i>MLH1</i>	Cancer colorectal	Resistance
<b>Doxorubicine, méthotrexate</b>	<i>PCDH10</i>	Cellules de la leucémie lymphoblastique aiguë	Resistance

#### 1.2.4.3.2.2- Les inhibiteurs de la méthylation de l'ADN (DNMTi)

Contrairement aux altérations génétiques, les événements épigénétiques sont réversibles, ce qui en fait des outils intéressants pour développer de nouvelles approches thérapeutiques. Des agents capables de restaurer des profils épigénétiques normaux ont peu à peu été mis au point. Les inhibiteurs de DNMTs peuvent être des analogues de la cytosine qui, utilisés à faible dose, ont une action de déméthylation en se liant de manière covalente aux DNMTs (**Tableau 1.6**). Ils permettent ainsi la réactivation de gènes suppresseurs de tumeurs. Deux

analogues nucléosidiques qui inhibent les DNMT, la 5-azacytidine (azacitidine) et la 5-aza-2'-déoxycytidine (décitabine), ont été approuvés par la FDA (Food and Drug Administration) pour le traitement des patients adultes atteints de syndromes myélodysplasiques (SMD) (Kaminskas et al., 2005; Kantarjian et al., 2007; Silverman et al., 2002). Ils sont également actifs contre la leucémie myéloïde aiguë (AML) et d'autres hémopathies myéloïdes (Robak, 2011). Ces analogues nucléosidiques sont incorporés dans les acides nucléiques au cours de la phase S et inhibent de manière irréversible les DNMTs liant l'ADN (Issa and Kantarjian, 2009; Stresemann and Lyko, 2008). Un inconvénient majeur des analogues de nucléosides sont leurs effets cytotoxiques significatifs sur certaines cellules du fait de leur incorporation directe dans l'ADN (Beisler, 1978; Santi et al., 1984; Yoo and Jones, 2006). Récemment, des inhibiteurs non nucléosidiques des DNMTs avec une cytotoxicité réduite, se lient directement au site catalytique des DNMTs sans être incorporés dans l'ADN ont été développés (Brueckner and Lyko, 2004). À ce jour, un nombre considérable d'inhibiteurs des DNMTs ont été identifiés, et le nombre ne cesse de croître.

**Tableau 1.6: Les inhibiteurs de l'ADN méthyltransférases (DNMTs).**

Cibles	Nature chimique	Drogues	Indications	Status clinique
DNMTs	<b>Analogues des nucléosides</b>	Azacitidine (5-azacytidine)	Oncologie	Phase I/II/III (approuvée, FDA)
		Décitabine (5-aza-2'-deoxycytidine)	Oncologie	Phase I/II/III (approuvée, FDA)
		Zebularine	Oncologie	Préclinique
		5-Fluoro-2'-deoxycytidine	Oncologie	Phase I
DNMTs	<b>Non-analogues des nucléosides</b>	RG108	Oncologie	Préclinique
		MG98	Oncologie	Phase I/II
		Hydralazine	Oncologie	Phase I/II/III

### 1.2.2.3.2.3- Les inhibiteurs de la déacétylation des histones (HDACi)

Les HDACs sont divisés en cinq classes phylogénétiques (de Ruijter et al., 2003) (**Tableau 1.7**). Les enzymes appartenant aux classes I, II et IV nécessitent un ion métallique divalent pour leur activité catalytique (Finnin et al., 1999). Les sirtuines sont des enzymes NAD-dépendantes avec une activité déacétylase et ADP-ribosylase des protéines, et sont structurellement et biochimiquement différentes des autres classes (Sauve, 2010; Sauve et al., 2006). Compte tenu de la distribution ubiquitaire des marques acétylés à l'intérieur de la cellule (Choudhary et al., 2009), les HDAC désacétylent des substrats histones et non histones. Par exemple, HDAC6 n'est pas impliquée dans la signalisation épigénétique mais déacétyle les microtubules et la protéine HSP 90 (Hubbert et al., 2002).

**Tableau 1.7: les différentes classes de molécules HDACs** (de Ruijter et al., 2003).

Classe	Molécules HDACs
Classe I	HDAC1, HDAC2, HDAC3 et HDAC8
Classe IIa	HDAC4, HDAC5, HDAC7 et HDAC9
Classe IIb	HDAC6 et HDAC10
Classe III	SIRT1–SIRT7
Classe IV	HDAC11

Plusieurs inhibiteurs des HDACs métaux-dépendants sont en phase clinique et ciblent principalement les cancers hématologiques (**Tableau 1.8**). Le vorinostat (Isotadex) et la romidepsine (Celgene) ont été respectivement approuvés pour le traitement du lymphome cutané à cellules T en 2006 et 2009 (Grant et al., 2007; Prince et al., 2009). Leur action provoque l'accumulation de groupements acétylés dans les histones et est suivie de modifications des processus cellulaires critiques pour les cellules cancéreuses, notamment grâce à leur pouvoir d'arrêt de la croissance cellulaire tumorale, d'apoptose et anti-

angiogénique (Butler et al., 2000; Marks, 2010). Outre ces exemples, beaucoup d'autres inhibiteurs des HDACs sont actuellement soit aux stades précliniques ou cliniques (Riessland et al., 2010).

Ces thérapies épigénétiques, utilisées en combinaison avec une chimiothérapie conventionnelle, permettront de traiter efficacement certains cas, comme l'utilisation conjointe de vorinostat (inhibiteur de HDAC) et de doxorubicine, paclitaxel ou bevacizumab dans le cas du cancer du sein (Jovanovic et al., 2010). L'épigénétique ouvre donc désormais de nouveaux horizons à la médecine contemporaine.

**Tableau 1.8: les inhibiteurs de HDACs et sirtuines en développement clinique**

<b>Drogues</b>	<b>Cibles</b>	<b>Indications</b>	<b>Statuts clinique</b>
<b>Vorinostat</b>	HDAC1, HDAC2, HDAC3 et HDAC6,	Oncologie	Approuvée
<b>Romidepsin</b>	HDAC1, HDAC2, HDAC3 et HDAC8	Oncologie	Approuvée
<b>Panobinostat</b>	HDAC1, HDAC2, HDAC3 et HDAC6	Oncologie	Phase III
<b>Belinostat</b>	HDAC1, HDAC2, HDAC3 et HDAC6	Oncologie	Phase II
<b>Entinostat</b>	HDAC1 et HDAC2	Oncologie	Phase II
<b>Mocetinostat</b>	HDAC1 et HDAC2	Oncologie	Phase II
<b>Resminostat</b>	HDAC1, HDAC3 et HDAC6	Oncologie	Phase II
<b>Givinostat</b>	HDAC (class I and II)	Inflammation, Oncologie	Phase II
<b>CUDC-101</b>	HDACs, EGFR et HER2	Oncologie, tumeurs solides	Phase Ib
<b>PCI-24781</b>	HDAC (class I et II)	Oncologie	Phase I/II

#### **1.2.4.4- Méthylation dans le CEO**

##### **1.2.4.4.1- L'hyperméthylation des gènes suppresseurs de tumeur**

L'hyperméthylation des gènes est un phénomène courant dans le cancer de l'ovaire (Balch et al., 2004; Ibanez de Caceres et al., 2004; Press et al., 2008). Toutefois, la fréquence de la méthylation des gènes hyperméthylés varie considérablement dans les différentes études. L'hyperméthylation des gènes suppresseurs classiques de tumeur a été rapportée dans le cancer de l'ovaire comme BRCA1 (Press et al., 2008), p16 (Milde-Langosch et al., 1998), MLH1 (Balch et al., 2004), OPCML et RASSF1A (Ibanez de Caceres et al., 2004; Sellar et al., 2003). De nos jours, la liste des gènes hyperméthylés s'agrandit dont ceux impliqués dans l'empreinte génétique ARHI (ARLTS1), PEG3 (Feng et al., 2008), DLEC1 (Kwong et al., 2006) et ARL11 (Petrocca et al., 2006); l'apoptose (LOT1, DAPK, TMS1/ASC et PAR - 4) (Cvetkovic et al., 2004; Pruitt et al., 2005; Terasawa et al., 2004), l'adhésion cellulaire (ICAM - 1, CDH1) (Arnold et al., 2001; Yuecheng et al., 2006). Dans la plupart des cas, les effets fonctionnels des gènes réprimés sur la pathogenèse du cancer de l'ovaire ne sont pas connus. Un des gènes les plus étudiés dans le cancer de l'ovaire est *BRCA1* en raison de son rôle dans la forme héréditaire et sporadique de la maladie (Baldwin et al., 2000). Des études ont montré que BRCA1 est hyperméthylé dans 5-24 % des cancers épithéliales de l'ovaire (Baldwin et al., 2000; Ibanez de Caceres et al., 2004; Teodoridis et al., 2005). Une étude récente portant sur les profils de méthylation du cancer de l'ovaire sporadique et héréditaire a montré que BRCA1 est méthylé seulement dans les tumeurs sporadiques dans 14 % des cas (Bol et al., 2010). La méthylation de *BRCA1* est fortement associée à la perte d'expression au niveau protéique et de l'ARNm (Press et al., 2008) et au mauvais pronostic

de la maladie (Hilton et al., 2002). Aucune corrélation de la méthylation de BRCA1 en fonction des sous-types histologiques, de grade ou de stade n'a été trouvée (Wilcox et al., 2005). On trouve rarement la méthylation du promoteur BRCA2 dans le cancer sporadique non héréditaire (Gras et al., 2001; Hilton et al., 2002).

Cependant, les profils de méthylation des gènes sont souvent associés à des caractéristiques moléculaires, cliniques et pathologiques des carcinomes ovariens. La comparaison du statut de méthylation de SFRP1, 2, 4, 5, SOX1, PAX1 et LMX1A a montré que les taux de méthylation étaient plus élevés chez les patientes atteintes de cancer de l'ovaire et diminuent progressivement chez les patientes avec une tumeur borderline et des tissus normaux ovariens (Su et al., 2009). La méthylation des gènes de développement HOXA10 et HOXA11 s'est avérée hautement discriminatoire entre les tissus ovariens normaux et malins (Fiegl et al., 2008). Le profil de méthylation de l'ADN des tumeurs ovariennes indique également les différences entre sous-types histologiques (Houshdaran et al., 2010). Par exemple, la méthylation aberrante des promoteurs de 14-3-3 sigma, TMS1 et WT1 est plus fréquente dans les tumeurs ovariennes à cellules claires que dans d'autres sous-types histologiques (Kaneuchi et al., 2004; Kaneuchi et al., 2005; Teodoridis et al., 2005; Terasawa et al., 2004). Dans une étude menée par Houshdaran et coll. (Houshdaran et al., 2010), les tumeurs séreuses et endométrioïdes ovariennes se sont révélées être discernables dans 49 sites de CpG étudiés correspondant à 36 gènes plus méthylés dans les tumeurs endométrioïdes. De même, 19 sites CpG (18 gènes) et 12 sites de CpG (10 gènes) ont respectivement montré une méthylation forte dans les tumeurs séreuses et endométrioïdes par rapport aux tumeurs à cellules claires.

#### **1.2.4.4.2- L'hypométhylation des oncogènes**

Contrairement à l'hyperméthylation, l'hypométhylation a été moins étudiée dans le cancer de l'ovaire (Ehrlich, 2006; Feinberg and Vogelstein, 1983). Cependant, l'hypométhylation du promoteur de certains gènes comme MCJ (methylation-controlled DNAJ gene) (Strathdee et al., 2005), SNCG (synuclein-  $\gamma$ ) (Czekierdowski et al., 2006), TRAG - 3 (Yao et al., 2004), IGF2 (Murphy et al., 2006) et la claudine - 4 (Litkouhi et al., 2007) a été rapportée. Les rétrotransposons, une classe importante de séquences répétitives intermédiaires, ont été identifiés comme cibles potentielles de l'hypométhylation (Florl et al., 1999; Lorincz et al., 2001). Les rétrotransposons sont classifiés en trois sous-types: les séquences LINEs (long interspersed elements), SINEs (short interspersed elements) et *LTRs* (long terminal repeat retrotransposons) (Lander et al., 2001). Les séquences LINE-1 sont hypométhylés dans 95 % des cas de cancer épithélial de l'ovaire (Pattamadilok et al., 2008). Une diminution du niveau de la méthylation des séquences LINE-1 est en corrélation avec les sous-types histologiques; les tumeurs mucineuses possédant des niveaux plus élevés de méthylation que celles endométrioïdes. L'hypométhylation implique souvent l'ADN satellite 2 (Sat2) dans la région juxtacentromérique des chromosomes 1 et 16 dans les cancers de l'ovaire (Qu et al., 1999). L'hypométhylation à la fois de Sat2 du chromosome 1 et Sata du chromosome 2 augmente de façon significative des tissus non néoplasiques aux tissus du cancer de l'ovaire. Les tumeurs séreuses et endométrioïdes ont montré des niveaux plus élevés d'hypométhylation que les tumeurs mucineuses (Widschwendter et al., 2004). En outre, une hypométhylation massive était plus fréquente dans les tumeurs de stade avancé ou de haut grade (Widschwendter et al., 2004).



#### **1.2.4.4.3- Vers un marqueur associé au CEO**

Comme mentionné ci-dessus, le cancer de l'ovaire se caractérise par un certain nombre d'aberrations épigénétiques. En conséquence, ces séquences spécifiquement hyper ou hypométhylées représentent des biomarqueurs potentiels pour le diagnostic, la stadification, le pronostic et le suivi ou la prédiction de la réponse au traitement.

##### **1.2.4.4.3.1- Marqueurs précoces de diagnostic**

Comme décrit dans la **section 1.1.7**, la présentation tardive des symptômes et l'absence des modalités de dépistage contribuent au taux élevé de mortalité de la maladie. Un diagnostic précoce est donc essentiel pour la réussite du traitement du cancer de l'ovaire. La détection du cancer à un stade précoce par des méthodes non invasives peut être facilitée par l'identification de biomarqueurs détectables dans les liquides biologiques. Ces marqueurs spécifiques d'ADN méthylé peuvent être détectés dans le sérum, le plasma et le liquide péritonéal des patientes ayant un cancer de l'ovaire (Ibanez de Caceres et al., 2004; Teschendorff et al., 2009). Bien que l'évaluation de la méthylation d'un seul gène ne soit pas suffisamment spécifique pour le diagnostic du cancer de l'ovaire, un panel de différents biomarqueurs de méthylation peut atteindre la précision requise pour le dépistage de la population générale (Laird, 2003). La méthylation spécifique de tumeur d'au moins un panel de six gènes suppresseurs de tumeur dont *BRCA1*, *RASSF1A*, *APC*, *p14 arf*, *p16 ink4a* et *DAPK* peut être détectée dans le sérum des patientes atteintes de cancer de l'ovaire avec 100 % de spécificité et 82 % de sensibilité (Ibanez de Caceres et al., 2004). Leur hyperméthylation a été observée dans les stades, grades et types histologiques des cellules.

En revanche, aucune méthylation n'a été observée dans les tissus non néoplasiques, les liquides péritonéaux ou le sérum des femmes témoins. La méthylation de *DAPK* dans l'ADN du sang total périphérique de patientes ayant un cancer de l'ovaire a été indépendamment examiné (Collins et al., 2006). La méthylation de *DAPK* a été observée dans environ 67 % des échantillons de tumeur testés. La comparaison des échantillons appariés de ces patientes a montré que 54 % avaient également une méthylation dans le sang périphérique. La méthylation de *DAPK* n'a pas été observée dans l'ADN du sang des groupes témoins. Récemment, l'hyperméthylation du gène *IFFO1* dans le sang a été caractérisée comme un marqueur potentiel de la détection du cancer de l'ovaire (Campan et al., 2011).

Bien que plusieurs limitations existent encore, y compris la sensibilité des tests de méthylation, la détection de marqueurs épigénétiques spécifiques dans la circulation sanguine des patientes semble une approche prometteuse pour la détection précoce du cancer ovarien.

#### **1.2.4.4.3.2- Marqueurs de pronostic**

Le stade de la tumeur, la maladie résiduelle après la chirurgie initiale, le type histologique et le grade tumoral constituent les principaux facteurs clinico-pathologiques liés au résultat du traitement du cancer ovarien. Pour compléter ces facteurs pronostiques classiques, plusieurs gènes régulés épigénétiquement par méthylation ont été évalués pour leur potentiel pronostique du cancer de l'ovaire. Par exemple, la méthylation de *HOXA11* est liée à une tumeur résiduelle post-chirurgicale et est associée à un mauvais pronostic (Fiegl et al., 2008). Le gène *FBXO32* est associé à une survie sans progression à court terme (Chou et al., 2010) alors que le gène *IGFBP-3* est associé à la progression de la maladie et

au décès, particulièrement chez les patientes atteintes au stade précoce de la maladie (Wiley et al., 2006). De même, l'hyperméthylation de l'ADN ribosomiale 18s et 28s est associée à une survie prolongée sans progression (Chan et al., 2005). Bien que certains de ces marqueurs méthylés constituent individuellement des indicateurs pronostiques potentiels, des panels de gènes semblent être plus informatifs. L'état de méthylation simultanée de *SFRP1*, *SFRP2*, *SOX1* et *LMX1A* est en corrélation avec la récurrence et la survie globale (Su et al., 2009). La combinaison des données pour *SFRP1*, *SFRP2* et *SOX1* a montré un risque relatif de récurrence de 3.19 chez les patientes ayant au moins un des gènes méthylés. Pour ces gènes, le taux de décès lié au cancer était augmenté par deux fois chez les patientes avec un seul gène méthylé et par six fois chez celles ayant de multiples gènes méthylés (Su et al., 2009). Un degré plus élevé de la méthylation de l'îlot CpG était également associé à la récurrence précoce de la maladie après chimiothérapie (Wei et al., 2002). L'examen du liquide péritonéal de 57 patients atteintes de cancer de l'ovaire a révélé que les niveaux de méthylation d'un panel de 15 gènes (*TIMP3*, *CDH1*, *CDH13*, *APC*, *PPP1R13B*, *HSPA2*, *HSD17B4*, *ESR1*, *GSTP1*, *CYP11B1*, *BRCA1*, *MYOD1*, *SOCS1*, *TITF1* et *GSTM3*) permet de faire une discrimination d'une survie à court versus long terme (Muller et al., 2004).

L'hypométhylation de certaines régions chromosomiques semble également avoir une valeur pronostique. Les patientes avec peu ou pas d'hypométhylation dans les séquences juxtacentromériques Sat1 ou Sat $\alpha$  du chromosome 1 avaient une survie plus longue par rapport aux patientes avec une forte hypométhylation dans ces régions (Widschwendter et al., 2004). De même, les patientes présentant une hypométhylation élevée dans les séquences LINE-1 présentaient un taux global de survie très faible (Pattamadilok et al., 2008).

#### **1.2.4.4.3.3- Marqueurs de prédiction à la chimiothérapie**

Les variations dans les profils de méthylation peuvent se produire dans le même type de tumeur. En plus de fournir des informations pronostiques, ces tendances pourraient être associées à la réponse au traitement. Un obstacle majeur pour améliorer la survie des patientes atteintes du cancer de l'ovaire est le développement de la chimiorésistance. Plusieurs gènes dans le cancer de l'ovaire, y compris ceux impliqués dans les voies d'apoptose associées à l'action chimiothérapeutique, sont réprimés par des mécanismes épigénétiques. Un exemple bien documenté est l'hyperméthylation du gène MLH1 associée à la résistance aux dérivés platine dans les lignées cellulaires de cancer de l'ovaire (Plumb et al., 2000; Strathdee et al., 1999). Dans une étude menée par Hofstetter et coll., les agents déméthylants analogues de la 5-azacytidine déméthylaient avec succès MLH1 (Hofstetter et al., 2010). De même, une étude récente a montré que l'azacitidine peut améliorer la réponse au platine chez les patientes présentant une résistance à la platine (Fu et al., 2011). La méthylation du gène TUBB3 a été liée à la résistance des taxanes dans des lignées cellulaires de cancer de l'ovaire (Izutsu et al., 2008). En outre, la répression épigénétique du gène SFRP5 (un membre de la famille de protéine sécrétée frizzled) semble activer les oncogènes de la signalisation Wnt et contribuer à la progression du cancer de l'ovaire et à la chimiorésistance (Su et al., 2010). En outre, l'expression élevée en raison de l'hypométhylation peut induire également la résistance aux médicaments. Par exemple, la surexpression de la protéine MAL (myelin and lymphocyte protein) par hypométhylation de la région promotrice était associée à un mauvais pronostic dans le cancer de l'ovaire. Par conséquent, le gène MAL semble être un marqueur potentiel de la sensibilité au platine (Lee et al., 2010). L'inactivation de FANCF induite par la méthylation est observée dans

les cellules de cancer de l'ovaire présentant une voie de BRCA2 défectueuse et est associée à une sensibilité accrue à la cisplatine. Cependant sa pertinence pour les résultats cliniques après chimiothérapie n'a pas encore été établie (Taniguchi et al., 2003).

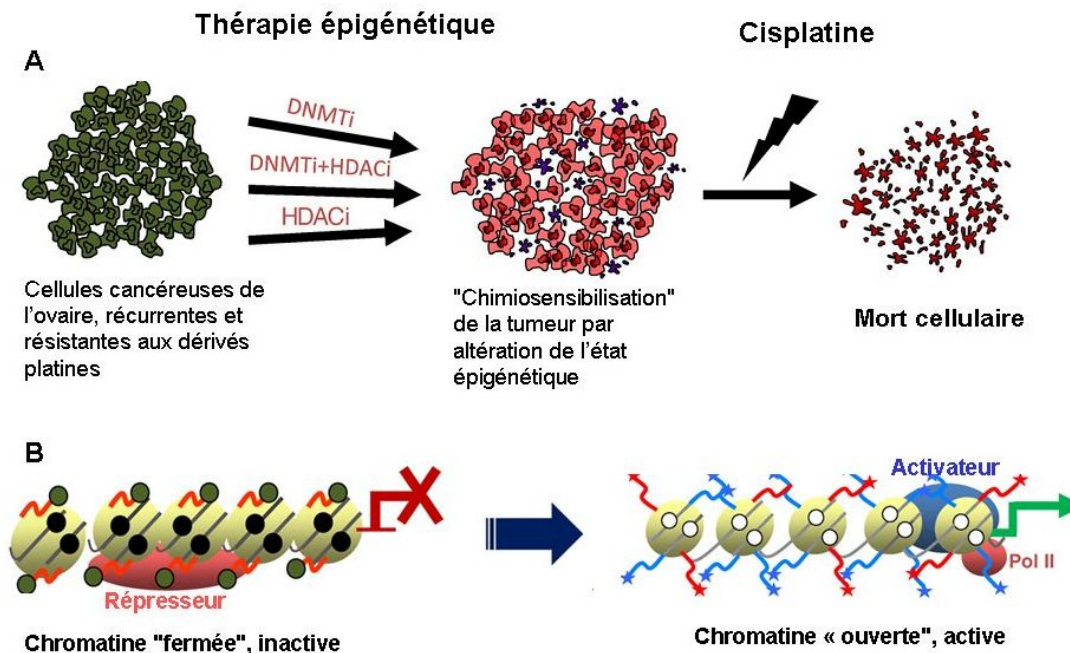
#### **1.2.4.4- La thérapie épigénétique dans le CEO**

Dans les études précliniques, divers inhibiteurs des DNMTs (**Tableau 1.6**), comme l'azacitidine, induisent par hypométhylation de l'ADN l'inversion de la chimiorésistance des cellules de cancer de l'ovaire résistantes au platine (Balch et al., 2005; Li et al., 2009). Cet effet semble être dû à la réexpression de gènes suppresseurs de tumeur par déméthylation du promoteur. De la même manière, dans les cellules de cancer de l'ovaire résistantes au cisplatine, la décitabine et la zebularine induiraient une sensibilisation à la platine par déméthylation de *RASSF1A* et *MLH1* (Balch et al., 2005). Des études *in vivo* avec des xénogreffes dérivés de ces cellules ont été sensibilisées par la décitabine au cisplatine, carboplatine, témozolomide et l'épirubicine (Plumb et al., 2000). Une récente étude clinique a montré que la combinaison de l'agent déméthylant de l'azacitidine avec la carboplatine avait une activité clinique efficace chez les patientes atteintes du cancer de l'ovaire résistant aux dérivés platine. Ces résultats indiquent la réversion partielle par l'agent hypométhylant de la résistance à la platine (Fu et al., 2011). Les toxicités prédominantes étaient la fatigue et la dépression médullaire.

En plus des inhibiteurs des DNMTs, les inhibiteurs des HDACs (**Tableau 1.8**) comme le vorinostat ont démontré une activité inhibitrice puissante et une toxicité minimale dans les cellules de cancer de l'ovaire et les xénogreffes (Takai and Narahara, 2007). Cependant, un essai de phase II avancé a montré une réponse anti-tumorale faible (Modesitt et al., 2008).

Un autre inhibiteur des HDACs, le belinostat, a également montré une activité puissante contre les xénogreffes de cancer de l'ovaire qui sont généralement réfractaires à la chimiothérapie (Plumb et al., 2003). Dans une récente phase d'essai clinique, le belinostat, combiné avec la carboplatine ou le paclitaxel dans les tumeurs solides, y compris les carcinomes ovariens, étaient bien tolérés, sans évidence d'interaction pharmacocinétique. Il faut toutefois une évaluation plus poussée de l'activité anti-tumorale.

Les inhibiteurs des DNMTs et des HDACs ont démontré une activité thérapeutique comme agents simples, mais on pense que les combinaisons de ces deux inhibiteurs seraient plus efficaces ajoutés aux traitements classiques (**Figure 1.8**) (Jones and Baylin, 2007; Matei and Nephew, 2010). L'évaluation par micropuce du traitement de cellules de cancer de l'ovaire avec les inhibiteurs de la méthylation (5-aza-2'-désoxycytidine) et ou de la désacétylation (trichostatine A) a montré que le traitement combiné induisait la réactivation synergique de plusieurs gènes (Shi et al., 2003). Par conséquent, une étude préclinique a montré qu'une combinaison de la décitabine avec le belinostat a suscité une plus grande sensibilisation aux dérivés platine qu'au décitabine seul des xénogreffes du cancer de l'ovaire résistant (Steele et al., 2009).



**Figure 1.8: Ré-sensibilisation des tumeurs ovariennes chimiorésistantes au carboplatine en pharmacothérapie épigénétique.**

A) les inhibiteurs des DNMTs ou les inhibiteurs des HDACs, seuls ou en combinaison, peuvent inverser la résistance aux dérivés platine dans le cancer de l'ovaire chimiorésistant par effets additifs ou synergiques. (B) Cette chimiosensibilisation semble être due à la dérégulation de gènes suppresseurs de tumeur (TSG) qui ont été précédemment réprimés par la méthylation du promoteur de l'ADN ou par la conformation fermée de la chromatine. Les thérapies épigénétiques restaurent l'expression des gènes TSG en créant un environnement plus actif de la chromatine (ouverte). Cercles noirs: ADN méthylé ; cercles blancs: ADN non méthylé; cercles verts: modifications des histones répressives ; étoiles: activation des modifications d'histone (Matei and Nephew, 2010).

### 1.2.5 Les méthodes d'étude de la méthylation de l'ADN

#### 1.2.5.1- Analyse par digestion enzymatique et Southern Blot

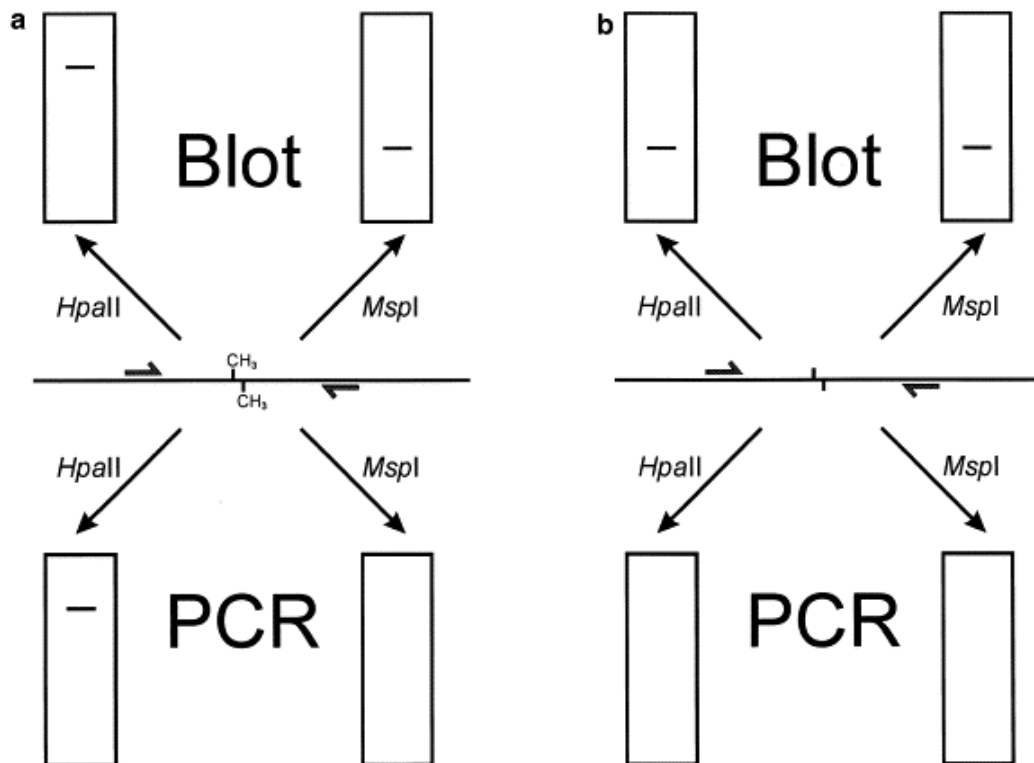
L'analyse par digestion enzymatique a été l'une des premières méthodes décrites pour la recherche des 5-méthylcytosines. Les endonucléases de restriction, sensibles à la méthylation, peuvent être utilisées pour fractionner le génome en portions méthylées et non-méthylées. Elle consiste en l'utilisation en parallèle d'un enzyme avec l'un de ses isoschizomères (qui présente une sensibilité différente à la méthylation). Par exemple, Msp I coupe l'ADN au niveau de la séquence CCGG, quel que soit le statut de la cytosine

interne alors que Hpa II coupera l'ADN seulement si la cytosine n'est pas méthylée. L'ADN est ensuite analysé par Southern blot quand des grandes quantités d'ADN sont disponibles (**Figure 1.9**). L'observation des bandes d'hybridation de même taille après digestion par les deux enzymes indique que cette base n'est pas méthylée. Par contre, l'observation d'une bande plus grande avec HpaII qu'avec Msp I indique la méthylation du site. Dans le cas d'une méthylation partielle, deux bandes de deux tailles distinctes seront détectées et leur intensité relative va être proportionnelle au degré de méthylation. Comme avantages, cette technique est intéressante pour étudier les grandes séries d'échantillons. Cette technique permet de détecter des différences de méthylation et de les quantifier dans des régions de faible densité en CpGs. Elle coûte moins chère et est relativement facile à mettre en œuvre et à interpréter. Comme inconvénients, cette procédure est applicable à un nombre limité de sites de méthylation, avec une quantité d'informations restreinte. De plus, cette méthode nécessite une quantité importante d'ADN et donc ne peut pas s'appliquer à des prélèvements biologiques comme les biopsies ou le plasma. Des biais peuvent facilement y être introduits dans le cas où la digestion par les enzymes serait incomplète. La sensibilité de cette technique peut être augmentée par l'utilisation d'une PCR dans le cas de petites quantités d'ADN.

(a) ADN méthylé

(b) ADN non méthylé



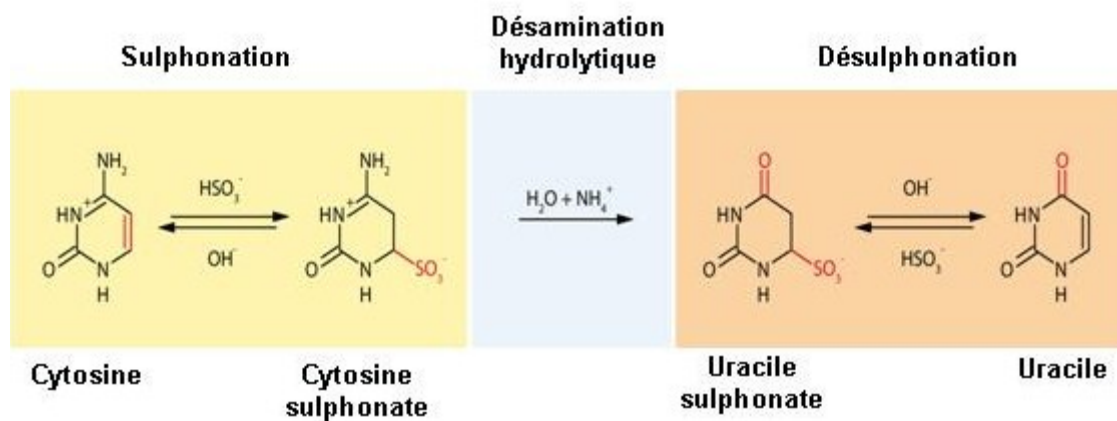


**Figure 1.9: Représentation schématique de l'analyse de la méthylation de l'ADN par Southern Blot : a- présence de méthylation; b- absence de méthylation.**

### 1.2.5.2- Conversion au bisulfite

Les possibilités d'analyse du profil de méthylation de l'ADN ont été augmentées depuis la découverte du traitement de l'ADN au bisulfite de sodium. Il a surtout permis la détermination directe du statut de méthylation d'une partie définie de l'ADN. Les polymérasés utilisées dans les réactions de PCR avant séquençage ne peuvent différencier une cytosine méthylée d'une non-méthylée. De ce fait, l'état de méthylation des CpGs est perdu après amplification. Le protocole de la conversion par le bisulfite a été mis au point par Frommer en 1992 et amélioré ensuite par Clark en 1994 (Clark et al., 1994). Le bisulfite est une méthode chimique qui va permettre de préserver l'information sur leur statut de méthylation. Pour cela, le bisulfite de sodium provoque une désamination des

cytosines non méthylées en uraciles (**Figure 1.10**), que la polymérase remplacera par des thymines au cours de la PCR, tandis que les cytosines méthylées ne sont pas affectées, la cinétique étant plus lente (Wang et al., 1980). Actuellement, des tests commerciaux de modification d'ADN avec ce traitement sont disponibles (Qiagen). De cette façon, l'information épigénétique est transformée en une information de type polymorphisme de séquence (C ou T) qui est facilement accessible par de nombreuses technologies existantes, telles que la PCR ou le séquençage.



**Figure 1.10: Diagramme schématisé de la réaction de conversion par le bisulfite**

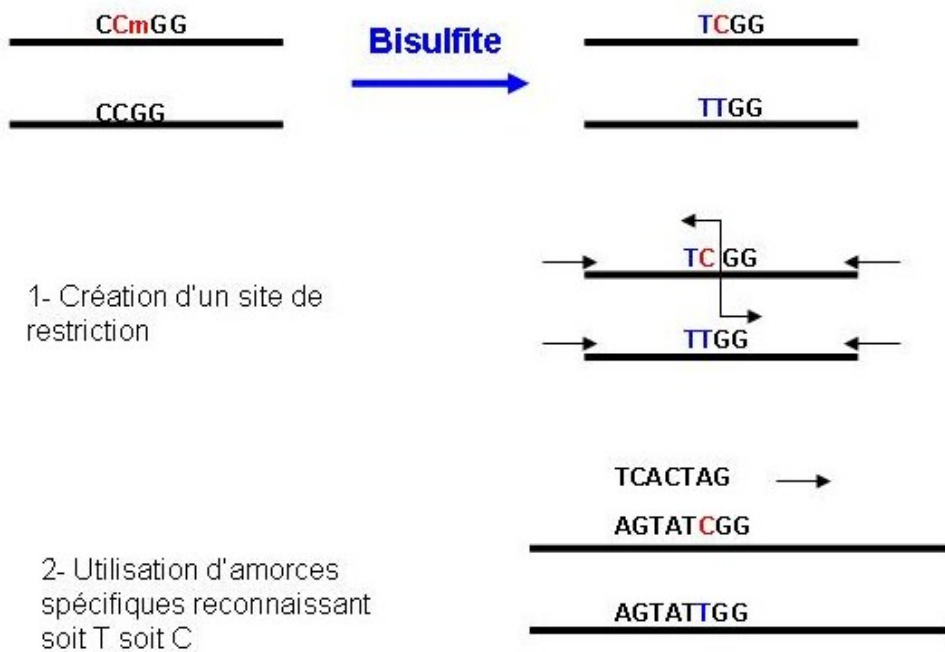
#### 1.2.5.2.1 PCR spécifique à la méthylation (MSP)

Cette technique consiste à amplifier par PCR (MSP pour méthylation specific PCR) l'ADN convertit après traitement au bisulfite de sodium. Les amorces choisies permettent l'amplification sélective soit de l'ADN méthylé; reconnaissant ainsi des séquences où les cytosines situées dans les dinucléotides CG restent inchangées par rapport à la séquence native, soit, au contraire, de l'ADN non méthylé; toutes les cytosines ayant ainsi été transformées en uracile (**Figure 1.11**). Deux paires d'amorces sens et anti-sens sont choisies dans une région du promoteur des gènes contenant des dinucléotides CG à l'aide

du logiciel Methprimer (Li and Dahiya, 2002). L'ADN transformé par le bisulfite de sodium n'étant plus auto-complémentaire, les amorces qui sont choisies pour l'amplification de brins sens d'une partie définie de l'ADN seront donc différentes de celles qui sont utilisées pour les brins anti-sens. De plus, les amorces doivent contenir plusieurs cytosines qui ne font pas partie de dinucléotides CpG dans la séquence originale, et qui sont, donc, transformées en uracile après le traitement. L'inclusion de ces bases dans les amorces aide à éviter l'amplification de l'ADN résiduel non transformé, et, donc, à éviter les faux positifs. Enfin, les amorces doivent être choisies dans une région contenant plusieurs CpG dont une en 3' pour garantir la spécificité méthylé/non méthylé. La MSP est une méthode plus simple, rapide et beaucoup plus sensible que les analyses par Southern blot. Ces arguments font que la MSP est une méthode plus adéquate pour l'analyse de grandes séries (Herman et al., 1996).

La sensibilité de la MSP peut être augmentée en utilisant la méthode MethyLight. Elle est basée sur le traitement bisulfite suivi d'une PCR. Cette méthode utilise la PCR quantitative en temps réel pour analyser quantitativement la méthylation d'une région donnée avec une très grande sensibilité avec des sondes de type taqman. Pour un gène donné un couple d'amorce permettant d'amplifier aussi bien l'ADN méthylé que l'ADN non méthylé ainsi que deux sondes taqman marquées avec deux fluorochromes distincts et s'hybridant soit à l'ADN méthylé soit à l'ADN non méthylé sont choisis. Le fluorochrome dans la sonde est libéré pendant l'amplification dans une fréquence qui est proportionnelle à la concentration initiale d'ADN. Chaque échantillon comprend les contrôles pour corriger les différences de quantité d'ADN, vérifier si la réaction bisulfite est complète, et aussi pour quantifier les mesures de méthylation (Eads et al., 2000).

Deux groupes d'amorces de PCR et sondes doivent être utilisés en parallèle : un groupe « méthylyé » pour le gène d'intérêt et un groupe « référence » pour le gène de la  $\beta$ -actine servant à normaliser la quantité d'ADN.



**Figure 1.11: Représentation schématique de l'analyse de la méthylation de l'ADN par MSP après conversion au bisulfite**

#### 1.2.5.2.2 Conversion au bisulfite suivi du séquençage (BSP)

Le développement de bisulfite séquençage PCR (BSP) a été un grand progrès dans l'étude de la méthylation de l'ADN et est devenu l'une des techniques les plus fréquemment utilisées. Cette méthode permet le couplage d'un traitement de l'ADN génomique au bisulfite suivi d'une amplification PCR de la région d'intérêt d'un gène connu au sein de l'ADN modifié. Les amorces utilisées pour la stratégie BSP sont construites avec le programme Methyl Primer et ne doivent pas contenir de sites CpG potentiellement méthylysés. Ensuite, l'ADN génomique traité au bisulfite de sodium subit une double

réaction PCR pour intensifier le signal. Il s'ensuit du séquençage classique du produit amplifié pour évaluer spécifiquement la méthylation de l'ADN dans une séquence particulière (Frommer et al., 1992). La présence d'un C ou T dans le brin séquencé peut distinguer un dinucléotide CpG méthylé ou non de la séquence d'origine. Bien qu'il soit possible de séquencer directement le produit PCR, cette approche peu donner au chromatogramme deux pics à la même position (nucléotides) sur le séquençage (un pour C et l'autre pour T). Ce doublet rend souvent difficile la quantification de l'étendue de la méthylation dans le site CpG particulier. Pour cette raison, l'ADN amplifié après traitement au bisulfite est généralement cloné dans des cellules bactériennes (clonage TA) et l'ADN de plusieurs clones bactériens est séquencé pour déterminer le degré de méthylation sur chaque site CpG. Cela peut être très coûteux et fastidieux si un grand nombre de clones est séquencé.

#### **1.2.5.2.3 Conversion au bisulfite suivi du pyroséquençage**

Le pyroséquençage a été récemment adapté pour étudier la méthylation de l'ADN et, par conséquent, s'est imposé comme une technique alternative au BSP classique (Dupont et al., 2004). Pour étudier la méthylation de l'ADN, le pyroséquençage requiert également un traitement de l'ADN génomique au bisulfite suivi d'une amplification par PCR de la séquence cible. Ensuite, il s'ensuit du pyroséquençage plutôt que des méthodes de séquençage classique (Dupont et al., 2004). Pour pallier les problèmes de faux positifs, le pyroséquençage a été développé depuis 2003 et permet une approche quantitative du taux de méthylation sur des dinucléotides CG précis (environ 4 à 25 di nucléotides CpG). Cette méthode est basée sur la chimioluminescence des réactions enzymatiques, qui sont

déclenchées quand il y a reconnaissance d'un événement moléculaire. Cette méthode permet le séquençage d'un ADN monocaténaire par la synthèse de la branche complémentaire. Chaque fois qu'un nucléotide est incorporé dans la cascade des réactions enzymatiques, un signal lumineux est envoyé (Colella et al., 2003). L'intensité de la lumière émise est proportionnelle à la quantité incorporée d'un nucléotide. A la différence des méthodes par affinité, les méthodes basées sur la conversion par le bisulfite fournissent des informations sur la méthylation à la résolution du nucléotide.

### **1.2.5.3- Immunoprécipitation de l'ADN méthylé (MeDIP)**

La plupart des stratégies développées enrichissent d'abord une fraction du méthylome, car l'analyse de la méthylation sur le génome entier reste très dispendieuse. Plusieurs méthodes basées sur le « microarray » ont été récemment développées pour déterminer la localisation et la fréquence de la cytosine méthylée dans les génomes (van Steensel and Henikoff, 2003). Nous décrivons l'une d'entre elles: l'analyse de l'immunoprécipitation de l'ADN méthylé sur puce (MeDIP-Chip).

#### **1.2.5.3.1- Immunoprécipitation de l'ADN méthylé et analyse sur puce (MeDIP-Chip)**

Un anticorps dirigé contre les 5-méthylcytosines présente une grande affinité pour cette base et est utilisé pour immunoprécipiter les fragments méthylés du génome. Dans cette technique appelée MeDIP (Methylated DNA ImmunoPrecipitation), l'enrichissement dépend de la densité en CpGs des fragments et la présence minimale de 2 CpGs est nécessaire pour immunoprécipiter un fragment de 100 bases. Le MeDIP a été développé en 2005 (Weber et al., 2005) puis combiné à une analyse sur puce (MeDIP-chip) sur laquelle

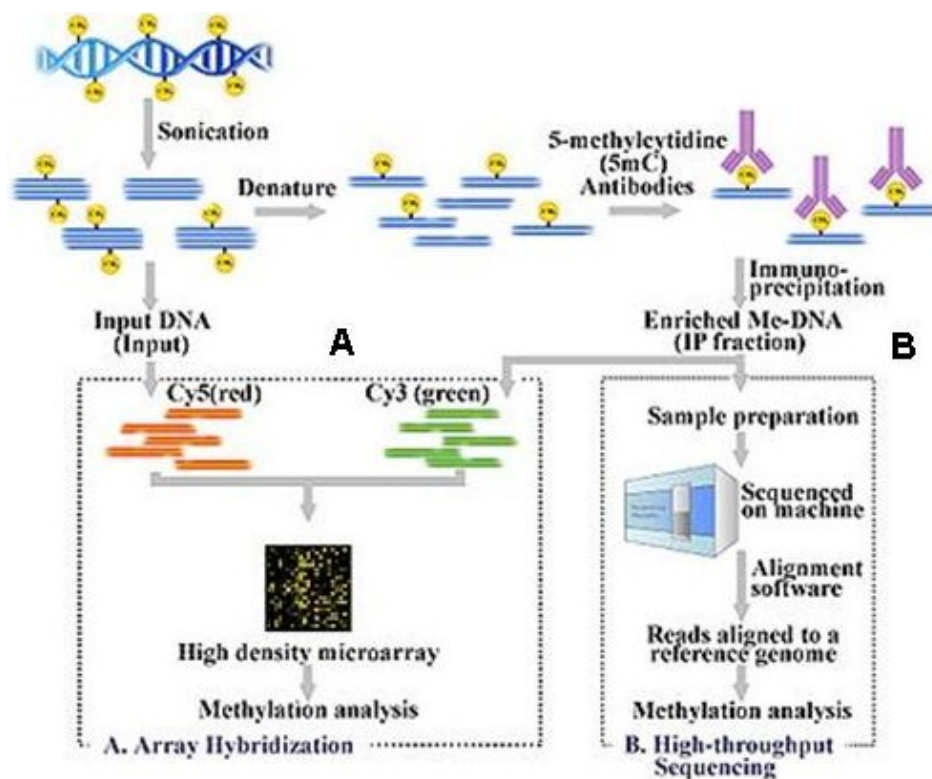
l'ADN immunoprécipité (méthylé) marqué par la Cy3-dUTP est co-hybridé avec l'ADN n'ayant subi aucun traitement (contrôle ou input) marqué par la Cy-dUTP (Rakyan et al., 2008; Weber et al., 2007) (**Figure 1.12A**). L'ADN immunoprécipité et son contrôle proviennent du même échantillon. Actuellement plusieurs Kits pour l'étude de la méthylation de l'ADN sur de puces à ADN commerciales sont disponibles (Agilent, Illumina...). Ce type de technique permet d'étudier la méthylation sur certaines régions du génome comme les promoteurs ou les îlots CpG.

#### **1.2.5.3.2- Immunoprécipitation de l'ADN méthylé et séquençage (MeDIP-Seq)**

Récemment, les premiers méthylomes couvrant l'intégralité du génome ont été publiés grâce à l'utilisation du séquençage haut-débit après MeDIP, c'est le MeDIP-Seq (**Figure 1.12B**). Le principe consiste à fragmenter l'ADN et à fixer les adaptateurs (permettant l'amplification puis le séquençage) aux extrémités des fragments. Ceux-ci peuvent également être fixés après l'immunoprécipitation (Pomraning et al., 2009). Après dénaturation, l'ADN méthylé simple brin est immunoprécipité grâce à l'anticorps spécifique des 5-méthylcytosines. Le complexe ADN-anticorps est alors capturé par un second anticorps anti-IgG (ou la protéine A) fixé sur des billes et l'ADN méthylé en est relâché après lavage et traitement à la protéinase K.

Les méthodes d'enrichissement par affinité (immunoprecipitation et sélection par les methyl binding proteins MBD) ont l'avantage de ne pas être restreintes à l'analyse d'un nombre limité de sites, contrairement aux méthodes basées sur l'utilisation d'enzymes. Un avantage supplémentaire des méthodes utilisant le MeDIP en comparaison aux autres techniques est sa capacité à distinguer une 5-méthylcytosine d'une 5-hydroxyméthylcytosine (Jin et al., 2010). Cependant, elles ont une résolution réduite et ne

permettent pas de donner des valeurs de méthylation précises. Ceci implique de définir des niveaux de méthylation assez grossiers (peu, moyennement ou très méthylé), à moins d'investir dans la mise en place d'outils informatiques adaptés. De plus, elles nécessitent une grande quantité d'ADN et ont tendance à enrichir les régions riches en CpGs, notamment les séquences répétées. Quelle que soit la méthode utilisée, il est théoriquement possible d'augmenter la couverture du méthylome en séquençant à une plus grande profondeur ou en augmentant la longueur de lecture du séquenceur. Enfin, la combinaison de plusieurs méthodes, bien que parfois coûteuse, peut permettre de couvrir de plus nombreuses régions de densités différentes en CpGs.



**Figure 1.12: Représentation schématique de l'analyse de la méthylation de l'ADN par la technique MeDIP.**

De toutes les techniques citées précédemment, le MeDIP-Chip est une méthode de choix et est au centre du projet présenté ici afin d'étudier le méthylome du cancer de l'ovaire en



utilisant des puces 1 x 244K de la Technologie Agilent contenant 27.800 îlots CpGs. Nous avons en complément développé une approche basée sur l'utilisation du bisulfite, permettant l'analyse de la méthylation sur des régions candidates.

### **1.3- Les facteurs de transcription *RUNX***

La famille des gènes *RUNX* comprend les facteurs de transcription *RUNX1*, *RUNX2* et *RUNX3*. Chaque membre est capable de former des hétérodimères avec le cofacteur commun CBF $\beta$  (Core Binding Factor  $\beta$ ), un partenaire ne liant pas l'ADN (Huang et al., 1999). Ces facteurs de transcription peuvent activer ou réprimer la transcription des principaux régulateurs des voies de la croissance, de la survie et de la différenciation (Wang et al., 2010; Wang et al., 1996). Bien que les membres de la famille *RUNX* partagent une grande similarité au niveau de la séquence des acides aminés et affichent certaines fonctions qui se chevauchent, ces gènes semblent néanmoins avoir des fonctions biologiques distinctes au cours du développement. Chaque membre présente des anomalies phénotypiques très distinctes. Par exemple, *RUNX1* est essentiel pour l'hématopoïèse définitive, la maturation des mégacaryocytes, des cellules T et B et le développement neuronal (Okuda et al., 1996). *RUN2* est essentiel pour l'ostéogenèse (Komori et al., 1997; Otto et al., 1997). *RUNX3* a un rôle essentiel dans la neurogénèse (Levanon et al., 2002), la signalisation du TGF- $\beta$  et la maturation des cellules dendritiques (Fainaru et al., 2004).

Les facteurs *RUNX* sont de plus en plus liés à divers cancers humains, car ils pourraient fonctionner tant comme gènes suppresseurs (GSTs) de tumeurs et comme oncogènes dominants suivant le contexte tumoral (Blyth et al., 2005; Cameron and Neil, 2004; Nimmo and Woollard, 2008). *RUNX3* est généralement considéré comme un GST dans les tumeurs

et est inactivé dans la plupart des cancers épithéliaux (Subramaniam et al., 2009), y compris le carcinome ovarien (Zhang et al., 2009), bien que la fonction oncogénique de *RUNX3* dans le CEO a également été suggérée (Lee et al., 2011a). L'importance de *RUNX1* dans l'hématopoïèse et sa fonction de GST en leucémie sont bien établies (Scheitz et al., 2012). Cependant l'amplification et des mutations gain de fonction de *RUNX1* semblent être impliquées dans la leucémie (Robinson et al., 2003; Wotton et al., 2002). De même, des études récentes sur les tumeurs solides présentent des rôles contrastés de *RUNX1* comme GST ou oncogène (Scheitz et al., 2012). L'implication de *RUNX1* dans la tumorigénèse du CEO est actuellement inconnue, bien qu'il a été démontré qu'en liaison avec des métalloprotéinases de la matrice extracellulaire (MMP-2 et -9), *RUNX1* pourrait contribuer à la phase invasive des carcinomes de l'endomètre et des ovaires endométrioïdes (Planaguma et al., 2011). De façon similaire à *RUNX1*, la preuve la plus évidente pour une fonction pro-oncogéniques pour *RUNX2* proviennent des études menées dans des modèles de lymphome et de leucémie (Blyth et al., 2010). Ainsi, *RUNX2* s'est avéré également jouer un rôle dans le cancer du sein invasif (Nagaraja et al., 2006), de la prostate (Chua et al., 2009), de la thyroïde (Niu et al., 2012) et du pancréas (Kayed et al., 2007). Récemment, l'expression de *RUNX2* était également associée à la progression tumorale du CEO et au mauvais pronostic (Doll et al., 2009). En plus de ces données de la littérature, des rapports récents montrent que les facteurs de transcription *RUNX1* et *RUNX2* pourraient agir comme oncogènes et sont impliqués dans la survie des cellules cancéreuses, la progression et la métastase.

#### **1.4- Problématique, hypothèse et objectifs générales du projet**

Le cancer de l'ovaire est la première cause de décès parmi les tumeurs gynécologiques en occident. Le taux de survie à long terme demeure décevant en raison de la nature asymptomatique de la maladie. Le traitement repose sur la chirurgie cytoréductive suivie de la chimiothérapie avec un taux de réponse de plus de 80%. Cependant, la plus part des patientes font une récurrence après une période médiane de 18 mois de traitement par l'émergence de la résistance. Il existe donc un besoin criant d'identification de marqueurs cliniques permettant la détection précoce de la maladie. Les bases moléculaires du déclenchement et de la progression du cancer de l'ovaire sont encore méconnues.

La dérégulation génique entraînant une perte ou gain de fonction génique est essentielle pour la carcinogénèse. Des études ont montré l'importance de la perturbation épigénétique notamment la méthylation de l'ADN sur la régulation génique dans le cancer. Au cours d'un cancer, l'hyperméthylation des îlots CpG de certains promoteurs géniques conduit souvent à l'inactivation des gènes suppresseurs de tumeur impliqués dans plusieurs voies de signalisation. Puisque, cette répression épigénétique par hyperméthylation est maintenant identifiée comme un événement fréquent et précoce lors de la pathogénie de beaucoup de cancers, les différentes modifications rencontrées pourraient potentiellement servir de biomarqueurs pour l'identification des individus à risque. Par conséquent, l'hyperméthylation spécifique de gènes suppresseurs de tumeurs peut servir d'indice pour découvrir les gènes à l'origine de tumeurs et/ou servir de biomarqueurs pour le diagnostic de la maladie, la prédiction de la réponse au traitement, et le développement de stratégies originales de traitement. L'hypométhylation des îlots CpG de certains promoteurs est également impliquée dans la carcinogénèse. Des travaux récents ont également montré un

profil d'hypométhylation des séquences répétées de l'ADN, avec augmentation de l'instabilité génétique et la réactivation des proto-oncogènes et des gènes prométastatiques. Dans le cancer de l'ovaire, l'hypométhylation a été très brièvement étudiée malgré qu'elle semble un bon marqueur indépendant du mauvais pronostic.

Nous présumons, que l'initiation et la progression de la tumorigénèse ovarienne sont en partie, influencées par des changements épigénétiques des gènes impliqués dans les mécanismes de suppression ou d'activation de l'oncogénèse. La méthylation aberrante de l'ADN contribuerait aussi à la progression vers un état de chimiorésistance. Nous avons utilisé la technologie des micropuces à ADN dans le but de pouvoir atteindre quatre objectifs spécifiques suivants:

- 1. Analyser, par une approche épigénomique, le profil de méthylation aberrante de l'ADN dans les différents grades du cancer de l'ovaire de type séreux, comparativement aux tissus normaux de l'ovaire,**
- 2. Comparer le profil de la méthylation aberrante de l'ADN dans les cellules primaires ovariennes dérivées de patientes avant et après traitement,**
- 3. Confirmer le statut de la méthylation aberrante et d'expression génique des gènes sélectionnés dans les échantillons tumoraux comparés aux tissus normaux, et des échantillons post-chimiothérapie comparés aux tumeurs naïves,**
- 4. Étudier le rôle fonctionnel des gènes sélectionnés par leur expression ectopique et/ou suppression dans les cellules cancéreuses ovariennes pour investiguer leur implication dans la tumorigénèse ovarienne et/ou la réponse au traitement.**

Les analyses présentées dans cette thèse se distinguent des études similaires par le fait qu'elles intègrent différents paramètres tels que l'utilisation des micropuces comportant plus d'ilots CpG, des populations (cohortes) homogènes. Enfin, tous ces nouveaux éléments contribueront au développement de nouvelles stratégies permettant la détection précoce, à la personnalisation des pronostiques et de façon générale, à l'amélioration du traitement des cancers de l'ovaire.



## **2. Global methylation profiling in serous ovarian cancer is indicative for distinct aberrant DNA methylation signatures associated with tumor aggressiveness and disease progression**

(Article publié dans Gynecologic Oncology, Fevrier 2013, volume 128, numéro 2, pages 356 à 363) (PMID: 23219462)

## **2.1 Mise en contexte et objectifs de l'article et contributions des auteurs**

Le cancer de l'ovaire représente 4% de tous les cancers chez la femme et est la première cause de décès parmi les tumeurs gynécologiques en occident. Malgré les avancées médicales et chirurgicales, le taux de survie à long terme demeure décevant en raison de la nature asymptomatique de la maladie. Le traitement repose sur la chirurgie cytoréductive suivie de la chimiothérapie combinant les dérivés de platine et de taxanes avec un taux de réponse de plus de 80%. Cependant, la plupart des patientes font une récurrence après une période médiane de 18 mois de traitement par l'émergence de la résistance à ces drogues conventionnelles. Les bases moléculaires du déclenchement et de la progression du cancer de l'ovaire sont encore méconnues. La compréhension de la pathologie moléculaire serait essentielle pour établir de nouvelles stratégies diagnostique et thérapeutique pour le traitement du CEO.

La dérégulation génique entraînant une perte ou gain de fonction génique est essentielle pour la carcinogénèse. La méthylation aberrante de l'ADN, intervenant très tôt durant la carcinogénèse est l'un des mécanismes épigénétiques importants pour le déclenchement, la progression du cancer et donc pour leur thérapie. Au cours d'un cancer, l'hyperméthylation des îlots CpG de certains promoteurs géniques conduit souvent à l'inactivation des gènes suppresseurs de tumeur impliqués dans plusieurs voies de signalisation comme la réparation de l'ADN, la régulation du cycle cellulaire, l'apoptose, le métabolisme du carcinogène, la réponse hormonale et l'adhérence cellulaire. L'hypométhylation des îlots CpG de certains promoteurs est également impliquée dans la carcinogénèse en induisant l'augmentation de l'instabilité génétique et la réactivation des proto-oncogènes et des gènes pro-métastatiques. Par conséquent, les gènes cibles de ces deux événements peuvent



servir d'indices pour découvrir les gènes à l'origine de tumeurs et/ou servir de biomarqueurs tumeur-spécifiques pour le diagnostic de la maladie, la prédiction de la réponse au traitement, et le développement de stratégies originales de traitement. L'analyse des profils de méthylation de l'ADN par l'utilisation de micropuces à ADN s'est rapidement avéré un outil de choix permettant d'étudier le statut de méthylation de milliers de gènes et de les corrélérer avec des phénotypes cliniques précis. Plusieurs équipes de recherche, incluant la nôtre, ont utilisé cette approche pour identifier des signatures moléculaires spécifiques aux différents groupes de tumeurs. Les objectifs généraux de cet article sont de déterminer les profils de méthylation aberrante de l'ADN dans les différents grades/stades de la maladie et dans les cellules primaires des patientes avant et après traitements. Plus spécifiquement, nous avons tenté d'identifier de nouveaux gènes méthylés de façon aberrante comme des biomarqueurs potentiels pour le pronostic et la thérapeutique au cours de la prise en charge du cancer de l'ovaire.

Pour cet article, dix auteurs ont été mis à contribution. Zhi-Qiang Wang et Jean-François Pelletier, respectivement étudiants au doctorat et en maîtrise ont participé à la phase de validation du statut de méthylation des gènes par la technique de conversion au bisulfite suivi du séquençage (BSP).

Magdalena Bachvarova, assistante de recherche de notre laboratoire, a plus précisément été impliqué dans la collecte, le stockage et l'archivage des tissus ovariens dans la banque de tumeur. Marie Plante, Jean Gregoire et Marie-Claude Renaud ont été impliqués dans le recrutement des différentes patientes des cohortes. Dr Anne-Marie Mes-Masson (université de Montréal), une collaboratrice du l'axe Banque de Tissus et de Données du Réseau Cancer du FRSQ, nous a fourni les cellules primaires pré- et post-chimiothérapeutiques utilisées dans cette étude (OV-2295 P61, TOV3133G P65, OV-3133(2) P58, TOV2295G

P57). Éric R. Paquet à l'analyse bioinformatique des données. Dimcho Bachvarov est le principal investigateur de cette étude. Il a été fortement impliqué dans le design, les hybridations des micropuces et la rédaction de l'article. Pour ma part, j'ai contribué à l'extraction d'ADN des tissus, l'immunoprécipitation et la purification des fragments méthylés. J'ai également participé en compagnie de Dimcho Batchvarov à l'hybridation des micropuces et à la validation du statut de méthylation des gènes par BSP et RT-PCR. Finalement, j'ai assisté le Dr Bachvarov dans la conception et la rédaction de l'article.

## **2.2. Résumé en français**

L'un des problèmes majeurs liés au cancer épithélial de l'ovaire (CEO) est sa nature asymptomatique avec la majorité des patientes présentant une phase avancée de la maladie. De ce fait, la compréhension des bases moléculaires de l'initiation et de la progression de la maladie demeurent essentielle dans la lutte contre cette pathologie. Un élément pathogénique clé dans le cancer est l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs et l'activation des oncogènes, fréquemment dues respectivement à l'hyperméthylation et à l'hypométhylation du promoteur. La compréhension de ces mécanismes pourrait aboutir à l'identification des biomarqueurs potentiels pour les individus à risque. Dans ce contexte, nous avons caractérisé à haute résolution, les changements de la méthylation aberrante de l'ADN survenant dans le génome du CEO de sous-type séreux en liaison avec l'agressivité de la tumeur suivant les grades/stades. Le choix de ce sous-type se justifie par le fait que la majorité des patientes en clinique développe ce sous-type de tumeur. Nous avons utilisé la méthode de l'immunoprécipitation de l'ADN méthylée combiné à une analyse sur puce (MeDIP-chip). Par cette technique, nous avons comparé les profils de méthylation de cinq échantillons de chacun des sous-groupes à savoir borderline, grade 1/stade III/IV, grade 3/stade I et grade3/stade III/IV à ceux des tissus normaux ovariens. Nous avons observé une hyperméthylation de l'ADN dans tous les sous-groupes de tumeur y compris borderline. Les cibles de l'hyperméthylation comprennent principalement les gènes de développement. Contrairement à l'hyperméthylation, l'hypométhylation de l'ADN a été observée seulement dans le sous-groupe de grade 3. Cette dernière observation a été confirmée lorsqu'on compare les profils de méthylation de l'ADN dans les cultures de cellules primaires provenant de deux patientes avant et après traitement, ces deux patientes présentant la

phase avancée de la maladie. Nos résultats semblent être l'un des premiers rapports d'une hypométhylation massive associée à la progression tumorale maligne de la maladie. Nos données soulèvent la crainte que la prise des médicaments déméthylants actuellement utilisés dans la maladie avancée du CEO pourrait avoir des effets néfastes liés à l'activation d'oncogènes et de gènes prométastatiques.

## 2.3 Manuscrit original de l'article (anglais)

# **Global methylation profiling in serous ovarian cancer is indicative for distinct aberrant DNA methylation signatures associated with tumor aggressiveness and disease progression**

Mamadou Keita<sup>1,2</sup>, Zhi-Qiang Wang<sup>1,2</sup>, Jean-Francois Pelletier<sup>1,2</sup>, Magdalena Bachvarova<sup>2</sup>, Marie Plante<sup>2,3</sup>, Jean Gregoire<sup>2,3</sup>, Marie-Claude Renaud<sup>2,3</sup>, Anne-Marie Mes-Masson<sup>4,5</sup>, Éric R. Paquet<sup>2</sup> and Dimcho Bachvarov<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Molecular Medicine, Laval University, Québec (Québec), Canada

<sup>2</sup>Centre de recherche du Centre Hospitalier Universitaire (CHU) de Québec, (Québec), Canada

<sup>3</sup>Department of Obstetrics and Gynecology, Laval University, Québec (Québec), Canada

<sup>4</sup>Department of Medicine, Université de Montréal, Montréal, (Québec) Canada

<sup>5</sup>Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM), Institut du cancer de Montréal, Montréal (Québec), Canada

\* Corresponding author:

CHUQ- Centre de recherche, Hôtel-Dieu de Québec

9 rue McMahon, Québec (Québec) Canada G1R 2J6

Tel.: (418) 525-4444, ext. 15590

Fax: (418) 691-5439

Email: [dimtcho.batchvarov@crhdq.ulaval.ca](mailto:dimtcho.batchvarov@crhdq.ulaval.ca)

### **2.3.1 ABSTRACT**

**Objective:** To characterize at high resolution the DNA methylation changes which occur in the genome of serous epithelial ovarian cancer (EOC) in association with tumor aggressiveness.

**Methods:** Methylated DNA immunoprecipitation in combination with CpG island-tiling arrays was used to compare the methylation profiles of five borderline, five grade 1/stage III/IV, five grade 3/stage I and five grade 3/stage III/IV serous EOC tumors, to those of five normal human ovarian tissue samples.

**Results:** We found widespread DNA hypermethylation that occurs even in low-malignant potential (borderline) tumors and which predominantly includes key developmental/homeobox genes. Contrary to DNA hypermethylation, significant DNA hypomethylation was observed only in grade 3 serous EOC tumors. The later observation was further confirmed when comparing the DNA methylation profiles of primary cell cultures derived from matched tumor samples obtained prior to, and following chemotherapy treatment from two serous EOC patients with advanced disease. To our knowledge this is the first report that has shown the presence of massive DNA hypomethylation in advanced serous EOC, associated with tumor malignancy and disease progression.

**Conclusions:** Our data raise the concern that demethylating drugs that are currently being used in advanced EOC disease (representing the majority of serous EOC cases) might have adverse effects due to activation of oncogenes and prometastatic genes. Understanding the relative roles of hypomethylation and hypermethylation in cancer could have clear implications on the therapeutic use of agents targeting the DNA methylation machinery.

### 2.3.2 INTRODUCTION

Recently, the importance of epigenetic perturbation of gene regulation in cancer has begun to be more fully appreciated [1]. The most studied epigenetic alteration is DNA methylation, which is reset early in the embryogenesis and reestablished early during development [1]. In cancer, the physiological regulation of DNA methylation is disrupted, as often the heavy methylation found in the bulk of chromatin is reduced, while the normally unmethylated CpG islands located in the promoter and first exon of genes become hypermethylated. Similar to other malignancies, aberrant DNA methylation occurs in epithelial ovarian cancer (EOC) and contributes to ovarian tumorigenesis and mechanisms of chemoresistance [2]. Using a more global array-based approach, a few studies have demonstrated that DNA methylation changes in EOC are cumulative with disease progression and are associated with early disease recurrence after chemotherapy [3-9]. However, most of these studies have used a mix of different histological EOC subtypes in their studies. Indeed, ovarian carcinomas are currently classified into different histological subtypes (including serous, endometrioid, mucinous and clear cell); among these, serous carcinomas are the most frequent type, representing about 80% of all advanced EOC cases. Recent studies were strongly indicative for ovarian carcinoma subtypes being different diseases that should be investigated separately in order to define reliable risk and therapy predictors [10].

In the present study we used methylated DNA immunoprecipitation (MeDIP) in combination with CpG island tiling arrays to characterize at high resolution the DNA methylation changes that occur in the genome of serous ovarian tumors displaying different degrees of malignancy. Our data are indicative for the occurrence of DNA

hypermethylation in all serous EOC tumor subtypes studied (including borderline and grade 1 tumors) with predominant targeting of developmental/homeobox genes, while poorly differentiated (grade 3) tumors were also associated with significant hypomethylation of genes, mostly involved in tumor invasion and metastasis. Our study also led to the discovery of novel aberrantly methylated genes that could be implicated in serous EOC tumorigenesis.



### **2.3.3. MATERIALS AND METHODS**

#### **2.3.3.1 Cell cultures**

Paired primary EOC cell lines (OV-2295/OV 2295-post CT and OV-3133/OV-3133-post CT) were propagated from matched tumor samples obtained prior to, and following chemotherapy (CT) treatment from two serous EOC patients with advanced disease (grade 3, FIGO stage IIIC/IV), using previously established methods [11].

#### **2.3.3.2 Patients and Tissue specimens**

Primary tumor tissues were obtained for genomic DNA extraction prior to initial chemotherapy (CT) from 20 serous EOC patients at the Hotel-Dieu de Quebec Hospital, Quebec, Canada. These included patients with serous borderline (BL) tumors, as well as patients with grade 1, FIGO stage IIIC/IV (G1;SIII/IV) tumors, grade 3, FIGO stage I (G3;SI) tumors, and grade 3, FIGO stage IIIC/IV (G3;SIII/IV) tumors. All tumors were histologically classified according to the criteria defined by the World Health Organization [12]. Tumor material from all EOC patients was snap-frozen in liquid nitrogen within one hour after surgery. No patient had received chemotherapy before surgery. Frozen sections were stained with hematoxylin and eosin (H&E); only samples that had more than 70% tumor cells were selected for genomic DNA extraction. Normal ovarian samples were derived from women subjected to hysterectomy with oophorectomy due to non-ovarian pathologies. The study was approved by the Clinical Research Ethics Committee of the Hotel-Dieu de Quebec Hospital and all patients signed an informed consent for voluntary participation.

### **2.3.3.3 MeDIP, Agilent CpG island microarrays and data analysis**

Methylated DNA samples from all tumor and normal tissue samples were extracted following the Agilent MeDIP protocol. MeDIP-isolated DNA and input (control) DNA were consecutively labeled using the Agilent Genomic DNA Labeling Kit PLUS, and microarray hybridization was performed on high-density (244 K) Agilent human CpG island arrays (including 195 K CpG island probes and 50 K non-CpG island probes) according to the Agilent ChIP-on-chip protocol. Microarray slides were scanned using the Agilent G2505B scanner and data were extracted with Agilent Feature Extraction 9.1 software. The package limma in BioConductor (<http://www.bioconductor.org>) was used to read and pre-process the raw methylation data. The data were first background subtracted and further normalized using median normalization. Significant hypomethylated or hypermethylated regions were identified by scanning the genome with three consecutive probes at a time and testing for the significant differential methylation using a Wilcoxon non-parametric test. Regions with a Benjamini-Hochberg false discovery rate lower than 0.05 and an absolute fold change higher than 1.5 were considered as significant. The data were visualized using the Broad Institute IGV software (<http://www.broadinstitute.org/software/igv/>). Network/pathway analysis of the methylation microarray data was completed using the Ingenuity Pathway Analysis (IPA) software (see <http://www.ingenuity.com>).

#### **2.3.3.4 Bisulfite sequencing PCR (BSP) analysis**

BSP analysis was performed, as previously described [13]. PCR conditions varied depending on primer selection and composition (see Supplemental Table 1A for primers details).

#### **2.3.3.5 Semi-quantitative RT-PCR (sqRT-PCR)**

SqRT-PCR was performed, as previously described [13]. The GUSB gene was used as an internal standard. Primers were designed using the Primer3 algorithm ([http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3\\_www.cgi](http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3_www.cgi)) (see Supplemental Table 1B for primers details).

## 2.3.4 RESULTS

### 2.3.4.1 Aberrant DNA hypermethylation is common for all serous EOC tumor subtypes and is representative for developmental regulatory genes

To investigate for DNA methylation changes associated with different degrees of tumor malignancy, the common methylation profiles of five BL, five G1/SIII/IV, five G3/SI and five G3/SIII/IV serous EOC tumors were compared to the common methylation profiles of five normal ovarian tissue samples. These analyses led to the identification of numerous hypermethylated CpG islands and genes among the different serous EOC tumor subtypes studied (**Table 2.1A**). Moreover, Venn diagram analysis was indicative for a substantial number of genes (n=132) that were commonly hypermethylated in all tumor subtypes, including BL and G1 tumors (**Figure 2.1A**). Most of the gene-associated hypermethylation was localized in the control (promoter/exon I) region (**Table 2.1A**). A large proportion of the hypermethylated genes identified in all tumor subtypes represented developmental regulatory genes, including numerous homeobox genes (**Table 2.1A**). Notably, IPA pathway analysis displayed a number of development-related pathways as the most significantly hypermethylated pathways in all tumor types, including analysis based on the 132 commonly hypermethylated genes (**Figure 2.1B**). The majority of these genes were shown to be hypermethylated in different cancer types, including EOC.

BSP-mediated validation confirmed the hypermethylation status of several of the most significantly methylated homeobox genes identified (including POU4F2, OTX2, RAX, BARHL2, HOXD3, FOXE1, SOX14, FOXB2; see **Supplemental Figure 1**). These genes were not previously identified as hypermethylated in EOC, as the FOXB2 gene was never shown to be hypermethylated in cancer. IPA analysis has also shown that about half (n=63)

of the 132 commonly hypermethylated genes are functionally related to mechanisms of apoptosis (see Supplemental Table 1), including a number of genes (AIM1, AKAP12, CDKN2A, CYP1B1, FOXF2, HOXA9, HOXA10, IRX1, NRN1, SSTR1) with potential tumor suppressor function. For CDKN2A, HOXA9 and HOXA10, hypermethylation has been previously demonstrated in EOC [14, 15].

Homeobox genes and other key developmental regulatory genes are normally repressed in embryonic stem (ES) cells by the Polycomb group (PcG) proteins, including the PcG chromatin repressive mark, H3K27me3 [16]. Recent reports show that ES cell PcG targets are up to 12-fold more likely to have cancer-specific promoter DNA hypermethylation than non-targets [16]. Using the Integrative Genomics Viewer (IGV) software, we observed a significant overlap between the chromosomal distribution of the DNA hypermethylated sites identified in all serous EOC tumor subtypes and the localization of the H3K27me3 marks in human ES cells, based on ChIP-seq data (see Supplemental Figure 2 for details). Similarly, upon applying the Genomic Regions Enrichment of Annotations Tool (GREAT) (see: <http://bejerano.stanford.edu/great/public/html/>), considerable overlap was also observed between the H3K27me3 marks in ES cells reported by Ben-Porath et al. [17] and our hypermethylation sites. Notably, the methylation sites of the BL, GI;SIII/IV, G3;S1 and G3:SIII/IV tumors obtained highly significant hypergeometric q-values of 3.8e-93, 5.5e-63, 8.2e-89 and 2.1e-95 respectively, in concordance with the H3K27me3 marks in ES cells identified by Ben-Porath et al. [17].

Our epigenomic approach has also lead to the identification of several novel hypermethylation targets in serous EOC (including TNK1, DMRT3, LECT1, TUBB6, CADPS, GRK7, NETO1, LAMB1, HSPA1A, HSPA1L and PCDH17); consecutive BSP validation in independent set of control and tumor tissues has confirmed their

hypermethylation status in less aggressive forms of the disease (BL tumors), which also persisted in advanced serous EOC (Figure 2). Some of these genes (TNK, DMRT3, LECT1, LAMB1, PCDH17, CADPS and TUBB6) represent potential TSGs, or display loss of expression in cancer tissues, frequently associated with poorer prognosis [18-24]. With the exception of PCDH17 [22], these genes were never reported to undergo functional epigenetic silencing by promoter hypermethylation in human cancers. A total of 24 genes from our hypermethylated gene lists were also identified as hypermethylated in The Cancer Genome Atlas (TCGA) methylation data set for serous EOC [9] (see Supplemental Tables 3A-6A for details).

#### **2.3.4.2 Aberrant DNA hypomethylation correlates with tumor malignancy grade**

Contrary to DNA hypermethylation, DNA hypomethylation was very limited in BL and G1 tumors; however, it increased significantly in poorly differentiated (G3) tumors, and especially in G3;SIII/IV tumors (see **Table 2.1B** and **Figure 2.1C**). Here, the two most significant pathways associated with DNA hypomethylation in G3 tumors were functionally related to cell-to-cell signaling and interaction and cellular assembly and organization, as other pathways implicated in cell signaling, molecular transport and cell death also displayed considerable significance (**Figure 2.1D**). Notably, a large portion of these genes are associated with mechanisms of tumorigenesis, cell migration, invasion and metastasis, including EOC tumorigenesis, EOC metastasis and EOC chemoresistance (see Table 2.2). BSP validation of some novel hypomethylation targets in serous EOC (including TGFB111, GALNT3, ARC, BCAT1, CAPS) confirmed their hypomethylation status in advanced disease (Figure 2.3). The role of this genes in EOC etiology is currently

unknown; however, TGFB1I1, GALNT3 and BCAT1 were already shown to be implicated in tumor invasion and metastasis in other cancers [25-27], and CAPS has been characterized as novel tumor marker and potential drug target in endometrial cancer [28]. Additionally, we have performed global DNA methylation profiling of primary cell cultures (PCCs), derived from matched tumor samples obtained prior to, and following chemotherapy (CT) treatment from two serous EOC patients with advanced (G3;SIII/IV) disease (for both patients, the CT regimen included the standard carboplatin/paclitaxel combination). These analyses further confirmed the association of DNA hypomethylation with EOC disease severity and progression. Thus, we found only 9 CpG islands (including 7 genes) to be hypermethylated, while the hypomethylated regions comprised 51 CpG islands, including 46 genes. IPA functional analysis of the post-CT hypomethylated 46-gene set was indicative for strong presentation of pathways linked to cellular growth and proliferation, cell cycle control and cellular movement and DNA replication, recombination and repair (Figure 2.4A). Indeed, almost half (n=22) of the post-CT hypomethylated 46-gene list includes genes implicated in tumor invasion and metastasis. We have performed initial BSP validation of the methylation status of four of these genes (RUNX1, RUNX2, EPSTI1 and ELL3) with previously proven implication in tumor growth, invasion and metastasis [29-32] (see Figure 2.4B). As seen from Figure 2.4B, BSP analyses confirmed their hypomethylation status in the post-CT PCCs. The overexpression of these genes in the post-CT PCCs was further validated by sqRT-PCR (Figure 2.4C).

### 2.3.5 DISCUSSION

In this study, we have used the MeDIP method in combination with genome-wide CpG island arrays for a comprehensive analysis of DNA methylation patterns in low- and high malignant potential serous ovarian tumors, the latter also subdivided by stage. The generated methylation patterns showed strong differentiation between tumor and normal DNA, with all tumor DNA samples displaying a far greater number of hypermethylated CpG loci compared to normal samples. Our data are indicative that dense *de novo* methylation of homeobox and other developmental regulatory genes occurs even in low-malignant potential (BL) tumors. This is similar to what has been found in other cancer types, for example lung [33], brain [34], breast [35], colorectal [36], prostate cancer [37] and lymphomas [38]. A number of homeobox and other key developmental genes, including HOXA9, HOXA10, HOXA11, SOX1, PAX1 and LMX1A, were also shown to be frequently methylated in EOC, as some of them were suggested as valuable molecular markers for EOC diagnostic screening and prognostic predication [39]. With the exception of HOXA11, all the above homeobox genes were also found to be hypermethylated in the serous EOC tumors analyzed, as HOXA9, HOXA10, SOX1 and PAX1 were present in the 132-gene list of genes, commonly hypermethylated in all tumor subtypes analyzed.

Our and others' findings of widespread methylation of developmental/homeobox genes substantiate the hypothesis that a substantial fraction of genes methylated in human cancer are PcG targets. It has also been shown that genes affected by *de novo* DNA methylation during tumorigenesis are pre-marked by the PcG chromatin repressive mark, H3K27me3, suggesting that this chromatin modification directs the establishment of cancer-specific DNA methylation patterns [16]. The relationship between H3K27 trimethylation, and *de*



*novo* DNA methylation is assumed to reflect the presence of a stem cell-like epigenetic program in cancer cells [16]. Indeed, we have found a highly significant overlap between the chromosomal distribution of the DNA hypermethylated sites identified in all serous EOC tumor subtypes by our MeDIP-array experiments and the localization of the H3K27me3 repressive marks in human ES cells (**Figure 2.6**). Thus, our data provide additional support to the emerging model that the addition of DNA methylation in adult cancer cells completely and heritably represses transcription as compared to low, but continued, expression in the ES cells where the gene is marked only by PcG constituents and bivalent chromatin [16]. As suggested, such a permanent silencing of pro-differentiation genes might lead to the accumulation of ES-like cell population that is unable to differentiate but which could persist long enough, perhaps over the lifetime of an individual, to acquire the necessary transforming genetic or epigenetic aberrations associated with tumorigenesis [34].

Contrary to DNA hypermethylation, significant DNA hypomethylation was observed only in high-grade (G3) serous tumors. This observation was further confirmed when comparing the DNA methylation profiles of PCCs derived from matched tumor samples obtained prior to, and following CT from two serous EOC patients with advanced disease. To our knowledge this is the first report that has shown the presence of massive DNA hypomethylation in advanced serous EOC associated with the possible induction of a number of oncogenes, functionally related to higher tumor malignancy and disease progression, including invasion/metastasis. Similarly, a recent study using analogous epigenomic approach has led to the identification of 3,700 demethylated genes in tumors from 11 liver cancer patients, which were mainly involved in cell growth, cell adhesion and communication, mobility, and invasion [40]. These observations might have important

implications on the therapeutic use of DNA demethylating agents. Currently, a number of demethylating drugs are used in cancer therapy, including EOC therapy [41]. However, as in the case of other epigenetic drugs such as histone deacetylase (HDAC) inhibitors, clear proof-of-concept data for the clinical efficacy of epigenetic approaches remains to be established. Besides, our data raise the concern that demethylating drugs are used in advanced EOC disease (representing the majority of serous EOC cases) might have adverse effects due to activation of oncogenes and prometastatic genes. Thus, and as suggested recently [40], the DNA demethylation machinery might serve as a new approach to cancer (including serous EOC) therapy.

Our epigenomic approach has led to the identification of novel aberrantly methylated gene targets in EOC, including hypermethylated genes with potential TSG function, and hypomethylated genes, associated with highly-malignant disease. These genes could represent new therapeutic targets and/or novel biomarkers indicative for EOC etiology and possibly, for early detection of the disease. For some of the above listed genes functional analyses are currently underway to better understand their putative functional implication in EOC tumorigenesis.

There was only a limited overlap between our DNA methylated data and the recently published TCGA methylation data set for serous EOC [9] which could be due to the positions of CpG sites investigated. The Illumina 27K methylation array used in the TCGA study covers only a proportion of all CpG sites in the genome and is biased toward promoter CpG islands, while the Agilent CpG microarray also extends into gene bodies, downstream gene locations, and currently uncharacterized chromosomal regions. More importantly, the TCGA data set do not incorporate analyses on DNA hypomethylation.

In conclusion, we found widespread DNA hypermethylation at CpG islands in serous EOC that is even characteristic for low-malignant potential (BL) tumors. This hypermethylation preferentially included key developmental genes and is possibly associated with repressive chromatin marks, such as PcG- and H3K27me3-mediated gene silencing. However, we have also shown that massive DNA hypomethylation occurs in poorly differentiated (G3) tumors, which is probably related to disease progression, including tumor invasion/metastasis. A comprehensive understanding of the global genomic/epigenomic changes in serous EOC would be required to develop a more effective (including epigenetic) treatment strategy for this deadly disease.

**Conflict of interest statement**

None.

### **2.3.6 ACKNOWLEDGMENTS**

This study was sustained by grants to D.B. from the Cancer Research Society of Canada and the CHRP Program of NSERC-Canada. Clinical specimens were provided by the Banque de tissus et de données of the Réseau de recherche sur le cancer of the Fonds de recherche du Québec – Santé which is affiliated with the Canadian Tumour Repository Network.

### 2.3.7 REFERENCES

- [1] Jones PA, Baylin SB. The epigenomics of cancer. *Cell* 2007;128: 683-92.
- [2] Balch C, Fang F, Matei DE, Huang TH, Nephew KP. Minireview: epigenetic changes in ovarian cancer. *Endocrinology* 2009;150: 4003-11.
- [3] Watts GS, Futscher BW, Holtan N, Degeest K, Domann FE, Rose SL. DNA methylation changes in ovarian cancer are cumulative with disease progression and identify tumor stage. *BMC Med Genomics* 2008;1: 47.
- [4] Woloszynska-Read A, Mhaweck-Fauceglia P, Yu J, Odunsi K, Karpf AR. Intertumor and intratumor NY-ESO-1 expression heterogeneity is associated with promoter-specific and global DNA methylation status in ovarian cancer. *Clin Cancer Res* 2008;14: 3283-90.
- [5] Yoon MS, Suh DS, Choi KU, Sol MY, Shin DH, Park WY, Lee JH, Jeong SM, Kim WG, Shin NR. High-throughput DNA hypermethylation profiling in different ovarian epithelial cancer subtypes using universal bead array. *Oncol Rep* 2010;24: 917-25.
- [6] Kolbe DL, DeLoia JA, Porter-Gill P, Strange M, Petrykowska HM, Guirguis A, Krivak TC, Brody LC, Elnitski L. Differential analysis of ovarian and endometrial cancers identifies a methylator phenotype. *PLoS One* 2012;7: e32941.
- [7] Shih Ie M, Chen L, Wang CC, Gu J, Davidson B, Cope L, Kurman RJ, Xuan J, Wang TL. Distinct DNA methylation profiles in ovarian serous neoplasms and their implications in ovarian carcinogenesis. *Am J Obstet Gynecol* 2010;203: 584 e1-22.
- [8] Li M, Balch C, Montgomery JS, Jeong M, Chung JH, Yan P, Huang TH, Kim S, Nephew KP. Integrated analysis of DNA methylation and gene expression reveals specific

signaling pathways associated with platinum resistance in ovarian cancer. *BMC Med Genomics* 2009;2: 34.

[9] Integrated genomic analyses of ovarian carcinoma. *Nature* 2011;474: 609-15.

[10] Kobel M, Kalloger SE, Boyd N, McKinney S, Mehl E, Palmer C, Leung S, Bowen NJ, Ionescu DN, Rajput A, Prentice LM, Miller D, Santos J, Swenerton K, Gilks CB, Huntsman D. Ovarian carcinoma subtypes are different diseases: implications for biomarker studies. *PLoS Med* 2008;5: e232.

[11] Lounis H, Provencher D, Godbout C, Fink D, Milot MJ, Mes-Masson AM. Primary cultures of normal and tumoral human ovarian epithelium: a powerful tool for basic molecular studies. *Exp Cell Res* 1994;215: 303-9.

[12] Vergote I, Rustin GJ, Eisenhauer EA, Kristensen GB, Pujade-Lauraine E, Parmar MK, Friedlander M, Jakobsen A, Vermorken JB. Re: new guidelines to evaluate the response to treatment in solid tumors [ovarian cancer]. *Gynecologic Cancer Intergroup. J Natl Cancer Inst* 2000;92: 1534-5.

[13] Mercier PL, Bachvarova M, Plante M, Gregoire J, Renaud MC, Ghani K, Tetu B, Bairati I, Bachvarov D. Characterization of DOK1, a candidate tumor suppressor gene, in epithelial ovarian cancer. *Mol Oncol* 2011;5: 438-53.

[14] Abou-Zeid AA, Azzam AZ, Kamel NA. Methylation status of the gene promoter of cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (CDKN2A) in ovarian cancer. *Scand J Clin Lab Invest* 2011;71: 542-7.

[15] Wu Q, Lothe RA, Ahlquist T, Silins I, Trope CG, Micci F, Nesland JM, Suo Z, Lind GE. DNA methylation profiling of ovarian carcinomas and their in vitro models identifies HOXA9, HOXB5, SCGB3A1, and CRABP1 as novel targets. *Mol Cancer* 2007;6: 45.

- [16] Widschwendter M, Fiegl H, Egle D, Mueller-Holzner E, Spizzo G, Marth C, Weisenberger DJ, Campan M, Young J, Jacobs I, Laird PW. Epigenetic stem cell signature in cancer. *Nat Genet* 2007;39: 157-8.
- [17] Ben-Porath I, Thomson MW, Carey VJ, Ge R, Bell GW, Regev A, Weinberg RA. An embryonic stem cell-like gene expression signature in poorly differentiated aggressive human tumors. *Nat Genet* 2008;40: 499-507.
- [18] May WS, Hoare K, Hoare S, Reinhard MK, Lee YJ, Oh SP. Tnk1/Kos1: a novel tumor suppressor. *Trans Am Clin Climatol Assoc* 2010;121: 281-92; discussion 292-3.
- [19] Kang JU, Koo SH, Kwon KC, Park JW. Frequent silence of chromosome 9p, homozygous DOCK8, DMRT1 and DMRT3 deletion at 9p24.3 in squamous cell carcinoma of the lung. *Int J Oncol* 2010;37: 327-35.
- [20] Mera H, Kawashima H, Yoshizawa T, Ishibashi O, Ali MM, Hayami T, Kitahara H, Yamagiwa H, Kondo N, Ogose A, Endo N. Chondromodulin-1 directly suppresses growth of human cancer cells. *BMC Cancer* 2009;9: 166.
- [21] Iwamoto Y, Robey FA, Graf J, Sasaki M, Kleinman HK, Yamada Y, Martin GR. YIGSR, a synthetic laminin pentapeptide, inhibits experimental metastasis formation. *Science* 1987;238: 1132-4.
- [22] Haruki S, Imoto I, Kozaki K, Matsui T, Kawachi H, Komatsu S, Muramatsu T, Shimada Y, Kawano T, Inazawa J. Frequent silencing of protocadherin 17, a candidate tumour suppressor for esophageal squamous cell carcinoma. *Carcinogenesis* 2010;31: 1027-36.
- [23] Miller S, Rogers HA, Lyon P, Rand V, Adamowicz-Brice M, Clifford SC, Hayden JT, Dyer S, Pfister S, Korshunov A, Brundler MA, Lowe J, Coyle B, Grundy RG. Genome-

wide molecular characterization of central nervous system primitive neuroectodermal tumor and pineoblastoma. *Neuro Oncol* 2011;13: 866-79.

[24] Leandro-Garcia LJ, Leskela S, Landa I, Montero-Conde C, Lopez-Jimenez E, Leton R, Cascon A, Robledo M, Rodriguez-Antona C. Tumoral and tissue-specific expression of the major human beta-tubulin isotypes. *Cytoskeleton (Hoboken)* 2010;67: 214-23.

[25] Deakin NO, Turner CE. Distinct roles for paxillin and Hic-5 in regulating breast cancer cell morphology, invasion, and metastasis. *Mol Biol Cell* 2011;22: 327-41.

[26] Inoue T, Eguchi T, Oda Y, Nishiyama K, Fujii K, Izumi H, Kohno K, Yamaguchi K, Tanaka M, Tsuneyoshi M. Expression of GalNAc-T3 and its relationships with clinicopathological factors in 61 extrahepatic bile duct carcinomas analyzed using stepwise sections - special reference to its association with lymph node metastases. *Mod Pathol* 2007;20: 267-76.

[27] Yoshikawa R, Yanagi H, Shen CS, Fujiwara Y, Noda M, Yagy T, Gega M, Oshima T, Yamamura T, Okamura H, Nakano Y, Morinaga T, Hashimoto-Tamaoki T. ECA39 is a novel distant metastasis-related biomarker in colorectal cancer. *World J Gastroenterol* 2006;12: 5884-9.

[28] Voisin SN, Krakovska O, Matta A, DeSouza LV, Romaschin AD, Colgan TJ, Siu KW. Identification of novel molecular targets for endometrial cancer using a drill-down LC-MS/MS approach with iTRAQ. *PLoS One* 2011;6: e16352.

[29] Doll A, Gonzalez M, Abal M, Llauro M, Rigau M, Colas E, Monge M, Xercavins J, Capella G, Diaz B, Gil-Moreno A, Alameda F, Reventos J. An orthotopic endometrial cancer mouse model demonstrates a role for RUNX1 in distant metastasis. *Int J Cancer* 2009;125: 257-63.



- [30] Pratap J, Javed A, Languino LR, van Wijnen AJ, Stein JL, Stein GS, Lian JB. The Runx2 osteogenic transcription factor regulates matrix metalloproteinase 9 in bone metastatic cancer cells and controls cell invasion. *Mol Cell Biol* 2005;25: 8581-91.
- [31] Johnstone RW, Gerber M, Landewe T, Tollefson A, Wold WS, Shilatifard A. Functional analysis of the leukemia protein ELL: evidence for a role in the regulation of cell growth and survival. *Mol Cell Biol* 2001;21: 1672-81.
- [32] de Neergaard M, Kim J, Villadsen R, Fridriksdottir AJ, Rank F, Timmermans-Wielenga V, Langerod A, Borresen-Dale AL, Petersen OW, Ronnov-Jessen L. Epithelial-stromal interaction 1 (EPSTI1) substitutes for peritumoral fibroblasts in the tumor microenvironment. *Am J Pathol* 2010;176: 1229-40.
- [33] Rauch T, Wang Z, Zhang X, Zhong X, Wu X, Lau SK, Kernstine KH, Riggs AD, Pfeifer GP. Homeobox gene methylation in lung cancer studied by genome-wide analysis with a microarray-based methylated CpG island recovery assay. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104: 5527-32.
- [34] Wu X, Rauch TA, Zhong X, Bennett WP, Latif F, Krex D, Pfeifer GP. CpG island hypermethylation in human astrocytomas. *Cancer Res* 2010;70: 2718-27.
- [35] Tommasi S, Karm DL, Wu X, Yen Y, Pfeifer GP. Methylation of homeobox genes is a frequent and early epigenetic event in breast cancer. *Breast Cancer Res* 2009;11: R14.
- [36] McGarvey KM, Van Neste L, Cope L, Ohm JE, Herman JG, Van Criekinge W, Schuebel KE, Baylin SB. Defining a chromatin pattern that characterizes DNA-hypermethylated genes in colon cancer cells. *Cancer Res* 2008;68: 5753-9.
- [37] Truong M, Yang B, Wagner J, Kobayashi Y, Rajamanickam V, Brooks J, Jarrard DF. Even-skipped homeobox 1 is frequently hypermethylated in prostate cancer and predicts PSA recurrence. *Br J Cancer* 2012;107: 100-7.

- [38] Bennett LB, Schnabel JL, Kelchen JM, Taylor KH, Guo J, Arthur GL, Papageorgio CN, Shi H, Caldwell CW. DNA hypermethylation accompanied by transcriptional repression in follicular lymphoma. *Genes Chromosomes Cancer* 2009;48: 828-41.
- [39] Montavon C, Gloss BS, Warton K, Barton CA, Statham AL, Scurry JP, Tabor B, Nguyen TV, Qu W, Samimi G, Hacker NF, Sutherland RL, Clark SJ, O'Brien PM. Prognostic and diagnostic significance of DNA methylation patterns in high grade serous ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2012;124: 582-8.
- [40] Stefanska B, Huang J, Bhattacharyya B, Suderman M, Hallett M, Han ZG, Szyf M. Definition of the landscape of promoter DNA hypomethylation in liver cancer. *Cancer Res* 2011;71: 5891-903.
- [41] Matei DE, Nephew KP. Epigenetic therapies for chemoresensitization of epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2010;116: 195-201.

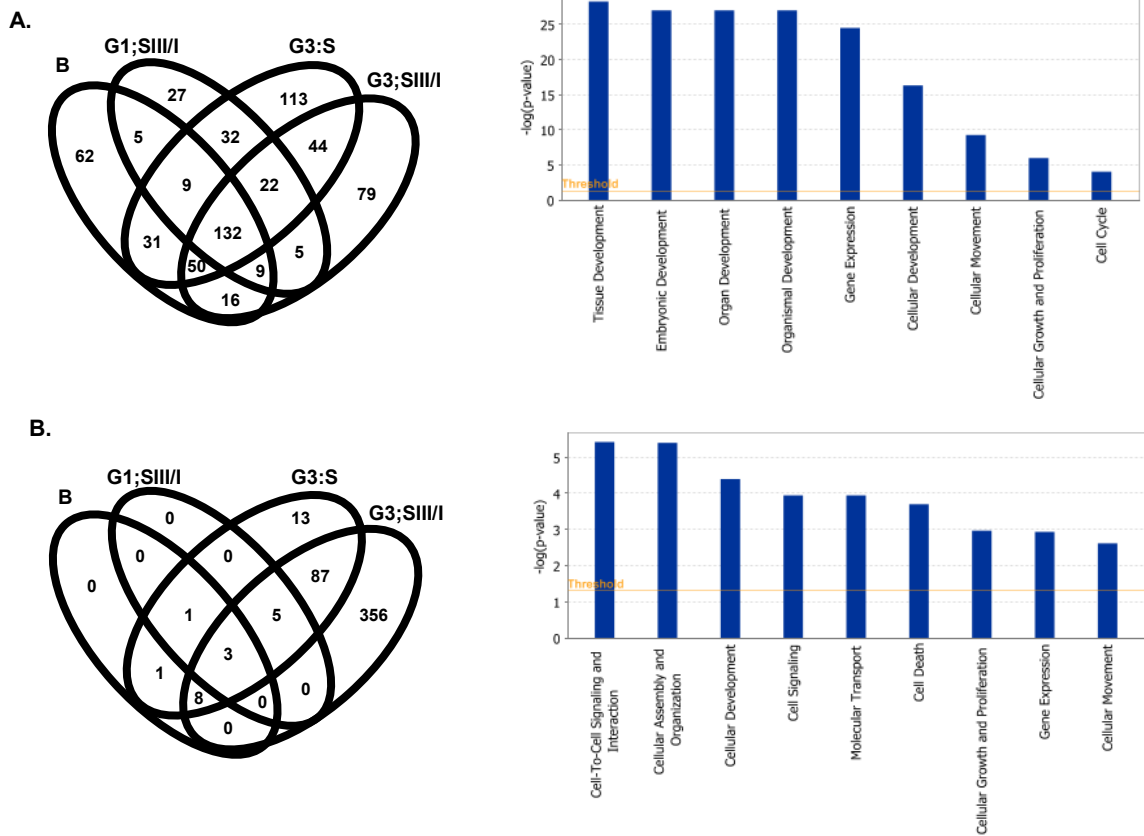
### 2.3.8 FIGURE LEGENDS

**Figure 2.1.** Venn diagram and functional analyses of common and distinct aberrantly methylated genes in BL, G1;SIII/IV, G3;S1 and G3;SIII/IV serous EOC tumors compared to normal ovarian tissue samples. A. Venn diagram analysis of hypermethylated genes; B. IPA functional analysis of the commonly hypermethylated genes (132-genes set) in all serous EOC tumor subtypes studied; C. Venn diagram analysis of hypomethylated genes; D. IPA functional analysis of hypomethylated genes in G3 tumors. Top functions that meet a *p*-value cutoff of 0.05 are displayed.

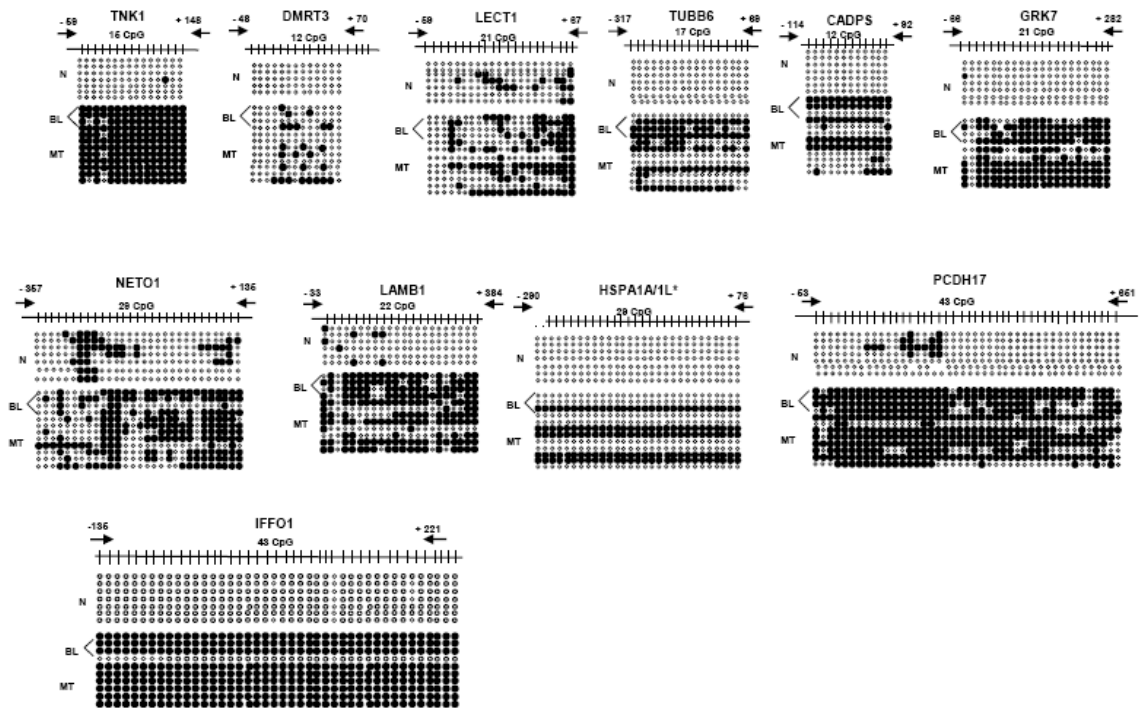
**Figure 2. 2** BSP analysis of the methylation status of selected hypermethylated genes in serous EOC tumors compared to normal tissue samples. Filled circles represent methylated CpGs and open circles represent unmethylated CpGs. CpG plots of the analyzed regions are also presented (CpGs are displayed with vertical marks). The indicated positions on the CpG plots represent the number of nucleotides stretching upstream (+) and downstream (-) of the first exon for each gene analyzed. N – normal ovarian tissue; BL – serous borderline tumors; MT – malignant serous adenocarcinoma tumors.

**Figure 2.3** BSP analysis of the methylation status of selected hypomethylated genes in serous EOC tumors compared to normal tissue samples. Figure legends are as described in Fig. 2.

**Figure 2.4.** Characterization of DNA hypomethylation in PCCs derived from matched tumor samples obtained prior to, and post-CT treatment from two serous EOC patients with advanced (G3;SIII/IV) disease. A. IPA functional analysis of the hypomethylated genes in post-CT PCCs. B. BSP analysis of the methylation status of the selected hypomethylated genes RUNX1, RUNX2, EPSTI1 and ELL3 in the matched prior to/post-CT PCCs. (figure legends are as described in Fig. 2). C. Semi-quantitative RT-PCR analysis of the RUNX1, RUNX2, EPSTI1 and ELL3 gene expression in the matched prior to/post-CT PCCs. The GUSB gene was used as internal standard.

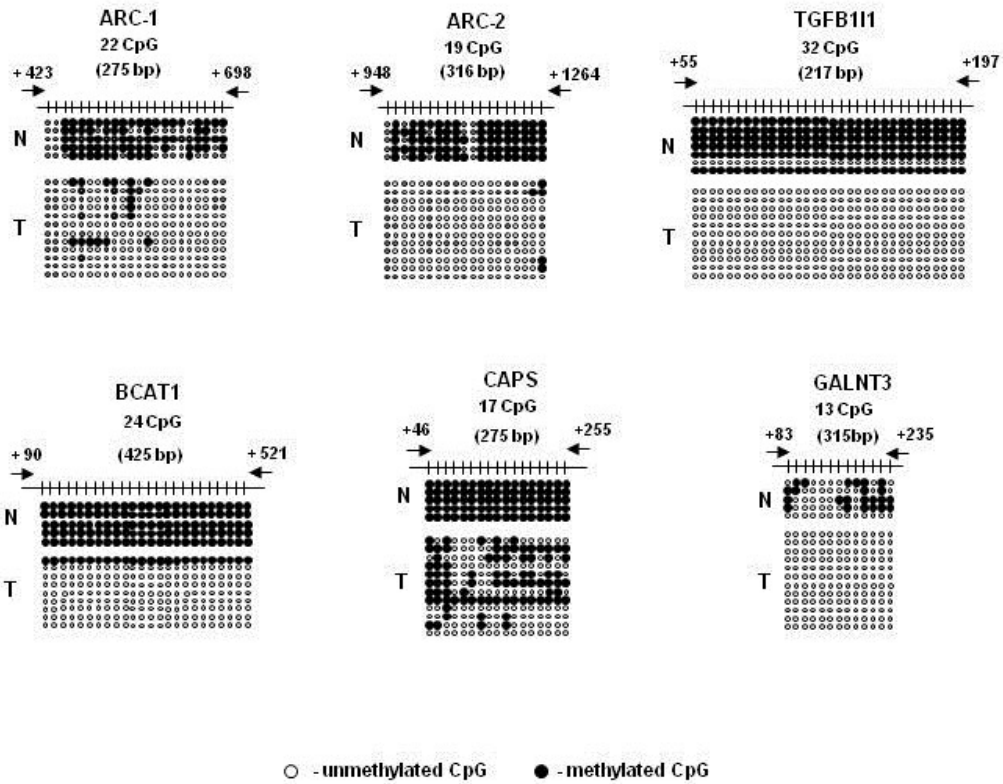


**Figure 2.1.** Venn diagram and functional analyses of common and distinct aberrantly methylated genes in BL, G1;SIII/IV, G3;S1 and G3;SIII/IV serous EOC tumors compared to normal ovarian tissue samples.

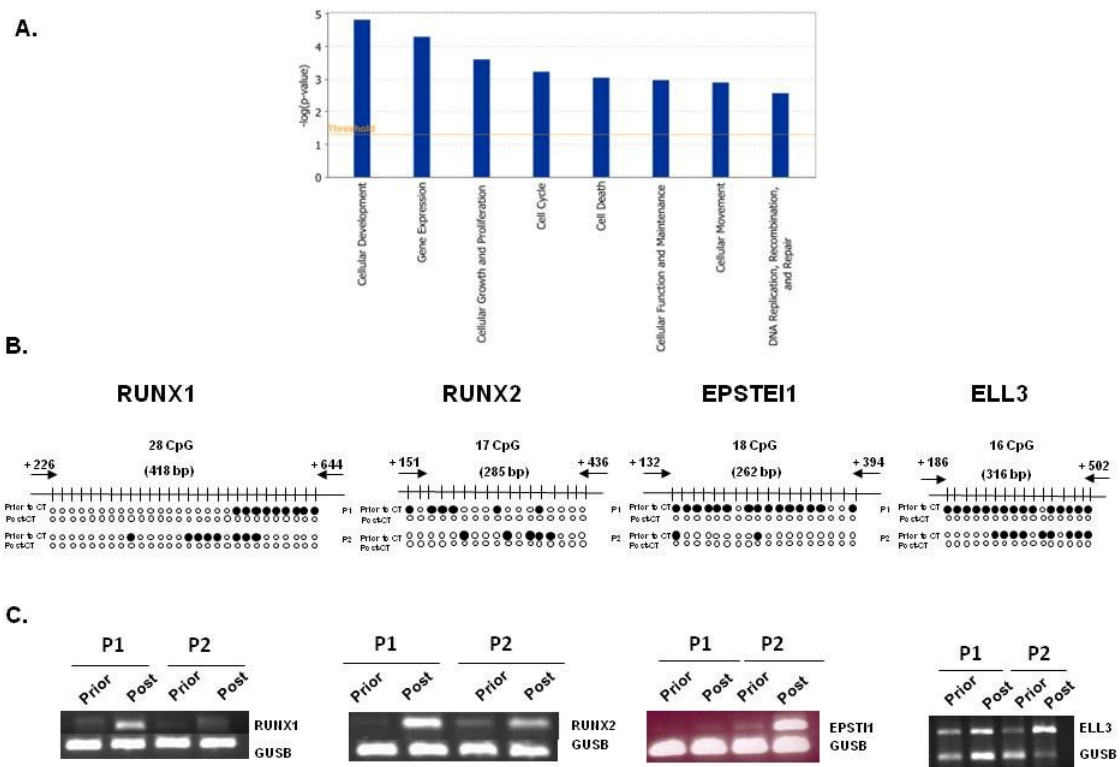


\*HSPA1A and HSPA1L share the same hypermethylated CpG island covering a potential bi-directional HSPA1A/HSPA1L gene promoter.

**Figure 2.2.** BSP analysis of the methylation status of selected hypermethylated genes in serous EOC tumors compared to normal tissue samples.



**Figure 2.3.** BSP analysis of the methylation status of selected hypomethylated genes in serous EOC tumors compared to normal tissue samples.



**Figure 2.4.** Characterization of DNA hypomethylation in PCCs derived from matched tumor samples obtained prior to, and post-CT treatment from two serous EOC patients with advanced (G3;SIII/IV) disease.



### 2.3.9. TABLES

**Tableau 2.1 Numbers of aberrantly methylated CpG islands and genes in serous ovarian tumors, compared to normal ovarian tissue.**

A. Hypermethylated CpG islands/genes					
Tumor	CpG islands	Genes	Promoter/I exon <sup>a</sup>	Developmental genes <sup>b</sup>	Homeobox genes <sup>b</sup>
BL	439	314	263 (83.7%)	141 (44.9%)	62
G1;SIII/IV	331	241	177 (55.5%)	103 (42.1%)	35
G3;SI	617	433	338 (78.1%)	167 (38.6%)	67
G3;SIII/IV	500	357	296 (82.9)	156 (43.7%)	62

B. Hypomethylated CpG islands/genes					
Tumor	CpG islands	Genes	Promoter/I exon <sup>a</sup>	Developmental genes <sup>b</sup>	Homeobox genes <sup>b</sup>
G1;SIII/IV	12	9	4 (44.4%)	8 (88.9%)	2
G3;SI	168	118	47 (39.8%)	34 (28.8%)	7
G3;SIII/IV	767	459	205 (44.7%)	90 (19.6%)	12

<sup>a</sup>The number of genes is indicated, for which the aberrant DNA methylation occurs in the potential gene control regions, including the gene promoter and/or I exon.

<sup>b</sup>The number of developmental and homeobox genes was determined using the gene ontology analysis tool of the DAVID/EASE software (Huang da et al., 2009) (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/>).

**Tableau 2.2. Functional characterization of hypomethylated genes in poorly-differentiated (grade 3) EOC tumors<sup>a</sup>**

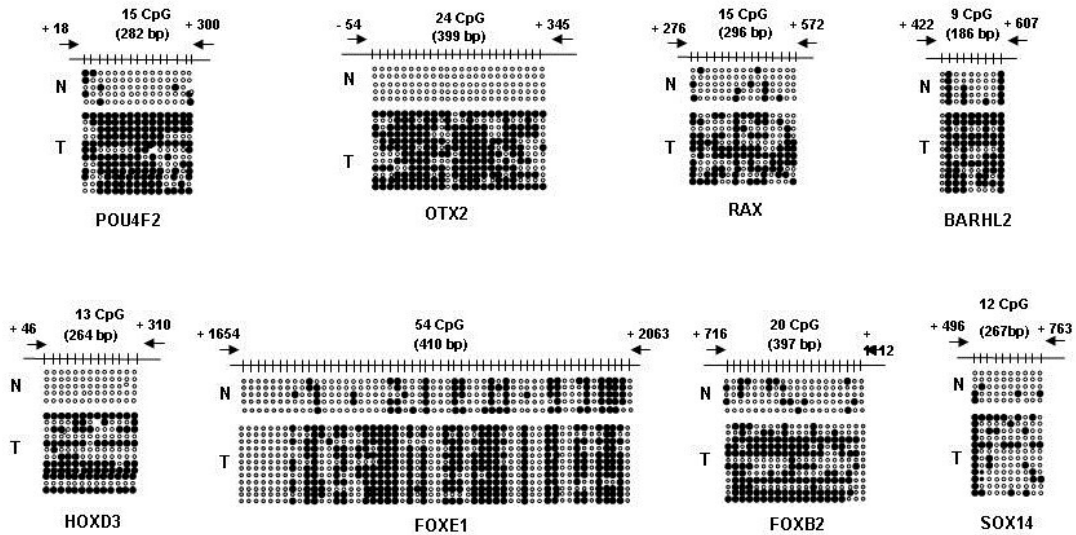
Functional category	Tumor grade & stage	Genes
tumorigenesis	G3;SI	GALNT3, TGFB11, BCAT1, EMX2, PCSK2, MAB21L1, CELSR1, CDH4, SLC9A3, EGFL7, EEF1A2, FOSB, <b>GBX2b</b> , MEIS1, RPL28, FOXC1, <b>IL17C</b> , <b>TNXB</b> , <b>GRIN2C</b> , <b>SALL1</b> , RBM47, NR5A1, ARID3A, ADAMTS10, PRDM16, LTBP4, AGPAT2, PTPRN2, DHH, F10, VENTX, <b>RUVBL1</b> , OBSCN, BAI1, MAD1L1, EMP3, RGS12, TBX3, PIK3R2, <b>ALX4</b>
	G3;SIII/IV	CDH4, EMX2, GALNT3, TGFB11, CELSR1, SFN, TNFRSF6B, PCSK2, SLC9A3, F10, MTA1, NR5A1, RPL28, ADAMTS10, CACNA1A, EMP3, EEF1A2, ASPSCR1, TBX3, BAI1, PTPRN2, NTSR1, NOTCH1, PRDM16, BCR, CLDN4, BRSK2, MAD1L1, DPP6, PIK3R2, MAB21L1, MUC1, MEIS1, OBSCN, FOSB, DMPK, DHH, NFATC1, TIE1, BMP7, GRIN3B, SPTBN1, GRIN2D, HIC1, MBP, SLC25A5, RBM47, ATP11A, ALOX5, AXIN1, GRIN1, CLDN3, KLK10, TNK2, ZNF536, FAM20C, SEMA6B, LSM7, ARID3A, ITIH5, ADAMTS2, CREBBP, AGPAT2, MUM1, TIMM44, CIRBP, NOTCH3, LTBP4, NCOR2, TFE3, TNNT3, IGF2BP1, HOXC6, HDAC6, DCHS1, RGS12, G6PD, IGDCC4, PLXNB2, GNAS, PCSK4, TRIP13, TTC38, EMD, TRIM29, SOCS3, CHRNA4, IHH, PKM2, TGM3, LAGE3, VENTX, EFN1, HOXC4, CCND1, LPPR2, B3GNT3, NONO, ELANE, SSTR5, FLT4, MDFI, IRAK1, CUX2, FOXC1, EGFL7, FHOD3, CACNA2D4, DPYSL4, ZBTB20, MUC2, ARAF, HRH3, PRKCZ, TP73, JPH3, CAMK2B, MCM2, PLA2G6, IRAK2, BCAT1, MAP2K2, RPS6KA3, SYP, ZBTB4, ELK1, CHST8
metastasis	G3;SI	EMX2, MEIS1, DHH
	G3;SIII/IV	NR5A1, CACNA1A, EEF1A2, BCR, CLDN4, MUC1, FOSB, BMP7, HIC1, CLDN3, NOTCH3, TFE3, HOXC6, GNAS, EMD, SSTR5, FLT4, TP73
invasion	G3;SI	CDH4, SCRIB, PIK3R2
	G3;SIII/IV	CDH4, MTA1, NOTCH1, SCRIB, CLDN4, PIK3R2, MUC1, BMP7, KCNH2, CLDN3, TNK2, IGF2BP1, PKM2, CCND1, AJAP1, FLT4, CTBP2, PLA2G6, MAP2K2, ELK1
migration	G3;SI	FUT7, EGFL7, EEF1A2, FOXC1, SOX8, F10, BAI1, TRPM2, MCF2L, PIK3R2
	G3;SIII/IV	FUT7, TNFRSF6B, F10, MTA1, TRPM2, MCF2L, EEF1A2, BAI1, NOTCH1, SOX8, BCR, CLDN4, EPHA8, DLX1, PIK3R2, MUC1, ABR, NFATC1, TIE1, KCNH2, ALOX5, TNK2, FGF13, MRC2, EXOC3L2, HDAC6, G6PD, GNAS, PCSK4, LIMS2, SOCS3, TRPM4, EFN1, CCND1, WDR44, CNTN2, PIP5K1C, ELANE, FLT4, CTBP2, FOXC1, EGFL7, PRKCZ, TP73, MCM2, PLA2G6, MAP2K2, ELK1, PENK
ovarian cancer	G3;SI	EEF1A2 <sup>c</sup> , FOSB <sup>d</sup>
	G3;SIII/IV	EEF1A2 <sup>c</sup> , GNAS <sup>c</sup> , EMD <sup>c</sup> , TP73 <sup>c</sup> , HOXC6 <sup>d</sup> , VEGFR3 <sup>d</sup> , FOSB <sup>d</sup> , CLDN4 <sup>d</sup> , MUC1 <sup>d</sup> , CLDN3 <sup>d</sup> , NOTCH3 <sup>c</sup> , BMP7 <sup>c</sup>

<sup>a</sup>The gene's functional classification was determined using the IPA functional pathway analysis tool.

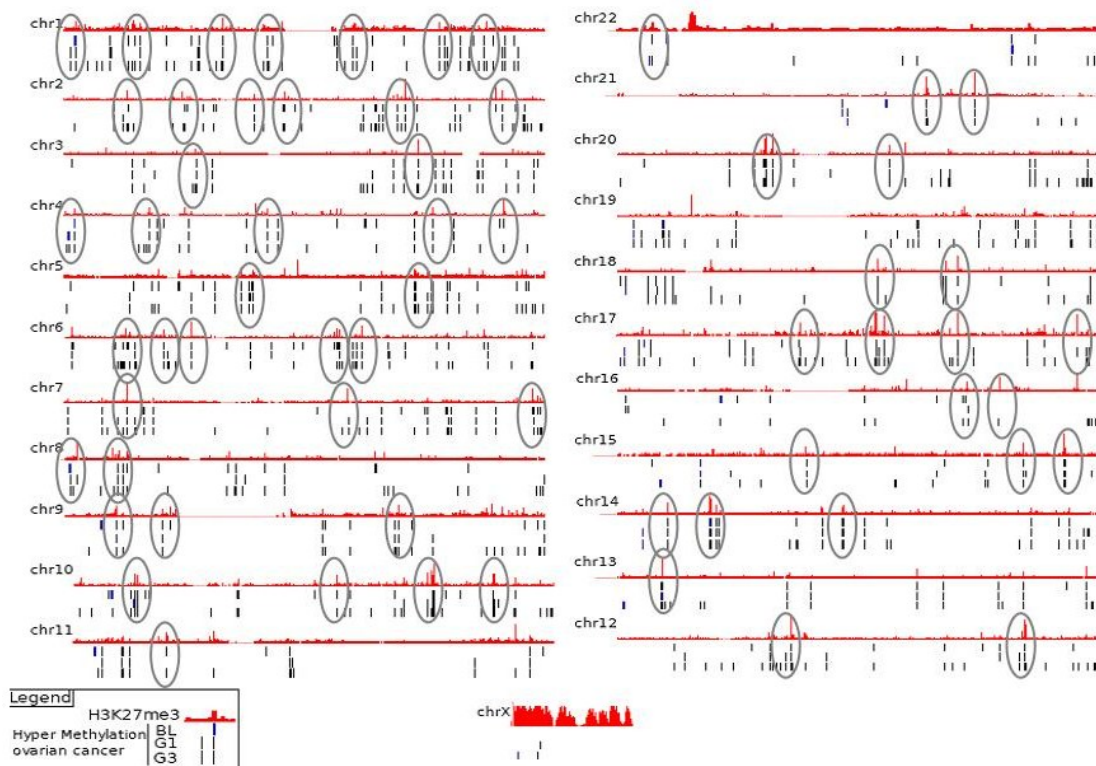
<sup>b</sup>Genes indicated in bold represent tumorigenesis-associated genes that are hypomethylated uniquely in G3;SI serous EOC tumors.

<sup>c,d,e</sup>Genes implicated in EOC <sup>c</sup>tumorigenesis, <sup>d</sup>metastasis, and <sup>e</sup>chemoresistance.

### 2.3.10. SUPPLEMENTAL FIGURES



**Supplemental figure 2.5. BSP analysis of the methylation status of selected homeobox genes in G3;SIII/IV serous EOC tumors compared to normal tissue samples.** Filled circles represent methylated CpGs and open circles represent unmethylated CpGs. CpG plots of the analyzed regions are also presented (CpGs are displayed with vertical marks). The indicated positions on the CpG plots represent the number of nucleotides stretching upstream (+) and downstream (-) of the first exon for each gene analyzed. N - normal ovarian tissue; T - serous adenocarcinoma tumors.



**Supplemental figure 2.6 Schematic presentation of the chromosomal distribution of the DNA hypermethylated sites identified in all serous EOC tumor subtypes by our MeDIP-array experiments, and the localization of the H3K27me3 repressive marks in human ES cells.** Results were generated using and co-displaying our significant hypermethylation events with H3K27me3 ChIP-seq results in ES cells. Using also the Genomic Regions Enrichment of Annotations Tool (GREAT) with the default options “basal plus extension”, we obtained significant overlap of the hypermethylated regions identified for the BL, G1;SIII/IV, G3;S1 and G3:SIII/IV serous EOC tumors with the H3K27me3 marks in ES cells, identified by the Weinberg’s group (Ben-Porath et al. Nat Genet 2008;40: 499-507). Regions where perfect overlap between BL, G1 and G3 and the ES H3K27me3 histone mark was observed were highlighted.

### **3. The RUNX1 transcription factor is expressed in serous epithelial ovarian carcinoma and contributes to cell proliferation, migration and invasion**

(Article publié dans Cell Cycle, Février 2013, volume 26, numéro 12, pages: 972-86)  
(PMID: 23442798)

### 3.1 Mise en contexte et objectifs de l'article et contributions des auteurs

L'un des problèmes majeurs liés au cancer de l'ovaire est l'absence des moyens de diagnostic précoce adéquat et la prédominance clinique de la forme métastatique. Le mauvais pronostic associé à cette pathologie est dû au fait que les patientes se présentent avec une phase avancée de la maladie associée ou non à une chimiorésistance. La récente percée technologique obtenue grâce à l'utilisation de la technologie des micropuces à ADN a ouvert la porte aux diagnostics moléculaires. Dans le chapitre précédent, nous avons démontré que les cellules primaires post-chimiothérapiques comparativement aux cellules primaires pré-chimiothérapeutiques possédaient une signature moléculaire caractérisée par un profil d'hypométhylation prédominant de gènes associés à la prolifération, la survie et l'invasion. Parmi les gènes hypométhylés et surexprimés dans les cellules chimiorésistantes, nous avons identifié *RUNXI* (runt-related transcription factor1). *RUNXI* est un facteur clé de l'hématopoïèse définitive durant le développement. En plus de son rôle dans le développement, *RUNXI* est impliqué dans plusieurs maladies, dont le cancer. Plusieurs études ont montré que *RUNXI* peut opérer comme oncogène ou gène suppresseur de tumeur dépendamment du type de cancer et du contexte génétique cellulaire. Cependant, l'implication de *RUNXI* dans le cancer épithéliale de l'ovaire n'est pas assez connue. Par conséquent, il est important d'investiguer si l'expression de *RUNXI* est régulée de façon épigénétique par hypométhylation de *RUNXI* dans le cancer épithéliale avancé de l'ovaire et si cette expression contribue à la progression tumorale et la réponse au traitement.

Pour cet article, neuf auteurs ont été mis à contribution. Magdalena Bachvarova, assistante de recherche de notre laboratoire était particulièrement impliquée dans la collecte, le stockage et l'archivage des tissus ovariens dans la banque de tumeur. En plus, elle a fait

l'évaluation de la qualité et de la quantité de chaque ARNs clones utilisés ainsi que leur hybridation sur les micropuces pour l'expression génique. Marie Plante, Jean Gregoire et Marie-Claude Renaud ont été impliqués dans le recrutement des différentes patientes des cohortes. Chantal Morin a effectué la lecture et l'évaluation des micropuces d'immunohistochimie. Xuan Bich Trinh a réalisé le design des tissus à micropuce et les tests statistiques associés aux taux de survie en fonction du niveau d'expression protéique. Dimcho Bachvarov est le principal investigateur de cette étude. Il a été fortement impliqué dans le design, les hybridations des micropuces et la rédaction de l'article. Pour ma part. Pour cet article, j'ai validé le statut de méthylation de *RUNXI* par BSP et réalisé la construction des micropuces à tissus et les tests d'immunohistochimie. J'ai établis le clone sous-exprimant *RUNXI* ainsi que la réalisation des études fonctionnelles. Finalement, j'ai assisté Dr Bachvarov dans la conception et la rédaction de l'article.

### 3.2. Résumé en français

Les bases moléculaires de l'initiation et de la progression ainsi que les mécanismes liés à la chimiorésistance du cancer ovarien épithélial (COE) sont encore mal connus. L'un des mécanismes essentiels à la pathogénie dans le cancer est l'activation des oncogènes, fréquemment due à l'hypométhylation du promoteur. Dans ce contexte, nous avons utilisé une approche épigénomique pour identifier des gènes hypométhylés dans les cellules primaires pré- et post-chimiothérapeutiques provenant d'ascites de patientes atteintes du CEO. Nous avons identifié plusieurs cibles hypométhylées qui pourraient jouer un rôle fonctionnel dans la survie, la prolifération et l'invasion des cellules tumorales. Parmi ces gènes, nous avons identifié le gène *RUNXI* comme hypométhylé et surexprimé dans les cultures primaires post-chimiothérapeutiques en comparaison avec les cultures primaires pré-chimiothérapeutiques correspondants. Dans cette étude nous avons montré une tendance à l'hypométhylation de *RUNXI* dans les tumeurs d'épiploon métastatiques par rapport aux tumeurs primaires du CEO, bien qu'elle ne soit pas significative. Cependant, *RUNXI* est significativement plus exprimé, non seulement dans les tissus métastatiques, mais aussi dans les tumeurs primaires de haut grade ainsi que dans les tumeurs à faible potentiel de malignité. Les niveaux d'expression de *RUNXI* étaient presque identiques dans les tumeurs primaires et celles métastatiques, suggérant que l'hypométhylation de *RUNXI* pourrait avoir un impact limité sur sa surexpression au stade avancé de la maladie (métastatique). La suppression de l'expression de *RUNXI* dans les cellules CEO conduit à une forte diminution de la prolifération cellulaire et à l'arrêt du cycle cellulaire en G1. En outre, la suppression de *RUNXI* inhibe significativement l'invasion et la migration cellulaire. Ces différents phénotypes cellulaires ont été confirmés par le profilage



d'expression génique. Ainsi de nombreux gènes et voies de signalisation connus précédemment comme étant impliqués dans la tumorigénèse ovarienne, y compris l'invasion tumorale et la métastase sont réprimés, alors qu'un certain nombre de gènes pro-apoptotiques et certains gènes suppresseurs du CEO ont été induits. Nos résultats suggèrent que le gène *RUNXI* est un oncogène potentiel de la progression du CEO et pourrait être une nouvelle cible thérapeutique du CEO. D'autres études sont nécessaires pour élucider davantage les implications fonctionnelles de *RUNXI* et d'autres membres de la famille des gènes *RUNX* dans la tumorigénèse ovarienne.



# The RUNX1 transcription factor is expressed in serous epithelial ovarian carcinoma and contributes to cell proliferation, migration and invasion

Mamadou Keita<sup>1,2</sup>, Magdalena Bachvarova<sup>2</sup>, Chantale Morin<sup>2</sup>, Marie Plante<sup>2,3</sup>, Jean Gregoire<sup>2,3</sup>, Marie-Claude Renaud<sup>2,3</sup>, Alexandra Sebastianelli<sup>2,3</sup>, Xuan Bich Trinh<sup>2,4</sup>, and Dimcho Bachvarov<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Molecular Medicine, Laval University, Québec (Québec), Canada

<sup>2</sup>Centre de recherche du CHU de Québec, L'Hôtel-Dieu de Québec, Québec (Québec), Canada

<sup>3</sup>Department of Obstetrics and Gynecology, Laval University, Québec (Québec), Canada

<sup>4</sup>Department of Gynecological Oncology, Antwerp University Hospital, Antwerp, Belgium

\* Corresponding author:

Centre de recherche du CHU de Québec, L'Hôtel-Dieu de Québec

9 rue McMahon, Québec (Québec) Canada G1R 2J6

Tel.: (418) 525-4444, ext. 15590

Fax: (418) 691-5439

Email: [dimtcho.batchvarov@crhdq.ulaval.ca](mailto:dimtcho.batchvarov@crhdq.ulaval.ca)

**Keywords:** RUNX1, ovarian cancer; DNA hypomethylation; cell proliferation, G1 cell cycle arrest, cell migration, cell invasion, metastasis, global gene expression Agilent Whole Human Genome microarray

**Abbreviations:** EOC, epithelial ovarian cancer; IHC, immunohistochemistry; CT, chemotherapy; LMP, low malignant potential; PFS, progression-free survival; IPA, Ingenuity Pathway Analysis; TMA, tissue microarray; sh-RNA, Short hairpin RNA; BSP, bisulfite sequencing PCR; sqRT-PCR, semi-quantitative reverse transcriptase-PCR.

### **3.3.1. ABSTRACT**

Previously, we have identified the RUNX1 gene as hypomethylated and overexpressed in post-chemotherapy (CT) primary cultures derived from epithelial ovarian cancer (EOC) patients, when compared to primary cultures derived from matched primary (prior to CT) tumors. Here we show that RUNX1 displays a trend of hypomethylation, although not significant, in omental metastases, compared to primary EOC tumors. Surprisingly, RUNX1 displayed significantly higher expression not only in metastatic tissue, but also in high-grade primary tumors and even in low malignant potential tumors. The RUNX1 expression levels were almost identical in primary tumors and omental metastases, suggesting that RUNX1 hypomethylation might have a limited impact on its overexpression in advanced (metastatic) stage of the disease.

Knockdown of the RUNX1 expression in EOC cells led to sharp decrease of cell proliferation and induced G1 cell cycle arrest. Moreover, RUNX1 suppression significantly inhibited EOC cell migration and invasion. Gene expression profiling and consecutive network and pathway analyses confirmed these findings, as numerous genes and pathways known previously to be implicated in ovarian tumorigenesis, including EOC tumor invasion and metastasis, were found to be downregulated upon RUNX1 suppression, while a number of pro-apoptotic genes and some EOC tumor suppressor genes were induced.

Taken together, our data are indicative for a strong oncogenic potential of the RUNX1 gene in EOC progression and suggest that RUNX1 might be a novel EOC therapeutic target. Further studies are needed to more completely elucidate the functional implications of RUNX1 and other members of the RUNX gene family in ovarian tumorigenesis.

### 3.3.2. INTRODUCTION

Epithelial ovarian cancer (EOC) accounts for 4% of all cancers in women and is the leading cause of death from gynecologic malignancies<sup>1</sup>. Despite treatment improvements, long-term survival rates for patients with advanced disease remain disappointing<sup>2</sup>. The molecular basis of EOC initiation and progression is still poorly understood<sup>3</sup>, as experimental models of ovarian cancer lack disease specificity<sup>4</sup>. To establish novel therapeutic and diagnostic strategies against this deadly disease, it is essential to understand its molecular pathology.

Disruption of normal gene regulation is important for carcinogenesis resulting in loss, or gain of genetic function. Recently, the importance of epigenetic perturbation of gene regulation in cancer<sup>5</sup>, including EOC<sup>6</sup>, has begun to be more fully appreciated. The most studied epigenetic alteration is DNA methylation, the addition of a methyl moiety to the cytosine-5 position within the context of a CpG dinucleotide, mediated by DNA methyltransferases<sup>5</sup>. DNA methylation patterns are reset early in the embryogenesis and reestablished early during development. After that, they are thought to be relatively stable. In cancer, the physiological regulation of DNA methylation is disrupted leading to drastic changes of the distribution pattern of 5-methylcytosine. The heavy methylation found in the bulk of chromatin is reduced, while the normally unmethylated CpG islands located in the promoter and first exon of genes become hypermethylated. Promoter hypermethylation often leads to inactivation of different tumor-suppressing genes and is associated with many important pathways involved in cancer, such as DNA repair, cell cycle regulation, apoptosis, carcinogen metabolism, hormonal response, and cell adherence<sup>7</sup>. Aberrant DNA methylation is also involved in the development of resistance to chemotherapy (CT)<sup>8</sup>. The role of DNA hypomethylation in carcinogenesis is less studied. Recent studies have

demonstrated that global decrease in the level of DNA methylation is related to hypomethylation of repeated sequences, increase in genetic instability, as well as re-activation of proto-oncogenes and pro-metastasis genes<sup>9</sup>.

Similar to other malignancies, aberrant DNA methylation, including global hypomethylation of heterochromatin and local CpG island methylation, occurs in EOC and contributes to ovarian tumorigenesis and mechanisms of chemoresistance<sup>6</sup>. Applying a more global array-based technology, several studies have demonstrated that DNA methylation changes in ovarian cancer are cumulative with disease progression and CT resistance<sup>10-12</sup>. Using a similar approach (methylated DNA immunoprecipitation coupled to CpG island tiling arrays) we have recently shown that DNA hypermethylation occurs in less invasive/early stages of ovarian tumorigenesis, while advanced disease was associated with DNA hypomethylation of a number of oncogenes, implicated in cancer progression, invasion/metastasis and probably chemoresistance<sup>13</sup>. This observation was further confirmed when comparing the DNA methylation profiles of primary cell cultures derived from matched tumor samples obtained prior to, and following CT treatment from two serous EOC patients with advanced disease. The runt-related transcription factor 1 (RUNX1) was among the genes identified to be notably hypomethylated and overexpressed in the post-CT primary cultures.

The RUNX1 gene belongs to the RUNX gene family which encodes transcription factors (including RUNX2 and RUNX3) that bind DNA as components of the core-binding factor (CBF) complex, in partnership with the CBF $\beta$  cofactor<sup>14</sup>. This complex activates and represses transcription of key regulators of growth, survival and differentiation pathways<sup>15-17</sup>. RUNX1 is essential for definitive hematopoiesis, megakaryocyte maturation, T- and B-cell lineages and neuronal development<sup>18</sup>. The prosurvival activity of RUNX1 is mediated

by transcriptional regulation of enzymes involved in sphingolipid metabolism which may reduce intracellular long-chain ceramides with elevation of extracellular sphingosine 1 phosphate<sup>19</sup>. RUNX1 also suppresses the onset of apoptosis in response to exogenous tumor necrosis factor  $\alpha$  by opposing to activation of c-Jun-NH<sub>2</sub>-kinase and p38<sup>MAPK</sup>, keys mediators of ceramides-induced death<sup>19</sup>.

The importance of RUNX1 in hematopoiesis and its tumor suppressor function in leukemia are well established<sup>20</sup>, although RUNX1 gene amplifications and gain-of-RUNX1 function mutations have been postulated to have leukemogenic effects<sup>21, 22</sup>. Similarly, recent studies in solid tumors present contrasting roles of RUNX1 as either tumor suppressor or oncogene (reviewed in <sup>20</sup>). The implication of RUNX1 in EOC tumorigenesis is currently unknown, although it was shown that in conjunction with some matrix metalloproteinases (MMP-2 and -9), RUNX1 could contribute to the invasive stage of endometrial and ovarian endometrioid carcinomas<sup>23</sup>.

This prompted us to further investigate if RUNX1 expression is epigenetically modulated (due to DNA hypomethylation) in advanced EOC and whether the RUNX1 gene is functionally implicated in EOC tumorigenesis, including disease progression and response to treatment.

### **3.3.3. RESULTS**

#### **3.3.3.1 RUNX1 gene exhibits specific hypomethylation in serous EOC omental metastases, compared to primary serous EOC tumors**

Previously, we have identified the RUNX1 gene as hypomethylated and overexpressed in post-CT primary cell cultures, derived from two serous EOC patients, when compared to matched primary cultures, obtained prior to CT. RUNX1 has two promoters driving the expression of 3 isoforms: the distal promoter P1 and the proximal promoter P2<sup>20</sup>. P1 controls the longest isoform RUNX1c. RUNX1a is the shortest and RUNX1b the most expressed form, and the proximal P2 promoter drives expression of both of them (Supplemental Figure 1). Here, we have further validated the RUNX1 methylation status in primary tumors and omental metastases. BSP analysis was performed targeting a 419 bp DNA fragment of the proximal promoter (P2) region of RUNX1 gene, stretching between nt -2475 to -2056 upstream of its first exon, and containing 13 putative CpG methylation targets (Figure 1; see also Supplemental Figure 1 for RUNX1 gene structure in relation to these CpG sites). As seen in Figure 1, the BSP analysis displayed a trend of hypomethylation of some of these targets in metastatic tissues, compared to primary EOC tumors, although the difference in methylation was not significant. No differences were observed when comparing RUNX1 methylation status between primary EOC tumors and normal ovarian tissue samples (data not shown).



### **3.3.3.2 Analysis of RUNX1 expression in serous EOC tumors by immunohistochemistry (IHC)**

We further evaluated RUNX1 protein expression by IHC in serous EOC tumors and ovarian normal tissue samples, using tissue microarrays (TMAs). Our TMAs included triplicate cores of 117 serous EOC tumors, including 13 low-malignant potential (LMP) tumors, 52 high-grade tumors and 52 omental metastases. Thirteen normal ovarian tissue samples were also included as controls. Table 1 shows the major clinical characteristics of these patients for whom extensive follow-up clinical data (up to 5-years) were available. The age ranged from 41 to 83 years (median: 64 years). High-grade tumors were mainly grade 3 (99%) and stage III (80%). The majority of patients (87%) received a combination of platinum and taxol. The median baseline CA125 was around 800 U/ml. Forty three percent of the patients had a progression or a recurrence within the first 6 months of follow-up; for 35.4 % of the patients the progression-free survival (PFS) interval was in the range of 7 to 24 months, and 21.2% of the patients displayed PFS values higher than 25 months (Table 1).

Surprisingly, RUNX1 displayed significantly higher expression not only in metastatic tissue, but also in LMP and high-grade primary tumors, when compared to normal tissue, as the expression levels were almost identical between the primary tumors and omental metastases (Figure 2). These findings indicate that the hypomethylation of some of the CpG targets might have a limited, if any, impact on its expression in advanced (metastatic) stage of the disease. Kaplan–Meier survival curves based on RUNX1 expression analyses in cohort of 52 high-grade serous ovarian adenocarcinoma patients displayed no association with PFS (data not shown).

### **3.3.3.3 Phenotype analysis of RUNX1 suppression in EOC cells: possible implications in EOC cell proliferation, cell cycle control, migration and invasion**

Next, we decided to verify if short hairpin RNA (shRNA)-mediated RUNX1 gene knockdown could produce any cancer-related phenotypic changes in EOC cells. We tested several EOC cell lines for endogenous RUNX1 expression by sqRT-PCR and Western analysis (data not shown). Among these, the SKOV3 cell line displayed strong RUNX1 expression and was further used to generate stably transfected shRNA-RUNX1 clones. Clone selection for further analyses was based on sqRT-PCR and Western blot validation of the RUNX1 gene/protein expression in selected clones, compared with empty vector-transfected clones. Among the clones analyzed, the shRNA-RUNX1 knockdown clone sh-cl4 displayed a significant decrease of RUNX1 expression levels compared to the mock-transfected control (see Figure 3) and was selected for further analyses.

We investigated the impact of RUNX1 gene suppression on SKOV3 cell proliferation, cell cycle control, migration, invasion and sensitivity to cisplatin and paclitaxel (drugs, conventionally used for first-line EOC CT). The RUNX1 gene knockdown led to sharp decrease of the number of viable adherent cells (represented by cell index), compared to control cells (Figure 4A). This observation was further supported by the colony formation assay showing that the numbers of clones formed by cells with stably reduced RUNX1 expression were significantly lower than that of control cells (Figure 4B). Taken together, our observations strongly indicate an influence of RUNX1 transcripts on EOC cell proliferation and further on their propensity to form colonies. Moreover, when compared with control clones, the shRNA-RUNX1 clone exhibited a significant accumulation of cells in the G1 phase, with a corresponding reduction of cells in the S and G2/M phases at 0, 3,

6, 9 and 24 hours after removing hydroxyurea (Figure 4C). These data indicate that RUNX1 depletion induces G1 arrest and thus explain the drastic reduction in the proliferation rates of these cells observed earlier.

Additionally, RUNX1 suppression significantly inhibited both migration and invasion of SKOV3 cells. As shown in Figure 5A and 5B, the numbers of SKOV3 cells that passed through the filter using the sh-cl4 clone were remarkably less than that in the negative control (ctrl3) clone, which is indicative for a role for RUNX1 in the regulation of invasion and migration in EOC.

Finally, RUNX1 suppression had no significant impact on SKOV3 cisplatin and paclitaxel sensitivity (data not shown).

#### **3.3.3.4 Molecular mechanisms of RUNX1 action in EOC cells**

To better understand the molecular mechanisms of RUNX1 action in EOC cells, we employed the Agilent Whole Human Genome microarrays, containing ~ 44,000 genes to identify global gene expression changes upon RUNX1 suppression in SKOV3 cells. We compared the gene expression of the previously selected clones shRNA- RUNX1 (sh-cl4) against the corresponding control clone (ctrl3). All microarray experiments were performed in duplicates, as two hybridizations were carried out for the RUNX1-suppressing cell clone against the corresponding control, using a fluorescent dye reversal (dye-swap) technique. For each comparison, a subset of differentially expressed genes was selected displaying at least 2-fold difference in both duplicate microarray experiments. Using these selection criteria, we found 334 genes to be upregulated and 607 genes to be downregulated in SKOV3 cells following RUNX1 knockdown, as the RUNX1 gene displayed 3.48-fold

suppression in the shRNA-RUNX1 (sh-cl4) clone, compared to the corresponding control (Supplemental Table 1). In order to investigate if some the differentially expressed genes represent RUNX1 direct target genes, we searched for human RUNX1 binding sites using the oPOSSUM software (<http://www.cisreg.ca/cgi-bin/oPOSSUM/opussum>)<sup>24</sup>. We found that almost half of both upregulated genes (140/334) and downregulated genes (282/607) contained at least one conserved RUNX1 binding site in their regulatory regions (see Supplemental Table 1 for details). Table 2 shows a list of selected functionally related groups of genes that were differentially expressed ( $\geq 2$ -fold) in SKOV3 cells upon RUNX1 knockdown. As seen from Table 2, genes with previously shown implication in mechanisms of cell growth & proliferation, cell adhesion, regulation of transcription, metabolism and transport were predominantly suppressed, while RUNX1 knockdown was associated with the induction of apoptosis-related genes. Comparable numbers of genes, functionally related to cell cycle control and signal transduction, were equally up- and downregulated following RUNX1 suppression. Supplemental Table 1 shows the complete list of the differentially expressed genes ( $\geq 2$ -fold) following RUNX1 knockdown in SKOV3 cells.

Pathway and network analyses, generated through the use of the IPA software confirmed the major functionally related gene groups, found to be differentially expressed in the shRNA-RUNX1 clone. As seen from Figure 6, similar pathways were both induced and suppressed upon RUNX1 knockdown: these included pathways functionally related to cellular movement, cellular growth & proliferation, cell-to-cell signaling and interaction and carbohydrate metabolism. Pathways implicated in cell death and survival, cell signaling and cellular development were upregulated (Figure 6A), while linked to cellular assembly

and organization, cellular function and maintenance, cell cycle, lipid metabolism, molecular transport and gene expression were mostly suppressed (Figure 6B).

Common networks obtained upon merging the five top-scoring networks recognized some important nodes that are specifically up- or downregulated upon RUNX1 suppression in SKOV3 cells (Figure 7). Thus, major nodes and associated interaction partners that were upregulated upon RUNX1 knockdown (displayed on Figure 7A) comprised genes implicated in signal transduction (ADM, DCN, FGF2, SFN, TGF beta), cell adhesion (CD34, CXCL3), cell-to-cell signaling (GJA1), cell cycle control (CCNA1, CCNB1, GADD45A), gene expression (ATF3; members of the RNA polymerase II network), immune response (IL1 network, including IL1A) and cytoskeleton formation (KRT5, cytokeratin). Gene nodes that were downregulated upon RUNX1 knockdown in SKOV3 cells are presented in Figure 7B; these were mostly involved in signal transduction (AR, BMP4, BMP6, BMP7, FGFR2, FGFR3, Notch, NOTCH3, WNT3A, WNT5A, members of the AKT network), regulation of transcription (DLX5, HOXA10, ID2, LEF1, MEIS1, SNAI1), cell growth and/or maintenance (collagen, SPARC), metabolism (MMP1, MMP7) and cell adhesion (CDH1). Interestingly, the majority of the up- and down-regulated gene nodes listed above (including ADM, DCN, FGF2, TGF beta, CD34, GADD45A, ATF3, IL1A, BMP4, BMP6, BMP7, FGFR3, WNT5A, DLX5, ID2, LEF1, MEIS1 and SPARC) represent RUNX1 direct target genes (see Supplemental Table 1).

### **3.3.3.5 Validation of microarray findings with semi-quantitative RT-PCR (sqRT-PCR).**

To validate microarray results, we arbitrarily selected 9 differentially expressed genes and quantified their expression by sqRT-PCR in SKOV3 cells following shRNA-RUNX1 knockdown compared to control (vehicle transfected) SKOV3 cells. Table 3 summarizes the gene expression measurements of all validated genes. We found that both methods (microarray analysis and sqRT-PCR) detected similar patterns for the up- and down-regulated genes selected for validation.

### 3.3.4. DISCUSSION

As previously demonstrated, the RUNX1 protein can activate or repress target gene expression depending on whether it interacts with co-activator or corepressor and as a consequence it has displayed both oncogenic and tumor-suppressive functions in different cancer types<sup>20</sup>. Thus, RUNX1 overexpression displays context-specific effects, inducing growth arrest or senescence in most primary cell types, but promoting proliferation and/or survival in cells expressing collaborating oncogenes or mutated tumor suppressor pathways<sup>25-28</sup>. The dysfunction of RUNX1 is strongly correlated to hematological disorders. Indeed RUNX1, also known as AML1 (acute myeloid leukemia-1), has long been recognized as an important translocation breakpoint in human leukemias, with the TEL-AML1 t (12;21) fusion accounting for 20% of acute lymphoblastic leukemia (ALL) cases, and the AML1-ETO t (8;21) fusion accounting for 12% of AMLs<sup>17</sup>. RUNX1 is also frequently mutated in AML and myelodysplastic syndrome<sup>25, 29, 30</sup>, suggesting a tumor suppressor role of this gene in these malignancies. However, oncogenic functions for RUNX1 are also demonstrated, since RUNX1 amplification is associated with some cases of childhood acute ALL, as well as with Down's syndrome-related acute megakaryoblastic leukemia<sup>31</sup> and RUNX1 positively modulates myeloid leukemogenesis in animal models<sup>32</sup>. Similarly, potential RUNX1 tumor suppressor role in breast, intestinal and esophagus cancer<sup>33-36</sup>; however, RUNX1 overexpression has been associated with development of invasive/metastatic endometrial carcinoma<sup>37, 38</sup>, and a recent study was indicative for the role of RUNX1 in driving cancer stem cell proliferation and promoting carcinogenesis in epithelial tissues<sup>39</sup>. These data warrant further studies to elucidate the role of RUNX1 in formation and/or progression of human cancers.

Our previous findings, based on analyses in primary cultures, derived from matched tumor samples obtained prior to, and following CT treatment from two serous EOC patients, were suggestive for RUNX1 overexpression in advanced (metastatic) EOC, which might be due to epigenetic mechanisms, associated with DNA hypomethylation of its putative promoter region<sup>13</sup>. Here, we have shown that stretch of DNA sequence, located between nt -2475 to -2056 upstream of the first exon of RUNX1 isoforms 1a and 1b, displays rather limited and non-significant hypomethylation in EOC omental metastases, compared to primary serous EOC tumors, which has probably no impact on RUNX1 expression. Moreover, our IHC analyses were indicative for equally strong RUNX1 protein overexpression both in grade 3 serous EOC tumors and metastatic tissues. However, a recent *in silico* study based on the Cancer Genome Atlas (TCGA) data and focused on the clinical relevance of epigenetic modifications of Notch superfamily genes in high-grade serous EOC, identified a significant inverse relationship between RUNX1 methylation status and its mRNA expression levels<sup>40</sup>. Moreover, patients with a lower RUNX1 methylation level and higher RUNX1 expression level had significantly poorer overall survival, compared to patients with a higher RUNX1 methylation level and lower RUNX1 expression level. Thus, we cannot fully exclude that epigenetic alterations of RUNX1 expression could influence its role in ovarian tumorigenesis. Interestingly, RUNX1 knockdown was associated with downregulation of members of the Notch pathway, including NOTCH3 (see below and Figure 7B).

We have found a significantly higher RUNX1 expression not only in metastatic tissue, but also in high-grade primary tumors and even in LMP tumors, compared to normal ovarian tissue. Normal ovarian tissues controls consistently displayed low RUNX1 expression; minimal expression was also detected in other human adult tissues (data not shown). The



above findings persuaded us to investigate the functional implication of RUNX1 in mechanisms of EOC tumorigenesis. Our functional analyses are strongly indicative for evident oncogenic capacity of RUNX1 in serous EOC, including its potential role in EOC cell proliferation, cell cycle control and cell migration/invasion (see Figs. 5 and 6). Thus, our data confirm recent findings that RUNX1 is required for tumor and cancer cell growth and/or invasion/metastasis, as found for skin, head and neck, prostate, colon & rectal and endometrioid cancers<sup>37, 39, 41, 42</sup>.

To better elucidate the molecular mechanisms and biological pathways implicated in RUNX1-mediated action in EOC cells, we used a complementary gene expression profiling using the DNA microarray technology to monitor cellular changes in gene expression and discover the molecular targets upon RUNX1 suppression in EOC cells. To our knowledge, the present work represents the first effort to define global changes in gene expression upon modulation of RUNX1 gene expression in epithelial cancer cells. The gene expression data and consecutive IPA network and pathway analyses were quite confirmatory of the data obtained by the RUNX1 functional assays. Indeed, microarray data sustained RUNX1 correlation with EOC cell proliferation (including cell cycle control), migration and invasion, since RUNX1 knockdown resulted in reduced of genes associated with cell proliferation, cell migration and cell invasion and cell cycle control, while inducing some pro-apoptotic genes (see Table 2 and Figure 6).

IPA network analysis was indicative for some important gene nodes linked to RUNX1 suppression in EOC cells, as most of these substantiate and/or complement the functional data obtained. Thus, RUNX1 knockdown resulted in upregulation of gene nodes known to be implicated in apoptosis induction (ATF3, CCNA1, CCNB1, GADD45A, IL1A, TGF beta)<sup>43-50</sup>, or suppressing cell cycle progression and survival (CD55, SFN)<sup>51-54</sup>; as well as

gene nodes linked to suppression of cell invasion and/or metastasis (ADM, CXCL3, DCN, FGF2, GJA1)<sup>55-59</sup> or increasing cell adhesion (CD34)<sup>60</sup> (see Figure 7A). Among these, CCNA1, DCN, GADD45A and SFN have been previously recognized as potential EOC tumor suppressor genes<sup>61-64</sup>, while increased expression of ADM and ATF in EOC tumors was associated with positive disease outcome<sup>65</sup> and decreased tumor invasion<sup>66</sup>. The CCNB1 was found to be downregulated in advanced EOC<sup>67</sup>, and GJA1 inhibition was shown to promote EOC drug resistance<sup>68</sup>. The TGF beta gene and related pathway displays a dual role in EOC, both promoting and inhibiting tumorigenesis<sup>69</sup>.

In parallel, upon RUNX1 knockdown, we have observed a predominant and strong downregulation of major gene nodes (including AR, BMP4, BMP6, BMP7, CDH1, DLX5, FGFR2, FGFR3, HOXA10, ID2, LEF1, MEIS1, MMP1, MMP7, members of the Notch pathway including NOTCH3, SNAI1, SPARC, WNT3A, WNT5A) with proven functional implication in EOC cellular growth and proliferation, migration, invasion, and metastasis (see Figure 7B). All these gene nodes are also known to be implicated in EOC tumorigenesis (BMP4, BMP6, BMP7, CDH1, LEF1, MEIS1, NOTCH3, WNT3A, WNT5A)<sup>70-74</sup>, including disease progression (AR, FGFR2, FGFR3, DLX5, HOXA10)<sup>75-78</sup> and EOC tumor invasion/metastasis (ID2, MPP1, MPP7, SNAI1, SPARK)<sup>79-82</sup> (see Figure 7B). Our data confirm previous findings for the possible implication of RUNX1 in metalloproteinase-mediated invasion and metastasis in gynecological cancers<sup>23</sup>. Additionally, RUNX1 suppression was associated with downregulation of numerous genes from the AKT pathway (see Figure 7B), representing one of the major oncogenic pathways implicated in EOC etiology<sup>83</sup>. Thus, our findings support the concept of oncogenic functionality of RUNX1 in EOC carcinogenesis. Given that all three RUNX proteins recognize common DNA sequence motifs, it would be important to investigate what is the

role of the other members of the RUNX gene family in EOC cancer formation and progression. Similarly to RUNX1, the RUNX2 gene was also identified as hypomethylated and overexpressed in post-CT EOC primary cultures compared to matched primary cultures derived prior to CT<sup>13</sup>, and its role in EOC progression is currently under investigation. Moreover, RUNX2 was recently associated with advanced EOC progression and poor disease prognosis<sup>84</sup>. As for the RUNX3 gene, the current literature data are rather contradictory, since RUNX3 has been initially recognized as EOC tumor suppressor gene which is downregulated in EOC tumors due to DNA hypermethylation<sup>85</sup>; however, novel findings are indicative for RUNX3 overexpression and oncogenic function in ovarian carcinoma<sup>86</sup>.

In conclusion, we have shown that the RUNX1 transcription factor is significantly overexpressed in serous EOC tumors, including LMP tumors, compared to normal ovarian tissue. BSP validation of the RUNX1 methylation status in primary EOC tumors and omental metastasis was mostly indicative for limited, or no implication of epigenetics mechanisms (DNA hypomethylation) in RUNX1 overexpression in metastatic tissues. Consecutive functional analyses of RUNX1 in EOC cells pointed towards its association with EOC cell proliferation (including cell cycle control), migration and invasion. Gene expression profiling and consecutive network and pathway analyses confirmed these findings, as numerous genes and pathways known previously to be implicated in ovarian tumorigenesis, including EOC tumor invasion and metastasis, were found to be suppressed upon RUNX1 knockdown, while a number of pro-apoptotic genes and some EOC tumor suppressor genes were found to be induced. Hence, RUNX1 is possibly required for EOC tumor and cancer cell growth and invasion and could represent a potential EOC therapeutic target. Further *in vitro* and *in vivo* studies, including also the other RUNX genes, are

warranted to more completely elucidate the functional implications of the RUNX transcription factors in ovarian tumorigenesis.

### **3.3.5. PATIENTS AND METHODS**

#### **3.3.5.1 Patients and Tissue specimens**

Snap frozen and formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tissues of 117 serous EOC tumors were obtained at the Hotel-Dieu de Quebec Hospital, Quebec, Canada. These included 13 borderline, or low-malignant potential (LMP) tumors, 52 high-grade adenocarcinomas and 52 omental metastases. None of the patients received chemotherapy before surgery (see Table 1 for detailed clinicopathological characteristics). All tumors were histologically classified according to the criteria defined by the World Health Organization<sup>87</sup>. The CT treatment was completed for all patients and the response to treatment was known. Disease progression was evaluated following the guidelines of the Gynecology Cancer Intergroup<sup>87</sup>. Progression free survival (PFS) was defined as the time from surgery to the first observation of disease progression, recurrence or death. Thirteen normal ovarian samples were derived from women subjected to hysterectomy with oophorectomy due to non-ovarian pathologies. The study was approved by the Clinical Research Ethics Committee of the Hotel-Dieu de Quebec Hospital and all patients signed an informed consent for voluntary participation.

#### **3.3.5.2 Cell cultures**

The EOC cell lines OVCAR3, SKOV3 and C13 were purchased from American Tissue Type Collection (Manassas, VA); OV-90, OV2008, TOV-112 and TOV-21 cell lines were a kind gift from Dr. Anne-Marie Mes-Masson (Montreal University), while A2780s and A2780cp cell lines were a kind gift from Dr. Benjamin Tsang (Ottawa University). The cell

lines were passaged in different culture media supplemented with 10% fetal bovine serum, as described previously<sup>88</sup>.

### **3.3.5.3 Bisulfite sequencing PCR (BSP) analysis**

BSP analysis was performed, as previously described<sup>89</sup>. Briefly, genomic DNAs from primary and metastatic EOC tumor specimens were isolated using the Qiagen DNeasy Blood and Tissue Kit. Bisulfite modification of genomic DNAs was done using the Methyl Detector kit (Active Motif, Carlsbad, CA). For BSP, a 419-bp fragment was amplified using primer pairs specific for bisulfite-modified sequences but not harboring CpGs, located at nt -2475 (AATTTGATTTTTTTTTGGGAGA) to nt -2056 (TCCACTTTCTAACTCTATCCCTAAA) upstream of the RUNX1 transcription start (ATG) codon. BSP primer selection was performed using the Methyl Primer Express Software v1.0 (Applied Biosystems). PCR was done for 35 cycles (94°C, 30 s; 60°C, 50 s; 72°C, 1 min). PCR products were sent for dideoxy-sequencing analysis at the Genomics Analysis Platform at Laval University (<http://www.bioinfo.ulaval.ca/seq/en/>).

### **3.3.5.4 Tissue microarrays (TMAs) construction and IHC**

TMAs were constructed, as previously described<sup>90</sup>. Briefly, one representative block of each ovarian tumor and normal ovarian tissue was selected for the preparation of the tissue arrays. Three 0.6 mm cores of tumor were taken from each tumor block and placed, 0.4 mm apart, on a recipient paraffin block using a commercial tissue arrayer (Beecher Instruments, Sun Prairie, WI). The cores were randomly placed on one of two recipient blocks to avoid IHC evaluation biases. Four micron thick sections were cut for the hematoxylin-eosin (HE) staining and IHC analyses.

IHC was performed, as previously described<sup>89, 90</sup>. Briefly, 4 µm tissue sections were deparaffinized and then heated in an autoclave for 12 min to retrieve the antigenicity before blocking with endogenous peroxidase. Following treatment with 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 10 min to quench the endogenous peroxidase activity, sections were incubated with anti-RUNX1 antibody (1:100 dilution) (Abnova corporation, Taipei, Taiwan) at room temperature for 2 hours. Sections were then incubated with a biotinylated secondary antibody (Dako, Carpinteria, CA) and then exposed to a streptavidin complex (Dako, Carpinteria, CA). Complete reaction was revealed by 3-3' diaminobenzidine and slides were counterstained with hematoxylin. RUNX1 protein expression was assessed by semiquantitative scoring of the intensity of staining and recorded as absent (0), weak (1+), moderate (2+) or strong (3+). The relationship between RUNX1 expression in serous ovarian carcinomas and normal ovarian tissues was evaluated by the Wilcoxon two-sample test. A significant association was considered when p-value was below 0.05. A Kaplan Meier curve and the log-rank test were performed based on PFS values to test the effect of the intensity of RUNX1 (3, 2 versus 0, 1) on disease progression.

#### **3.3.5.5 Short Hairpin RNA (shRNA) – mediated RUNX1 knockdown in SKOV3 cells**

We used the pSilencer 4.1 puro vector (Ambion, Austin, TX) to construct a plasmid that exogenously expresses RUNX1-specific shRNA (RUNX1 target sequence: AAATGCTACCGCAGCCATGAA), as described<sup>91</sup>. SKOV3 cells were stably transfected with the shRNA-RUNX1 plasmid using the ExGen 500 transfection reagent (Fermentas Canada Inc., Burlington ON) and according to the manufacturer's instructions. Cells were consecutively grown for 2 weeks in selection medium containing 5 µg/mL puromycin (Wisent, Canada) to isolate stable clones. Cells were also mock-transfected with the

pSilencer 4.1 puro vector, and stably transfected clones were isolated as controls. Stable clones with inhibited RUNX1 expression were evaluated and validated by Western blot and semi-quantitative RT-PCR.

### **3.3.5.6 Western Blot Analysis**

Western blot analysis was performed as previously described<sup>89</sup>. Briefly, protein lysates were prepared by resuspending cell pellets in Laemmli sample buffer containing 5%  $\beta$ -mercaptoethanol. Protein lysates were separated by 6 to 12% Tris-glycine gel electrophoresis and transferred onto a polyvinylidene difluoride membrane using a semidry apparatus (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). The membrane was blocked with 5% nonfat dry milk in TBST (20 mmol/L Tris-HCl, 0.5 M NaCl, and 0.1% Tween 20), incubated with the anti-RUNX1 mouse monoclonal antibody (1:200) (Santa Cruz Biotechnology) and anti- $\beta$ -actin antibody (1:5000) (Santa Cruz Biotechnology) at 4°C overnight. After 3 X 15 min washes with TBST (20 mmol/L Tris-HCl, 0.5 M NaCl, and 0.1% Tween 20) at room temperature, the membrane was incubated with horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody and detected with ECL solution (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA).

### **3.3.5.7 Cell proliferation assay using impedance measurement with the xCELLigence system**

Cell proliferation (cell index) was checked by the xCELLigence Real-Time Cell Analyzer (RTCA) instrument according to the instructions of the supplier (Roche Applied Science and ACEA Biosciences). The xCELLigence system consists of four main components: the RTCA analyzer, the RTCA DP station, the RTCA computer with integrated software and



disposable E-plate 16. Cells were seeded in triplicate at  $2 \times 10^4$  cells/well in the E-Plate 16, a specialized 16-well plate used with the RTCA instrument. Each of the 16 wells on the E-Plate 16 contains an integral sensor electrode array so that cells inside each well can be monitored and assayed. Cell growth was monitored for 20 hours.

#### **3.3.5.8 Colony formation assay**

Colony formation assay was performed, as previously described<sup>89</sup>. Briefly, SKOV3 cells were seeded at 500 cells per 60 mm culture dish. After 14 days, the dishes were washed twice in PBS, fixed with cold methanol, stained with Coomassie Blue (Sigma-Aldrich) for 5 min, washed with water and air dried. The number of colonies was determined by imaging with a Multimage™ Cabinet (Alpha Innotech Corporation, San Leandro, CA) and using AlphaEase Fc software.

#### **3.3.5.9 Cell migration and invasion assays**

Cell migration assays were performed in a modified Boyden-chamber assay using a Transwell 2-chamber insert (6.5 mm diameter) separated by a polycarbonate filter of 5  $\mu$ m pores (Costar, Cambridge, MA). shRNA-RUNX1 transfected, control (vehicle-transfected) and intact SKOV3 cells were seeded into the upper chambers in 0.1% FBS containing medium at a density of  $2.5 \times 10^4$  per well, and 600  $\mu$ l of 1% FBS containing medium was placed in the lower chamber as a chemoattractant. After 24 h at 37°C in 5% CO<sub>2</sub>, the cells were fixed with cold methanol and stained with trypan blue solution. Cells on the upper surface of the filter were removed with cotton buds. Migrated cells on the underside of the filter were photographed and counted by phase contrast microscopy, by selecting 10 random fields per filter (at magnification $\times$  40). The experiments were performed in

triplicate. Cell invasion was assayed in a similar way, as the 5- $\mu$ m pore polycarbonate filters were coated with 40  $\mu$ l of Matrigel™ at concentration of 0.5 mg/ml (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ). Here, 600  $\mu$ l of NIH3T3 conditioned medium was added in the lower chamber as a chemoattractant. Differences between shRNA-RUNX1-transfected, vehicle-transfected and intact SKOV3 cells were determined by a Student's t-test, where  $p < 0.05$  was considered significant.

#### **3.3.5.10 Flow cytometry**

For flow cytometer analysis,  $7.5 \times 10^4$  SKOV3 cells were treated with 20 mM hydroxyurea (Sigma) for synchronization at the G1/S boundary. After 16 hours of incubation, cells were washed once with PBS, and resuspended in 1 ml of complete media (time 0). Then, cells were harvested by trypsinization at 0, 3, 6, 9 and 24 h and washed three times with PBS, and fixed with ice-cold 95% ethanol overnight. Cells were washed with PBS (3 x) and incubated with propidium iodide (50  $\mu$ g/ml) (Sigma) in the dark at room temperature for 30 min. Flow cytometric analysis was performed on a Beckman Coulter EPICS XL-MCL analyzer. The cell cycle phase distribution was calculated from the resultant DNA using the cell QuesPro software.

#### **3.3.5.11 MTT (cytotoxicity) assay**

The MTT cell proliferation assay (Sigma, St-Louis, MS, USA) was used to measure the cell growth inhibition effects of cisplatin and paclitaxel in SKOV3 cell clones suppressing RUNX1, as previously described<sup>89</sup>. Briefly, cell suspensions (at  $2 \times 10^4$  cells/ml) were transferred to 96-well plates in triplicates and incubated for 3 days with different drugs' concentrations (ranging between 1 nM and 100  $\mu$ M). Then, 38  $\mu$ l of 3-[4,5-dimethylthiazol-

2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT, 5 mg/ml) was added to each well 4 h before the end of the incubation. After centrifugation and removing the supernatant, 200  $\mu$ L of dimethyl sulphoxide (DMSO) were added to resolve the crystals and the optical density was measured by microplate reader at 595 nm.

### **3.3.5.12 Gene expression profiling and data analysis**

Gene expression analysis was carried out as previously described<sup>88</sup>. Briefly, total RNA was extracted from the shRNA-RUNX1 knockdown clone (sh-cl4) and the corresponding control (mock-transfected) SKOV3 clone (ctrl3). The quality of the RNA samples was examined by capillary electrophoresis using the Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent, Palo Alto, CA). Fluorescently labeled cRNA targets were generated from 0.5  $\mu$ g of total RNA from each corresponding SKOV3 cell clone, using the Fluorescent Linear Amplification Kit (Agilent) and 10.0mM Cyanine 3- or 5-labeled CTP (PerkinElmer, Boston, MA), and following user's manual. Cyanine labeled cRNA from the clone suppressing RUNX1 (sh-cl4) was mixed with the same amount of reverse-color cyanine-labeled cRNA from the corresponding control (ctrl3) clone and hybridized on the Agilent Whole Human Genome microarrays, containing 44,000 genes. Array hybridization, washing, scanning, data extraction and analyses were performed as previously described<sup>88</sup>. Network analysis of the microarray data was completed using the Ingenuity Pathway Analysis (IPA) software (see <http://www.Ingenuity.com>).

### **3.3.5.13 Semi-quantitative duplex RT-PCR (sqRT-PCR)**

Analysis of RUNX1 gene expression in stably transfected RUNX1 knockdown clones (shRNA-RUNX1) and the corresponding mock-transfected SKOV3 clones was performed by sqRT-PCR as previously described<sup>88</sup>. The 18S ribosomal RNA gene was used as an internal standard. Comparative signal intensity was evaluated using the ImageJ software (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>). Primers were designed for these loci with the sequences freely available from the Entrez Nucleotide database and the Primer3 algorithm for primer design ([http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3\\_www.cgi](http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3_www.cgi)).

### **3.3.6. ACKNOWLEDGEMENTS**

This study was sustained by A grant to D.B. from the Cancer Research Society of Canada. Clinical specimens were provided by the Banque de tissus et de données of the Réseau de recherche sur le cancer of the Fonds de recherche du Québec - Santé which is affiliated with the Canadian Tumor Repository Network.

### 3.3.7. REFERENCES

1. Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E. Cancer statistics, 2010. *CA: a cancer journal for clinicians* 2010; 60:277-300.
2. Marchetti C, Pisano C, Facchini G, Bruni GS, Magazzino FP, Losito S, et al. First-line treatment of advanced ovarian cancer: current research and perspectives. *Expert review of anticancer therapy* 2010; 10:47-60.
3. Ricci F, Bernasconi S, Perego P, Ganzinelli M, Russo G, Bono F, et al. Ovarian carcinoma tumor-initiating cells have a mesenchymal phenotype. *Cell cycle* 2012; 11:1966-76.
4. Cho KR. Murine models of ovarian cancer for preclinical testing of targeted therapeutics: has their time arrived? *Cell cycle* 2012; 11:430-1.
5. Jones PA, Baylin SB. The epigenomics of cancer. *Cell* 2007; 128:683-92.
6. Balch C, Fang F, Matei DE, Huang TH, Nephew KP. Minireview: epigenetic changes in ovarian cancer. *Endocrinology* 2009; 150:4003-11.
7. Momparler RL. Cancer epigenetics. *Oncogene* 2003; 22:6479-83.
8. Maier S, Dahlstroem C, Haefliger C, Plum A, Piepenbrock C. Identifying DNA methylation biomarkers of cancer drug response. *American journal of pharmacogenomics : genomics-related research in drug development and clinical practice* 2005; 5:223-32.
9. Szyf M, Pakneshan P, Rabbani SA. DNA demethylation and cancer: therapeutic implications. *Cancer Lett* 2004; 211:133-43.
10. Bauerschlag DO, Ammerpohl O, Brautigam K, Schem C, Lin Q, Weigel MT, et al. Progression-free survival in ovarian cancer is reflected in epigenetic DNA methylation profiles. *Oncology* 2011; 80:12-20.

11. Watts GS, Futscher BW, Holtan N, Degeest K, Domann FE, Rose SL. DNA methylation changes in ovarian cancer are cumulative with disease progression and identify tumor stage. *BMC medical genomics* 2008; 1:47.
12. Li M, Balch C, Montgomery JS, Jeong M, Chung JH, Yan P, et al. Integrated analysis of DNA methylation and gene expression reveals specific signaling pathways associated with platinum resistance in ovarian cancer. *BMC medical genomics* 2009; 2:34.
13. Keita M, Wang Z-Q, Pelletier J-F, Bachvarova M, Plante M, Gregoire J, et al. Global methylation profiling in serous ovarian cancer is indicative for distinct aberrant DNA methylation signatures associated with tumor aggressiveness and disease progression. *Gynecologic oncology* 2012.
14. Huang X, Peng JW, Speck NA, Bushweller JH. Solution structure of core binding factor beta and map of the CBF alpha binding site. *Nature structural biology* 1999; 6:624-7.
15. Wang CQ, Jacob B, Nah GS, Osato M. Runx family genes, niche, and stem cell quiescence. *Blood cells, molecules & diseases* 2010; 44:275-86.
16. Wong WF, Kohu K, Chiba T, Sato T, Satake M. Interplay of transcription factors in T-cell differentiation and function: the role of Runx. *Immunology* 2011; 132:157-64.
17. Chuang LS, Lai SK, Murata-Hori M, Yamada A, Li HY, Gunaratne J, et al. RUNX3 interactome reveals novel centrosomal targeting of RUNX family of transcription factors. *Cell cycle* 2012; 11:1938-47.
18. Okuda T, van Deursen J, Hiebert SW, Grosveld G, Downing JR. AML1, the target of multiple chromosomal translocations in human leukemia, is essential for normal fetal liver hematopoiesis. *Cell* 1996; 84:321-30.

19. Kilbey A, Terry A, Jenkins A, Borland G, Zhang Q, Wakelam MJ, et al. Runx regulation of sphingolipid metabolism and survival signaling. *Cancer research* 2010; 70:5860-9.
20. Scheitz CJ, Tumber T. New insights into the role of Runx1 in epithelial stem cell biology and pathology. *Journal of cellular biochemistry* 2012. doi: 10.1002/jcb.24453.
21. Wotton S, Stewart M, Blyth K, Vaillant F, Kilbey A, Neil JC, et al. Proviral insertion indicates a dominant oncogenic role for Runx1/AML-1 in T-cell lymphoma. *Cancer research* 2002; 62:7181-5.
22. Robinson HM, Broadfield ZJ, Cheung KL, Harewood L, Harris RL, Jalali GR, et al. Amplification of AML1 in acute lymphoblastic leukemia is associated with a poor outcome. *Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, UK* 2003; 17:2249-50.
23. Planaguma J, Liljestrom M, Alameda F, Butzow R, Virtanen I, Reventos J, et al. Matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9 codistribute with transcription factors RUNX1/AML1 and ETV5/ERM at the invasive front of endometrial and ovarian carcinoma. *Human pathology* 2011; 42:57-67.
24. Ho Sui SJ, Mortimer JR, Arenillas DJ, Brumm J, Walsh CJ, Kennedy BP, et al. oPOSSUM: identification of over-represented transcription factor binding sites in co-expressed genes. *Nucleic acids research* 2005; 33:3154-64.
25. Blyth K, Cameron ER, Neil JC. The RUNX genes: gain or loss of function in cancer. *Nature reviews Cancer* 2005; 5:376-87.
26. Wotton SF, Blyth K, Kilbey A, Jenkins A, Terry A, Bernardin-Fried F, et al. RUNX1 transformation of primary embryonic fibroblasts is revealed in the absence of p53. *Oncogene* 2004; 23:5476-86.



27. Wolyniec K, Wotton S, Kilbey A, Jenkins A, Terry A, Peters G, et al. RUNX1 and its fusion oncoprotein derivative, RUNX1-ETO, induce senescence-like growth arrest independently of replicative stress. *Oncogene* 2009; 28:2502-12.
28. Linggi B, Muller-Tidow C, van de Locht L, Hu M, Nip J, Serve H, et al. The t(8;21) fusion protein, AML1 ETO, specifically represses the transcription of the p14(ARF) tumor suppressor in acute myeloid leukemia. *Nature medicine* 2002; 8:743-50.
29. Mikhail FM, Sinha KK, Sauntharajah Y, Nucifora G. Normal and transforming functions of RUNX1: a perspective. *Journal of cellular physiology* 2006; 207:582-93.
30. Speck NA, Gilliland DG. Core-binding factors in haematopoiesis and leukaemia. *Nature reviews Cancer* 2002; 2:502-13.
31. Roumier C, Fenaux P, Lafage M, Imbert M, Eclache V, Preudhomme C. New mechanisms of AML1 gene alteration in hematological malignancies. *Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, UK* 2003; 17:9-16.
32. Yanagida M, Osato M, Yamashita N, Liqun H, Jacob B, Wu F, et al. Increased dosage of Runx1/AML1 acts as a positive modulator of myeloid leukemogenesis in BXH2 mice. *Oncogene* 2005; 24:4477-85.
33. Janes KA. RUNX1 and its understudied role in breast cancer. *Cell cycle* 2011; 10:3461-5.
34. Ellis MJ, Ding L, Shen D, Luo J, Suman VJ, Wallis JW, et al. Whole-genome analysis informs breast cancer response to aromatase inhibition. *Nature* 2012; 486:353-60.
35. Fijneman RJ, Anderson RA, Richards E, Liu J, Tijssen M, Meijer GA, et al. Runx1 is a tumor suppressor gene in the mouse gastrointestinal tract. *Cancer science* 2012; 103:593-9.

36. Dulak AM, Schumacher SE, van Lieshout J, Imamura Y, Fox C, Shim B, et al. Gastrointestinal adenocarcinomas of the esophagus, stomach, and colon exhibit distinct patterns of genome instability and oncogenesis. *Cancer research* 2012; 72:4383-93.
37. Planaguma J, Diaz-Fuertes M, Gil-Moreno A, Abal M, Monge M, Garcia A, et al. A differential gene expression profile reveals overexpression of RUNX1/AML1 in invasive endometrioid carcinoma. *Cancer research* 2004; 64:8846-53.
38. Doll A, Gonzalez M, Abal M, Llauro M, Rigau M, Colas E, et al. An orthotopic endometrial cancer mouse model demonstrates a role for RUNX1 in distant metastasis. *International journal of cancer Journal international du cancer* 2009; 125:257-63.
39. Scheitz CJ, Lee TS, McDermitt DJ, Tumber T. Defining a tissue stem cell-driven Runx1/Stat3 signalling axis in epithelial cancer. *The EMBO journal* 2012; 31:4124-39.
40. Ivan C, Hu W, Bottsford-Miller J, Zand B, Dalton HJ, Liu T, et al. Epigenetic analysis of the Notch superfamily in high-grade serous ovarian cancer. *Gynecologic oncology* 2012. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ygyno.2012.11.029>.
41. Yeh HY, Cheng SW, Lin YC, Yeh CY, Lin SF, Soo VW. Identifying significant genetic regulatory networks in the prostate cancer from microarray data based on transcription factor analysis and conditional independency. *BMC medical genomics* 2009; 2:70.
42. Slattery ML, Lundgreen A, Herrick JS, Caan BJ, Potter JD, Wolff RK. Associations between genetic variation in RUNX1, RUNX2, RUNX3, MAPK1 and eIF4E and risk of colon and rectal cancer: additional support for a TGF-beta-signaling pathway. *Carcinogenesis* 2011; 32:318-26.

43. Xu K, Zhou Y, Qiu W, Liu X, Xia M, Liu L, et al. Activating transcription factor 3 (ATF3) promotes sublytic C5b-9-induced glomerular mesangial cells apoptosis through up-regulation of Gadd45alpha and KLF6 gene expression. *Immunobiology* 2011; 216:871-81.
44. Ehrhardt H, Schrembs D, Moritz C, Wachter F, Haldar S, Graubner U, et al. Optimized anti-tumor effects of anthracyclines plus Vinca alkaloids using a novel, mechanism-based application schedule. *Blood* 2011; 118:6123-31.
45. Porter LA, Singh G, Lee JM. Abundance of cyclin B1 regulates gamma-radiation-induced apoptosis. *Blood* 2000; 95:2645-50.
46. Zerbini LF, Wang Y, Czibere A, Correa RG, Cho JY, Ijiri K, et al. NF-kappa B-mediated repression of growth arrest- and DNA-damage-inducible proteins 45alpha and gamma is essential for cancer cell survival. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2004; 101:13618-23.
47. Pollock AS, Turck J, Lovett DH. The prodomain of interleukin 1alpha interacts with elements of the RNA processing apparatus and induces apoptosis in malignant cells. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 2003; 17:203-13.
48. Kim JE, Kim SJ, Jeong HW, Lee BH, Choi JY, Park RW, et al. RGD peptides released from beta ig-h3, a TGF-beta-induced cell-adhesive molecule, mediate apoptosis. *Oncogene* 2003; 22:2045-53.
49. Yan C, Boyd DD. ATF3 regulates the stability of p53: a link to cancer. *Cell cycle* 2006; 5:926-9.
50. Glinsky GV. Genomic models of metastatic cancer: functional analysis of death-from-cancer signature genes reveals aneuploid, anoikis-resistant, metastasis-enabling

phenotype with altered cell cycle control and activated Polycomb Group (PcG) protein chromatin silencing pathway. *Cell cycle* 2006; 5:1208-16.

51. Hamstra DA, Page M, Maybaum J, Rehemtulla A. Expression of endogenously activated secreted or cell surface carboxypeptidase A sensitizes tumor cells to methotrexate-alpha-peptide prodrugs. *Cancer research* 2000; 60:657-65.

52. Laronga C, Yang HY, Neal C, Lee MH. Association of the cyclin-dependent kinases and 14-3-3 sigma negatively regulates cell cycle progression. *The Journal of biological chemistry* 2000; 275:23106-12.

53. Dhar S, Squire JA, Hande MP, Wellinger RJ, Pandita TK. Inactivation of 14-3-3sigma influences telomere behavior and ionizing radiation-induced chromosomal instability. *Molecular and cellular biology* 2000; 20:7764-72.

54. Meng S, Arbit T, Veeriah S, Mellingshoff IK, Fang F, Vivanco I, et al. 14-3-3sigma and p21 synergize to determine DNA damage response following Chk2 inhibition. *Cell cycle* 2009; 8:2238-46.

55. Fukai N, Shichiri M, Ozawa N, Matsushita M, Hirata Y. Coexpression of calcitonin receptor-like receptor and receptor activity-modifying protein 2 or 3 mediates the antimigratory effect of adrenomedullin. *Endocrinology* 2003; 144:447-53.

56. Aggarwal BB, Sung B. Pharmacological basis for the role of curcumin in chronic diseases: an age-old spice with modern targets. *Trends in pharmacological sciences* 2009; 30:85-94.

57. Iozzo RV, Buraschi S, Genua M, Xu SQ, Solomides CC, Peiper SC, et al. Decorin antagonizes IGF receptor I (IGF-IR) function by interfering with IGF-IR activity and attenuating downstream signaling. *The Journal of biological chemistry* 2011; 286:34712-21.

58. Korah RM, Sysounthone V, Golowa Y, Wieder R. Basic fibroblast growth factor confers a less malignant phenotype in MDA-MB-231 human breast cancer cells. *Cancer research* 2000; 60:733-40.
59. Plante I, Stewart MK, Barr K, Allan AL, Laird DW. Cx43 suppresses mammary tumor metastasis to the lung in a Cx43 mutant mouse model of human disease. *Oncogene* 2011; 30:1681-92.
60. Krause DS, Fackler MJ, Civin CI, May WS. CD34: structure, biology, and clinical utility. *Blood* 1996; 87:1-13.
61. Rivera A, Mavila A, Bayless KJ, Davis GE, Maxwell SA. Cyclin A1 is a p53-induced gene that mediates apoptosis, G2/M arrest, and mitotic catastrophe in renal, ovarian, and lung carcinoma cells. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 2006; 63:1425-39.
62. Nash MA, Deavers MT, Freedman RS. The expression of decorin in human ovarian tumors. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2002; 8:1754-60.
63. Hollander MC, Kovalsky O, Salvador JM, Kim KE, Patterson AD, Haines DC, et al. Dimethylbenzanthracene carcinogenesis in Gadd45a-null mice is associated with decreased DNA repair and increased mutation frequency. *Cancer research* 2001; 61:2487-91.
64. Akahira J, Sugihashi Y, Suzuki T, Ito K, Niikura H, Moriya T, et al. Decreased expression of 14-3-3 sigma is associated with advanced disease in human epithelial ovarian cancer: its correlation with aberrant DNA methylation. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2004; 10:2687-93.

65. Baranello C, Mariani M, Andreoli M, Fanelli M, Martinelli E, Ferrandina G, et al. Adrenomedullin in ovarian cancer: foe in vitro and friend in vivo? *PloS one* 2012; 7:e40678.
66. Syed V, Mukherjee K, Lyons-Weiler J, Lau KM, Mashima T, Tsuruo T, et al. Identification of ATF-3, caveolin-1, DLC-1, and NM23-H2 as putative antitumorigenic, progesterone-regulated genes for ovarian cancer cells by gene profiling. *Oncogene* 2005; 24:1774-87.
67. Lee YH, Heo JH, Kim TH, Kang H, Kim G, Kim J, et al. Significance of cell cycle regulatory proteins as malignant and prognostic biomarkers in ovarian epithelial tumors. *International journal of gynecological pathology : official journal of the International Society of Gynecological Pathologists* 2011; 30:205-17.
68. Li J, Wood WH, 3rd, Becker KG, Weeraratna AT, Morin PJ. Gene expression response to cisplatin treatment in drug-sensitive and drug-resistant ovarian cancer cells. *Oncogene* 2007; 26:2860-72.
69. Chou JL, Chen LY, Lai HC, Chan MW. TGF-beta: friend or foe? The role of TGF-beta/SMAD signaling in epigenetic silencing of ovarian cancer and its implication in epigenetic therapy. *Expert opinion on therapeutic targets* 2010; 14:1213-23.
70. McLean K, Gong Y, Choi Y, Deng N, Yang K, Bai S, et al. Human ovarian carcinoma-associated mesenchymal stem cells regulate cancer stem cells and tumorigenesis via altered BMP production. *The Journal of clinical investigation* 2011; 121:3206-19.
71. Symowicz J, Adley BP, Gleason KJ, Johnson JJ, Ghosh S, Fishman DA, et al. Engagement of collagen-binding integrins promotes matrix metalloproteinase-9-dependent E-cadherin ectodomain shedding in ovarian carcinoma cells. *Cancer research* 2007; 67:2030-9.

72. Rask K, Nilsson A, Brannstrom M, Carlsson P, Hellberg P, Janson PO, et al. Wnt-signalling pathway in ovarian epithelial tumours: increased expression of beta-catenin and GSK3beta. *Br J Cancer* 2003; 89:1298-304.
73. Crijns AP, de Graeff P, Geerts D, Ten Hoor KA, Hollema H, van der Sluis T, et al. MEIS and PBX homeobox proteins in ovarian cancer. *European journal of cancer* 2007; 43:2495-505.
74. Lu KH, Patterson AP, Wang L, Marquez RT, Atkinson EN, Baggerly KA, et al. Selection of potential markers for epithelial ovarian cancer with gene expression arrays and recursive descent partition analysis. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2004; 10:3291-300.
75. Elattar A, Warburton KG, Mukhopadhyay A, Freer RM, Shaheen F, Cross P, et al. Androgen receptor expression is a biological marker for androgen sensitivity in high grade serous epithelial ovarian cancer. *Gynecologic oncology* 2012; 124:142-7.
76. Zecchini S, Bombardelli L, Decio A, Bianchi M, Mazzarol G, Sanguineti F, et al. The adhesion molecule NCAM promotes ovarian cancer progression via FGFR signalling. *EMBO molecular medicine* 2011; 3:480-94.
77. Tan Y, Cheung M, Pei J, Menges CW, Godwin AK, Testa JR. Upregulation of DLX5 promotes ovarian cancer cell proliferation by enhancing IRS-2-AKT signaling. *Cancer research* 2010; 70:9197-206.
78. Tanwar PS, Kaneko-Tarui T, Lee HJ, Zhang L, Teixeira JM. PTEN loss and HOXA10 expression are associated with ovarian endometrioid adenocarcinoma differentiation and progression. *Carcinogenesis* 2012. doi: 10.1093/carcin/bgs405.

79. Meng Y, Gu C, Wu Z, Zhao Y, Si Y, Fu X, et al. Id2 promotes the invasive growth of MCF-7 and SKOV-3 cells by a novel mechanism independent of dimerization to basic helix-loop-helix factors. *BMC cancer* 2009; 9:75.
80. Karam A, Dorigo O. MMPs in ovarian cancer as therapeutic targets. *Anti-cancer agents in medicinal chemistry* 2012; 12:764-72.
81. Lu ZY, Dong R, Li D, Li WB, Xu FQ, Geng Y, et al. SNAI1 overexpression induces stemness and promotes ovarian cancer cell invasion and metastasis. *Oncology reports* 2012; 27:1587-91.
82. Chen J, Wang M, Xi B, Xue J, He D, Zhang J, et al. SPARC is a key regulator of proliferation, apoptosis and invasion in human ovarian cancer. *PloS one* 2012; 7:e42413.
83. Nicosia SV, Bai W, Cheng JQ, Coppola D, Kruk PA. Oncogenic pathways implicated in ovarian epithelial cancer. *Hematology/oncology clinics of North America* 2003; 17:927-43.
84. Li W, Xu S, Lin S, Zhao W. Overexpression of runt-related transcription factor-2 is associated with advanced tumor progression and poor prognosis in epithelial ovarian cancer. *Journal of biomedicine & biotechnology* 2012; 2012:456534.
85. Zhang S, Wei L, Zhang A, Zhang L, Yu H. RUNX3 gene methylation in epithelial ovarian cancer tissues and ovarian cancer cell lines. *Omics : a journal of integrative biology* 2009; 13:307-11.
86. Lee CW, Chuang LS, Kimura S, Lai SK, Ong CW, Yan B, et al. RUNX3 functions as an oncogene in ovarian cancer. *Gynecologic oncology* 2011; 122:410-7.
87. Vergote I, Rustin GJ, Eisenhauer EA, Kristensen GB, Pujade-Lauraine E, Parmar MK, et al. Re: new guidelines to evaluate the response to treatment in solid tumors [ovarian



cancer]. Gynecologic Cancer Intergroup. Journal of the National Cancer Institute 2000; 92:1534-5.

88. L'Esperance S, Bachvarova M, Tetu B, Mes-Masson AM, Bachvarov D. Global gene expression analysis of early response to chemotherapy treatment in ovarian cancer spheroids. BMC genomics 2008; 9:99.

89. Mercier PL, Bachvarova M, Plante M, Gregoire J, Renaud MC, Ghani K, et al. Characterization of DOK1, a candidate tumor suppressor gene, in epithelial ovarian cancer. Molecular oncology 2011; 5:438-53.

90. Tetu B, Popa I, Bairati I, L'Esperance S, Bachvarova M, Plante M, et al. Immunohistochemical analysis of possible chemoresistance markers identified by microarrays on serous ovarian carcinomas. Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc 2008; 21:1002-10.

91. Lai SR, Andrews LG, Tollefsbol TO. RNA interference using a plasmid construct expressing short-hairpin RNA. Methods in molecular biology 2007; 405:31-7.

### 3.3.8. FIGURE LEGENDS

**Figure 3.1** BSP analysis of the methylation status of RUNX1 in grade 3 primary serous EOC tumors compared to omental metastases. Filled circles represent methylated CpGs and open circles represent unmethylated CpGs. CpG plot of the analyzed region is also presented (CpGs are displayed with vertical marks). The indicated positions on the CpG plot represent the number of nucleotides stretching upstream of the first exon of the RUNX1 gene.

**Figure 3.2** Analysis of RUNX1 expression in serous EOC tumors by IHC. A. Representative IHC images of RUNX1 protein expression in normal ovarian tissues, LMP tumors, high-grade tumors and omental metastases. B. Box-plot presentation of RUNX1 protein expression levels in normal ovarian tissues, LMP tumors, high-grade tumors and omental metastases.

**Figure 3.3** Analysis of RUNX1 expression in SKOV3 cells. A. Semi-quantitative duplex RT-PCR analysis of RUNX1 mRNA expression levels in the shRNA-RUNX1 clone sh-cl4, compared to the mock-transfected clone ctrl3. The 18S ribosomal RNA gene was used as internal standard. B. Western-blot analysis of RUNX1 protein expression in the shRNA-RUNX1 clone sh-cl4, compared to the mock-transfected clone ctrl3.  $\beta$ -actin was used as a loading control.

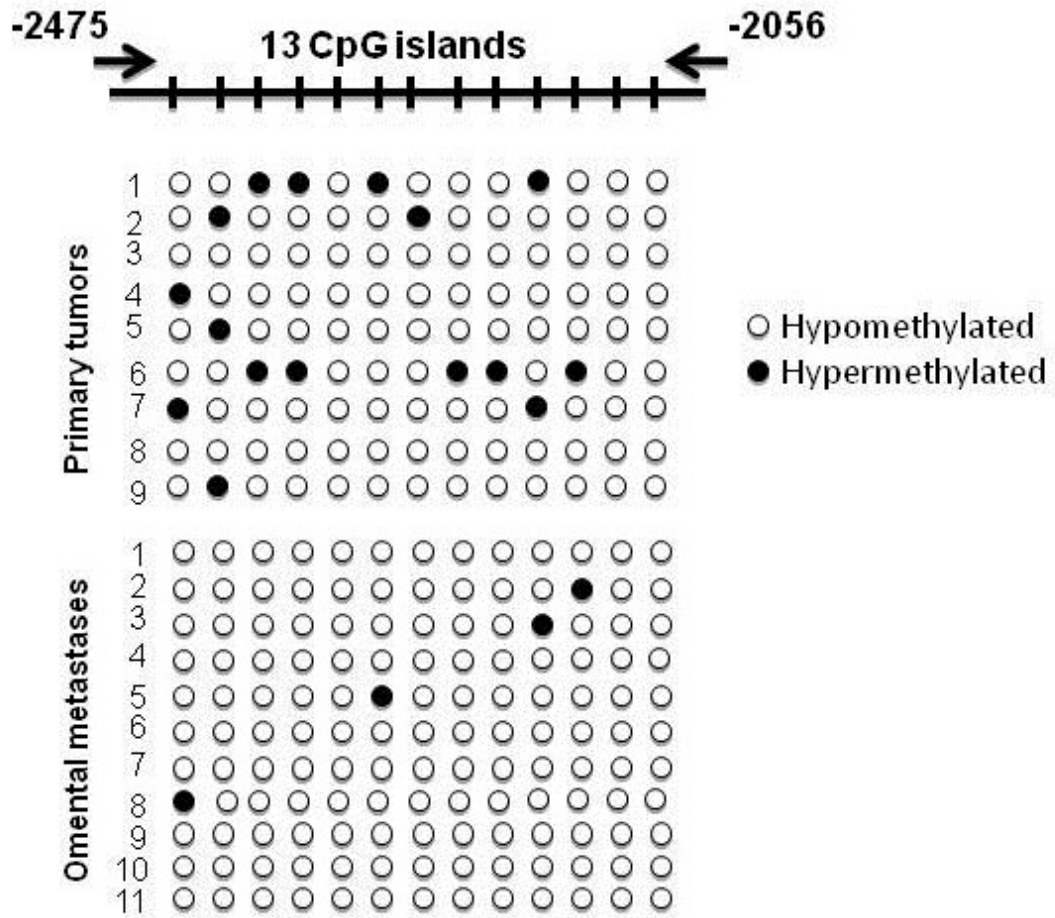
**Figure 3.4** ShRNA-mediated knockdown of the RUNX1 expression in SKOV3 cells: A, effect on cell proliferation; C, effect on cell cycle control. B. Representative images of colony forming assays following RUNX1 knockdown.

**Figure 3.5** Effect of RUNX1 knockdown on SKOV3 cell migration and invasion. A. Migration was assessed using Boyden-chamber assay. Cells from the shRNA-RUNX clone (sh-cl4) and the control clone (ctrl3) were seeded into the upper chambers in 0.1% FBS containing medium at a density of  $2.5 \times 10^4$  per well, and 600  $\mu$ l of 1% FBS containing medium was placed in the lower chamber as a chemoattractant. After 24 h at 37°C in 5% CO<sub>2</sub>, the cells were fixed with cold methanol and stained with blue trypan solution. Migrated cells on the underside of the filter were photographed and counted by phase contrast microscopy. B. Cell invasion was assayed in a similar way, as the upper chambers were coated with Matrigel. Here, NIH3T3 conditioned medium was added in the lower chamber as a chemoattractant (see Materials and Methods for details). All experiments were performed in triplicate. For each experiment, cell number was calculated as the total count from 10 random fields per filter (at magnification  $\times 40$ ). Differences between shRNA-RUNX1-transfected and vehicle-transfected SKOV3 cells were determined by a Student's t-test, where  $p < 0.05$  was considered significant.

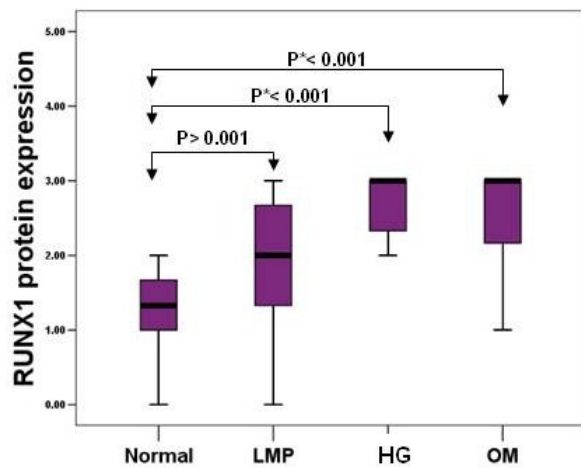
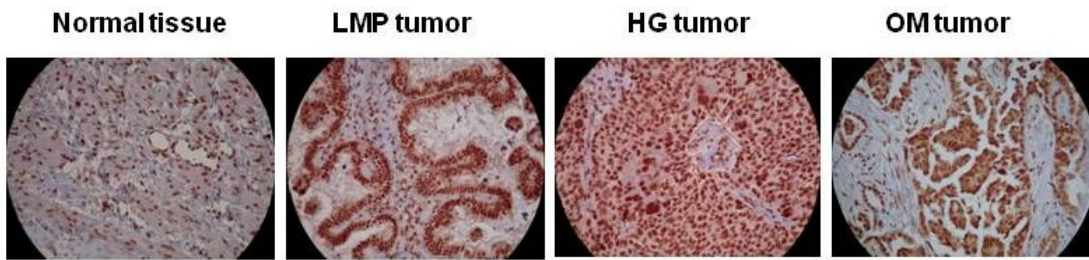
**Figure 3.6** Functional analysis for a dataset of differentially expressed genes ( $\geq 2$ -fold) following RUNX1 suppression in SKOV3 cells. A. Functional analysis of upregulated genes; B. Functional analysis of downregulated genes. Top functions that meet a p-value cutoff of 0.05 are displayed.

**Figure 3.7** Network analysis of dynamic gene expression in SKOV3 cells based on the 2-fold common gene expression list obtained following shRNA-mediated RUNX1 knockdown. A. Upregulated networks; B. Downregulated networks. The five top-scoring networks for each cell line were merged and are displayed graphically as nodes (genes/gene products) and edges (the biological relationships between the nodes). Intensity of the node color indicates the degree of up- (red) or downregulation (green). Nodes are displayed

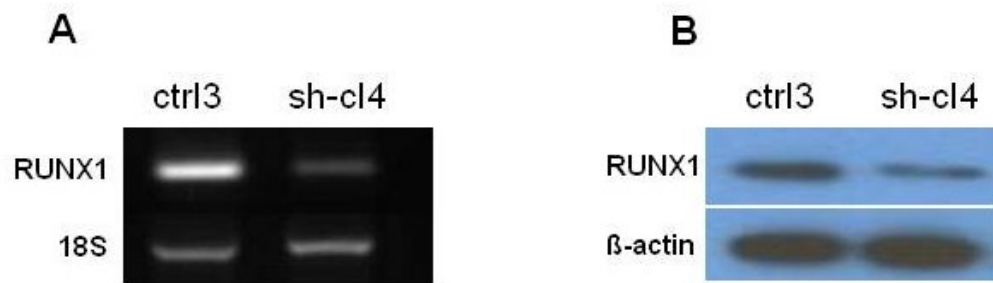
using various shapes that represent the functional class of the gene product (square, cytokine, vertical oval, transmembrane receptor, rectangle, nuclear receptor, diamond, enzyme, rhomboid, transporter, hexagon, translation factor, horizontal oval, transcription factor, circle, other). Edges are displayed with various labels that describe the nature of relationship between the nodes: — binding only, → acts on. The length of an edge reflects the evidence supporting that node-to-node relationship, in that edges supported by article from literature are shorter. Dotted edges represent indirect interaction.



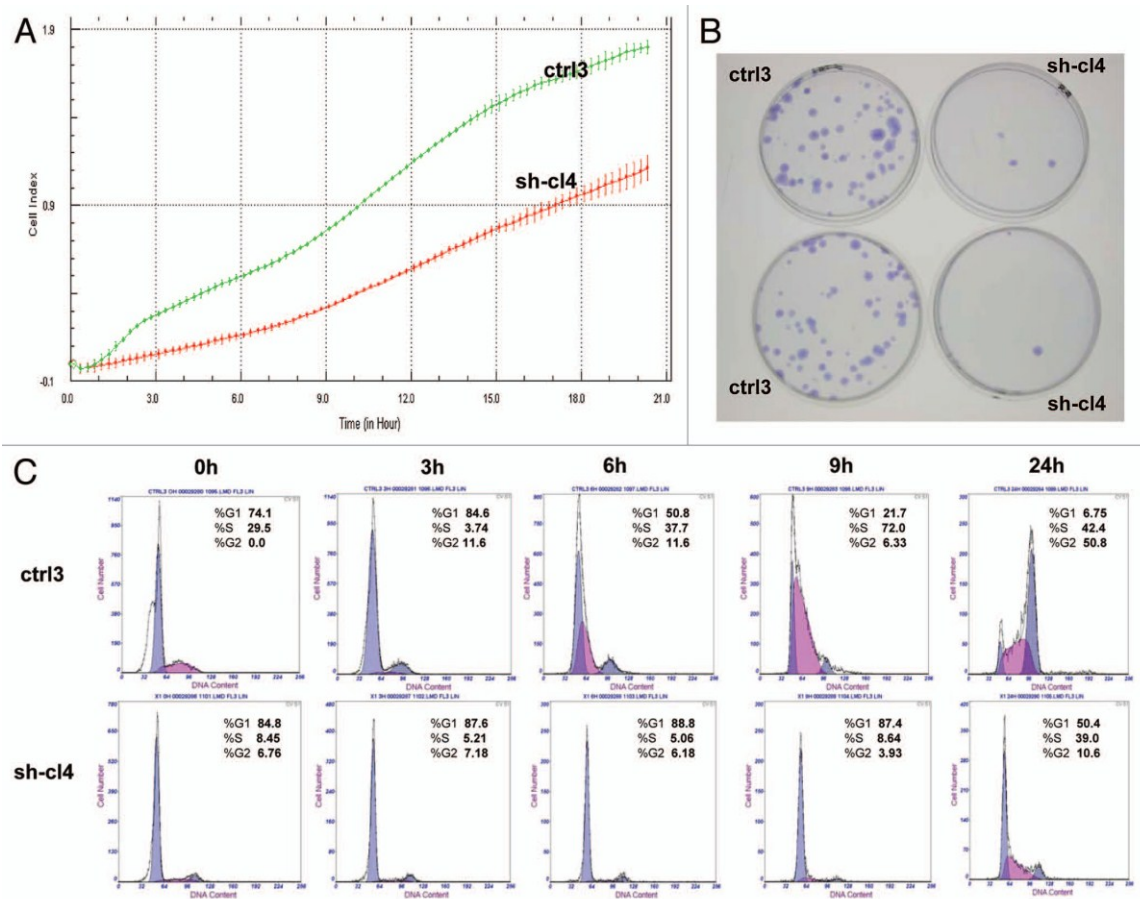
**Figure 3.1** BSP analysis of the methylation status of RUNX1 in grade 3 primary serous EOC tumors compared to omental metastases.



**Figure 3.2** Analysis of RUNX1 expression in serous EOC tumors by IHC.

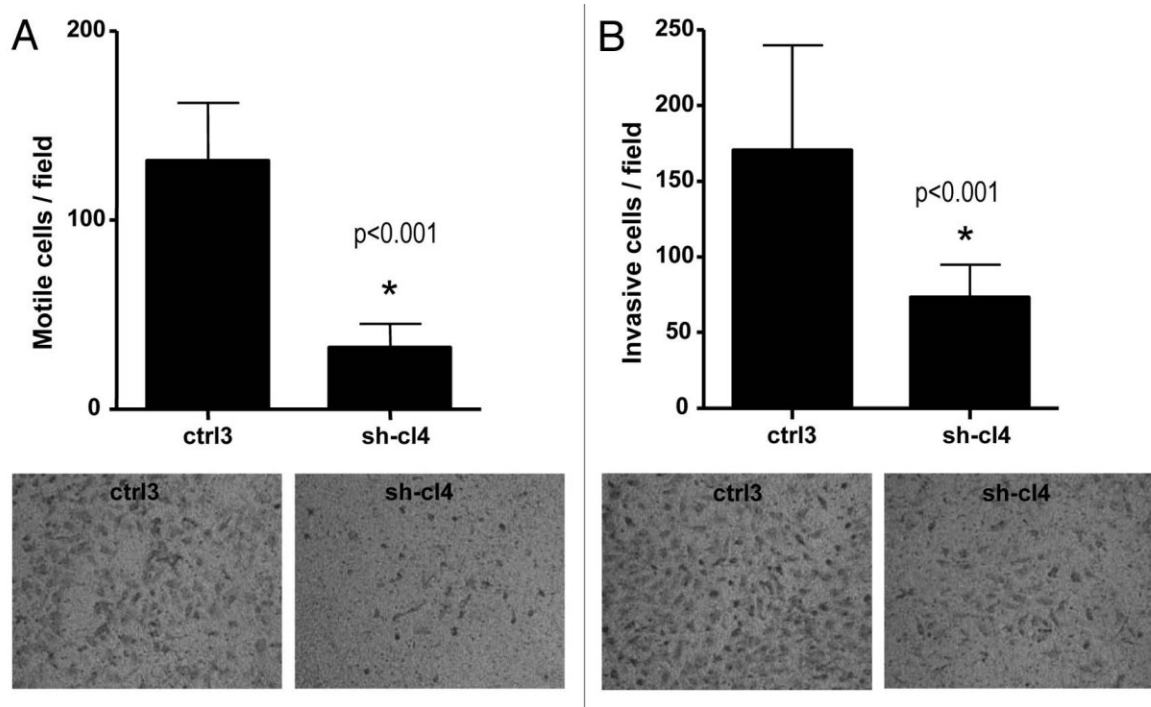


**Figure 3.3** Analysis of RUNX1 expression in SKOV3 cells.

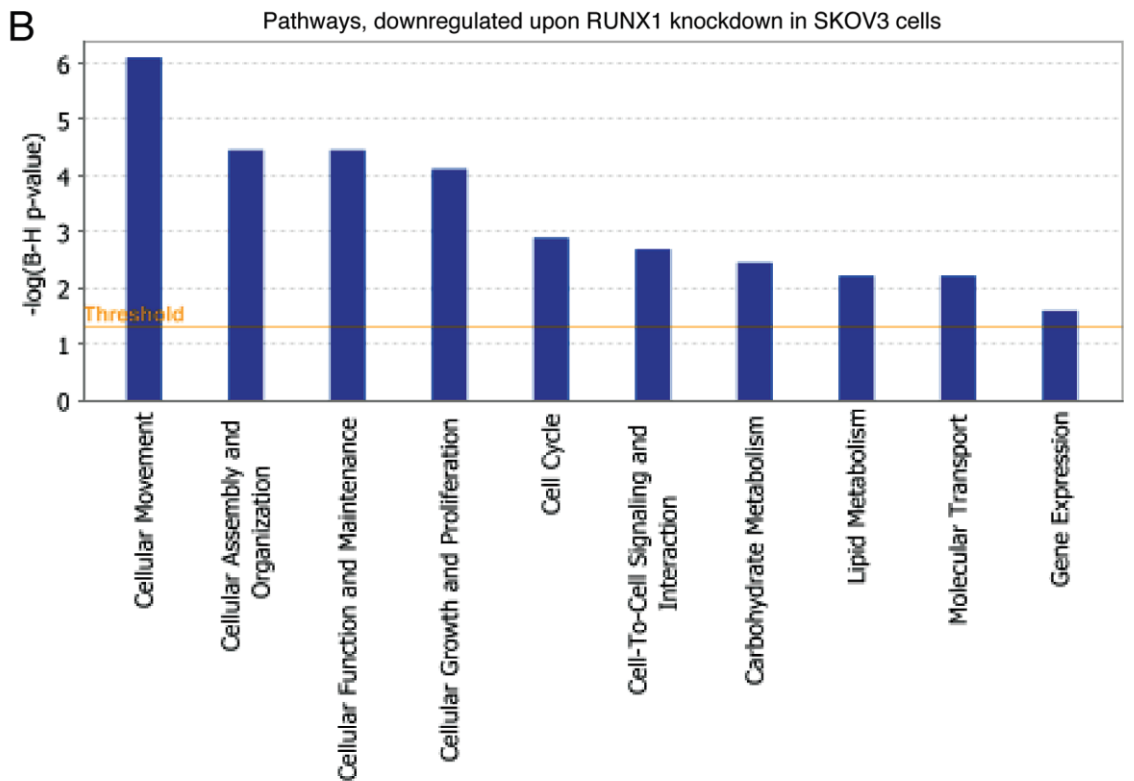
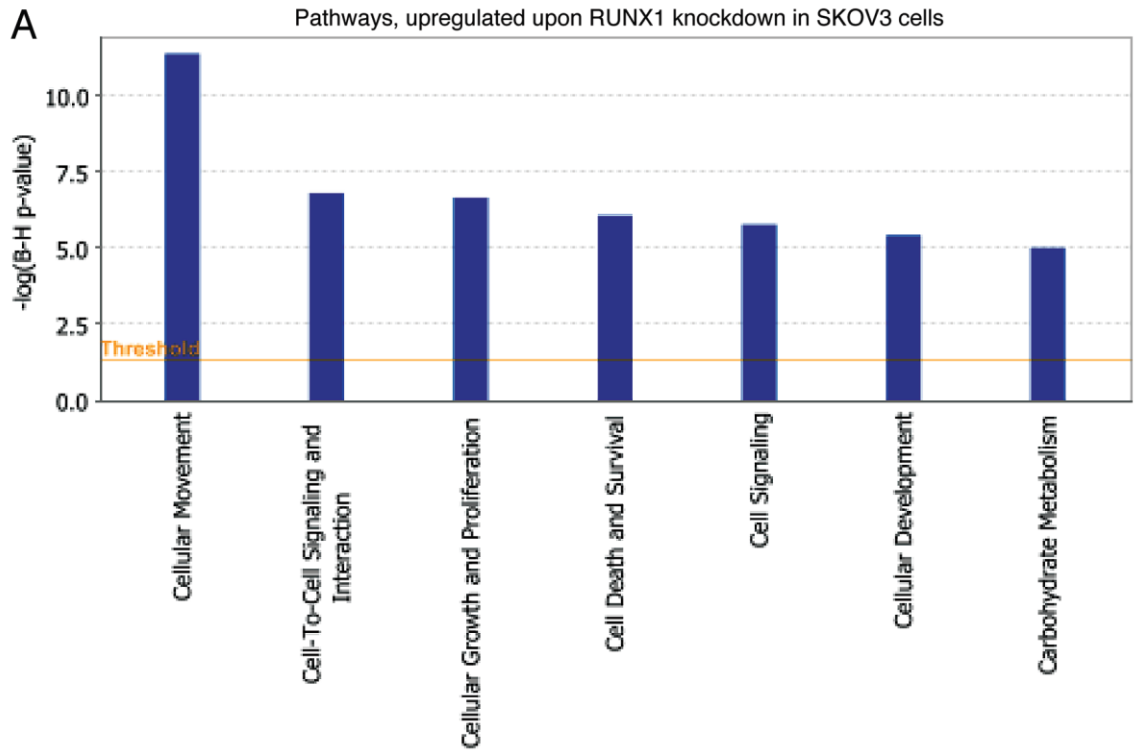


**Figure 3.4** ShRNA-mediated knockdown of the RUNX1 expression in SKOV3 cells.



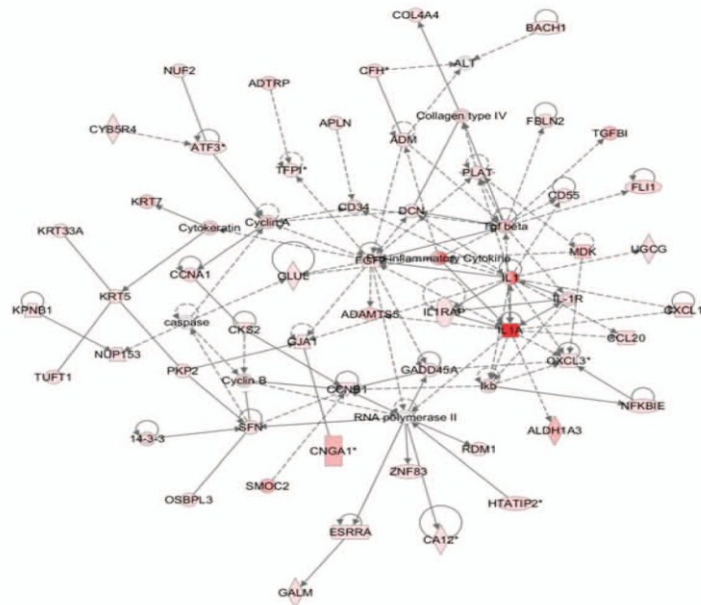


**Figure 3.5** Effect of RUNX1 knockdown on SKOV3 cell migration and invasion.

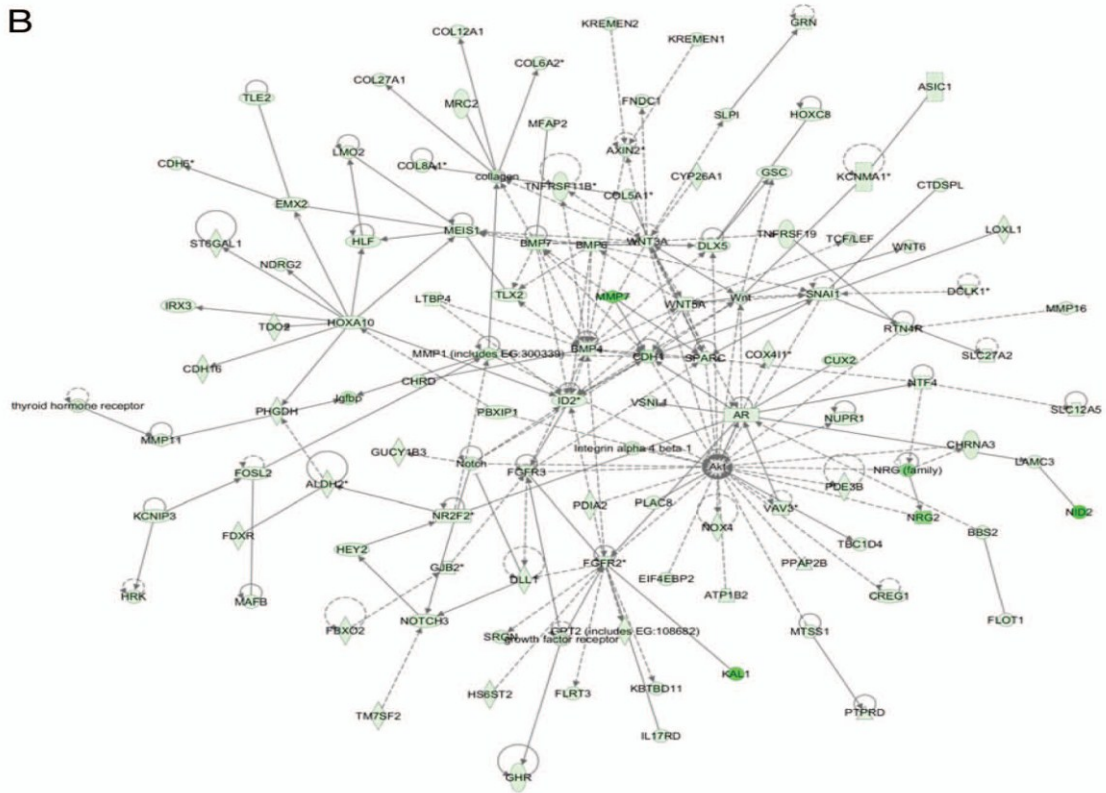


**Figure 3.6** Functional analysis for a dataset of differentially expressed genes ( $\geq 2$ -fold) following RUNX1 suppression in SKOV3 cells.

A



B



**Figure 3.7** Network analysis of dynamic gene expression in SKOV3 cells based on the 2-fold common gene expression list obtained following shRNA-mediated RUNX1 knockdown.

### 3.3.9. TABLES

**Tableau 3.1** Patients' characteristics.

Variable	Range	n/total	%
Age (years)	< 50	18/130	14.0
	50-60	66/130	50.9
	> 70	46/130	35.1
Median age	64		
Tissue/tumor type	Normal	13/130	10.0
	LMP	13/130	10.0
	High-grade	52/130	40.0
	OM	52/130	40.0
Stage	III (A, B and C)	69/130	53.0
	IV	30/130	23.0
PFS (months)*	0-6	43/99	43.4
	7-24	35/99	35.4
	> 25	21/99	21.2

\*Extended follow-up, including PFS values, were available for 99 patients.

**Tableau 3.2** Selected differentially expressed gene groups in SKOV3 cells upon RUNX1 knock-down.

<b>A. Upregulated genes</b>	
apoptosis	<i>AMID, APG12L, EMP1, FAS, GADD45A, GULP1, HTATIP2, IER3, IL18, IL1A, INHBA, ITGB2, TC3, TLR2, TNFAIP3, TNFRSF21</i>
cell cycle	<i>CCNBI, CDCA1, CKS2, FGF5, IL1B, IL8, SFN, TGFB2</i>
cell adhesion	<i>ASAM, CD34, CD44, CDH18, CLDN1, CLDN3, FBLN2, ICAM2, LAMC2, NELL2, PKP2A, PODXL, TGFB1</i>
cell growth & proliferation	<i>ABLIM3, ADAMTS1, ANLN, AREG, C14orf151, CCNA1, CXCL1, EFEMP1, EGFL3, EPLIN, KLF4, KRT19, KRT7, KRTHA3A, LUM, NUDT6, TUBA1, TUBA2, TUBGCP3, TUFT1</i>
regulation of transcription	<i>AML1a, ATF3, BACH1, C10orf48, C21orf7, E2F7, ESRRA, FLI1, FLJ20449, FLJ37649, FOSL1, FOXQ1, GATA5, GATA6, HPF1, IER5, IFI16, IRF2, KLF8, MYEF2, NFKB1, NFKBIE, NT5C, OVOL2, POLR1D, SCML1, SP5, TIGD2, VGL-3, ZNF311, ZNF582</i>
signal transduction	<i>ADRB2, ADORA2B, ANGPT2, ADM, DUSP10, RHDE, INPPI, RAB39B, RALA, OXTR, NMU, APBB1IP, PPP1R1B, APBB1IP, INPP4B, PDE1C, PDE10A, LGR7, GPRC5A, GPRC5B, GPR74, GPR110, STC2, WNT10A, DEPDC1, SH2D4A, ARF7, RAB32, ARL4, RHOJ, RAB34, RHOD, DLGAP1, DKK1, MDK, BIRC3, CD97, EDN1, FGF2, OPHN1, WISP2, PSG2, CEACAM7, EFCAB1, HRASLS, HRASLS2, RHOBTB3, S100A3, S100A4</i>
metabolism	<i>HERC4, BC015514, BC047030, CA2, LDLR, ALDH1A3, RBMS3, AGPAT4, ME3, PAPSS2, AADAC, CA12, CDA, CPM, GLUL, MEST, CD73, PLAG1, PTPRB, UAPI, UGCG, DDO, UCHL1, GDA, GALNT3, VNN1, DHRS3, GCHFR, HIF0, BCAT1, TFPI, EBP, ZNF185, GLUD2, DIO2, (NMNAT2, ATP11A, TMLHE, FLJ11088, NANS, SERPINB1, LOXL4, PPP1R14A, GALM, OSBPL3, RAD52B, PTE2B, ABHD7, NMNAT3, LOC201164, UPPI, NAV2, CMAH</i>
transport	<i>AP3SI, ATOX1, CFTR, CNGA1, COL17A1, COL4A4, CTHRC1, CYB5R4, CYP24A1, CYP4V2, FLJ22028, FOLR3, GJA1, IL4I1, KCTD4, LOC203427, LTF, NNT, RBP7, SLC22A3, SLC2A6, SLC39A8, SYTL3, Sytl4, TICAM2, TMED7, TRPC6, TRPM2, UNC13D</i>

<b>B. Downregulated genes</b>	
cell cycle	<i>APC2, BCL2, KIAA1036, LZTS1, MATK, MTSS1, SEPT4, SEPT6</i>
cell adhesion	<i>AB208934, ADAM23, AK021957, BAI1, BBS2, CDH1, CDH16, CDH22, CDH6, CLDN23, COL12A1, COL5A1, COL6A2, COL8A1, DLL1, FBLN5, FEZ1, FLRT3, FN1, GP1BB, GPR56, HMCN1, ITGB3, JAM2, KITLG, LAMC3, MBP, NID2, NLGN4X, NLGN4Y, PCDHA1, PCDHB11, PCDHB16, PCDHB2, PCDHB5, PCDHB6, PCDHB8, PCDHB9, RET, ROBO1, S70348, SCARF2, TLN2, TRO</i>
cell growth & proliferation	<i>AKRIC3, AL390129, APEG1, AR, BAI1, BST2, CD40, ChGn, CHRD, CNN1, CREG1, CSPG2, CYR61, , DMD, EPB41L1, FGFR2, FGFR3, FNDC1, FNDC5, GRN, IGFBP2, KIF12, KITLG, LCE1B, LTBP1, LTBP3, LTBP4, MYO10, NDRG2, NDRG4, NRP1, ODF1, P8, PDGFD, RUNX3, SPTBN5, SSTR2, TNFRSF11B, TRIB1, TSPAN1, TUBB3, ZFP36L2</i>
regulation of transcription	<i>BAPX1, BRACE3032537, CSEN, CUTL2, DLX5, DTX1, EBF3, EGR1, EIF4EBP2, EMX2, EOMES, FLJ13298, GCL, GLI1, GSC, HEXIM1, HEXIM2, HEY2, HLF, HOXA9, HOXC8, HSPB1, ID2, ID4, IRX3, IVNS1ABP, KIAA0518, LEF1, LHX6, LMO2, LOC392152, MAFB, MEIS1, NANOS1, NFATC1, NKX6-2, NPAS2, NR2F1, NR2F2, NR4A1, NUDT21, ONECUT2, OVOL1, RARB, RNASE4, RUNX1, SALF, SALL1, SALL2, SHOX2, SNAI1, TBLIXR1, TFCEP2L1, THRA, TLE2, TLX2, TSC22D1, ZFHx2, ZFHx4, ZIM3, ZNF114, ZNF219, ZNF452, ZNF537, ZNF556, ZNF6</i>
signal transduction	<i>ANXA4, ANXA6, ARF4L, ATRNL1, AXIN2, BAI2, BMP4, BMP6, BMP7, CXXC4, D4S234E, DIRAS1, DKFZp76101810, EYA2, GFRA1, GHR, GNG3, GNG4, GPM6B, GPR124, GRB14, GRCA, ITPKA, INHBB, KCNH2, KREMEN2, LPHN3, MC1R, M1, MPP1, MPP3, MMP7, MMP11, NUDT11, PDE3B, PDE7A, PDE8B, PIK3R3, RAB15, RASGEF1A, RASGRP3, RASIP1, RASSF2, RASSF5, RGS9, RHOTB1, RRP22, RTN4R, SEMA4G, SFRP1, SH3MD1, SNTB1, SPARC, STMN3, TNNI3, VAV3, WNT3A, WNT5A, WNT6, ZD52F10</i>
metabolism	<i>ABLIM2, ACSL5, ADPN, ADSSL1, AK5, AKR1B1, AKR1B10, AKRIC1, ALDH2, ANK3, APOC1, ARG2, ASRGL1, AUH, C6orf68, CFTR/MRP, CHST6, CILP, CTONG3005648, DHDH, DHRS6, DNM3, DPYSL2, DPYSL4, DSCR1L1, EEF1A2, ENPP5, FMNL1, GAA, GALNAC4S-6ST, GALNT14, GAMT, GLS, GLT8D2, GPT2, GSTT2, GUCY1A2, GUCY1B3, H2AFY2, H3F3A, HGD, HMOX1, IMAGE:3952485, KHK, KIAA1727, LARGE, LOC389129, MAN1A1, MANIC1, MARLIN1, MMP1, MMP15, MMP19, MMP7, MOXD1, NEIL1, NP, NT2NE2000392, OGDHL, PAMCI, PFKM, PGM2L1, PHGDH, PKM2, PPAP2B, PPP1R1A, PROS1, PTGS1, QPRT, RKHD3, SLC27A2, SMARCD3, SOD3, SRrp35, ST3GAL5, TDO2, TEK1, TM7SF2, TMEM54, TMSL8, UGT1A6, UGT1A8</i>
transport	<i>ABC1, ABCC5, ACCN2, AMBP, AMPH, APOE, Apo-E, ARL7, ATP10A, ATP1B2, ATP1B4, ATP8B2, CACNA1G, CACNB4,</i>

---

<i>CHRNA3, COL23A1, COLEC12, COX4I1, CYB5, CYP26A1, DKFZp761K0912, DNMI, ELMOD1, EMID1, FDXR, FLJ10847, FLJ31196, FXYD2, GFOD1, GJB2, HEMBA1007301, IBRDC2, ICA1, ITPR1, KCNC1, KCNE3, KCNJ16, KCNJ4, KCNJ8, KCNMA1, KCNQ1, KCNS3, KCTD12, LCN2, LRP4, MRAS, NBEA, NOX4, NUP93, PDIA2, PLACE1008629, RAB3B, RAB6B, RBP4, RIMS2, RIMS3, SCAMP5, SLC6A6, SLC10A4, SLC12A5, SLC26A10, SLC2A11, SLC40A1, SNIP, SYT17, SYTL1, SYTL2, TRPM4</i>
---

---

**Tableau 3.3** Semi-quantitative RT-PCR validation of microarray data.

<b>Gene</b>	<b>Common name</b>	<b>Fold expression</b>	
		Microarray data	sqRT-PCR
CCNB1	cyclin B1	2.18	1.72
IGFBP2	insulin-like growth factor binding protein 2	-16.1	-2.41
SNAI1	snail homolog 1 (Drosophila)	-2.77	-2.31
MMP1	matrix metalloproteinase 1	-13.19	-6.06
MMP7	matrix metalloproteinase 7	-44.84	-4.35
EIF4EBP2	eukaryotic translation initiation factor 4E binding protein 2	-4.31	-2.65
MCL1	myeloid cell leukemia sequence 1	-2.26	-1.38
NOTCH3	notch 3	-2.13	-1.69
BCL2	B-cell CLL/lymphoma 2	-4.19	-1.89



#### **4. Inhibition of RUNX2 transcriptional activity blocks the proliferation, migration and invasion of epithelial ovarian carcinoma cells**

(Article publié dans Plos One, Octobre 2013, volume 8, numéro 10) (PMID: 24124450)

#### 4.1 Mise en contexte et objectifs de l'article et contributions des auteurs

Le cancer de l'ovaire est considéré comme le cancer gynécologique le plus mortel. La majorité des patientes sont diagnostiquées avec la forme métastatique et présentent une survie à 5 ans estimée à moins de 40%. Le traitement repose sur la chirurgie suivi d'une chimiothérapie avec une combinaison des drogues de la famille des platines et des taxanes. Malgré un taux de réponse initiale élevé au traitement, il y a un risque important de récurrence et de résistance à la thérapie. Ainsi, l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques et une meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans la propagation du cancer ovarien s'avèrent nécessaires et urgents. Il est bien établi que la forme invasive et métastatique du CEO représente encore les principales causes de l'échec du traitement du cancer. De ce fait, le ciblage des voies impliquées dans la métastase pourrait présenter une avenue thérapeutique intéressante. En utilisant la technique de l'immunoprécipitation de l'ADN méthylé suivi du séquençage (comme décrit dans le chapitre 1), nous avons démontré que les cellules primaires post-chimiothérapeutiques comparativement aux cellules primaires pré-chimiothérapeutiques possédaient une signature moléculaire caractérisée par un profil d'hypométhylation prédominant de gènes associés à la prolifération, la survie et l'invasion. Parmi les gènes hypométhylés et surexprimés dans les cellules chimiorésistantes, nous avons identifié *RUNX1* dont le rôle fonctionnel a été caractérisé dans le chapitre 3. De la même manière, *RUNX2* a été identifié comme l'un des gènes hypométhylés dans les cellules primaires post-chimiothérapeutiques. En plus de son rôle dans le développement des ostéoblastes, le rôle métastatique de *RUNX2* a été décrit dans plusieurs types de cancers. Récemment, l'expression de *RUNX2* dans le CEO a été associée à la progression et au mauvais pronostic. Par conséquent, il est important d'investiguer si

l'expression de *RUNX2* est régulée de façon épigénétique par hypométhylation ainsi que son implication fonctionnelle dans la progression tumorale du CEO et la réponse au traitement.

Pour cet article, onze auteurs ont été mis à contribution. Magdalena Bachvarova, assistante de recherche de notre laboratoire était impliquée dans la collecte et l'archivage des tissus ovariens dans la banque de tumeurs. En plus, elle a réalisé l'hybridation sur les micropuces pour l'expression génique. Marie Plante, Jean Gregoire et Marie-Claude Renaud ont été impliqués dans le recrutement des différentes patientes des cohortes. La lecture et l'évaluation des micropuces d'immunohistochimie a été réalisée par Chantal Morin. Stéphane Gobeil nous a fourni les ShRNA pour sous-exprimer *RUNX2*. Xuan Bich Trinh a réalisé le design des micropuces à tissus ainsi que les tests statistiques de signification des niveaux d'expression de *RUNX2* associé aux taux de survie. Dimcho Bachvarov est le principal investigateur de cette étude. Il a été fortement impliqué dans le design et la rédaction de l'article. J'ai contribué de façon égale avec Zhi-Qiang Wang (étudiant au doctorat) pour la réalisation de cet article. J'ai validé le statut de méthylation de *RUNX1* par BSP et réalisé la construction des micropuces à tissus, les tests d'immunohistochimie, les essais de formation de colonies et de cycle cellulaire. Zhi-Qiang Wang a établi les clones stables sous-exprimant *RUNX2* et a effectué les essais de prolifération, d'invasion et de migration, de résistance aux drogues ainsi que la validation de certains gènes par RT-PCR semi-quantitative. Finalement, j'ai assisté Dr Bachvarov dans la conception et la rédaction de l'article.

## 4.2. Résumé en français

Auparavant, nous avons identifié le gène *RUNX2* comme hypométhylé et surexprimé dans les cultures primaires de cellules post-chimiothérapeutiques (CT) provenant de patientes atteintes du CEO, par rapport aux cultures pré-CT correspondantes. Les cellules post-CT présentaient la forme métastatique, réfractaires au traitement. Cependant, nous n'avons trouvé aucune différence dans la méthylation de *RUNX2* entre les tumeurs primaires du CEO et les tissus de l'épiploon présentant la forme métastatique de la tumeur. Cela suggère que la méthylation de l'ADN n'aurait aucune incidence sur l'expression *RUNX2* au stade avancé (métastatique) de la maladie. De plus, l'expression de *RUNX2* est significativement plus élevée non seulement dans le tissu métastatique, mais aussi dans les tumeurs primaires de haut grade et les tumeurs à faible potentiel de malignité. La suppression de l'expression *RUNX2* dans cellules du CEO entraîne une forte diminution de la prolifération cellulaire et inhibe de façon significative la migration et l'invasion cellulaire. Ces différents phénotypes cellulaires ont été confirmés par l'analyse du profil d'expression génique globale. L'analyse du réseau des voies de signalisation par le logiciel IPA a confirmé que différents gènes et voies connus précédemment impliqués dans la tumorigénèse ovarienne, y compris l'invasion tumorale et la métastase, se sont révélés diminués lors de la suppression de *RUNX2*. Ainsi un certain nombre de gènes pro-apoptotiques et certains suppresseurs de tumeur du CEO ont été induits.

De façon globale, nos résultats ont montré un rôle oncogénique potentiel du gène *RUNX2* dans la progression du CEO et suggèrent que *RUNX2* pourrait être une nouvelle cible thérapeutique du CEO. D'autres études sont nécessaires pour élucider plus complètement

les implications fonctionnelles de *RUNX2* et d'autres membres de la famille des gènes *RUNX* dans la tumorigénèse ovarienne.



### 4.3 Manuscrit original de l'article (anglais)

# **Inhibition of RUNX2 transcriptional activity blocks the proliferation, migration and invasion of epithelial ovarian carcinoma cells**

Zhi-Qiang Wang<sup>1,2§</sup>, Mamadou Keita<sup>1,2§</sup>, Magdalena Bachvarova<sup>2</sup>, Stephane Gobeil<sup>1,3</sup>, Chantale Morin<sup>2</sup>, Marie Plante<sup>2,4</sup>, Jean Gregoire<sup>2,4</sup>, Marie-Claude Renaud<sup>2,4</sup>, Alexandra Sebastianelli<sup>2,4</sup>, Xuan Bich Trinh<sup>2,5</sup>, and Dimcho Bachvarov<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Molecular Medicine, Laval University, Québec (Québec), Canada

<sup>2</sup>Centre de recherche du CHU de Québec, L'Hôtel-Dieu de Québec, Québec (Québec), Canada

<sup>3</sup>Centre de recherche du CHU de Québec, CHUL, Québec (Québec), Canada

<sup>4</sup>Department of Obstetrics and Gynecology, Laval University, Québec (Québec), Canada

<sup>5</sup>Department of Gynecological Oncology, Antwerp University Hospital, Antwerp, Belgium

§M. Keita and Z-Q. Wang have equally contributed to this work.

\* Corresponding author:

Centre de recherche du CHU de Québec, L'Hôtel-Dieu de Québec  
9 rue McMahon, Québec (Québec) Canada G1R 2J6

Tel.: (418) 525-4444, ext. 15590

Fax: (418) 691-5439

Email: [dimtcho.batchvarov@crhdq.ulaval.ca](mailto:dimtcho.batchvarov@crhdq.ulaval.ca)

**Keywords:** RUNX2, ovarian cancer; DNA hypomethylation; cell proliferation, cell migration, cell invasion, global gene expression

#### **4.3.1. ABSTRACT**

Previously, we have identified the RUNX2 gene as hypomethylated and overexpressed in post-chemotherapy (CT) primary cultures derived from epithelial ovarian cancer (EOC) patients, when compared to primary cultures derived from matched primary (prior to CT) tumors. However, we found no differences in the RUNX2 methylation in primary EOC tumors and EOC omental metastases, suggesting that DNA methylation-based epigenetic mechanisms have no impact on RUNX2 expression in advanced (metastatic) stage of the disease. Moreover, RUNX2 displayed significantly higher expression not only in metastatic tissue, but also in high-grade primary tumors and even in low malignant potential tumors. Knockdown of the RUNX2 expression in EOC cells led to sharp decrease of cell proliferation and significantly inhibited EOC cell migration and invasion. Gene expression profiling and consecutive network and pathway analyses confirmed these findings, as various genes and pathways known previously to be implicated in ovarian tumorigenesis, including EOC tumor invasion and metastasis, were found to be downregulated upon RUNX2 suppression, while a number of pro-apoptotic genes and some EOC tumor suppressor genes were induced.

Taken together, our data are indicative for a strong oncogenic potential of the RUNX2 gene in EOC progression and suggest that RUNX2 might be a novel EOC therapeutic target. Further studies are needed to more completely elucidate the functional implications of RUNX2 and other members of the RUNX gene family in ovarian tumorigenesis.



#### 4.3.2. INTRODUCTION

Epithelial ovarian cancer (EOC) is a disease that is responsible for more cancer deaths among women in the Western world than all other gynecologic malignancies [1]. EOC lethality primarily stems from the inability to detect the disease at an early, organ-confined stage, and the lack of effective therapies for advanced-stage disease [2]. Indeed, despite treatment improvements [3], the majority of women continue to present at advanced stages with a 5-year survival rate of only 40%. The currently established therapy of ovarian cancer includes radical surgical tumor debulking and subsequent platinum plus paclitaxel-based chemotherapy (CT). However, a significant risk of recurrence and resistance to therapy remains and when this occurs, ovarian cancer is currently incurable [4]. So there is a need for new therapeutic targets and a better understanding of the mechanisms involved in the spread of ovarian carcinoma.

It is well established that cancer invasion and metastasis still represent the major causes of the failure of cancer treatment. Approximately 70% of patients with advanced-stage EOC have widespread intraperitoneal metastases, including the formation of malignant serous effusions within the peritoneal cavity [1]. Pleural effusions constitute the most frequent site of distant metastasis (FIGO stage IV disease). Unlike the majority of solid tumors, particularly at the primary site, cancer cells in effusions are not amenable to surgical removal, and failure in their eradication is one of the main causes of treatment failure. Thus, management of the metastatic disease becomes a crucial problem for the treatment of EOC. One possible way to resolve this problem is to target metastasis-specific pathways with novel therapies. Hence, focused identification of novel pro-metastatic target pathways and molecules could enhance the chances of discovering new and effective therapies.

Recently, the importance of epigenetic perturbation of gene regulation in cancer [5], including EOC [6], has begun to be more fully appreciated. The most studied epigenetic alteration is DNA methylation, the addition of a methyl moiety to the cytosine-5 position within the context of a CpG dinucleotide, mediated by DNA methyltransferases[5]. In cancer, promoter hypermethylation often leads to inactivation of different tumor-suppressing genes and is associated with many important pathways involved in cancer progression [7] and the development of resistance to chemotherapy (CT) [8]. The role of DNA hypomethylation in carcinogenesis is less studied. Similar to other malignancies, aberrant DNA methylation, including global hypomethylation of heterochromatin and local CpG island methylation, occurs in EOC and contributes to ovarian tumorigenesis and mechanisms of chemoresistance [6].

Using an epigenomic approach (methylated DNA immunoprecipitation coupled to CpG island tiling arrays) we have recently shown that DNA hypermethylation occurs in less invasive/early stages of ovarian tumorigenesis, while advanced disease was associated with DNA hypomethylation of a number of oncogenes, implicated in cancer progression, invasion/metastasis and probably chemoresistance [9]. In this study we have also shown, that the RUNX1 and RUNX2 transcription factors were hypomethylated and overexpressed in primary cell cultures (PCCs) derived from post-CT tumors of two serous EOC patients, when compared to PCCs derived from matched primary (pre-CT) tumors [9].

The RUNX gene family comprises the RUNX1, RUNX2 and RUNX3 transcription factors, each of which is capable of forming heterodimers with the common CBF $\beta$  cofactor (a non-DNA-binding partner), as components of the core-binding factor (CBF) complex [10]. These transcription factors can activate or repress transcription of key regulators of growth, survival and differentiation pathways [11]. Although the RUNX family members share

considerable amino acid identity and display some overlapping functions, they nevertheless appear to have distinct biological functions during development, with each of the three corresponding RUNX knockout mice displaying highly distinct phenotypic abnormalities. RUNX1 is essential for definitive hematopoiesis, megakaryocyte maturation, T- and B-cell lineages and neuronal development [12, 13]. RUNX2 is essential for osteogenesis [14]. RUNX3 has essential roles in neurogenesis [15], TGF- $\beta$  signaling and dendritic cell maturation [16]. RUNX factors are increasingly linked to various human cancers, as they could function both as tumor suppressor genes (TSGs) and dominant oncogenes in a context-dependent manner (reviewed in [17]). RUNX3 is generally considered as a TSG in human neoplasia as a multitude of epithelial cancers exhibit inactivation of RUNX3 [18], including ovarian carcinoma [19], although oncogenic function of RUNX3 in EOC was also suggested [20]. The importance of RUNX1 in hematopoiesis and its TSG function in leukemia are well established [21], although RUNX1 gene amplifications and gain-of-RUNX1 function mutations have been postulated to have leukemogenic effects [22, 23]. Similarly, recent studies in solid tumors present contrasting roles of RUNX1 as either TSG or oncogene (reviewed in [21]). The implication of RUNX1 in EOC tumorigenesis is currently unknown, although it was shown that in conjunction with some matrix metalloproteinases (MMP-2 and -9) RUNX1 could contribute to the invasive stage of endometrial and ovarian endometrioid carcinomas [24]. We have recently shown that RUNX1 is significantly overexpressed in serous EOC tumors, although DNA hypomethylation was not significantly associated with its induction in advanced (metastatic) stage of the disease [25]. Moreover, RUNX1 expression was associated with increased EOC cell proliferation, migration and invasion, suggesting for a strong oncogenic potential of the RUNX1 gene in EOC progression [25].

Similar to RUNX1, the strongest evidence for a pro-oncogenic function for RUNX2 comes from studies in lymphoma/leukemia models [26]; however RUNX2 was also shown to play a role in invasive bone [27], breast [28], prostate [29], thyroid [30] and pancreatic cancer [31]. Lately, RUNX2 expression was also associated with EOC tumor progression and poor prognosis [32]. This prompted us to investigate if RUNX2 is induced due to hypomethylation in advanced EOC and whether the RUNX2 gene is functionally implicated in EOC tumorigenesis, including disease progression and response to treatment. Here we show that, similar to RUNX1, the RUNX2 gene is functionally involved in EOC cell proliferation, migration and invasion. However, we also demonstrate that RUNX1 and RUNX2 employ distinct molecular mechanisms in EOC dissemination that are specific for each gene.

### **4.3.3. RESULTS**

#### **4.3.3.1 Analysis of RUNX2 protein expression and DNA methylation status in serous EOC tumors**

Previously, we have identified the RUNX2 gene as hypomethylated and overexpressed in post-CT PCCs, derived from two serous EOC patients, when compared to matched PCCs, obtained prior to CT [9]. Here, we further evaluated RUNX2 protein expression by immunohistochemistry (IHC) in serous EOC tumors and ovarian normal tissue samples, using tissue microarrays (TMAs). Our TMAs included triplicate cores of 117 serous EOC tumors, including 13 low-malignant potential (LMP) tumors, 52 high-grade tumors and 52 omental metastases. Thirteen normal ovarian tissue samples were also included as controls. Table 1 shows the major clinical characteristics of these patients for whom extensive follow-up clinical data (up to 5-years) were available. The patient's age ranged from 41 to 83 years (median: 64 years). High-grade tumors were mainly grade 3 (99%) and stage III (80%). The majority of patients (87%) received a combination of platinum and taxol. The median baseline CA125 was around 800 U/ml. Forty three percent of the patients had a progression or a recurrence within the first 6 months of follow-up; for 35.4% of the patients the progression-free survival (PFS) interval was in the range of 7 to 24 months, and 21.2% of the patients displayed PFS values higher than 25 months (Table 1).

Surprisingly, RUNX2 displayed significantly higher expression not only in metastatic tissue, but also in LMP and high-grade primary tumors, when compared to normal tissue (Figure 1). Kaplan–Meier survival curves based on RUNX2 expression analyses in cohort of 52 high-grade serous ovarian adenocarcinoma patients displayed no association with PFS (data not shown).

We also validated the RUNX2 methylation status in primary tumors and omental metastases. BSP analysis was performed targeting a 285 bp DNA fragment of the proximal promoter (P2) region of RUNX2 gene, stretching between nt -2816 to -2531 upstream of the ATG (start) codon of RUNX2 isoform 3, and containing 12 putative CpG methylation targets (Figure 2; see also Supplemental Figure 1 for RUNX2 gene structure in relation to these CpG sites). As seen in Figure 2, the BSP analysis displayed no specific RUNX2 hypomethylation in metastatic tissues, compared to primary EOC tumors. These findings indicate that the DNA hypomethylation has no impact on RUNX2 expression in advanced (metastatic) stage of the disease. No differences were also observed when comparing RUNX2 methylation status between primary EOC tumors and normal ovarian tissue samples (data not shown).

#### **4.3.3.2 Phenotype analysis of RUNX2 suppression in EOC cells: possible implications in EOC cell proliferation, migration and invasion**

Next, we verified whether shRNA-mediated RUNX2 gene knockdown could produce any cancer-related phenotypic changes in EOC cells. We tested several EOC cell lines for endogenous RUNX2 expression by semi-quantitative RT-PCR (sqRT-PCR) and Western analysis (data not shown). Among these, the SKOV3 cell line displayed strong RUNX2 expression and was further used to generate stably transfected RUNX2 knockdown clones using the short hairpin RNA (shRNA) approach. Clone selection for further analyses was based on sqRT-PCR and Western blot validation of the RUNX2 gene/protein expression in selected clones, compared with empty vector-transfected clones. Among the clones analyzed, the shRNA-RUNX2 knockdown clones 3 (cl3) and 6 (cl6) displayed significant

decrease of RUNX2 mRNA and protein expression levels compared to the mock-transfected control (see Figure 3) and were selected for further analyses.

We investigated the impact of RUNX2 gene suppression on SKOV3 cell proliferation, cell cycle control, migration, invasion and sensitivity to cisplatin and paclitaxel (drugs, conventionally used for first-line EOC CT). The RUNX2 gene knockdown led to sharp decrease of the number of viable adherent cells (represented by cell index), compared to control cells (Figure 4A). This observation was further supported by the colony formation assay showing that the numbers of clones formed by cells with stably reduced RUNX2 expression were significantly lower than that of control cells (Figure 4B). Taken together, our observations strongly indicate an influence of RUNX2 transcripts on EOC cell proliferation and further on their propensity to form colonies. Moreover, RUNX2 suppression significantly inhibited both migration and invasion of SKOV3 cells. As shown in Figure 5A and 5B, the numbers of SKOV3 cells that passed through the filter using shRNA clones 3 and 6 were remarkably less than that in the control clone, which is indicative for a role for RUNX2 in the regulation of invasion and migration in EOC.

Finally, RUNX2 suppression had no significant impact on SKOV3 cell cycle control and cisplatin and paclitaxel sensitivity (data not shown).

#### **4.3.3.3 Molecular mechanisms of RUNX2 action in EOC cells**

To better understand the molecular mechanisms of RUNX2 action in EOC cells, we employed the Agilent Whole Human Genome microarrays, containing ~ 44,000 genes to identify global gene expression changes upon RUNX2 suppression in SKOV3 cells. We compared the gene expression of the previously selected clone shRNA- RUNX2-clone 3

(cl3) against the corresponding control clone. All microarray experiments were performed in duplicates, as two hybridizations were carried out for the RUNX2-suppressing cell clone against the corresponding control, using a fluorescent dye reversal (dye-swap) technique. For each comparison, a subset of differentially expressed genes was selected displaying at least 2-fold difference in both duplicate microarray experiments. Using these selection criteria, we found 87 genes to be upregulated and 251 genes to be downregulated in SKOV3 cells following RUNX2 knockdown, as the RUNX2 gene displayed 3.36-fold suppression in the shRNA-RUNX2-cl3 clone, compared to the corresponding control (Supplemental Table 1). Table 2 shows a list of selected functionally related groups of genes that were differentially expressed ( $\geq 2$ -fold) in SKOV3 cells upon RUNX2 knockdown. As seen from Table 2, genes with previously shown implication in mechanisms of metabolism, cell growth & proliferation, regulation of transcription, signal transduction, transport and immune & inflammatory response were predominantly or exclusively suppressed, while RUNX2 knockdown was related with the induction of genes, mostly associated with cell morphology and apoptosis. Supplemental Table 1 shows the complete list of the differentially expressed genes ( $\geq 2$ -fold) following RUNX2 knockdown in SKOV3 cells.

Pathway and network analyses, generated through the use of the IPA software confirmed the major functionally related gene groups, found to be differentially expressed in the shRNA-RUNX2-cl3 clone. As seen from Figure 6, pathways implicated in cellular morphology, cell death and survival and cell-to cell-signaling and interaction were predominantly upregulated (Figure 6A), while pathways linked to carbohydrate and lipid metabolism, cell growth and proliferation, molecular transport, cellular movement and gene expression were mostly suppressed (Figure 6B).



Common networks obtained upon merging the top-scoring networks recognized some important gene nodes and genes that are specifically up- or downregulated upon RUNX2 suppression in SKOV3 cells (Figure 7). Thus, genes and associated interaction partners that were upregulated upon RUNX2 knockdown (displayed on Figure 7A) comprised members of the ubiquitin C (UBC) interaction network, including genes, predominantly implicated in cell morphology (KRT17, LMNB1, MARCKS, MYH6, PVR, SEPT9, WASF2) and apoptosis (ARHGDIA, BCL2L1, CRYAB, CTFG, EZR, ITGB2). Major gene nodes that were downregulated upon RUNX2 knockdown in SKOV3 cells are presented in Figure 7B; these were mostly involved in metabolism (MMP1, MMP13, PTGS1/COX1/COX1), cell growth & proliferation (GADD45A, DDIT3, FGF2, IL1A), regulation of transcription (ATF3, ATF4, RUNX2), signal transduction (Creb, TRIB3, Sapk), immune & inflammatory response (CEBPB, C/ebp, SELE) and ubiquitination (UBQLN1).

#### **4.3.3.4 Validation of microarray findings with semi-quantitative RT-PCR (sqRT-PCR)**

To validate microarray results, we arbitrarily selected 9 differentially expressed genes and quantified their expression by sqRT-PCR in SKOV3 cells following shRNA-RUNX2 knockdown compared to control (vehicle transfected) SKOV3 cells. Table 3 summarizes the gene expression measurements of all validated genes. We found that both methods (microarray analysis and sqRT-PCR) detected similar patterns for the up- and down-regulated genes selected for validation.

#### **4.3.3.5 RUNX1 and RUNX2 use distinct molecular mechanisms to promote ovarian cancer cell proliferation, migration and invasion**

Our functional analyses were strongly indicative for similar roles of RUNX1 and RUNX2 in EOC progression, including implication in EOC cell proliferation, migration and invasion (see [25] and the data above). This prompted us to compare the microarray data obtained upon RUNX1 and RUNX2 knockdown in SKOV3 cells in order to get insight of the specific and/or common mechanisms of RUNX1/RUNX2 action in EOC. Venn diagram comparison analyses were indicative for negligible number of commonly overexpressed or suppressed genes following RUNX1 and RUNX2 suppression (Figure 8A). This was further confirmed by clustering analysis, as following filtering on 2-fold signal intensity, we used one-way ANOVA parametric test (Welch *t*-test; variances not assumed equal) to select discriminatory genes. Indeed, *t* test with *p*-value cutoff of 0.05 selected 95 genes for which expression differed in shRNA-RUNX1 SKOV3 cell clones compared to shRNA-RUNX2 SKOV3 cell clones. Clustering analysis based on the 95-genes list was performed using the standard Condition Tree algorithm provided in GeneSpring, and revealed formation of two major cluster groups that clearly distinguish SKOV3 cells upon RUNX1 and RUNX2 knockdown (Figure 8B). Fifty two genes from the 95-genes list were relatively downregulated in SKOV3 cells upon RUNX2 knockdown compared to RUNX1 knockdown, as major functional classifications of these genes predominantly include metabolism, cellular development and cell signaling (Figure 8C). Genes, mostly downregulated in shRNA-RUNX1 clones when compared to shRNA-RUNX2 cell clones were mainly involved in cellular movement, cell cycle control and molecular transport (Figure 8D). The 95-genes list is presented in Supplemental Table 2.

However, we cannot completely exclude some common mechanisms of RUNX1/RUNX2 action in EOC cells, since both RUNX1 and RUNX2 knockdown leads to the suppression of the pro-metastatic gene p8/NURP1 [[33](#), [34](#)], as well as the downregulation of genes (MMP1, MMP19, PTGS1/COX1) with proven role in EOC progression and dissemination [[35-37](#)].

#### 4.3.4. DISCUSSION

RUNX proteins have been demonstrated to play positive and negative roles in carcinogenesis according to different cancer types [11]. The RUNX2 gene, also known as CBF, runt domain,  $\alpha$ -subunit 1, CBFA1, AML3, or OSF2, is a lineage-specific transcription factor and the human homolog of mouse PEBP2A [38]. During embryonic development, RUNX2 is involved in the process of bone formation or osteogenesis [14]. In carcinogenesis, RUNX2 acts as a master regulator of disease progression, and was shown to be strongly implicated in the development of osteosarcoma [39]. In addition, overexpression of RUNX2 has also been identified in several human malignancies, including lymphoma/leukemia [26], bone [27], breast [28], prostate [29], thyroid [30] and pancreatic cancers [31]. Similarly, overexpression of RUNX2 has been reported in EOC tissues compared with normal ovarian tissues, and its upregulation was closely related with the clinical stage and poor prognosis of EOC patients [32]. In most of these studies, RUNX2 was functionally associated with tumor invasion and metastasis. Indeed, Akech et al. [29] indicated that RUNX2 is associated with prostate cancer bone metastasis and maybe a potential therapeutic target to block prostate cancer cells ability for tumor growth and metastatic lesions formation *in vivo*. The results of Niu et al. [30] group revealed that RUNX2 is functionally linked to tumor invasion and metastasis of thyroid carcinoma by regulating EMT-related molecules, matrix metalloproteinases and angiogenic factors. Pratap et al. [28] found that RUNX2 expression may play important role in breast tumor cell invasion. A recent study identified RUNX2 as a potent prognostic factor in nonsmall cell lung cancer (NSCLC) patients, as RUNX2 expression was significantly correlated with NSLCL with tumor progression and metastatic capability [40].

Our previous findings based on analyses in PCCs derived from matched tumor samples obtained prior to, and following CT treatment from two serous EOC patients, were suggestive for RUNX2 overexpression in advanced (metastatic) EOC, which might be due to epigenetic mechanisms, associated with DNA hypomethylation of its putative promoter region [9]. However, in the present study we show that the CpG island located in this promoter region displays no significant hypomethylation in EOC omental metastases, compared to primary serous EOC tumors. Thus, our data point to no implications of epigenetics mechanisms (DNA hypomethylation) in RUNX2 overexpression in metastatic tissues. Moreover, our IHC analyses were indicative for strong RUNX2 protein overexpression both in grade 3 serous EOC tumors and metastatic tissues. Interestingly, RUNX2 also displayed significantly increased expression in LMP tumors, compared to normal ovarian tissue. Normal ovarian tissues controls consistently displayed low RUNX2 expression; minimal expression was also detected in other human adult tissues (data not shown).

The above findings persuaded us to investigate the functional implication of RUNX2 in mechanisms of EOC tumorigenesis. Our functional analyses are strongly indicative for evident oncogenic capacity of RUNX2 in serous EOC, including its potential role in EOC cell proliferation and cell migration/invasion (see Figs. 4 and 5). Thus, our data confirm recent findings that RUNX2 is required for tumor and cancer cell growth and/or invasion/metastasis, as mentioned above.

To better elucidate the molecular mechanisms and biological pathways implicated in RUNX2-mediated action in EOC cells, we used a complementary gene expression profiling approach using the DNA microarray technology to monitor cellular changes in gene expression and discover the molecular targets upon RUNX2 suppression in EOC cells. To

our knowledge, the present work represents the first effort to define global changes in gene expression upon modulation of RUNX2 expression in cancer cells. We analyzed both functionally related genes that were commonly differentially expressed in SKOV3 EOC cells upon RUNX2 knockdown. The gene expression data and consecutive network and pathway analyses were quite confirmatory of the data obtained by the RUNX2 functional assays. Indeed, microarray data sustained RUNX1 correlation with EOC cell proliferation, migration and invasion, since RUNX2 knockdown resulted in reduced expression of genes associated with metabolism, cellular growth & proliferation and cellular movement, while a number of genes linked to cell death were induced (see Table 2 and Figure 6).

IPA network analysis was indicative for some important gene nodes linked to RUNX2 suppression in EOC cells, as most of these substantiate and/or complement the functional data obtained. Thus, RUNX2 knockdown resulted in upregulation of gene nodes/genes known to be implicated in apoptosis induction or displaying TSG functions. Notably the UBC interaction network and its members were shown to decrease in anchorage-independent cell growth and an increase apoptosis, suggesting UBC may act as a negative regulator of skin carcinogenesis [41]; CRYAB has been reported as a potential TSG [42], while increased expression of BCL-XS (BCL2L1) protein in tumors was associated with decreased proliferation and induction of apoptosis [43, 44]. Similarly, CTGF upregulation was found to be associated with apoptosis and decrease of tumor cell invasion [45-47]; PPM1A (PP2C) expression could induce cell cycle arrest and apoptosis via activation of the p53 pathway [48], and NF2 has been characterized as a TSG in different cancers [49-51].

In parallel, upon RUNX2 knockdown, we have observed a predominant and strong downregulation of gene nodes known to be implicated in EOC tumorigenesis (PTGS1/COX1, FGF2, IL1A, Sapk, C/ebp, SELE, UBQLN1, PSAT1, ALDH1A1, GDF15,

MTHFD2) [[52-61](#)], including EOC tumor invasion/metastasis (MMP1, MMP13, Creb) [[62-64](#)]; (see Figure 7B). Some of these gene nodes have been shown to be functionally involved in other cancer types, including regulation of tumor cell proliferation (Creb, C/ebp, ATF3, ATF4) [[65-68](#)], invasion (MTHFD2, FGF2) [[69](#), [70](#)] and metastasis (PTGS1/COX1, E-selectin, ATF3, FGF2, IL1A, MMP1, MMP13) [[71-76](#)]. Thus, our data support the concept of oncogenic role of RUNX2 in EOC, and support previous findings for its rather universal functions in tumorigenesis, including tumor invasion and metastasis. Given the similar roles of RUNX1 and RUNX2 in EOC progression (implications in EOC cell proliferation, migration and invasion) and the fact that all three RUNX proteins recognize common DNA sequence motifs [[10](#)], we analyzed the extent of overlap in differentially expressed genes/functional pathways following RUNX1 and RUNX2 knockdown in the SKOV3 ovarian adenocarcinoma cell line (analyses based on the data presented herein and our previous findings [[25](#)]). Both the Venn diagram comparisons, as well as gene clustering and IPA functional analyses were indicative for distinct molecular mechanisms and functional pathways associated with RUNX1 or RUNX2 implication in EOC progression (see Figure 8), although both genes could potentially modulate the expression of some common genes involved in EOC disease advancement and metastasis (including MMP1, MMP19 and PTGS1/COX1, and possibly p8/NURP1).

In conclusion, we have shown that the RUNX2 transcription factor is significantly overexpressed in serous EOC tumors, including LMP tumors, compared to normal ovarian tissue. BSP validation of the RUNX2 methylation status in primary EOC tumors and omental metastasis were indicative for no implication of epigenetics mechanisms (DNA hypomethylation) in RUNX2 overexpression in metastatic tissues. Further functional analyses of RUNX2 in EOC cells pointed towards its association with EOC cell

proliferation, migration and invasion. Gene expression profiling and consecutive network and pathway analyses confirmed these findings, as various genes and pathways known previously to be implicated in ovarian tumorigenesis, including EOC tumor invasion and metastasis, were found to be suppressed upon RUNX2 knockdown, while a number of pro-apoptotic genes and some EOC TSGs were found to be induced. Hence, RUNX2 is possibly required for EOC tumor and cancer cell growth and invasion and could represent a potential EOC therapeutic target. The present study also reveals that RUNX1 and RUNX2 employ distinct molecular mechanisms in EOC tumorigenesis despite evident similarities of their action on EOC cell phenotype and behavior. Taken together, our data are indicative of strong oncogenic potential of both transcription factors in EOC progression and warrant further and more profound studies of the functional implications of the RUNX transcription factors in EOC tumorigenesis.



### **4.3.5. PATIENTS AND METHODS**

#### **4.3.5.1 Patients and Tissue specimens**

Snap frozen and formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tissues of 117 serous EOC tumors were obtained at the Hotel-Dieu de Quebec Hospital, Quebec, Canada. These included 13 borderline, or low-malignant potential (LMP) tumors, 52 high-grade adenocarcinomas and 52 omental metastases. None of the patients received chemotherapy before surgery (see Table 1 for detailed clinicopathological characteristics). All tumors were histologically classified according to the criteria defined by the World Health Organization [77]. The CT treatment was completed for all patients and the response to treatment was known. Disease progression was evaluated following the guidelines of the Gynecology Cancer Intergroup [77]. Progression free survival (PFS) was defined as the time from surgery to the first observation of disease progression, recurrence or death. Thirteen normal ovarian samples were derived from women subjected to hysterectomy with oophorectomy due to non-ovarian pathologies. The study was approved by the Clinical Research Ethics Committee of the Hotel-Dieu de Quebec Hospital and all patients signed an informed consent for voluntary participation.

#### **4.3.5.2 Cell cultures**

The EOC cell lines OVCAR3, SKOV3 and C13 were purchased from American Tissue Type Collection (Manassas, VA); OV-90, OV2008, TOV-112 and TOV-21 cell lines were a kind gift from Dr. Anne-Marie Mes-Masson (Montreal University), while A2780s and A2780cp cell lines were a kind gift from Dr. Benjamin Tsang (Ottawa University). The cell

lines were passaged in different culture media supplemented with 10% fetal bovine serum, as described previously [78].

#### **4.3.5.3 Bisulfite sequencing PCR (BSP) analysis**

BSP analysis was performed, as previously described [79, 80]. Briefly, genomic DNAs from primary and metastatic EOC tumor specimens were isolated using the Qiagen DNeasy Blood and Tissue Kit. Bisulfite modification of genomic DNAs was done using the Methyl Detector kit (Active Motif, Carlsbad, CA). For BSP, a 285-bp fragment was amplified using primer pairs specific for bisulfite-modified sequences but not harboring CpGs, located at nt -2816 (GGTTTGGTTAAATGGGTTT) to nt -2531 (ACCCTTCCTCCATACACTACTC) upstream of the RUNX2 transcription start (ATG) codon. BSP primer selection was performed using the Methyl Primer Express Software v1.0 (Applied Biosystems). PCR was done for 35 cycles (94°C, 30 s; 60°C, 50 s; 72°C, 1 min). PCR products were sent for dideoxy-sequencing analysis at the Genomics Analysis Platform at Laval University (<http://www.bioinfo.ulaval.ca/seq/en/>).

#### **4.3.5.4 Tissue microarrays (TMAs) construction and IHC**

TMAs were constructed, as previously described [81]. Briefly, one representative block of each ovarian tumor and normal ovarian tissue was selected for the preparation of the tissue arrays. Three 0.6 mm cores of tumor were taken from each tumor block and placed, 0.4 mm apart, on a recipient paraffin block using a commercial tissue arrayer (Beecher Instruments, Sun Prairie, WI). The cores were randomly placed on one of two recipient blocks to avoid IHC evaluation biases. Four micron thick sections were cut for the hematoxylin-eosin (HE) staining and IHC analyses.

IHC was performed, as previously described [79-81]. Briefly, 4 µm tissue sections were deparaffinized and then heated in an autoclave for 12 min to retrieve the antigenicity before blocking the endogenous peroxidase. Following treatment with 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 10 min to quench the endogenous peroxidase activity, sections were incubated with anti-RUNX2 antibody (1:100 dilution) (Santa Cruz Biotechnology; sc-101145) at room temperature for 2 hours. Sections were then incubated with a biotinylated secondary antibody (Dako, Carpinteria, CA) and then exposed to a streptavidin complex (Dako, Carpinteria, CA). Complete reaction was revealed by 3-3' diaminobenzidine and slides were counterstained with hematoxylin. RUNX2 protein expression was assessed by semi-quantitative scoring of the intensity of staining and recorded as absent (0), weak (1+), moderate (2+) or strong (3+). The relationship between RUNX2 expression in serous ovarian carcinomas and normal ovarian tissues was evaluated by the Wilcoxon two-sample test. A significant association was considered when p-value was below 0.05. A Kaplan Meier curve and the log-rank test were performed based on PFS values to test the effect of the intensity of RUNX2 (3, 2 versus 0, 1) on disease progression.

#### **4.3.5.5 Short Hairpin RNA (shRNA) – mediated RUNX1 knockdown in SKOV3 cells**

The shRNA-mediated RUNX2 knockdown in SKOV3 cells was done, as previously described [79, 80]. Briefly, a RUNX2 shRNA cloned into the pLKO.1-puro vector was retrieved from the Sigma Mission TRC human 1.5 shRNA library (clone number TRCN0000013655). Viral supernatants were generated by transfecting 293T cells with the shRNA construct and the packaging vectors psPAX2 and pMD2.G (Addgene, Cambridge, MA). The high-titer lentiviral supernatants in the presence of 8 µg/ml polybrene were used to infect SKOV3 cells. Two days later, infected cells were treated with puromycin (0,5

µg/ml) for the selection of stably-transduced clones. The pLKO.1-puro vector encoding a scramble sequence not matching any mammalian sequence was used for the generation of mock-transduced (control) clones. Stable clones with inhibited RUNX2 expression were evaluated and validated by semi-quantitative RT-PCR and Western blot.

#### **4.3.5.6 Western Blot Analysis**

Western blot analysis was performed as previously described [79, 80]. Briefly, protein lysates were prepared by resuspending cell pellets in Laemmli sample buffer containing 5% β-mercaptoethanol. Protein lysates were separated by 6 to 12% Tris-glycine gel electrophoresis and transferred onto a polyvinylidene difluoride membrane using a semi-dry apparatus (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). The membrane was blocked with 5% nonfat dry milk in TBST (20 mmol/L Tris-HCl, 0.5 M NaCl, and 0.1% Tween 20), incubated with the anti-RUNX2 mouse monoclonal antibody (1:500) (Santa Cruz Biotechnology) and anti-β-actin antibody (1:5000) (Santa Cruz Biotechnology) at 4°C overnight. After 3 X 15 min washes with TBST (20 mmol/L Tris-HCl, 0.5 M NaCl, and 0.1% Tween 20) at room temperature, the membrane was incubated with horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody and detected with ECL solution (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA).

#### **4.3.5.7 Cell proliferation assay using impedance measurement with the xCELLigence system**

Cell proliferation (cell index) was checked by the xCELLigence Real-Time Cell Analyzer (RTCA) instrument, as previously described [80]. Cells were seeded in triplicate at  $2 \times 10^4$  cells/well in the E-Plate 16, a specialized 16-well plate used with the RTCA instrument.

Each of the 16 wells on the E-Plate 16 contains an integral sensor electrode array so that cells inside each well can be monitored and assayed. Cell growth was monitored for 24 hours.

#### **4.3.5.8 Colony formation assay**

Colony formation assay was performed, as previously described [79, 80]. Briefly, SKOV3 cells were seeded at 500 cells per 60 mm culture dish. After 14 days, the dishes were washed twice in PBS, fixed with cold methanol, stained with Coomassie Blue (Sigma-Aldrich) for 5 min, washed with water and air dried. The number of colonies was determined by imaging with a Multimage™ Cabinet (Alpha Innotech Corporation, San Leandro, CA) and using AlphaEase Fc software.

#### **4.3.5.9 Cell migration and invasion assays**

Cell migration and invasion assay were performed, as previously described [80]. Briefly, shRNA-RUNX2 transfected, control (vehicle-transfected) and intact SKOV3 cells were seeded into the upper inserts of Boyden chambers (Costar, Cambridge, MA) in 0.1% FBS containing medium at a density of  $2.5 \times 10^4$  per well, and 600  $\mu$ l of 1% FBS containing medium was placed in the lower chamber as a chemoattractant. After 24 h at 37°C in 5% CO<sub>2</sub>, the cells were fixed with cold methanol and stained with trypan blue solution. Cells on the upper surface of the filter were removed with cotton buds. Migrated cells on the underside of the filter were photographed and counted by phase contrast microscopy, by selecting 10 random fields per filter (at magnification 40x). The experiments were performed in triplicate. Cell invasion was assayed in a similar way, as the 5- $\mu$ m pore polycarbonate filters were coated with 40  $\mu$ l of Matrigel™ at concentration of 0.5 mg/ml

(BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ). Here, 600  $\mu$ l of NIH3T3 conditioned medium was added in the lower chamber as a chemoattractant. Differences between shRNA-RUNX2-transfected, vehicle-transfected and intact SKOV3 cells were determined by a Student's t-test, where  $p < 0.05$  was considered significant.

#### **4.3.5.10 Flow cytometry**

Flow cytometry analysis was performed, as previously described [80]. Briefly,  $7.5 \times 10^4$  SKOV3 cells were treated with 20 mM hydroxyurea (Sigma) for synchronization at the G1/S boundary. After 16 hours of incubation, cells were washed once with PBS, and resuspended in 1 ml of complete media (time 0). Then, cells were harvested by trypsinization at 0, 3, 6, 9 and 24 h and washed three times with PBS, and fixed with ice-cold 95% ethanol overnight. Cells were washed with PBS (3 x) and incubated with propidium iodide (50  $\mu$ g/ml) (Sigma) in the dark at room temperature for 30 min. Flow cytometric analysis was performed on a Beckman Coulter EPICS XL-MCL analyzer. The cell cycle phase distribution was calculated from the resultant DNA using the cell QuestPro software.

#### **4.3.5.11 MTT (cytotoxicity) assay**

The MTT cell proliferation assay (Sigma, St-Louis, MS, USA) was used to measure the cell growth inhibition effects of cisplatin and paclitaxel in SKOV3 cell clones suppressing RUNX2, as previously described [79]. Briefly, cell suspensions (at  $2 \times 10^4$  cells/ml) were transferred to 96-well plates in triplicates and incubated for 3 days with different drugs' concentrations (ranging between 1 nM and 100  $\mu$ M). Then, 38  $\mu$ l of 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT, 5 mg/ml) was added to each well 4 h before

the end of the incubation. After centrifugation and removing the supernatant, 200  $\mu$ L of dimethyl sulphoxide (DMSO) were added to resolve the crystals and the optical density was measured by microplate reader at 595 nm.

#### **4.3.5.12 Gene expression profiling and data analysis**

Gene expression analysis was carried out as previously described [78]. Briefly, total RNA was extracted from the shRNA-RUNX2 knockdown clones (sh-cl3, sh-cl6) and the corresponding control (mock-transfected) SKOV3 clone. The quality of the RNA samples was examined by capillary electrophoresis using the Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent, Palo Alto, CA). Fluorescently labeled cRNA targets were generated from 0.5  $\mu$ g of total RNA from each corresponding SKOV3 cell clone, using the Fluorescent Linear Amplification Kit (Agilent) and 10.0mM Cyanine 3- or 5-labeled CTP (PerkinElmer, Boston, MA), and following user's manual. Cyanine labeled cRNA from the clone suppressing RUNX2 (sh-cl4) was mixed with the same amount of reverse-color cyanine-labeled cRNA from the corresponding control clone and hybridized on the Agilent Whole Human Genome microarrays, containing 44,000 genes. Array hybridization, washing, scanning, data extraction and analyses were performed as previously described [78]. Network analysis of the microarray data was completed using the Ingenuity Pathway Analysis (IPA) software (see <http://www.Ingenuity.com>).

#### **4.3.5.13 Semi-quantitative duplex RT-PCR (sqRT-PCR)**

Analysis of RUNX2 gene expression in stably transfected RUNX2 knockdown clones (shRNA-RUNX2) and the corresponding mock-transfected SKOV3 clones was performed

by sqRT-PCR as previously described [78, 80]. The 18S ribosomal RNA gene was used as an internal standard. Comparative signal intensity was evaluated using the ImageJ software (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>). Primers were designed for these loci with the sequences freely available from the Entrez Nucleotide database and the Primer3 algorithm for primer design ([http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3\\_www.cgi](http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3_www.cgi)).



#### **4.3.6. ACKNOWLEDGEMENTS**

This study was sustained by a grant to D.B. from the Cancer Research Society of Canada. Clinical specimens were provided by the Banque de tissus et de données of the Réseau de recherche sur le cancer of the Fonds de recherche du Québec - Santé which is affiliated with the Canadian Tumor Repository Network.

#### 4.3.7. REFERENCES

1. Siegel R, Ward E, Brawley O and Jemal A. Cancer statistics, 2011: the impact of eliminating socioeconomic and racial disparities on premature cancer deaths. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2011; 61(4):212-236.
2. Barnholtz-Sloan JS, Schwartz AG, Qureshi F, Jacques S, Malone J and Munkarah AR. Ovarian cancer: changes in patterns at diagnosis and relative survival over the last three decades. *American journal of obstetrics and gynecology*. 2003; 189(4):1120-1127.
3. Alouini S. Management of ovarian cancer has changed. *Gynecologic oncology*. 2012; 126(2):313; author reply 314.
4. Agarwal R and Kaye SB. Ovarian cancer: strategies for overcoming resistance to chemotherapy. *Nature reviews Cancer*. 2003; 3(7):502-516.
5. Jones PA and Baylin SB. The epigenomics of cancer. *Cell*. 2007; 128(4):683-692.
6. Balch C, Fang F, Matei DE, Huang TH and Nephew KP. Minireview: epigenetic changes in ovarian cancer. *Endocrinology*. 2009; 150(9):4003-4011.
7. Momparler RL. Cancer epigenetics. *Oncogene*. 2003; 22(42):6479-6483.
8. Maier S, Dahlstroem C, Haefliger C, Plum A and Piepenbrock C. Identifying DNA methylation biomarkers of cancer drug response. *American journal of pharmacogenomics : genomics-related research in drug development and clinical practice*. 2005; 5(4):223-232.
9. Keita M, Wang ZQ, Pelletier JF, Bachvarova M, Plante M, Gregoire J, Renaud MC, Mes-Masson AM, Paquet ER and Bachvarov D. Global methylation profiling in serous ovarian cancer is indicative for distinct aberrant DNA methylation signatures associated with tumor aggressiveness and disease progression. *Gynecologic oncology*. 2013; 128(2):356-363.

10. Huang X, Peng JW, Speck NA and Bushweller JH. Solution structure of core binding factor beta and map of the CBF alpha binding site. *Nature structural biology*. 1999; 6(7):624-627.
11. Wang CQ, Jacob B, Nah GS and Osato M. Runx family genes, niche, and stem cell quiescence. *Blood cells, molecules & diseases*. 2010; 44(4):275-286.
12. Okuda T, van Deursen J, Hiebert SW, Grosveld G and Downing JR. AML1, the target of multiple chromosomal translocations in human leukemia, is essential for normal fetal liver hematopoiesis. *Cell*. 1996; 84(2):321-330.
13. Wang Q, Stacy T, Binder M, Marin-Padilla M, Sharpe AH and Speck NA. Disruption of the *Cbfa2* gene causes necrosis and hemorrhaging in the central nervous system and blocks definitive hematopoiesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1996; 93(8):3444-3449.
14. Otto F, Thornell AP, Crompton T, Denzel A, Gilmour KC, Rosewell IR, Stamp GW, Beddington RS, Mundlos S, Olsen BR, Selby PB and Owen MJ. *Cbfa1*, a candidate gene for cleidocranial dysplasia syndrome, is essential for osteoblast differentiation and bone development. *Cell*. 1997; 89(5):765-771.
15. Levanon D, Bettoun D, Harris-Cerruti C, Woolf E, Negreanu V, Eilam R, Bernstein Y, Goldenberg D, Xiao C, Fliegauf M, Kremer E, Otto F, Brenner O, Lev-Tov A and Groner Y. The Runx3 transcription factor regulates development and survival of TrkC dorsal root ganglia neurons. *The EMBO journal*. 2002; 21(13):3454-3463.
16. Fainaru O, Woolf E, Lotem J, Yarmus M, Brenner O, Goldenberg D, Negreanu V, Bernstein Y, Levanon D, Jung S and Groner Y. Runx3 regulates mouse TGF-beta-mediated dendritic cell function and its absence results in airway inflammation. *The EMBO journal*. 2004; 23(4):969-979.

17. Blyth K, Cameron ER and Neil JC. The RUNX genes: gain or loss of function in cancer. *Nature reviews Cancer*. 2005; 5(5):376-387.
18. Subramaniam MM, Chan JY, Yeoh KG, Quek T, Ito K and Salto-Tellez M. Molecular pathology of RUNX3 in human carcinogenesis. *Biochimica et biophysica acta*. 2009; 1796(2):315-331.
19. Zhang S, Wei L, Zhang A, Zhang L and Yu H. RUNX3 gene methylation in epithelial ovarian cancer tissues and ovarian cancer cell lines. *Omics : a journal of integrative biology*. 2009; 13(4):307-311.
20. Lee CW, Chuang LS, Kimura S, Lai SK, Ong CW, Yan B, Salto-Tellez M, Choolani M and Ito Y. RUNX3 functions as an oncogene in ovarian cancer. *Gynecologic oncology*. 2011; 122(2):410-417.
21. Scheitz CJ and Tumber T. New insights into the role of Runx1 in epithelial stem cell biology and pathology. *Journal of cellular biochemistry*. 2012.
22. Wotton S, Stewart M, Blyth K, Vaillant F, Kilbey A, Neil JC and Cameron ER. Proviral insertion indicates a dominant oncogenic role for Runx1/AML-1 in T-cell lymphoma. *Cancer research*. 2002; 62(24):7181-7185.
23. Robinson HM, Broadfield ZJ, Cheung KL, Harewood L, Harris RL, Jalali GR, Martineau M, Moorman AV, Taylor KE, Richards S, Mitchell C and Harrison CJ. Amplification of AML1 in acute lymphoblastic leukemia is associated with a poor outcome. *Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, UK*. 2003; 17(11):2249-2250.
24. Planaguma J, Liljestrom M, Alameda F, Butzow R, Virtanen I, Reventos J and Hukkanen M. Matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9 codistribute with

transcription factors RUNX1/AML1 and ETV5/ERM at the invasive front of endometrial and ovarian carcinoma. *Human pathology*. 2011; 42(1):57-67.

25. Keita M, Bachvarova M, Morin C, Plante M, Gregoire J, Renaud MC, Sebastianelli A, Trinh XB and Bachvarov D. The RUNX1 transcription factor is expressed in serous epithelial ovarian carcinoma and contributes to cell proliferation, migration and invasion. *Cell cycle*. 2013; 12(6):972-986.

26. Blyth K, Vaillant F, Jenkins A, McDonald L, Pringle MA, Huser C, Stein T, Neil J and Cameron ER. Runx2 in normal tissues and cancer cells: A developing story. *Blood cells, molecules & diseases*. 2010; 45(2):117-123.

27. Martin JW, Zielenska M, Stein GS, van Wijnen AJ and Squire JA. The Role of RUNX2 in Osteosarcoma Oncogenesis. *Sarcoma*. 2011; 2011:282745.

28. Pratap J, Javed A, Languino LR, van Wijnen AJ, Stein JL, Stein GS and Lian JB. The Runx2 osteogenic transcription factor regulates matrix metalloproteinase 9 in bone metastatic cancer cells and controls cell invasion. *Molecular and cellular biology*. 2005; 25(19):8581-8591.

29. Akech J, Wixted JJ, Bedard K, van der Deen M, Hussain S, Guise TA, van Wijnen AJ, Stein JL, Languino LR, Altieri DC, Pratap J, Keller E, Stein GS and Lian JB. Runx2 association with progression of prostate cancer in patients: mechanisms mediating bone osteolysis and osteoblastic metastatic lesions. *Oncogene*. 2010; 29(6):811-821.

30. Niu DF, Kondo T, Nakazawa T, Oishi N, Kawasaki T, Mochizuki K, Yamane T and Katoh R. Transcription factor Runx2 is a regulator of epithelial-mesenchymal transition and invasion in thyroid carcinomas. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. 2012; 92(8):1181-1190.

31. Kayed H, Jiang X, Keleg S, Jesnowski R, Giese T, Berger MR, Esposito I, Lohr M, Friess H and Kleeff J. Regulation and functional role of the Runt-related transcription factor-2 in pancreatic cancer. *Br J Cancer*. 2007; 97(8):1106-1115.
32. Li W, Xu S, Lin S and Zhao W. Overexpression of runt-related transcription factor-2 is associated with advanced tumor progression and poor prognosis in epithelial ovarian cancer. *Journal of biomedicine & biotechnology*. 2012; 2012:456534.
33. Sandi MJ, Hamidi T, Malicet C, Cano C, Loncle C, Pierres A, Dagorn JC and Iovanna JL. p8 expression controls pancreatic cancer cell migration, invasion, adhesion, and tumorigenesis. *Journal of cellular physiology*. 2011; 226(12):3442-3451.
34. Cano CE, Hamidi T, Sandi MJ and Iovanna JL. Nupr1: the Swiss-knife of cancer. *Journal of cellular physiology*. 2011; 226(6):1439-1443.
35. Kanamori Y, Matsushima M, Minaguchi T, Kobayashi K, Sagae S, Kudo R, Terakawa N and Nakamura Y. Correlation between expression of the matrix metalloproteinase-1 gene in ovarian cancers and an insertion/deletion polymorphism in its promoter region. *Cancer research*. 1999; 59(17):4225-4227.
36. Zhao H, Yang Z, Wang X, Zhang X, Wang M, Wang Y, Mei Q and Wang Z. Triptolide inhibits ovarian cancer cell invasion by repression of matrix metalloproteinase 7 and 19 and upregulation of E-cadherin. *Experimental & molecular medicine*. 2012; 44(11):633-641.
37. Daikoku T, Wang D, Tranguch S, Morrow JD, Orsulic S, DuBois RN and Dey SK. Cyclooxygenase-1 is a potential target for prevention and treatment of ovarian epithelial cancer. *Cancer research*. 2005; 65(9):3735-3744.

38. Purcell DJ, Khalid O, Ou CY, Little GH, Frenkel B, Baniwal SK and Stallcup MR. Recruitment of coregulator G9a by Runx2 for selective enhancement or suppression of transcription. *Journal of cellular biochemistry*. 2012; 113(7):2406-2414.
39. van der Deen M, Akech J, Lapointe D, Gupta S, Young DW, Montecino MA, Galindo M, Lian JB, Stein JL, Stein GS and van Wijnen AJ. Genomic promoter occupancy of runt-related transcription factor RUNX2 in Osteosarcoma cells identifies genes involved in cell adhesion and motility. *The Journal of biological chemistry*. 2012; 287(7):4503-4517.
40. Li H, Zhou RJ, Zhang GQ and Xu JP. Clinical significance of RUNX2 expression in patients with nonsmall cell lung cancer: a 5-year follow-up study. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*. 2013.
41. Kim DJ, Akiyama TE, Harman FS, Burns AM, Shan W, Ward JM, Kennett MJ, Gonzalez FJ and Peters JM. Peroxisome proliferator-activated receptor beta (delta)-dependent regulation of ubiquitin C expression contributes to attenuation of skin carcinogenesis. *The Journal of biological chemistry*. 2004; 279(22):23719-23727.
42. Huang Z, Cheng Y, Chiu PM, Cheung FM, Nicholls JM, Kwong DL, Lee AW, Zabarovsky ER, Stanbridge EJ, Lung HL and Lung ML. Tumor suppressor Alpha B-crystallin (CRYAB) associates with the cadherin/catenin adherens junction and impairs NPC progression-associated properties. *Oncogene*. 2012; 31(32):3709-3720.
43. Fridman JS, Rehemtulla A, Hofmann A, Blau HM and Maybaum J. Expression of Bcl-XS alters cytokinetics and decreases clonogenic survival in K12 rat colon carcinoma cells. *Oncogene*. 1998; 17(23):2981-2991.
44. Mansour M, Palese P and Zamarin D. Oncolytic specificity of Newcastle disease virus is mediated by selectivity for apoptosis-resistant cells. *Journal of virology*. 2011; 85(12):6015-6023.

45. Hishikawa K, Oemar BS, Tanner FC, Nakaki T, Luscher TF and Fujii T. Connective tissue growth factor induces apoptosis in human breast cancer cell line MCF-7. *The Journal of biological chemistry*. 1999; 274(52):37461-37466.
46. Capparelli C, Whitaker-Menezes D, Guido C, Balliet R, Pestell TG, Howell A, Sneddon S, Pestell RG, Martinez-Outschoorn U, Lisanti MP and Sotgia F. CTGF drives autophagy, glycolysis and senescence in cancer-associated fibroblasts via HIF1 activation, metabolically promoting tumor growth. *Cell Cycle*. 2012; 11(12):2272-2284.
47. Yang MH, Lin BR, Chang CH, Chen ST, Lin SK, Kuo MY, Jeng YM, Kuo ML and Chang CC. Connective tissue growth factor modulates oral squamous cell carcinoma invasion by activating a miR-504/FOXP1 signalling. *Oncogene*. 2012; 31(19):2401-2411.
48. Ofek P, Ben-Meir D, Kariv-Inbal Z, Oren M and Lavi S. Cell cycle regulation and p53 activation by protein phosphatase 2C alpha. *The Journal of biological chemistry*. 2003; 278(16):14299-14305.
49. Morrow KA, Das S, Metge BJ, Ye K, Mulekar MS, Tucker JA, Samant RS and Shevde LA. Loss of tumor suppressor Merlin in advanced breast cancer is due to post-translational regulation. *The Journal of biological chemistry*. 2011; 286(46):40376-40385.
50. Li W and Giancotti FG. Merlin's tumor suppression linked to inhibition of the E3 ubiquitin ligase CRL4 (DCAF1). *Cell cycle*. 2010; 9(22):4433-4436.
51. Lecomte C, Andujar P, Renier A, Kheuang L, Abramowski V, Mellottee L, Fleury-Feith J, Zucman-Rossi J, Giovannini M and Jaurand MC. Similar tumor suppressor gene alteration profiles in asbestos-induced murine and human mesothelioma. *Cell cycle*. 2005; 4(12):1862-1869.
52. Daikoku T, Tranguch S, Chakrabarty A, Wang D, Khabele D, Orsulic S, Morrow JD, Dubois RN and Dey SK. Extracellular signal-regulated kinase is a target of



cyclooxygenase-1-peroxisome proliferator-activated receptor-delta signaling in epithelial ovarian cancer. *Cancer research*. 2007; 67(11):5285-5292.

53. Madsen CV, Steffensen KD, Olsen DA, Waldstrom M, Sogaard CH, Brandslund I and Jakobsen A. Serum platelet-derived growth factor and fibroblast growth factor in patients with benign and malignant ovarian tumors. *Anticancer research*. 2012; 32(9):3817-3825.

54. Papacleovoulou G, Critchley HO, Hillier SG and Mason JI. IL1alpha and IL4 signalling in human ovarian surface epithelial cells. *The Journal of endocrinology*. 2011; 211(3):273-283.

55. Brard L, Lange TS, Robison K, Kim KK, Ara T, McCallum MM, Arnold LA, Moore RG and Singh RK. Evaluation of the first Ergocalciferol-derived, non hypercalcemic anti-cancer agent MT19c in ovarian cancer SKOV-3 cell lines. *Gynecologic oncology*. 2011; 123(2):370-378.

56. Sundfeldt K, Ivarsson K, Carlsson M, Enerback S, Janson PO, Brannstrom M and Hedin L. The expression of CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP) in the human ovary in vivo: specific increase in C/EBPbeta during epithelial tumour progression. *Br J Cancer*. 1999; 79(7-8):1240-1248.

57. Mann AP, Somasunderam A, Nieves-Alicea R, Li X, Hu A, Sood AK, Ferrari M, Gorenstein DG and Tanaka T. Identification of thioaptamer ligand against E-selectin: potential application for inflamed vasculature targeting. *PloS one*. 2010; 5(9).

58. Stone B, Schummer M, Paley PJ, Thompson L, Stewart J, Ford M, Crawford M, Urban N, O'Briant K and Nelson BH. Serologic analysis of ovarian tumor antigens reveals a bias toward antigens encoded on 17q. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 2003; 104(1):73-84.

59. Lu KH, Patterson AP, Wang L, Marquez RT, Atkinson EN, Baggerly KA, Ramoth LR, Rosen DG, Liu J, Hellstrom I, Smith D, Hartmann L, Fishman D, Berchuck A, Schmandt R, Whitaker R, et al. Selection of potential markers for epithelial ovarian cancer with gene expression arrays and recursive descent partition analysis. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2004; 10(10):3291-3300.
60. Li H, Bitler BG, Vathipadiekal V, Maradeo ME, Slifker M, Creasy CL, Tummino PJ, Cairns P, Birrer MJ and Zhang R. ALDH1A1 is a novel EZH2 target gene in epithelial ovarian cancer identified by genome-wide approaches. *Cancer prevention research*. 2012; 5(3):484-491.
61. Bock AJ, Stavnes HT, Kempf T, Trope CG, Berner A, Davidson B and Staff AC. Expression and clinical role of growth differentiation factor-15 in ovarian carcinoma effusions. *International journal of gynecological cancer : official journal of the International Gynecological Cancer Society*. 2010; 20(9):1448-1455.
62. Agarwal A, Tressel SL, Kaimal R, Balla M, Lam FH, Covic L and Kuliopulos A. Identification of a metalloprotease-chemokine signaling system in the ovarian cancer microenvironment: implications for antiangiogenic therapy. *Cancer research*. 2010; 70(14):5880-5890.
63. Hantke B, Harbeck N, Schmalfeldt B, Claes I, Hiller O, Luther MO, Welk A, Kuhn W, Schmitt M, Tschesche H and Muehlenweg B. Clinical relevance of matrix metalloproteinase-13 determined with a new highly specific and sensitive ELISA in ascitic fluid of advanced ovarian carcinoma patients. *Biological chemistry*. 2003; 384(8):1247-1251.

64. Alper O, Bergmann-Leitner ES, Abrams S and Cho-Chung YS. Apoptosis, growth arrest and suppression of invasiveness by CRE-decoy oligonucleotide in ovarian cancer cells: protein kinase A downregulation and cytoplasmic export of CRE-binding proteins. *Molecular and cellular biochemistry*. 2001; 218(1-2):55-63.
65. Casaburi I, Avena P, Lanzino M, Sisci D, Giordano F, Maris P, Catalano S, Morelli C and Ando S. Chenodeoxycholic acid through a TGR5-dependent CREB signaling activation enhances cyclin D1 expression and promotes human endometrial cancer cell proliferation. *Cell cycle*. 2012; 11(14):2699-2710.
66. Kinjo K, Sandoval S, Sakamoto KM and Shankar DB. The role of CREB as a proto-oncogene in hematopoiesis. *Cell cycle*. 2005; 4(9):1134-1135.
67. Duprez E. A new role for C/EBPbeta in acute promyelocytic leukemia. *Cell cycle*. 2004; 3(4):389-390.
68. Tamura K, Hua B, Adachi S, Guney I, Kawauchi J, Morioka M, Tamamori-Adachi M, Tanaka Y, Nakabeppu Y, Sunamori M, Sedivy JM and Kitajima S. Stress response gene ATF3 is a target of c-myc in serum-induced cell proliferation. *The EMBO journal*. 2005; 24(14):2590-2601.
69. Lehtinen L, Ketola K, Makela R, Mpindi JP, Viitala M, Kallioniemi O and Iljin K. High-throughput RNAi screening for novel modulators of vimentin expression identifies MTHFD2 as a regulator of breast cancer cell migration and invasion. *Oncotarget*. 2013; 4(1):48-63.
70. Taraboletti G, Rusnati M, Ragona L and Colombo G. Targeting tumor angiogenesis with TSP-1-based compounds: rational design of antiangiogenic mimetics of endogenous inhibitors. *Oncotarget*. 2010; 1(7):662-673.

71. Karnezis T, Shayan R, Fox S, Achen MG and Stacker SA. The connection between lymphangiogenic signalling and prostaglandin biology: a missing link in the metastatic pathway. *Oncotarget*. 2012; 3(8):893-906.
72. Yamaoka T, Fujimoto M, Ogawa F, Yoshizaki A, Bae SJ, Muroi E, Komura K, Iwata Y, Akiyama Y, Yanaba K, Shimizu K and Sato S. The roles of P- and E-selectins and P-selectin glycoprotein ligand-1 in primary and metastatic mouse melanomas. *Journal of dermatological science*. 2011; 64(2):99-107.
73. Okada-Ban M, Moens G, Thiery JP and Jouanneau J. Nuclear 24 kD fibroblast growth factor (FGF)-2 confers metastatic properties on rat bladder carcinoma cells. *Oncogene*. 1999; 18(48):6719-6724.
74. Nakanishi K, Yoshimoto T, Tsutsui H and Okamura H. Interleukin-18 is a unique cytokine that stimulates both Th1 and Th2 responses depending on its cytokine milieu. *Cytokine & growth factor reviews*. 2001; 12(1):53-72.
75. Yan C and Boyd DD. ATF3 regulates the stability of p53: a link to cancer. *Cell cycle*. 2006; 5(9):926-929.
76. Sternlicht MD and Werb Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annual review of cell and developmental biology*. 2001; 17:463-516.
77. Vergote I, Rustin GJ, Eisenhauer EA, Kristensen GB, Pujade-Lauraine E, Parmar MK, Friedlander M, Jakobsen A and Vermorken JB. Re: new guidelines to evaluate the response to treatment in solid tumors [ovarian cancer]. *Gynecologic Cancer Intergroup*. *Journal of the National Cancer Institute*. 2000; 92(18):1534-1535.
78. L'Esperance S, Bachvarova M, Tetu B, Mes-Masson AM and Bachvarov D. Global gene expression analysis of early response to chemotherapy treatment in ovarian cancer spheroids. *BMC genomics*. 2008; 9:99.

79. Mercier PL, Bachvarova M, Plante M, Gregoire J, Renaud MC, Ghani K, Tetu B, Bairati I and Bachvarov D. Characterization of DOK1, a candidate tumor suppressor gene, in epithelial ovarian cancer. *Molecular oncology*. 2011; 5(5):438-453.
80. Keita M, Bachvarova M, Morin C, Plante M, Gregoire J, Renaud MC, Sebastianelli A, Trinh XB and Bachvarov D. The RUNX1 transcription factor is expressed in serous epithelial ovarian carcinoma and contributes to cell proliferation, migration and invasion. *Cell cycle*. 2013; 12(6).
81. Tetu B, Popa I, Bairati I, L'Esperance S, Bachvarova M, Plante M, Harel F and Bachvarov D. Immunohistochemical analysis of possible chemoresistance markers identified by micro-arrays on serous ovarian carcinomas. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc.* 2008; 21(8):1002-1010.

#### **4.3.8. FIGURE LEGENDS**

**Figure 4.1** BSP analysis of the methylation status of RUNX2 in grade 3 primary serous EOC tumors compared to omental metastases. Filled circles represent methylated CpGs and open circles represent unmethylated CpGs. CpG plot of the analyzed region is also presented (CpGs are displayed with vertical marks). The indicated positions on the CpG plot represent the number of nucleotides stretching upstream of the first exon of the RUNX2 gene.

**Figure 4.2** Analysis of RUNX2 expression in serous EOC tumors by IHC. A. Representative IHC images of RUNX2 protein expression in normal ovarian tissues, LMP tumors, high-grade tumors and omental metastases. B. Box-plot presentation of RUNX2

protein expression levels in normal ovarian tissues, LMP tumors, high-grade tumors and omental metastases.

**Figure 4.3** Analysis of RUNX2 expression in SKOV3 cells. A. Semi-quantitative duplex RT-PCR analysis of RUNX2 mRNA expression levels in the shRNA-RUNX2 clones (sh-cl3, sh-cl6), compared to the mock-transfected clone control (ctrl). The 18S ribosomal RNA gene was used as internal standard. B. Western-blot analysis of RUNX2 protein expression in the shRNA-RUNX2 clones, compared to the mock-transfected clone ctrl.  $\beta$ -actin was used as a loading control.

**Figure 4.4** ShRNA-mediated knockdown of the RUNX2 expression in SKOV3 cells: A, effect on cell proliferation; B. Representative images of colony forming assays following RUNX2 knockdown.

**Figure 4.5** Effect of RUNX2 knockdown on SKOV3 cell migration and invasion. A. Migration was assessed using Boyden-chamber assay. Cells from the shRNA-RUNX clones (sh-cl3, sh-cl6) and the control clone control (ctrl) were seeded into the upper chambers in 0.1% FBS containing medium at a density of  $2.5 \times 10^4$  per well, and 600  $\mu$ l of 1% FBS containing medium was placed in the lower chamber as a chemoattractant. After 24 h at 37°C in 5% CO<sub>2</sub>, the cells were fixed with cold methanol and stained with blue trypan solution. Migrated cells on the underside of the filter were photographed and counted by phase contrast microscopy. B. Cell invasion was assayed in a similar way, except that the upper chambers were coated with Matrigel. Here, NIH3T3 conditioned medium was added in the lower chamber as a chemoattractant (see Materials and Methods for details). All experiments were performed in triplicate. For each experiment, cell number was calculated as the total count from 10 random fields per filter (at magnification  $\times 40$ ).

Differences between shRNA-RUNX2-clones and control clone SKOV3 cells were determined by a Student's t-test, where  $p < 0.05$  was considered significant.

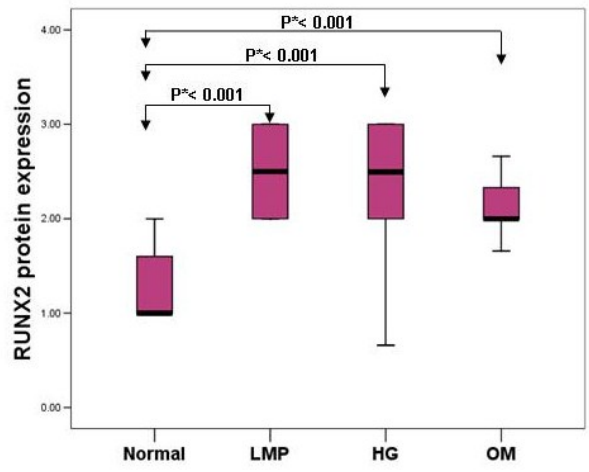
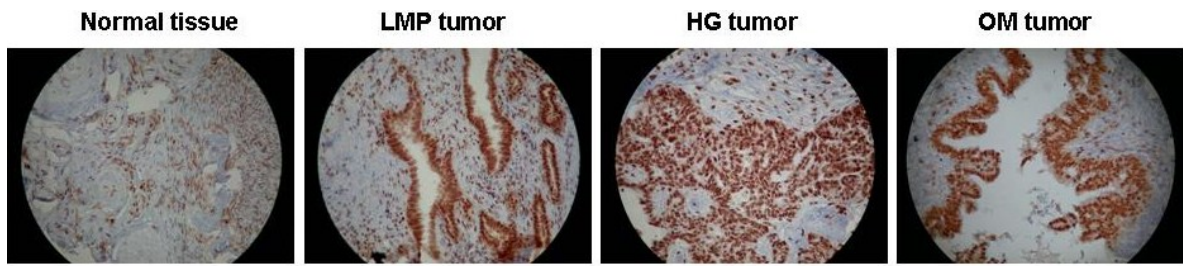
**Figure 4.6** Functional analysis for a dataset of differentially expressed genes ( $\geq 2$ -fold) following RUNX2 suppression in SKOV3 cells. A. Functional analysis of upregulated genes; B. Functional analysis of downregulated genes. Top functions that meet a p-value cutoff of 0.05 are displayed.

**Figure 4.7** Network analysis of dynamic gene expression in SKOV3 cells based on the 2-fold common gene expression list obtained following shRNA-mediated RUNX2 knockdown. A. Upregulated networks; B. Downregulated networks. The five top-scoring networks for each cell line were merged and are displayed graphically as nodes (genes/gene products) and edges (the biological relationships between the nodes). Intensity of the node color indicates the degree of up- (red) or downregulation (green). Nodes are displayed using various shapes that represent the functional class of the gene product (square, cytokine, vertical oval, transmembrane receptor, rectangle, nuclear receptor, diamond, enzyme, rhomboid, transporter, hexagon, translation factor, horizontal oval, transcription factor, circle, other). Edges are displayed with various labels that describe the nature of relationship between the nodes: — binding only,  $\rightarrow$  acts on. The length of an edge reflects the evidence supporting that node-to-node relationship, in that edges supported by article from literature are shorter. Dotted edges represent indirect interaction.

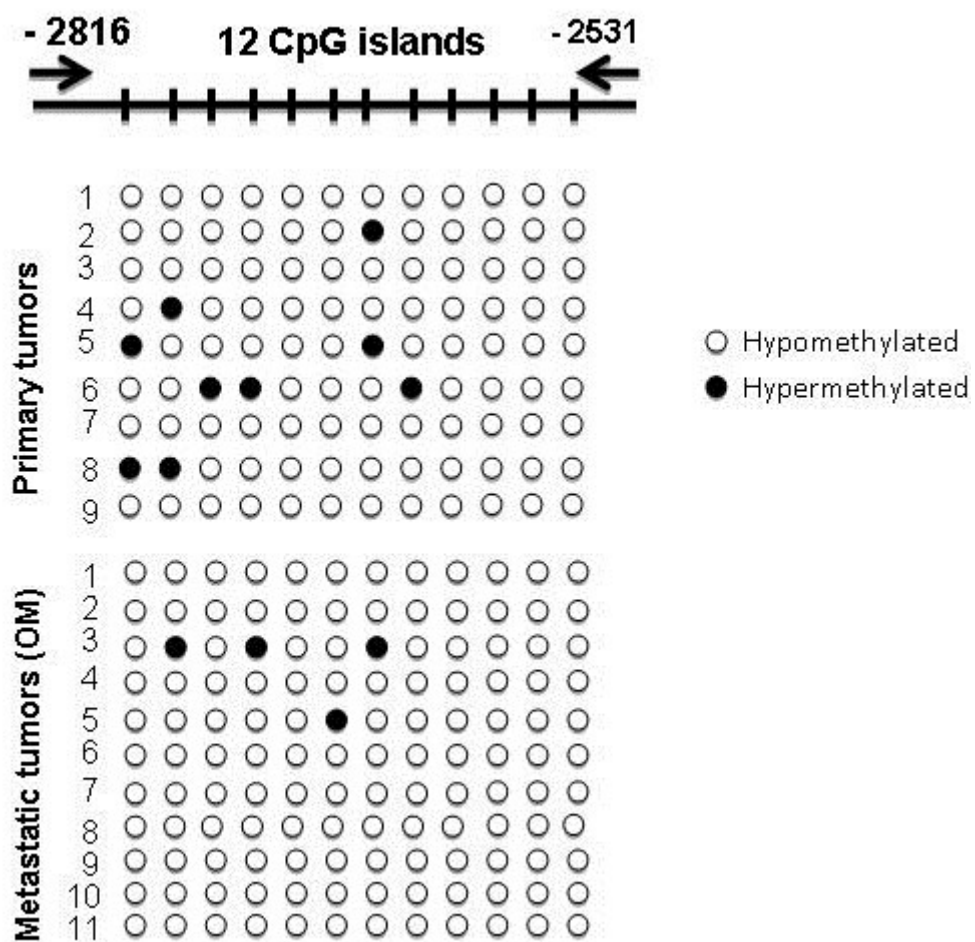
**Figure 4.8** Comparison of common and distinct gene expressions across the various differentially-expressed gene groups upon RUNX1 and RUNX2 knockdown in SKOV3 cells: A. Venn diagram analyses of the differentially expressed genes upon RUNX1 and RUNX2 knockdown in SKOV3 cells. B. Hierarchical clustering based on the 95-genes list (2-fold difference in gene expression; p-value cutoff of 0.05) that discriminates

differentially-expressed genes in SKOV3 cells upon RUNX1 and RUNX2 knockdown. Red signifies up-regulation, and green signifies down-regulation. C. IPA functional pathway analyses of genes, differentially expressed in SKOV3 cells upon RUNX1 and RUNX2 knockdown, based on the 95-genes list generated upon the clustering analysis.

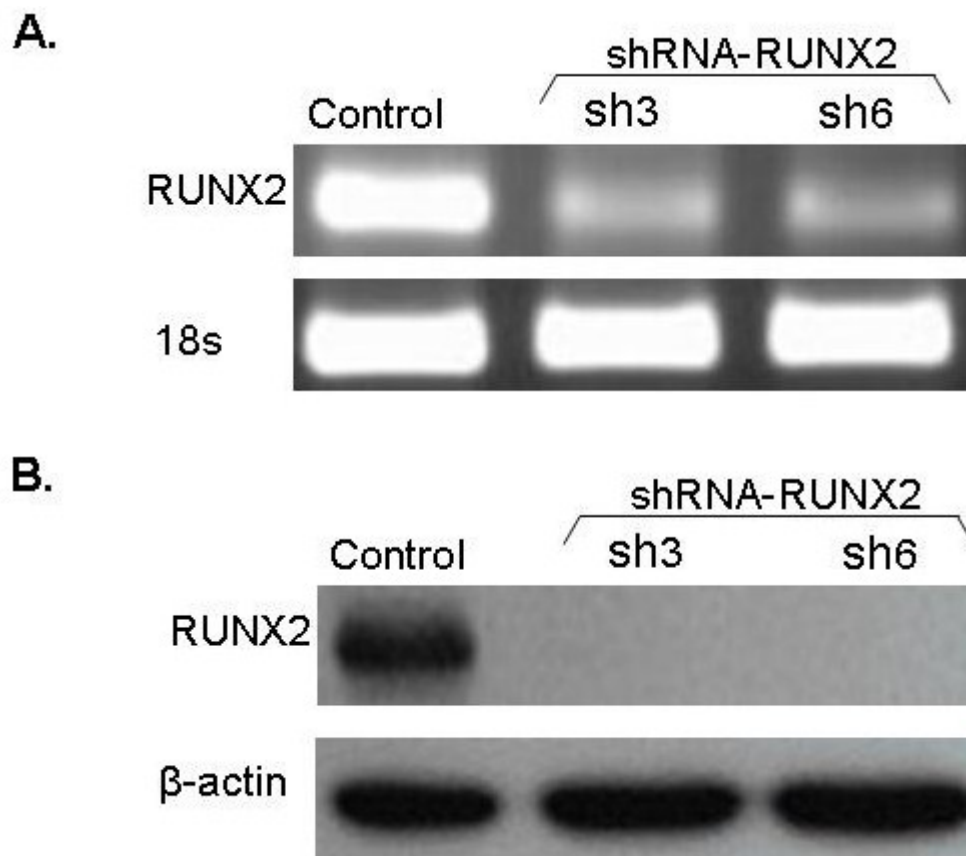




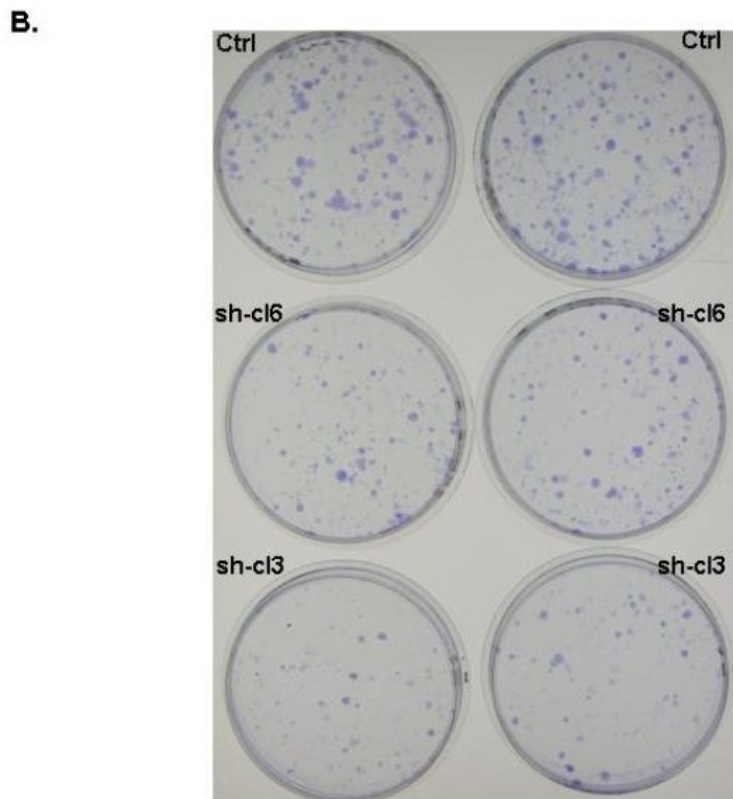
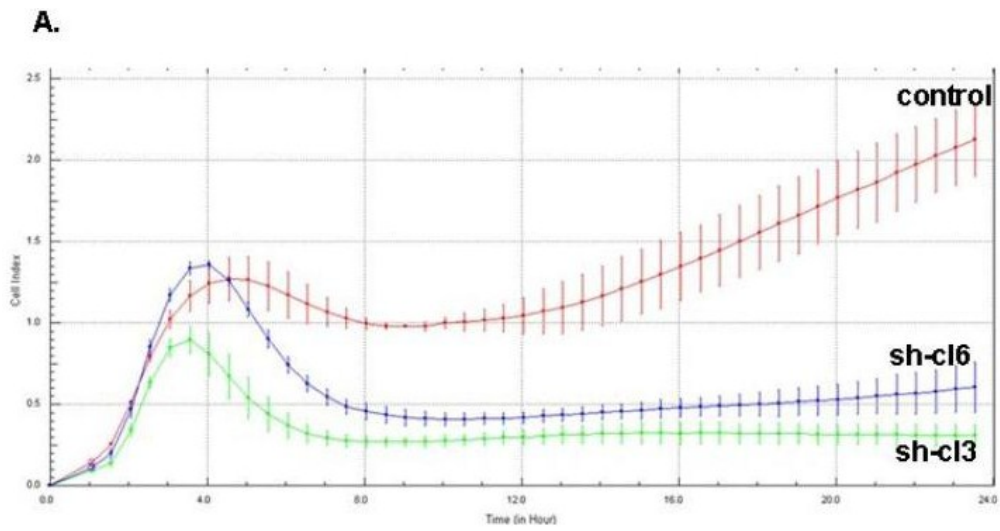
**Figure 4.1** Analysis of RUNX2 expression in serous EOC tumors by IHC.



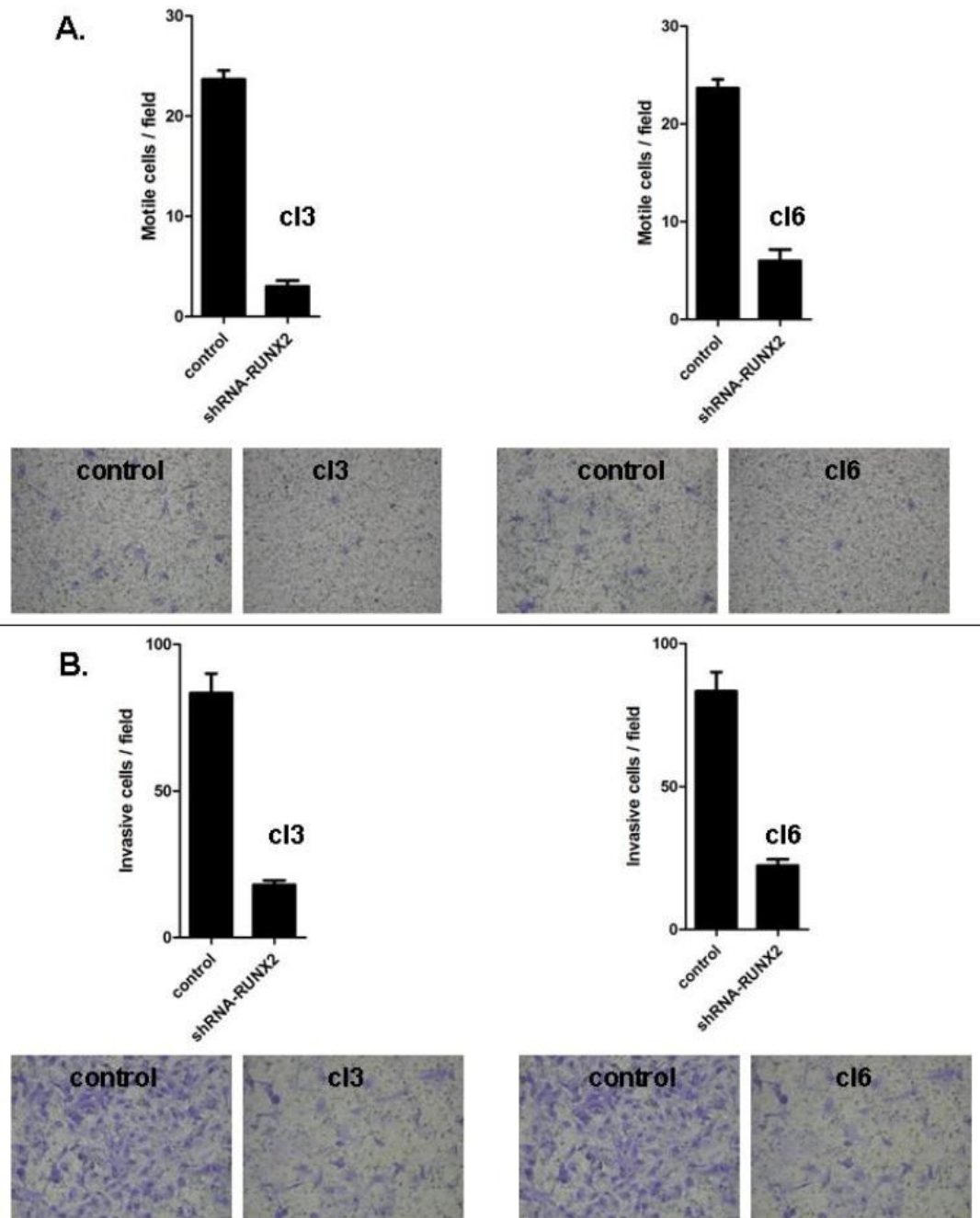
**Figure 4.2** BSP analysis of the methylation status of RUNX2 in grade 3 primary serous EOC tumors compared to omental metastases.



**Figure 4.3** ShRNA-mediated knockdown of the RUNX2 expression in SKOV3 cells.

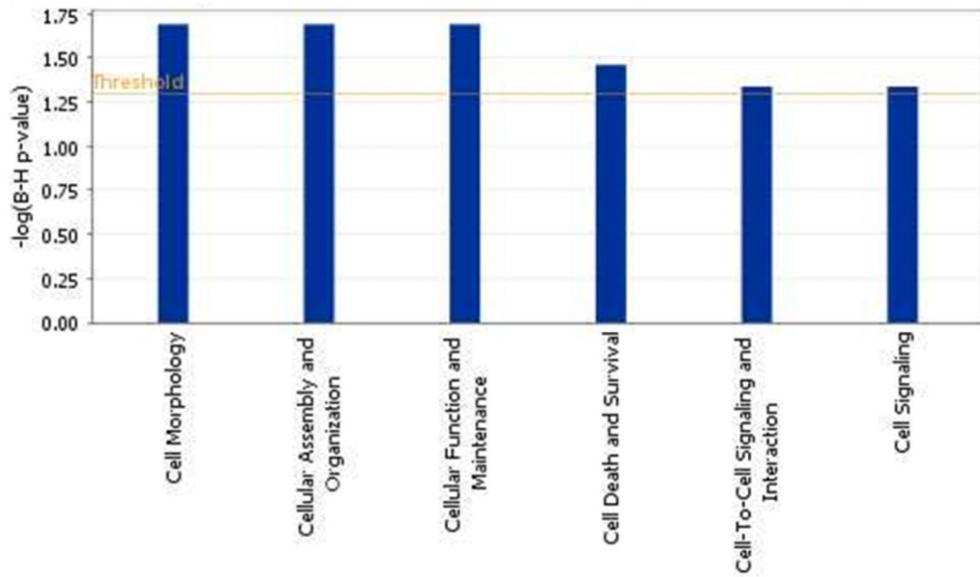


**Figure 4.4** Effect of RUNX2 knockdown on SKOV3 cell proliferation and colony formation.

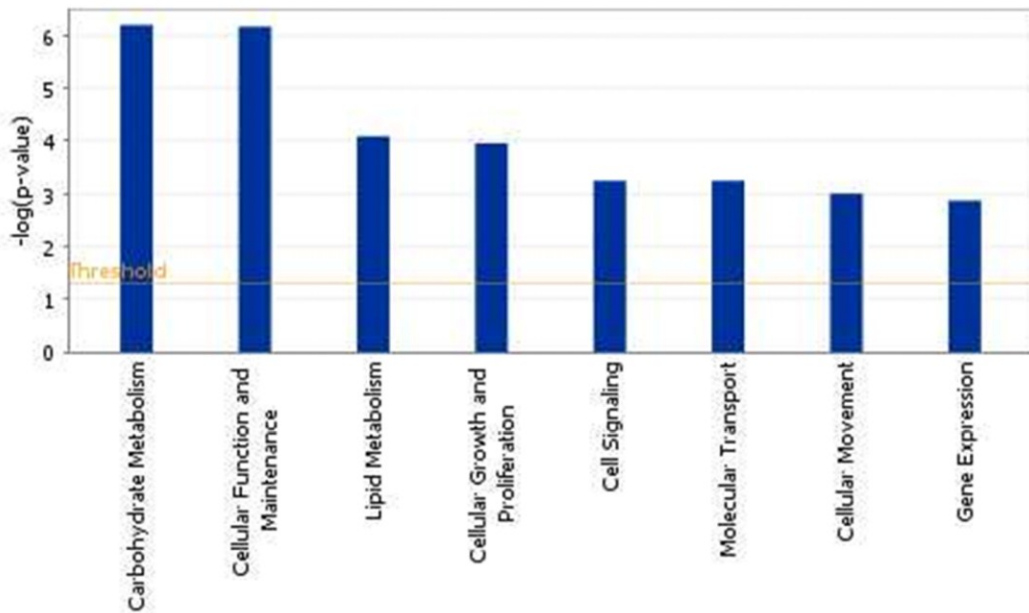


**Figure 4.5** Effect of RUNX2 knockdown on SKOV3 cell migration and invasion.

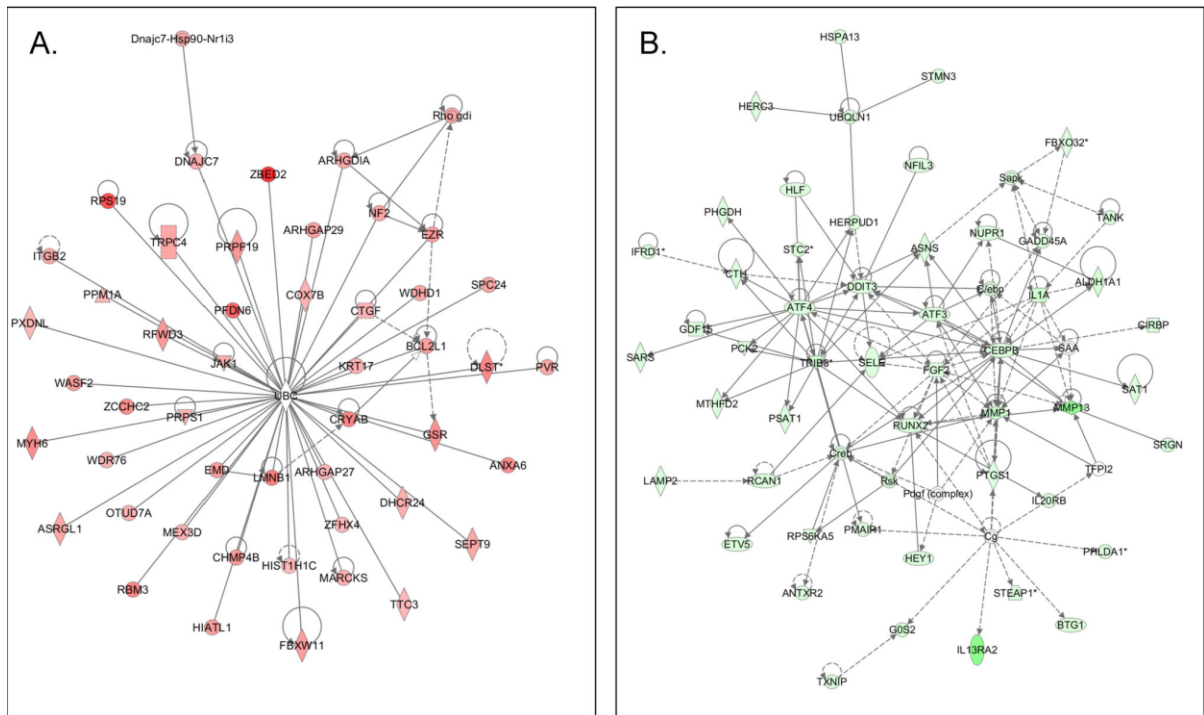
A. Pathways, upregulated upon RUNX2 knockdown in SKOV3 cells



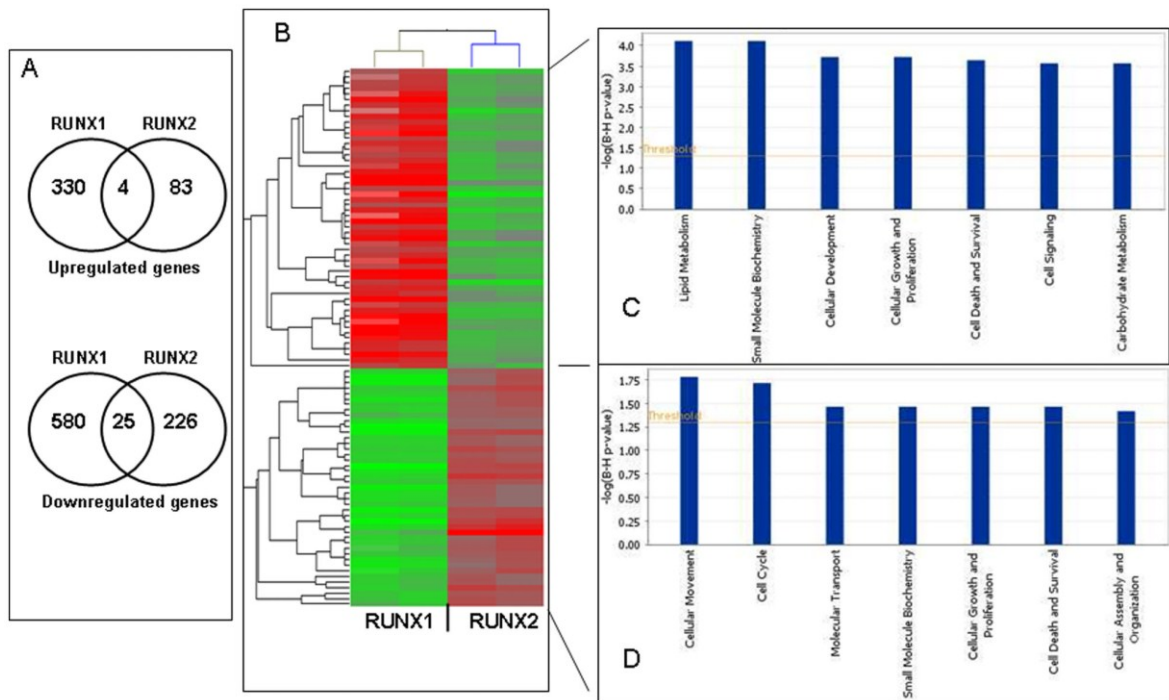
B. Pathways, downregulated upon RUNX2 knockdown in SKOV3 cells



**Figure 4.6** Functional analysis for a dataset of differentially expressed genes ( $\geq 2$ -fold) following RUNX2 suppression in SKOV3 cells.



**Figure 4.7** Network analysis of dynamic gene expression in SKOV3 cells based on the 2-fold common gene expression list obtained following shRNA-mediated RUNX2 knockdown.



**Figure 4.8** Comparison of common and distinct gene expressions across the various differentially-expressed gene groups upon RUNX1 and RUNX2 knockdown in SKOV3 cells.



### 4.3.9. TABLES

**Tableau 4.1** Patients' characteristics.

Variable	Range	n/total	%
Age (years)	< 50	18/130	14.0
	50-60	66/130	50.9
	> 70	46/130	35.1
Median age	64		
Tissue/tumor type	Normal	13/130	10.0
	LMP	13/130	10.0
	High-grade	52/130	40.0
	OM	52/130	40.0
Stage	III (A, B and C)	69/130	53.0
	IV	30/130	23.0
PFS (months)*	0-6	43/99	43.4
	7-24	35/99	35.4
	> 25	21/99	21.2

#### **A. Upregulated genes**

metabolism	<i>BC006267, BC035691, CILP, COX7A1, COX7B, DHCR24, DLST, GALNT14, GNTIVH, PRPS1, SORL1</i>
signal transduction	<i>ADAM18, ANXA6, , FBXW11, GPR110, LRRC17, PDAP1, PDZK1IP1, SEPT9, WDR76, WNT6, WNT7A</i>
cell morphology	<i>ARHGDI1, EMD, KRT17, LMNB1, LOC201175, MYH6, VIL2, WASF2</i>
apoptosis	<i>BCL2L1, CRYAB, CTGF, EZR, JAK1, HFK4, HIST1H1C, ITGB2</i>
regulation of transcription	<i>AY517556, EYA4, NEUROG3, ZCCHC2, ZFHX4, ZNF467</i>
ubiquitination	<i>BC018548, CGI-301, C15orf16, RFWD3, RKHD1, TTC3</i>

#### **B. Downregulated genes**

metabolism	<i>ACAT1, ACOX2, AK096526, ALDH1A1, ANGPTL4, ASNS, B3GALT3, BPNT1, CARS, CPE, CTH, DDX50, DHRS2, DMGDH, HSD17B12, ISOC1, KYNU, LOC440138, MARS, MLSTD2, MMP1, MMP13, MMP19, MTHFD2, NAALADL1, PCK2, PHGDH, PPP1CB, PSAT1, PTGS1, RBPI, SAT, SENP7, SERPINA5, SHMT2, SORD</i>
cell growth & proliferation	<i>ADRA2A, BTG1, CLK1, CNN1, COVA1, DDIT3, EPS8, FGF2, FRMD4A, G0S2, GADD45A, GDF15, HIST1H1A, IL1A, JEM-1, KIF3B, MORF4L2, P8, POLI, POPDC2, PRKRIR, RPS6KA5, SEPT10, SLAH1, TUBB1</i>
regulation of transcription	<i>AF024709, ATF1, ATF4, BX538289, CMPX1, ETV5, HEY1, HLF, LOC340501, NFE2, PHLDA1, RCOR3, RUNX2, TBX15, TSC22D1, ZFP90, ZNF140, ZNF146, ZNF22, ZNF354C, ZNF396, ZNF441, ZNF451, ZNF639</i>

signal transduction	<i>ANTXR2, CNIH3, DSCRI, ECT2, GRINL1A, IL13RA2, MAPK9, MRFAP1, MRFAP1L1, PRKARIA, PTGES3, RAGE, RASSF6, STC2, STMN3, TANK, TRIB3, TXNIP, TXNRD1, UNC5B</i>
transport	<i>FLJ35848, HRC11236, KCNE3, RBP4, SLC40A1, SLC9A9, STEAP1, STX6, TARS, TOM1L1, TRPA1, TRPM8, VPS13B</i>
immune & inflammatory response	<i>CD48, CEBPB, CFH, , CFH, CFHL1, CFHL3, CXCL12, IF, MIG-6, NFIL3, PRKRA, PTX3, SELE, SEPP1</i>
ubiquitination	<i>FBXO32, FBXO4, FTS, HERC3, LOC51136, RKHD2, RNF34, RNF6, TRIM4, TRIM40</i>

\*Extended follow-up, including PFS values, were available for 99 patients.

**Tableau 4.2** Selected differentially expressed gene groups in SKOV3 cells upon RUNX2 knock-down.

**Tableau 4.3** Semi-quantitative RT-PCR validation of microarray data.

Gene	Common name	Fold expression	
		Microarray data	sqRT-PCR
PCDH9	protocadherin 9	+4.62	+5.46
DEFB1	defensin, beta 1	+3.84	+2.01
MMP13	matrix metalloproteinase 13	-15.70	-4.23
MMP1	matrix metalloproteinase 1	-7.30	-2.55
IL1A	interleukin 1, alpha	-6.71	-1.89
CXCL12	chemokine (C-X-C motif) ligand 12	-6.13	-1.68
ALDH1A1	aldehyde dehydrogenase 1 family, member A1	-6.02	-2.76
CFH	complement factor H	-5.85	-3.57
TUBB1	tubulin, beta 1	-5.38	-2.33

#### 4.3.9. SUPPLEMENTAL FIGURE: isoforms of *RUNX2*.



**Supplemental figure 4.9** Genomic structure of the *RUNX2* gene, isoforms a, b and c. The CpG island (CpG 60) containing the analyzed 12 putative CpG methylation targets is indicated with arrow.

## **5. Discussion**

Le cancer de l'ovaire qui compte 4% des cas de cancer chez la femme, constitue la principale cause de mort de source gynécologique. Cela s'explique pour plusieurs raisons notamment l'absence de symptômes précoces chez les femmes atteintes. Celles-ci sont le plus souvent diagnostiquées avec une maladie avancée, difficile à traiter et qui possède un taux de récurrence élevé avec chimiorésistance. Il s'avère nécessaire et urgent de trouver un moyen de parvenir à la détection précoce de cette maladie. Ainsi, la découverte de biomarqueurs offrirait une avenue intéressante pour réaliser cet objectif. En effet, la découverte d'un simple gène associé à l'initiation du cancer ovarien lors d'un test de dépistage permettrait un diagnostic précoce. Les modifications épigénomiques dont la méthylation de l'ADN, sont impliquées dans l'initiation, la progression et la chimiorésistance de plusieurs cancers dont le cancer de l'ovaire. L'hyperméthylation des îlots CpG de la région promotrice des gènes est très souvent liée à l'inactivation des gènes suppresseurs de tumeur. Parallèlement, l'hypométhylation est associée à l'activation des oncogènes. Ainsi, la méthylation aberrante spécifique de gène au cours du cancer pourrait servir d'indice pour découvrir de nouveaux suppresseurs de tumeurs et oncogènes pouvant servir de biomarqueurs. Pour cela, nous avons réalisé l'immunoprécipitation de l'ADN méthylé suivi de l'analyse sur puce (MeDIP-Chip) afin d'étudier, à haute résolution, le profil de méthylation aberrante de l'ADN dans le cancer de l'ovaire de sous-type séreux. Le choix du sous-type séreux s'explique par sa fréquence en clinique (environ 70% des patientes). Nous avons comparé, par rapport à cinq échantillons des tissus normaux, le profil de méthylation de cinq échantillons de chaque sous-groupe dont les tumeurs faibles à potentiel de malignité BL, les tumeurs G1; SIII/IV, les tumeurs G3; SI et les tumeurs G3;

SIII/IV. Le criblage épigénomique des gènes candidats hyper ou hypométhylés sur les ADN extraits des différents échantillons a été réalisé en utilisant des biopuces  $1 \times 244K$  contenant 27 800 ilots GpG (Agilent Technologies). L'analyse a été faite sur la liste des gènes surexprimés 1.5 fois avec une valeur de p pour le t-test inférieure à 0.01.

### **5.1. L'hyperméthylation aberrante de l'ADN est associée à tous les grades/stades des tumeurs séreuses du CEO et cible préférentiellement les gènes de développement.**

Le criblage épigénomique sur cinq échantillons de sous-type séreux de chaque groupe a montré un profil d'hyperméthylation aberrante globale de 314 gènes dans les BL, 241 dans G1; SIII/IV, 433 dans G3; SI et 357 dans G3; SIII/IV (**Tableau 2.1**). L'analyse des fonctions de ces gènes, par le logiciel bioinformatique Ingenuity Pathway Analysis (IPA) a montré que la majorité des gènes sont impliqués dans le développement, l'expression génique, la prolifération, la croissance et le cycle cellulaire (**Figure 2.1 B**). Il ressort de ce profil une très grande différence d'hyperméthylation entre les tissus normaux et les tissus tumoraux et que l'hyperméthylation étant un événement très précoce dans le groupe BL, malgré que G3 ait un niveau d'hyperméthylation plus élevé. La majorité des gènes hyperméthylés dans les différents sous-groupes sont des gènes régulateurs du développement avec respectivement 87%, 55,5%, 78,1% et 82,9% pour BL, G1; SIII/IV, G3; SI et G3; SIII/IV (**Tableau 2.1**). Cette fréquence élevée d'hyperméthylation des gènes de développement a été par ailleurs retrouvée dans les autres types de cancer comme le cancer du poumon (Rauch et al., 2007), du cerveau (Wu et al., 2010), du sein (Tommasi et al., 2009), du colorectum (McGarvey et al., 2008), de la prostate (Truong et al., 2012) et des lymphomes (Bennett et al., 2009). Parmi les gènes de développement, les gènes à domaine homéobox étaient les plus représentés dont *HOXA9*, *HOXA10*, *HOXA11*, *SOX1*,

*PAX1* et *LMX1A*. Ces gènes ont été décrits dans la littérature comme étant méthylés dans le CEO, certains pouvant être utilisés comme des biomarqueurs potentiels pour le diagnostic et le pronostic de la maladie (Montavon et al., 2012). Les sites d'hyperméthylation dans les différents groupes de tumeurs ont montré par l'analyse bioinformatique, une corrélation significative avec les sites de méthylation triple de H3K27 (une modification répressive de chromatine) dans les cellules souches (**figure supplémentaire 2.6**). Récemment, des études ont montré une triméthylation de la lysine 27 de l'histone H3 (H3K27me3) dans les cellules souches embryonnaires pluripotentes et dans les cellules cancéreuses (Sparmann and van Lohuizen, 2006). Cette marque épigénétique est associée à la répression réversible des gènes régulateurs du développement par les complexes répressifs polycomb (CRPs) dans les cellules souches embryonnaires. Dans les cellules cancéreuses, H3K27me3 est plutôt associée à la répression permanente de ces gènes de développement par hyperméthylation de l'ADN (Bracken et al., 2006; Squazzo et al., 2006; Widschwendter et al., 2007). Les publications récentes ont montré que les cibles des CRPs des cellules souches ont 12 fois plus de probabilité d'être hyperméthylées dans les cellules tumorales au niveau de leur promoteur que les gènes non ciblés. Ces mêmes données suggèrent que les gènes affectés par la méthylation de l'ADN au cours de la tumorigénèse sont pré-marqués par les protéines CRPs de la chromatine répressive H3K27me3. Cela suggère que cette modification de la chromatine dirige l'établissement de profils de méthylation de l'ADN spécifique du cancer (Widschwendter et al., 2007). Cela expliquera le nombre abondant de gènes de développement dans nos résultats; ces gènes étant déjà hyperméthylés de façon précoce au cours de la tumorigénèse ovarienne (dans les tumeurs BL). Ces résultats supportent l'hypothèse des cellules souches comme étant à l'origine du cancer dans lesquelles la répression génique réversible par les CRPs au niveau de la chromatine est

remplacée par une répression permanente des gènes de développement par ajout de la méthylation de l'ADN. Ces deux signatures épigénétiques par méthylation, au niveau de la chromatine et de l'ADN, condamnent les cellules cancéreuses à un état perpétuel d'auto-renouvellement menant à une transformation maligne subséquente (Wu et al., 2010).

## **5.2. L'hypométhylation aberrante de l'ADN est associée à la phase avancée de la maladie.**

Après criblage épigénomique, nous avons observé un profil d'hypométhylation aberrante globale de 9 dans G1; SIII/IV, 118 dans G3; SI et 459 dans G3; SIII/IV (**Tableau 2.1**). L'analyse fonctionnelle de ces gènes par IPA a montré que la majorité des gènes sont impliqués dans la signalisation cellule-cellule, l'organisation et l'assemblage cellulaire, l'expression génique, le transport des molécules et la mort cellulaire (**Figure 2.1 D**). La plupart de ces gènes sont impliqués dans les mécanismes de tumorigénèse, d'invasion, de migration cellulaire et de métastase, y compris ceux du CEO (**Tableau 2.2**). Contrairement à l'hyperméthylation, l'hypométhylation de l'ADN n'a été observée que dans les tumeurs séreuses de haut grade (G3). Cette observation a été confirmée en utilisant la même approche épigénomique pour étudier le profil de méthylation dans les cellules primaires de tumeurs ovariennes isolées des patientes, avant et après leur chimiothérapie. Ces deux patientes présentent le CEO avancé (G3; SIII/IV). L'avantage de travailler dans un contexte génétiquement identique est qu'il a été possible d'éliminer tout le bruit de fond provenant des variations interindividuelles. Ainsi, la comparaison de deux paires de cellules primaires ovariennes, prélevées avant et après la chimiothérapie chez les mêmes patientes a permis d'identifier un profil de méthylation similaire avec un profil d'hypométhylation évidente



dans les échantillons post-chimiothérapie. Les gènes identifiés, au nombre de 46, sont impliqués dans la survie, l'invasion et la prolifération cellulaire (**Figure 2.4 A**). Ces observations confirment davantage l'association d'une hypométhylation massive de l'ADN en lien avec la sévérité et la progression de la maladie. Nos résultats confirment ceux obtenus dans le cancer du foie portant sur 11 patients, avec identification de 3 700 gènes hypométhylés. Ces gènes étant principalement impliqués dans la croissance cellulaire, l'adhésion cellulaire et la communication, mobilité et invasion (Stefanska et al., 2011). Ainsi, comme décrit dans le chapitre 2, notre étude a montré pour la première fois que le rôle aberrant de l'hypométhylation dans la progression du CEO et plus spécifiquement le rôle de l'hypométhylation de l'ADN dans l'induction des oncogènes et des gènes prométastatiques du CEO. L'hypométhylation observée de ces gènes pourrait être expliquée en partie l'échec de la thérapie épigénétique des agents déméthylants l'ADN dans les tumeurs solides notamment le CEO. Actuellement, les agents déméthylants sont de plus en plus utilisés dans le traitement du cancer y compris le cancer de l'ovaire (Matei and Nephew, 2010). Toutefois, à l'instar de d'autres drogues épigénétiques telles que les inhibiteurs d'histone déacétylase (HDAC), une validation complète des données pour tester l'efficacité clinique des approches épigénétiques restent à établir. En outre, nos données soulèvent la crainte que les médicaments déméthylants, utilisés au cours de la phase avancée du CEO puisse avoir des effets néfastes liés à l'activation d'oncogènes et des gènes prométastatiques. Ainsi, et comme suggéré récemment (Stefanska et al., 2011), la machinerie de déméthylation de l'ADN pourrait servir comme nouvelle approche thérapeutique contre le cancer y compris le CEO de type séreux.

### **5.3. Le profilage de la méthylation aberrante de l'ADN dans le CEO a permis l'identification de nouveaux gènes méthylés comme biomarqueurs potentiels de la progression tumorale.**

En utilisant l'approche PCR par séquençage après conversion au bisulfite (BSP), nous avons confirmé le statut d'hyperméthylation de plusieurs gènes à domaine homéobox qui sont significativement méthylés. Il s'agit des gènes *POU4F2*, *OTX2*, *RAX*, *BARHL2*, *HOXD3*, *FOXE1*, *SOX14*, *FOXB2* (figure supplémentaire 2.3.10.1). L'hyperméthylation de ces gènes dans le CEO n'a pas encore été reportée. Quant au gène *FOXB2*, son hyperméthylation n'a jamais été décrite dans le cancer. On a identifié 132 gènes hyperméthylés dans tous les sous-groupes. L'analyse par IPA a également montré qu'environ la moitié (n = 63) est fonctionnellement liée aux mécanismes de l'apoptose avec une fonction potentielle de gène suppresseur de tumeur. Parmi ces gènes, on note *AIM1*, *AKAP12*, *CDKN2A*, *CYP1B1*, *FOXF2*, *HOXA9*, *HOXA10*, *IRX1*, *NRN1* et *SSTR1*. Des études antérieures ont déjà démontré l'hyperméthylation des gènes *CDKN2A*, *HOXA9* et *HOXA10* dans le CEO (Abou-Zeid et al., 2011; Wu et al., 2007).

En plus des gènes régulateurs du développement, notre approche épigénomique couplée au BSP, a également conduit à l'identification de plusieurs nouveaux gènes hyperméthylés dans le CEO de type séreux. Parmi ces gènes, on note *TNK1*, *DMRT3*, *LECT1*, *TUBB6*, *CADPS*, *GRK7*, *NETO1*, *LAMB1*, *HSPA1A*, *HSPAIL* et *PCDH17* (Figure 2). Certains de ces gènes, comme *TNK*, *DMRT3*, *LECT1*, *LAMB1*, *PCDH17*, *CADPS* et *TUBB6*, sont potentiellement des gènes suppresseurs de tumeurs. Des études ont montré que la perte d'expression de ces gènes dans les tumeurs est souvent associée au pronostic moins favorable (Haruki et al.; Iwamoto et al., 1987; Kang et al.; Leandro-Garcia et al.; May et

al.; Mera et al., 2009; Miller et al.). À l'exception de *PCDH17* (Haruki et al.), ces gènes n'ont jamais été reportés comme hyperméthylés dans les cancers humains.

La validation du statut de méthylation par BSP a permis également d'identifier de nouveaux gènes cibles de l'hypométhylation dans la phase avancée du CEO séreux. Ces gènes comprennent *TGFBIII*, *GALNT3*, *BCAT1*, *ARC* et *CAPS* (**Figure 2.3**). Le rôle de ces gènes dans l'étiologie du CEO demeure encore inconnu. Cependant, *TGFBIII*, *GALNT3* et *BCAT1* sont déjà connus comme impliqués dans l'invasion tumorale et les métastases dans d'autres types de cancers (Deakin and Turner, 2011; Inoue et al., 2007; Yoshikawa et al., 2006). En plus, *CAPS* a été caractérisé comme un nouveau marqueur potentiel du cancer de l'endomètre (Voisin et al., 2011). Nous avons, par la suite, validé le statut de méthylation par BSP (**Figure 2.4 B**) et l'expression génique par la RT-PCR semi-quantitative de quatre gènes qui sont hypométhylés dans les échantillons post-chimiothérapeutiques. Il s'agit de *RUNX1*, *RUNX2*, *EPSTII* et *ELL3* (**Figure 2.4 C**) qui sont connus pour leur rôle dans la croissance tumorale, l'invasion et la métastase (de Neergaard et al., 2010; Doll et al., 2009; Johnstone et al., 2001; Pratap et al., 2005).

Cette étude a permis d'identifier de nouvelles cibles épigénétiques qui permettront de caractériser de nouveaux biomarqueurs efficaces pour le pronostic et la thérapeutique au cours de la prise en charge du cancer de l'ovaire.

#### **5.4. L'expression de RUNX1 dans les tumeurs ovariennes est associée à la prolifération avec arrêt du cycle cellulaire en phase G1, à l'invasion et à la métastase.**

Dans le chapitre précédent, nous avons identifié *RUNX1* comme hypométhylé et surexprimé dans des cultures primaires de cellules post-CT par rapport aux cellules

correspondantes pré-CT provenant de deux patientes du CEO de type séreux. Par la suite, nous avons évalué son expression dans les tissus cancéreux de l'ovaire. Nos micropuces à tissus (TMA) comportent, en triplicata, 117 tumeurs séreuses, dont 13 à faible potentiel de malignité ou borderline (LMP). Chaque sous-groupe de tumeurs de haut grade et de tumeurs métastatiques de l'épiploon comportent 52 échantillons. Les tissus normaux, au nombre de 13, sont également présentés sous forme de contrôles. Ainsi, le **tableau 3.1** présente les principales caractéristiques cliniques de ces patientes pour lesquelles des données cliniques suivies jusqu'à 5 ans étaient disponibles. L'analyse de l'expression protéique de RUNX1 par IHC a montré une forte expression non seulement dans les tissus métastatiques (épiploons), mais aussi dans les tumeurs primaires de haut grade et même dans les tumeurs borderline (LMP) par rapport aux tissus normaux de l'ovaire (**Figure 3.2**). En effet, nous n'avons pas trouvé d'association entre le taux de survie des patientes et les courbes de survie Kaplan–Meier, basées sur l'intensité de son expression protéique. *RUNX1* étant hypométhylé dans les cellules primaires post-chimiothérapeutiques, cela suggère que sa surexpression dans la phase avancée de la maladie (métastatique) pourrait s'expliquer par des mécanismes épigénétiques, notamment l'hypométhylation des îlots CpG de son promoteur. Ici, nous avons montré une tendance non significative à l'hypométhylation de la séquence d'ADN situé entre les nt-2475 et nt-2056, en amont du premier exon de RUNX1 des isoformes 1 a et 1 b dans les tumeurs d'épiploon du COE (métastatiques), comparée aux tumeurs primaires (**Figure 3.1**). En effet, contrairement aux cellules post-chimiothérapiques dans le chapitre précédent, l'hypométhylation ne semble pas avoir beaucoup d'impact sur l'expression de *RUNX1* dans les tumeurs métastatiques. Nos résultats confirment certaines données de la littérature sur le rôle oncogénique de *RUNX1* ; sa surexpression étant associée au développement du carcinome métastatique

invasif de l'endomètre (Doll et al., 2009; Planaguma et al., 2004), de la leucémie (Roumier et al., 2003) ainsi que la promotion de la carcinogenèse des tissus épithéliaux (Scheitz et al., 2012).

Par la suite, nous avons investigué l'implication fonctionnelle de la surexpression de *RUNX1* dans la tumorigénèse du CEO en réalisant sa suppression dans les cellules SKOV3. Nos résultats d'analyses fonctionnelles ont mis en évidence la capacité oncogénique de *RUNX1* dans le CEO de type séreux avec un rôle potentiel dans la prolifération cellulaire, le contrôle du cycle cellulaire, la migration et l'invasion des cellules (**Figure 3.4**). En effet, on observe que chez les cellules sous-exprimant *RUNX1* ont une nette diminution de la capacité à proliférer avec arrêt du cycle cellulaire en phase G1. De plus, la capacité de ces cellules à migrer et à s'évader est également atténuée. Nos données confirment donc certaines données récentes de la littérature montrant que *RUNX1* est requis pour la croissance des cellules tumorales ainsi que les processus d'invasion et de métastase de certains types de cancer, comme le cancer de la peau, de la tête, du cou, de la prostate, du colorectum et endométrioïde (Planaguma et al., 2004; Scheitz et al., 2012; Slattery et al., 2011; Yeh et al., 2009).

#### **5.5. La signature moléculaire de la suppression de *RUNX1* dans les cellules du CEO est associée à la surexpression des gènes impliqués dans l'apoptose et la régulation du cycle cellulaire et à la sous-expression des gènes de la voie PI3K-AKT et NOTCH.**

Suite à la suppression de *RUNX1* dans les cellules du CEO, la technologie des micropuces à ADN a été utilisée pour étudier les mécanismes moléculaires et les voies biologiques associés aux différents phénotypes cellulaires. L'analyse du réseau d'expression génique

par le logiciel IPA a permis d'identifier une liste de 334 gènes induits et 607 gènes réprimés dans les cellules de SKOV3, après suppression de RUNX1 dans le clone shARN-RUNX1 (sh-cl4), par rapport au contrôle (2 fold; p=0.05). Les gènes réprimés étaient fonctionnellement impliqués dans le cycle cellulaire, l'adhésion cellulaire, la croissance et la prolifération cellulaire, la régulation de la transcription, le métabolisme et le transport des molécules. De même, la suppression de *RUNX1* a été associée à l'induction de gènes liés à l'apoptose, au cycle cellulaire, à l'adhésion cellulaire, à la croissance et à la prolifération cellulaire, à la régulation de la transcription et au métabolisme (**Tableau 3.2 et Figure 3.6**). La comparaison de notre liste de gènes avec celles de la littérature a montré que la plupart des gènes différentiellement modulés étaient des cibles transcriptionnelles directes de *RUNX1*. Ainsi, le rôle potentiel de gène suppresseur de tumeur est déjà connu pour la plupart des gènes induits. C'est le cas des gènes encodant pour des protéines impliquées dans l'induction de l'apoptose (*CCNA1*, *CCNBI*, *GADD45A*, *ATF3*, *IL1A*, *TGF beta*) (Ehrhardt et al., 2011; Glinsky, 2006; Kim et al., 2003; Pollock et al., 2003; Porter et al., 2000; Xu et al., 2011; Yan and Boyd, 2006; Zerbini et al., 2004), la suppression de la progression du cycle cellulaire et de la survie (*CD55*, *SFN*) (Dhar et al., 2000; Hamstra et al., 2000; Laronga et al., 2000; Meng et al., 2009a); la suppression de l'invasion des cellules et/ou des métastases (*SMA*, *CXCL3*, *DCN*, *FGF2*, *GJAI*) (Aggarwal and Sung, 2009; Fukai et al., 2003; Iozzo et al., 2011; Korah et al., 2000; Plante et al., 2011), de l'adhésion cellulaire (*CD34*) (Krause et al., 1996) étant majoritairement sur-surexprimés après suppression de *RUNX1* (**Figure 3.7 A**). Plusieurs auteurs ont rapporté que la plupart de ces gènes modulent négativement la tumorigénèse ovarienne. Par exemple, *CCNA1*, *DCN*, *GADD45A* et *SFN* sont connus comme des gènes suppresseurs potentiels de tumeur dans le CEO (Akahira et al., 2004; Hollander et al., 2001; Nash et al., 2002; Rivera et al., 2006).

De même, l'expression augmentée des gènes *SMA* et *ATF* dans les tumeurs du CEO est associée à une issue favorable de la maladie avec diminution de l'invasion tumorale (Syed et al., 2005). L'inhibition de *CCNB1* (Lee et al., 2011) et de *GJAI* (Li et al., 2007) a été associée respectivement au degré métastatique et à la chimiorésistance du CEO. De même, la majorité des gènes sous-exprimés après suppression de *RUNX1* appartiennent à la voie de signalisation classique de l'oncogenèse à savoir les voies NOTCH et PI3K-AKT (**Figure 3.7 B**). Cette dernière étant connue comme l'une des voies de signalisation majeure impliquée dans l'étiologie du CEO (Nicosia et al., 2003). Parmi le réseau de gènes figurent les gènes *AR*, *BMP4*, *BMP6*, *BMP7*, *CDH1*, *DLX5*, *FGFR2*, *FGFR3*, *HOXA10*, *ID2*, *LEF1*, *MEIS1*, *MMP1*, *MMP7* et les gènes impliqués dans la voie de signalisation de Notch (*NOTCH3*, *SNAIL*, *SPARC*, *WNT3A*, *WNT5A*). Ces gènes sont déjà connus comme étant impliqués dans la croissance et la prolifération cellulaire, la migration, l'invasion et la métastase du COE. En effet, les gènes *BMP4*, *BMP6*, *BMP7*, *CDH1*, *LEF1*, *MEIS1*, *NOTCH3*, *WNT3A* et *WNT5A* sont fonctionnellement impliqués dans la tumorigénèse ovarienne (Crijns et al., 2007; Lu et al., 2004; McLean et al., 2011; Rask et al., 2003; Symowicz et al., 2007). De même, les gènes *ID2*, *MPP1*, *MPP7*, *SNAIL*, *SPARK* sont associés à la métastase du CEO (Chen et al., 2012; Karam and Dorigo, 2012; Lu et al., 2012; Meng et al., 2009b). Nos données confirment les résultats précédents sur l'implication possible de *RUNX1* dans les processus d'invasion et de métastase des métalloprotéines dans les tumeurs gynécologiques (Planaguma et al., 2011). Ainsi, nos résultats soutiennent le rôle oncogène de *RUNX1* dans la cancérogenèse du CEO. Étant donné que les trois protéines *RUNX* reconnaissent des motifs communs de séquence ADN, il serait intéressant d'étudier le rôle des autres membres de la famille de gènes *RUNX* dans la formation et la progression de CEO.

## **5.6. L'expression de RUNX2 dans les tumeurs ovariennes est associée à la prolifération, à l'invasion et à la métastase.**

Dans un premier temps, nous avons évalué l'expression protéique de RUNX2 par immunohistochimie (IHC) dans les tumeurs séreuses du CEO par rapport aux tissus normaux de l'ovaire sur des micropuces de tissus (TMA). Nous avons utilisé le même TMA précédant (pour *RUNX1*) afin d'évaluer l'expression de RUNX2. Ainsi, nos résultats d'analyse de l'expression protéique de RUNX2 ont montré une expression significativement plus élevée, non seulement dans le tissu métastatique, mais aussi dans les sous-groupes de LMP et de tumeurs de haut grade par rapport aux tissus normaux (**Figure 4.1**). Nos résultats confirment ceux de la littérature ayant montré l'implication fonctionnelle de RUNX2 dans les processus métastatiques et d'invasion tumorale. Ainsi, des études antérieures ont identifié la protéine RUNX2 surexprimée dans différents types de cancers dont le lymphome/leucémie (Blyth et al., 2010), le cancer des os (Martin et al., 2011), du sein (Pratap et al., 2005), de la prostate (Akech et al., 2010), de la thyroïde (Niu et al., 2012) et du pancréas (Kayed et al., 2007). De même, une étude récente a montré que la surexpression de RUNX2 dans le CEO de type séreux était étroitement associée à un mauvais pronostic chez les patientes (Li et al., 2012b). Cependant, les courbes de survie Kaplan–Meier basées sur l'intensité de son expression protéique n'ont pas montré d'association avec le taux de survie des patientes.

Par la suite, nous avons réalisé la technique BSP pour vérifier l'hypothèse de la surexpression de *RUNX2* dans les tumeurs par hypométhylation. Pour cela, nous avons procédé à la validé du statut de méthylation de *RUNX2* dans les métastases de l'épiploon par rapport aux tumeurs primaires en ciblant la région promotrice proximale du gène



*RUNX2*, qui s'étend entre nt-2816 et nt-2531 en amont du codon d'initiation de la transcription ATG de l'isoforme 3 de *RUNX2* (**figure supplémentaire 4.9**). Cette séquence d'ADN contient 12 sites CpG (**Figure 4.2**). Contrairement à la modulation épigénétique par méthylation de *RUNX2* dans les cellules primaires post-chimiothérapeutiques, l'analyse de la méthylation par BSP indique que l'hypométhylation de l'ADN n'a aucune incidence sur son expression au stade avancé de la maladie (métastatique). Ces résultats suggèrent que la surexpression de *RUNX2* dans les tumeurs semble être médiée par des mécanismes génétiques ou épigénétiques autres que la méthylation.

Nous avons par la suite investigué l'implication fonctionnelle de *RUNX2* dans les mécanismes de la tumorigénèse ovarienne.

### **5.7. La suppression de *RUNX2* dans les cellules du CEO induit la surexpression des gènes associés à la morphologie cellulaire et à l'apoptose avec la sous-expression des gènes impliqués dans le métabolisme, la croissance et la prolifération cellulaire.**

En utilisant la technique d'interférence ARN, nous avons établi deux clones stables (cl3 et cl6) sous-exprimant *RUNX2* dans les cellules SKOV3 (**Figure 4.3**). Le choix de SKOV3 se justifie par une forte expression endogène de notre gène d'intérêt dans cette lignée cellulaire du cancer de l'ovaire. Nous avons étudié l'impact de la suppression du gène *RUNX2* sur la prolifération des cellules, le contrôle du cycle cellulaire, la migration, et l'invasion. Enfin, nous avons évalué la sensibilité des cellules avec suppression de *RUNX2* au cisplatine et au paclitaxel qui sont des médicaments habituellement utilisés pour la chimiothérapie de première ligne. La suppression de notre gène d'intérêt conduit à une forte diminution du nombre de cellules prolifératives par rapport aux cellules contrôles tel

qu'indiqué par l'index cellulaire (**Figure 4.4 A**). De même, l'analyse de la formation de colonie montre que la suppression de *RUNX2* réduit significativement la capacité des cellules à former des colonies (**Figure 4.4 B**). En outre, la répression de *RUNX2* inhibe significativement la migration et l'invasion des cellules SKOV3 à travers le filtre de la chambre de Boyden. Enfin, la suppression de *RUNX2* n'a eu aucun impact significatif sur la sensibilité à la cisplatine et au paclitaxel (données non présentées).

La technologie des micropuces à ADN a été utilisée pour mieux comprendre les modifications d'expression génique globales associées aux différents phénotypes cellulaires suite à la suppression de *RUNX2*. Pour cela, le clone 3 (cl3) a été utilisé en raison d'une suppression plus significative de *RUNX2* (3.36 fois) par rapport au clone 6 (cl6). L'analyse comparative des différents profils d'expression génique du clone cl3 par rapport au clone contrôle a permis d'identifier 338 gènes (87 surexprimés et 251 sous-exprimés) différentiellement exprimés de façon significative (2 fold; p=0.05).

À l'aide du logiciel IPA, nous avons confirmé que la suppression de *RUNX2* était associée à la sous-expression des gènes fonctionnellement impliqués dans le métabolisme, la croissance et la prolifération cellulaire, la régulation de la transcription, la transduction du signal, le transport cellulaire et la réponse immune et inflammatoire. Par contre, les gènes induits sont pour la plupart fonctionnellement liés à la morphologie cellulaire, l'apoptose et aux interactions cellulaires (**Tableau 4.2**). La **Figure 4.7** montre les principaux réseaux génétiques surexprimés après suppression de *RUNX1*. Le gène *UBC* semble avoir un rôle central dans ce profil génique (**Figure 4.7 A**). Les ubiquitines semblent jouer un rôle très important durant la carcinogenèse. En effet, certaines études montrent que l'ubiquitine C (*UBC*) est un régulateur négatif de la carcinogenèse de la peau, de par sa capacité à

diminuer la croissance cellulaire et induire l'apoptose (Kim et al., 2004) . Parmi ce réseau de l'UBC figurent des gènes impliqués dans la morphologie cellulaire (KRT17, LMNB1, MARCKS, MYH6, PVR, SEPT9, WASF2) et l'apoptose (ARHGDI1, BCL2L1, CRYAB, CTGF, EZR, ITGB2). La plupart de ces gènes ont été décrits dans la littérature comme de potentiels suppresseurs de tumeurs. Par exemple le gène *CRYAB* a été décrit comme un potentiel suppresseur de tumeur dans le carcinome du nasopharynx (Huang et al., 2012), alors que l'expression de la protéine *BCL-XS (BCL2L1)* était associée à une diminution de la prolifération et l'induction de l'apoptose dans les tumeurs, notamment dans les cellules du carcinome du colon (Fridman et al., 1998; Mansour et al., 2011). De même, la surexpression de *CTGF* a été associée à l'apoptose et à la diminution de l'invasion des cellules tumorales (Capparelli et al., 2012; Hishikawa et al., 1999; Yang et al., 2012). L'expression du gène *PPM1A (PP2C)* induirait l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose via l'activation de la voie *p53* [48]. Le gène *NF2* a été caractérisé comme un gène suppresseur de tumeur dans différents types de cancers (Lecomte et al., 2005; Li and Giancotti, 2010; Morrow et al., 2011).

Après suppression de *RUNX2* (**Figure 4.7 B**) nous avons observé une forte diminution d'un ensemble de gènes dont la plupart a été rapportée dans la littérature comme des oncogènes potentiels de la tumorigénèse ovarienne (*PTGS1/COX1, FGF2, IL1A, Sapk, C/ebp, SELE, UBQLN1, PSAT1, ALDH1A1, GDF15, MTHFD2*) (Bock et al., 2010; Brard et al., 2011; Daikoku et al., 2007; Li et al., 2012a; Lu et al., 2004; Madsen et al., 2012; Mann et al., 2010; Papacleovoulou et al., 2011; Stone et al., 2003; Sundfeldt et al., 1999). En effet, les gènes *MMP1, MMP13* et *Creb* ont été décrits dans les processus d'invasion et de métastase tumorale du CEO (Agarwal et al., 2010; Alper et al., 2001; Hantke et al., 2003). D'autres gènes sous-exprimés sont connus dans d'autres types de cancer pour leur rôle dans la

régulation de la prolifération des cellules tumorales (*Creb*, *C/ebp*, *ATF3*, *ATF4*) (Casaburi et al., 2012; Duprez, 2004; Kinjo et al., 2005; Tamura et al., 2005), l'invasion (*MTHFD2*, *FGF2*) (Lehtinen et al., 2013; Taraboletti et al., 2010) et la métastase (*PTGS1/COX1*, la E-sélectine, *ATF3*, *FGF2*, *IL1A*, *MMP1*, *MMP13*) (Karnezis et al., 2012; Nakanishi et al., 2001; Okada-Ban et al., 1999; Sternlicht and Werb, 2001; Yamaoka et al., 2011; Yan and Boyd, 2006). Ainsi, nos données confortent davantage le concept du rôle oncogénique de *RUNX2* dans le CEO et conformément aux observations antérieures, en raison de ses fonctions assez universelles dans la tumorigénèse, y compris l'invasion et la métastase tumorale.

#### **5.8. RUNX2 et RUNX1 induisent des phénotypes cellulaires similaires par des mécanismes moléculaires différents.**

Comparativement à nos résultats sur les études fonctionnelles de *RUNX1* [25], les phénotypes cellulaires induits après la suppression de *RUNX1* et *RUNX2* dans les cellules SKOV3 étaient similaires sur la progression du CEO en termes de prolifération, de migration et d'invasion cellulaire. Étant donné que les trois protéines *RUNX* reconnaissent des motifs communs de séquence d'ADN (Huang et al., 1999), nous avons analysé et comparé, à partir de nos données d'expression génique globale, les gènes qui sont modulés par *RUNX1* et *RUNX2*. Cette comparaison nous permettra d'avoir un aperçu des mécanismes d'action spécifiques et/ou communs de *RUNX1* et *RUNX2* dans le CEO. La **Figure 4.8 A** nous montre que les deux gènes ont en commun peu de gènes modulés. Une analyse supervisée de type «cluster» a été exécutée et 95 gènes exprimés différemment de façon significative entre les deux types de clones sous-exprimant *RUNX1* et *RUNX2* (2 fold,  $p=0.05$ ) (**Figure 4.8 B**). En effet, parmi ces gènes, 52 gènes étaient relativement sous-

exprimés dans le clone de SKOV3 avec suppression de RUNX2 comparée à celui de RUNX1. Ces gènes étaient fonctionnellement impliqués dans le métabolisme, le développement cellulaire et la signalisation cellulaire (**Figure 4.8 C**). Par contre, les gènes réprimés dans le clone avec suppression de RUNX1 par rapport à celui de RUNX2 étaient principalement impliqués dans le mouvement cellulaire, le contrôle du cycle cellulaire et le transport des molécules (**Figure 4.8 D**).

Bien que RUNX1 et RUNX2 modulent l'expression de quelques gènes en commun, ces observations nous montrent que les deux gènes semblent avoir des mécanismes moléculaires distincts associés à des voies fonctionnelles associées spécifiques pour la progression du CEO. En effet, RUNX1 et RUNX2 modulent potentiellement l'expression de *MMP1*, *MMP19*, *PTGS1/COX1* et *p8/NUPRI*. Ainsi, nous ne pouvons pas exclure complètement certains mécanismes communs entre RUNX1 et RUNX2 dans les cellules du CEO, puisque leur suppression conduit à la répression du gène pro-métastatique *p8/NUPRI* (Cano et al., 2011; Sandi et al., 2011), ainsi qu'à la diminution de l'expression des gènes *MMP1*, *MMP19* et *PTGS1/COX1* ayant un rôle connu dans la progression et la dissémination du CEO (Daikoku et al., 2005; Kanamori et al., 1999; Zhao et al., 2012).



## **6- Conclusions et Perspectives**

La précédente étude avait pour but de caractériser, à haute résolution, les changements associés à la méthylation de l'ADN dans le CEO de type séreux en fonction de l'agressivité de la tumeur. Par un criblage épigénomique, l'analyse des profils de méthylation aberrante dans les différents grades des tumeurs a mis en évidence des signatures de méthylation distincts associés à l'agressivité et à la progression de la maladie. Par deux approches différentes (une comparant les différents grades de tumeur par rapport aux tissus normaux de l'ovaire, et une autre comparant des cellules primaires pré-chimiothérapeutiques de l'ovaire à des cellules du même type et des mêmes patientes mais post-chimiothérapeutiques), les études présentées dans cette thèse ont démontré clairement que l'hyperméthylation est un événement très précoce de la carcinogenèse avec suppression des gènes ayant un rôle protecteur alors que l'hypométhylation massive est associée à la phase avancée de la maladie avec la surexpression des gènes impliqués dans l'invasion et la métastase.

Les gènes hyperméthylés sont fonctionnellement impliqués dans le développement, l'expression génique, le mouvement cellulaire, la prolifération, la croissance et le cycle cellulaire. Ces gènes sont pour la plupart associés aux mécanismes de l'apoptose.

Les sites d'hyperméthylation dans les différents groupes de tumeurs ont montré, par l'analyse bioinformatique, une corrélation significative avec les sites de méthylation triple de H3K27 (une modification répressive de chromatine) dans les cellules souches. Ces observations supportent l'hypothèse des cellules souches comme étant à l'origine du cancer dans lesquelles la répression génique réversible est remplacée par une répression

permanente en condamnant les cellules dans un état perpétuel d'auto-renouvellement se traduisant par une transformation maligne subséquente.

Les gènes hypométhylés dans les différents grades sont fonctionnellement impliqués dans la signalisation cellule-cellule, l'interaction cellulaire, l'assemblage et l'organisation cellulaire, le transport des molécules et la mort cellulaire. Ces gènes sont également pour la plupart associés aux mécanismes de migration, d'invasion cellulaire, de métastase et de chimiorésistance dans différents types de cancers notamment le CEO. De plus, les gènes hypométhylés (46 gènes) dans les cellules primaires post-chimiothérapeutiques étaient fonctionnellement associés à la croissance et la prolifération cellulaire, le contrôle du cycle cellulaire, le mouvement cellulaire, la réplication, la recombinaison et la réparation de l'ADN. La majorité de ces gènes est également impliquée dans les processus d'invasion tumorale et de métastase.

Les signatures de méthylation présentées dans les chapitres précédents a permis d'identifier de nouvelles cibles épigénétiques qui permettront de caractériser de nouveaux biomarqueurs efficaces pour le pronostic et la thérapeutique au cours de la prise en charge du CEO. Plus spécifiquement, de nouveaux gènes hyperméthylés ont été identifiés et validés par BSP dans les différents grades du CEO. Il s'agit des gènes *TNK1*, *DMRT3*, *LECT1*, *TUBB6*, *CADPS*, *GRK7*, *NETO1*, *LAMB1*, *HSPA1A*, *HSPAIL* et *PCDH17*. De même, les gènes *TGFB111*, *GALNT3*, *BCAT1*, *ARC* et *CAPS* ont été validés comme étant de nouveaux gènes hypométhylés dans le CEO. D'autres gènes candidats tels que *RUNX1*, *RUNX2*, *EPST11* et *ELL3* ont été identifiés comme hypométhylés et surexprimés dans les



cellules primaires post-chimiothérapeutiques. De plus, la validation par BSP du statut de méthylation de d'autres gènes candidats potentiels pourrait être effectuée.

Pour mieux comprendre davantage l'implication de *RUNX1* et *RUNX2* dans la progression et la chimiorésistance, des études fonctionnelles impliquant la sous-expression de ces gènes dans des lignées cellulaires de cancer de l'ovaire ont été effectuées. Ces études ont comme but d'analyser l'impact de l'expression de ces gènes sur la survie cellulaire et la réponse à divers agents chimiothérapeutiques. Ainsi, nous avons montré qu'il y avait une tendance à l'hypométhylation non significative de *RUNX1* dans les tissus métastatiques par rapport aux tumeurs primaires, tandis qu'aucune tendance n'a été observée avec *RUNX2*. L'expression protéique par immunohistochimie de *RUNX1* et *RUNX2* était significativement plus élevée dans les tumeurs ovariennes par rapport aux tissus normaux. Les analyses fonctionnelles ont montré que la suppression de *RUNX1* et *RUNX2* diminuait la prolifération des cellules EOC (avec arrêt du cycle cellulaire en phase G1 pour *RUNX1*), la migration et l'invasion. Cependant, la suppression de *RUNX1* ou de *RUNX2* n'a pas eu d'effet sur la chimiosensibilité à la cisplatine ou au paclitaxel.

Le profil d'expression génique et des analyses subséquentes de réseau et des voies de signalisation ont confirmé ces résultats. En effet, de nombreux gènes et voies connues précédemment impliqués dans la tumorigénèse ovarienne, y compris l'invasion tumorale et les métastases, se sont avérés réprimés après suppression de *RUNX1*, tandis qu'un nombre de gènes pro-apoptotiques et certains gènes suppresseurs potentiels du CEO ont été induits. De même, la suppression de *RUNX2* dans les cellules du CEO était également associée à la suppression d'un certain nombre de gènes connus pour promouvoir l'initiation et la progression du CEO.

Bien que *RUNX1* et *RUNX2* exercent des effets similaires sur les cellules du CEO, la comparaison de données de micropuce a montré que ceux-ci utilisent néanmoins des mécanismes moléculaires distincts, spécifiques pour chaque gène. De façon générale, nos données indiquent un fort potentiel oncogénique de ces deux facteurs de transcription dans la progression du CEO. De ce fait, des études plus approfondies sur leur rôle dans la tumorigénèse CEO doivent être effectuées. Ainsi, il serait essentiel de confirmer ces résultats dans un contexte in vivo en injectant ces clones sous-exprimant *RUNX1* et *RUNX2* dans des souris immunodéficientes afin d'évaluer leur rôle sur l'expansion tumorale et la formation de métastases. De plus, il serait intéressant de déterminer la contribution de *RUNX1* et *RUNX2* au programme d'expression génique au cours de la progression du CEO en utilisant la technique ChIP-seq. Cette approche expérimentale permettra de suivre l'évolution des gènes cibles de *RUNX1* et *RUNX2* qui sont associés à la progression de la maladie. Comme pour *RUNX1* et *RUNX2*, il serait intéressant d'investiguer le rôle de *RUNX3* dans la carcinogénèse du CEO.

En terminant, les différents résultats décrits dans cette thèse soulignent le potentiel de la technologie des micropuces à ADN dans le diagnostic du cancer de l'ovaire. Cette approche pourrait avoir une implication clinique importante dans la détection précoce du CEO, la prédiction à la chimiorésistance et dans la définition d'un traitement optimal et personnalisé.

## 7- Bibliographie

(2002). The role of the generalist obstetrician-gynecologist in the early detection of ovarian cancer. *Gynecologic oncology* 87, 237-239.

(2008). Moving AHEAD with an international human epigenome project. *Nature* 454, 711-715.

Abou-Zeid, A.A., Azzam, A.Z., and Kamel, N.A. (2011). Methylation status of the gene promoter of cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (CDKN2A) in ovarian cancer. *Scand J Clin Lab Invest* 71, 542-547.

Abramowitz, L.K., and Bartolomei, M.S. (2012). Genomic imprinting: recognition and marking of imprinted loci. *Current opinion in genetics & development* 22, 72-78.

Agarwal, A., Tressel, S.L., Kaimal, R., Balla, M., Lam, F.H., Covic, L., and Kuliopulos, A. (2010). Identification of a metalloprotease-chemokine signaling system in the ovarian cancer microenvironment: implications for antiangiogenic therapy. *Cancer research* 70, 5880-5890.

Agarwal, R., and Kaye, S.B. (2003). Ovarian cancer: strategies for overcoming resistance to chemotherapy. *Nature reviews Cancer* 3, 502-516.

Aggarwal, B.B., and Sung, B. (2009). Pharmacological basis for the role of curcumin in chronic diseases: an age-old spice with modern targets. *Trends in pharmacological sciences* 30, 85-94.

Agrelo, R., Cheng, W.H., Setien, F., Ropero, S., Espada, J., Fraga, M.F., Herranz, M., Paz, M.F., Sanchez-Cespedes, M., Artiga, M.J., *et al.* (2006). Epigenetic inactivation of the premature aging Werner syndrome gene in human cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 8822-8827.

Ahmed, N., Thompson, E.W., and Quinn, M.A. (2007). Epithelial-mesenchymal interconversions in normal ovarian surface epithelium and ovarian carcinomas: an exception to the norm. *Journal of cellular physiology* 213, 581-588.

AJCC (2002). *AJCC Cancer Staging Manual*, 6 edn. Springer: New York, NY.

Akahira, J., Sugihashi, Y., Suzuki, T., Ito, K., Niikura, H., Moriya, T., Nitta, M., Okamura, H., Inoue, S., Sasano, H., *et al.* (2004). Decreased expression of 14-3-3 sigma is associated with advanced disease in human epithelial ovarian cancer: its correlation with aberrant DNA methylation. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 10, 2687-2693.

Akech, J., Wixted, J.J., Bedard, K., van der Deen, M., Hussain, S., Guise, T.A., van Wijnen, A.J., Stein, J.L., Languino, L.R., Altieri, D.C., *et al.* (2010). Runx2 association

with progression of prostate cancer in patients: mechanisms mediating bone osteolysis and osteoblastic metastatic lesions. *Oncogene* 29, 811-821.

Alper, O., Bergmann-Leitner, E.S., Abrams, S., and Cho-Chung, Y.S. (2001). Apoptosis, growth arrest and suppression of invasiveness by CRE-decoy oligonucleotide in ovarian cancer cells: protein kinase A downregulation and cytoplasmic export of CRE-binding proteins. *Molecular and cellular biochemistry* 218, 55-63.

Antequera, F. (2003). Structure, function and evolution of CpG island promoters. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 60, 1647-1658.

Arnold, J.M., Cummings, M., Purdie, D., and Chenevix-Trench, G. (2001). Reduced expression of intercellular adhesion molecule-1 in ovarian adenocarcinomas. *British journal of cancer* 85, 1351-1358.

Auersperg, N., Wong, A.S., Choi, K.C., Kang, S.K., and Leung, P.C. (2001). Ovarian surface epithelium: biology, endocrinology, and pathology. *Endocrine reviews* 22, 255-288.

Balch, C., Huang, T.H., Brown, R., and Nephew, K.P. (2004). The epigenetics of ovarian cancer drug resistance and resensitization. *American journal of obstetrics and gynecology* 191, 1552-1572.

Balch, C., Yan, P., Craft, T., Young, S., Skalnik, D.G., Huang, T.H., and Nephew, K.P. (2005). Antimitogenic and chemosensitizing effects of the methylation inhibitor zebularine in ovarian cancer. *Molecular cancer therapeutics* 4, 1505-1514.

Baldwin, R.L., Nemeth, E., Tran, H., Shvartsman, H., Cass, I., Narod, S., and Karlan, B.Y. (2000). BRCA1 promoter region hypermethylation in ovarian carcinoma: a population-based study. *Cancer research* 60, 5329-5333.

Bannister, A.J., and Kouzarides, T. (2011). Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell research* 21, 381-395.

Barton, C.A., Hacker, N.F., Clark, S.J., and O'Brien, P.M. (2008). DNA methylation changes in ovarian cancer: implications for early diagnosis, prognosis and treatment. *Gynecol Oncol* 109, 129-139.

Bast, R.C., Jr. (2003). Status of tumor markers in ovarian cancer screening. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 21, 200s-205s.

Bast, R.C., Jr., Feeney, M., Lazarus, H., Nadler, L.M., Colvin, R.B., and Knapp, R.C. (1981). Reactivity of a monoclonal antibody with human ovarian carcinoma. *The Journal of clinical investigation* 68, 1331-1337.

Bast, R.C., Jr., Hennessy, B., and Mills, G.B. (2009). The biology of ovarian cancer: new opportunities for translation. *Nature reviews Cancer* 9, 415-428.

Bast, R.C., Jr., Klug, T.L., St John, E., Jenison, E., Niloff, J.M., Lazarus, H., Berkowitz, R.S., Leavitt, T., Griffiths, C.T., Parker, L., *et al.* (1983). A radioimmunoassay using a monoclonal antibody to monitor the course of epithelial ovarian cancer. *The New England journal of medicine* *309*, 883-887.

Baylin, S.B., Esteller, M., Rountree, M.R., Bachman, K.E., Schuebel, K., and Herman, J.G. (2001). Aberrant patterns of DNA methylation, chromatin formation and gene expression in cancer. *Human molecular genetics* *10*, 687-692.

Beisler, J.A. (1978). Isolation, characterization, and properties of a labile hydrolysis product of the antitumor nucleoside, 5-azacytidine. *Journal of medicinal chemistry* *21*, 204-208.

Bennett, L.B., Schnabel, J.L., Kelchen, J.M., Taylor, K.H., Guo, J., Arthur, G.L., Papageorgio, C.N., Shi, H., and Caldwell, C.W. (2009). DNA hypermethylation accompanied by transcriptional repression in follicular lymphoma. *Genes Chromosomes Cancer* *48*, 828-841.

Beral, V., Doll, R., Hermon, C., Peto, R., and Reeves, G. (2008). Ovarian cancer and oral contraceptives: collaborative reanalysis of data from 45 epidemiological studies including 23,257 women with ovarian cancer and 87,303 controls. *Lancet* *371*, 303-314.

Berdasco, M., and Esteller, M. (2010). Aberrant epigenetic landscape in cancer: how cellular identity goes awry. *Developmental cell* *19*, 698-711.

Berdasco, M., and Esteller, M. (2011). DNA methylation in stem cell renewal and multipotency. *Stem cell research & therapy* *2*, 42.

Bin Hafeez, B., Adhami, V.M., Asim, M., Siddiqui, I.A., Bhat, K.M., Zhong, W., Saleem, M., Din, M., Setaluri, V., and Mukhtar, H. (2009). Targeted knockdown of Notch1 inhibits invasion of human prostate cancer cells concomitant with inhibition of matrix metalloproteinase-9 and urokinase plasminogen activator. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* *15*, 452-459.

Bird, A. (2002). DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes & development* *16*, 6-21.

Blyth, K., Cameron, E. R. & Neil, J. C. (2005) The RUNX genes: gain or loss of function in cancer, *Nature reviews Cancer*. *5*, 376-87.

Blyth, K., Vaillant, F., Jenkins, A., McDonald, L., Pringle, M.A., Huser, C., Stein, T., Neil, J., and Cameron, E.R. (2010). Runx2 in normal tissues and cancer cells: A developing story. *Blood cells, molecules & diseases* *45*, 117-123.

Bock, A.J., Stavnes, H.T., Kempf, T., Trope, C.G., Berner, A., Davidson, B., and Staff, A.C. (2010). Expression and clinical role of growth differentiation factor-15 in ovarian

carcinoma effusions. *International journal of gynecological cancer : official journal of the International Gynecological Cancer Society* 20, 1448-1455.

Bol, G.M., Suijkerbuijk, K.P., Bart, J., Vooijs, M., van der Wall, E., and van Diest, P.J. (2010). Methylation profiles of hereditary and sporadic ovarian cancer. *Histopathology* 57, 363-370.

Borchert, G.M., Lanier, W., and Davidson, B.L. (2006). RNA polymerase III transcribes human microRNAs. *Nature structural & molecular biology* 13, 1097-1101.

Bracken, A.P., Dietrich, N., Pasini, D., Hansen, K.H., and Helin, K. (2006). Genome-wide mapping of Polycomb target genes unravels their roles in cell fate transitions. *Genes & development* 20, 1123-1136.

Brard, L., Lange, T.S., Robison, K., Kim, K.K., Ara, T., McCallum, M.M., Arnold, L.A., Moore, R.G., and Singh, R.K. (2011). Evaluation of the first Ergocalciferol-derived, non hypercalcemic anti-cancer agent MT19c in ovarian cancer SKOV-3 cell lines. *Gynecologic oncology* 123, 370-378.

Brueckner, B., and Lyko, F. (2004). DNA methyltransferase inhibitors: old and new drugs for an epigenetic cancer therapy. *Trends in pharmacological sciences* 25, 551-554.

Butler, L.M., Agus, D.B., Scher, H.I., Higgins, B., Rose, A., Cordon-Cardo, C., Thaler, H.T., Rifkind, R.A., Marks, P.A., and Richon, V.M. (2000). Suberoylanilide hydroxamic acid, an inhibitor of histone deacetylase, suppresses the growth of prostate cancer cells in vitro and in vivo. *Cancer research* 60, 5165-5170.

Cai, K.Q., Albarracin, C., Rosen, D., Zhong, R., Zheng, W., Luthra, R., Broaddus, R., and Liu, J. (2004). Microsatellite instability and alteration of the expression of hMLH1 and hMSH2 in ovarian clear cell carcinoma. *Human pathology* 35, 552-559.

Calin, G.A., Cimmino, A., Fabbri, M., Ferracin, M., Wojcik, S.E., Shimizu, M., Taccioli, C., Zanesi, N., Garzon, R., Aqeilan, R.I., *et al.* (2008). MiR-15a and miR-16-1 cluster functions in human leukemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 5166-5171.

Calin, G.A., Dumitru, C.D., Shimizu, M., Bichi, R., Zupo, S., Noch, E., Aldler, H., Rattan, S., Keating, M., Rai, K., *et al.* (2002). Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 15524-15529.

Calin, G.A., Sevignani, C., Dumitru, C.D., Hyslop, T., Noch, E., Yendamuri, S., Shimizu, M., Rattan, S., Bullrich, F., Negrini, M., *et al.* (2004). Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 2999-3004.

Cameron, E. R. & Neil, J. C. (2004) The Runx genes: lineage-specific oncogenes and tumor suppressors, *Oncogene*. 23, 4308-14.

Campan, M., Moffitt, M., Houshdaran, S., Shen, H., Widschwendter, M., Daxenbichler, G., Long, T., Marth, C., Laird-Offringa, I.A., Press, M.F., *et al.* (2011). Genome-scale screen for DNA methylation-based detection markers for ovarian cancer. *PloS one* 6, e28141.

Cannistra, S.A. (2004). Cancer of the ovary. *The New England journal of medicine* 351, 2519-2529.

Cano, C.E., Hamidi, T., Sandi, M.J., and Iovanna, J.L. (2011). Nupr1: the Swiss-knife of cancer. *Journal of cellular physiology* 226, 1439-1443.

Capparelli, C., Whitaker-Menezes, D., Guido, C., Balliet, R., Pestell, T.G., Howell, A., Sneddon, S., Pestell, R.G., Martinez-Outschoorn, U., Lisanti, M.P., *et al.* (2012). CTGF drives autophagy, glycolysis and senescence in cancer-associated fibroblasts via HIF1 activation, metabolically promoting tumor growth. *Cell Cycle* 11, 2272-2284.

Casaburi, I., Avena, P., Lanzino, M., Sisci, D., Giordano, F., Maris, P., Catalano, S., Morelli, C., and Ando, S. (2012). Chenodeoxycholic acid through a TGR5-dependent CREB signaling activation enhances cyclin D1 expression and promotes human endometrial cancer cell proliferation. *Cell cycle* 11, 2699-2710.

Cassidy, S.B., Schwartz, S., Miller, J.L., and Driscoll, D.J. (2012). Prader-Willi syndrome. *Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics* 14, 10-26.

Cetin, I., Cozzi, V., and Antonazzo, P. (2008). Infertility as a cancer risk factor - a review. *Placenta* 29 Suppl B, 169-177.

Chan, M.W., Wei, S.H., Wen, P., Wang, Z., Matei, D.E., Liu, J.C., Liyanarachchi, S., Brown, R., Nephew, K.P., Yan, P.S., *et al.* (2005). Hypermethylation of 18S and 28S ribosomal DNAs predicts progression-free survival in patients with ovarian cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 11, 7376-7383.

Chen, J., Wang, M., Xi, B., Xue, J., He, D., Zhang, J., and Zhao, Y. (2012). SPARC is a key regulator of proliferation, apoptosis and invasion in human ovarian cancer. *PloS one* 7, e42413.

Chen, V.W., Ruiz, B., Killeen, J.L., Cote, T.R., Wu, X.C., and Correa, C.N. (2003). Pathology and classification of ovarian tumors. *Cancer* 97, 2631-2642.

Cheng, W., Liu, J., Yoshida, H., Rosen, D., and Naora, H. (2005). Lineage infidelity of epithelial ovarian cancers is controlled by HOX genes that specify regional identity in the reproductive tract. *Nature medicine* 11, 531-537.

Chou, J.L., Su, H.Y., Chen, L.Y., Liao, Y.P., Hartman-Frey, C., Lai, Y.H., Yang, H.W., Deatherage, D.E., Kuo, C.T., Huang, Y.W., *et al.* (2010). Promoter hypermethylation of FBXO32, a novel TGF-beta/SMAD4 target gene and tumor suppressor, is associated with poor prognosis in human ovarian cancer. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 90, 414-425.

Choudhary, C., Kumar, C., Gnad, F., Nielsen, M.L., Rehman, M., Walther, T.C., Olsen, J.V., and Mann, M. (2009). Lysine acetylation targets protein complexes and co-regulates major cellular functions. *Science* 325, 834-840.

Chua, C. W., Chiu, Y. T., Yuen, H. F., Chan, K. W., Man, K., Wang, X., Ling, M. T. & Wong, Y. C. (2009) Suppression of androgen-independent prostate cancer cell aggressiveness by FTY720: validating Runx2 as a potential antimetastatic drug screening platform, *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 15, 4322-35.

Clark, S.J., Harrison, J., Paul, C.L., and Frommer, M. (1994). High sensitivity mapping of methylated cytosines. *Nucleic acids research* 22, 2990-2997.

Colella, S., Shen, L., Baggerly, K.A., Issa, J.P., and Krahe, R. (2003). Sensitive and quantitative universal Pyrosequencing methylation analysis of CpG sites. *BioTechniques* 35, 146-150.

Collins, Y., Dicioccio, R., Keitz, B., Lele, S., and Odunsi, K. (2006). Methylation of death-associated protein kinase in ovarian carcinomas. *International journal of gynecological cancer : official journal of the International Gynecological Cancer Society* 16 Suppl 1, 195-199.

Colombo, N., Van Gorp, T., Parma, G., Amant, F., Gatta, G., Sessa, C., and Vergote, I. (2006). Ovarian cancer. *Critical reviews in oncology/hematology* 60, 159-179.

Corney, D.C., Hwang, C.I., Matoso, A., Vogt, M., Flesken-Nikitin, A., Godwin, A.K., Kamat, A.A., Sood, A.K., Ellenson, L.H., Hermeking, H., *et al.* (2010). Frequent downregulation of miR-34 family in human ovarian cancers. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 16, 1119-1128.

Cramer, D.W., Bast, R.C., Jr., Berg, C.D., Diamandis, E.P., Godwin, A.K., Hartge, P., Lokshin, A.E., Lu, K.H., McIntosh, M.W., Mor, G., *et al.* (2011). Ovarian cancer biomarker performance in prostate, lung, colorectal, and ovarian cancer screening trial specimens. *Cancer Prev Res (Phila)* 4, 365-374.

Cramer, D.W., and Welch, W.R. (1983). Determinants of ovarian cancer risk. II. Inferences regarding pathogenesis. *Journal of the National Cancer Institute* 71, 717-721.

Crijns, A.P., de Graeff, P., Geerts, D., Ten Hoor, K.A., Hollema, H., van der Sluis, T., Hofstra, R.M., de Bock, G.H., de Jong, S., van der Zee, A.G., *et al.* (2007). MEIS and PBX homeobox proteins in ovarian cancer. *European journal of cancer* 43, 2495-2505.



- Cuatrecasas, M., Villanueva, A., Matias-Guiu, X., and Prat, J. (1997). K-ras mutations in mucinous ovarian tumors: a clinicopathologic and molecular study of 95 cases. *Cancer* 79, 1581-1586.
- Cvetkovic, D., Pisarcik, D., Lee, C., Hamilton, T.C., and Abdollahi, A. (2004). Altered expression and loss of heterozygosity of the LOT1 gene in ovarian cancer. *Gynecologic oncology* 95, 449-455.
- Czekierdowski, A., Czekierdowska, S., Wielgos, M., Smolen, A., Kaminski, P., and Kotarski, J. (2006). The role of CpG islands hypomethylation and abnormal expression of neuronal protein synuclein-gamma (SNCG) in ovarian cancer. *Neuro endocrinology letters* 27, 381-386.
- Daikoku, T., Tranguch, S., Chakrabarty, A., Wang, D., Khabele, D., Orsulic, S., Morrow, J.D., Dubois, R.N., and Dey, S.K. (2007). Extracellular signal-regulated kinase is a target of cyclooxygenase-1-peroxisome proliferator-activated receptor-delta signaling in epithelial ovarian cancer. *Cancer research* 67, 5285-5292.
- Daikoku, T., Wang, D., Tranguch, S., Morrow, J.D., Orsulic, S., DuBois, R.N., and Dey, S.K. (2005). Cyclooxygenase-1 is a potential target for prevention and treatment of ovarian epithelial cancer. *Cancer research* 65, 3735-3744.
- de Neergaard, M., Kim, J., Villadsen, R., Fridriksdottir, A.J., Rank, F., Timmermans-Wielenga, V., Langerod, A., Borresen-Dale, A.L., Petersen, O.W., and Ronnov-Jessen, L. (2010). Epithelial-stromal interaction 1 (EPSTI1) substitutes for peritumoral fibroblasts in the tumor microenvironment. *Am J Pathol* 176, 1229-1240.
- de Ruijter, A.J., van Gennip, A.H., Caron, H.N., Kemp, S., and van Kuilenburg, A.B. (2003). Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family. *The Biochemical journal* 370, 737-749.
- Deakin, N.O., and Turner, C.E. (2011). Distinct roles for paxillin and Hic-5 in regulating breast cancer cell morphology, invasion, and metastasis. *Mol Biol Cell* 22, 327-341.
- Dhar, S., Squire, J.A., Hande, M.P., Wellinger, R.J., and Pandita, T.K. (2000). Inactivation of 14-3-3sigma influences telomere behavior and ionizing radiation-induced chromosomal instability. *Molecular and cellular biology* 20, 7764-7772.
- Dietel, M., and Hauptmann, S. (2000). Serous tumors of low malignant potential of the ovary. 1. Diagnostic pathology. *Virchows Archiv : an international journal of pathology* 436, 403-412.
- Doll, A., Gonzalez, M., Abal, M., Llauro, M., Rigau, M., Colas, E., Monge, M., Xercavins, J., Capella, G., Diaz, B., *et al.* (2009). An orthotopic endometrial cancer mouse model demonstrates a role for RUNX1 in distant metastasis. *International journal of cancer Journal international du cancer* 125, 257-263.

- Drapkin, R., von Horsten, H.H., Lin, Y., Mok, S.C., Crum, C.P., Welch, W.R., and Hecht, J.L. (2005). Human epididymis protein 4 (HE4) is a secreted glycoprotein that is overexpressed by serous and endometrioid ovarian carcinomas. *Cancer research* 65, 2162-2169.
- Dupont, J.M., Tost, J., Jammes, H., and Gut, I.G. (2004). De novo quantitative bisulfite sequencing using the pyrosequencing technology. *Analytical biochemistry* 333, 119-127.
- Duprez, E. (2004). A new role for C/EBPbeta in acute promyelocytic leukemia. *Cell cycle* 3, 389-390.
- Eads, C.A., Danenberg, K.D., Kawakami, K., Saltz, L.B., Blake, C., Shibata, D., Danenberg, P.V., and Laird, P.W. (2000). MethyLight: a high-throughput assay to measure DNA methylation. *Nucleic acids research* 28, E32.
- Egger, G., Liang, G., Aparicio, A., and Jones, P.A. (2004). Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature* 429, 457-463.
- Ehrhardt, H., Schrembs, D., Moritz, C., Wachter, F., Haldar, S., Graubner, U., Nathrath, M., and Jeremias, I. (2011). Optimized anti-tumor effects of anthracyclines plus Vinca alkaloids using a novel, mechanism-based application schedule. *Blood* 118, 6123-6131.
- Ehrlich, M. (2006). Cancer-linked DNA hypomethylation and its relationship to hypermethylation. *Current topics in microbiology and immunology* 310, 251-274.
- Esteller, M. (2007). Epigenetic gene silencing in cancer: the DNA hypermethylome. *Human molecular genetics* 16 *Spec No 1*, R50-59.
- Esteller, M., Corn, P.G., Baylin, S.B., and Herman, J.G. (2001). A gene hypermethylation profile of human cancer. *Cancer research* 61, 3225-3229.
- Fainaru, O., Woolf, E., Lotem, J., Yarmus, M., Brenner, O., Goldenberg, D., Negreanu, V., Bernstein, Y., Levanon, D., Jung, S. & Groner, Y. (2004) Runx3 regulates mouse TGF-beta-mediated dendritic cell function and its absence results in airway inflammation, *The EMBO journal*. 23, 969-79.
- Fathalla, M.F. (1971). Incessant ovulation--a factor in ovarian neoplasia? *Lancet* 2, 163.
- Feeley, K.M., and Wells, M. (2001). Precursor lesions of ovarian epithelial malignancy. *Histopathology* 38, 87-95.
- Feinberg, A.P. (2007). Phenotypic plasticity and the epigenetics of human disease. *Nature* 447, 433-440.
- Feinberg, A.P., Ohlsson, R., and Henikoff, S. (2006). The epigenetic progenitor origin of human cancer. *Nature reviews Genetics* 7, 21-33.

Feinberg, A.P., and Vogelstein, B. (1983). Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts. *Nature* *301*, 89-92.

Feng, W., Marquez, R.T., Lu, Z., Liu, J., Lu, K.H., Issa, J.P., Fishman, D.M., Yu, Y., and Bast, R.C., Jr. (2008). Imprinted tumor suppressor genes ARHI and PEG3 are the most frequently down-regulated in human ovarian cancers by loss of heterozygosity and promoter methylation. *Cancer* *112*, 1489-1502.

Ficz, G., Branco, M.R., Seisenberger, S., Santos, F., Krueger, F., Hore, T.A., Marques, C.J., Andrews, S., and Reik, W. (2011). Dynamic regulation of 5-hydroxymethylcytosine in mouse ES cells and during differentiation. *Nature* *473*, 398-402.

Fiegl, H., Windbichler, G., Mueller-Holzner, E., Goebel, G., Lechner, M., Jacobs, I.J., and Widschwendter, M. (2008). HOXA11 DNA methylation--a novel prognostic biomarker in ovarian cancer. *International journal of cancer Journal international du cancer* *123*, 725-729.

FIGO (1971). Classification and staging of malignant tumours in the female pelvis. *Acta Obstet Gynecol Scand* **50**: 1-7.

Finnin, M.S., Donigian, J.R., Cohen, A., Richon, V.M., Rifkind, R.A., Marks, P.A., Breslow, R., and Pavletich, N.P. (1999). Structures of a histone deacetylase homologue bound to the TSA and SAHA inhibitors. *Nature* *401*, 188-193.

Florl, A.R., Lower, R., Schmitz-Drager, B.J., and Schulz, W.A. (1999). DNA methylation and expression of LINE-1 and HERV-K provirus sequences in urothelial and renal cell carcinomas. *British journal of cancer* *80*, 1312-1321.

Fredrickson, T.N. (1987). Ovarian tumors of the hen. *Environmental health perspectives* *73*, 35-51.

Fridman, J.S., Rehemtulla, A., Hofmann, A., Blau, H.M., and Maybaum, J. (1998). Expression of Bcl-XS alters cytokinetics and decreases clonogenic survival in K12 rat colon carcinoma cells. *Oncogene* *17*, 2981-2991.

Friedman, R.C., Farh, K.K., Burge, C.B., and Bartel, D.P. (2009). Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome research* *19*, 92-105.

Frommer, M., McDonald, L.E., Millar, D.S., Collis, C.M., Watt, F., Grigg, G.W., Molloy, P.L., and Paul, C.L. (1992). A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *89*, 1827-1831.

Fryxell, K.J., and Moon, W.J. (2005). CpG mutation rates in the human genome are highly dependent on local GC content. *Molecular biology and evolution* *22*, 650-658.

Fu, S., Hu, W., Iyer, R., Kavanagh, J.J., Coleman, R.L., Levenback, C.F., Sood, A.K., Wolf, J.K., Gershenson, D.M., Markman, M., *et al.* (2011). Phase 1b-2a study to reverse platinum resistance through use of a hypomethylating agent, azacitidine, in patients with platinum-resistant or platinum-refractory epithelial ovarian cancer. *Cancer* *117*, 1661-1669.

Fukai, N., Shichiri, M., Ozawa, N., Matsushita, M., and Hirata, Y. (2003). Coexpression of calcitonin receptor-like receptor and receptor activity-modifying protein 2 or 3 mediates the antimigratory effect of adrenomedullin. *Endocrinology* *144*, 447-453.

Fuks, F., Hurd, P.J., Deplus, R., and Kouzarides, T. (2003). The DNA methyltransferases associate with HP1 and the SUV39H1 histone methyltransferase. *Nucleic acids research* *31*, 2305-2312.

Gadducci, A., Biglia, N., Cosio, S., Sismondi, P., and Genazzani, A.R. (2010). Gynaecologic challenging issues in the management of BRCA mutation carriers: oral contraceptives, prophylactic salpingo-oophorectomy and hormone replacement therapy. *Gynecological endocrinology : the official journal of the International Society of Gynecological Endocrinology* *26*, 568-577.

Gallion, H., van Nagell, J.R., Jr., Donaldson, E.S., Hanson, M.B., and Powell, D.F. (1983). Immature teratoma of the ovary. *American journal of obstetrics and gynecology* *146*, 361-365.

Gardiner-Garden, M., and Frommer, M. (1987). CpG islands in vertebrate genomes. *Journal of molecular biology* *196*, 261-282.

Gershenson, D.M., Sun, C.C., Lu, K.H., Coleman, R.L., Sood, A.K., Malpica, A., Deavers, M.T., Silva, E.G., and Bodurka, D.C. (2006). Clinical behavior of stage II-IV low-grade serous carcinoma of the ovary. *Obstetrics and gynecology* *108*, 361-368.

Glinsky, G.V. (2006). Genomic models of metastatic cancer: functional analysis of death-from-cancer signature genes reveals aneuploid, anoikis-resistant, metastasis-enabling phenotype with altered cell cycle control and activated Polycomb Group (PcG) protein chromatin silencing pathway. *Cell cycle* *5*, 1208-1216.

Goff, B.A., Mandel, L.S., Drescher, C.W., Urban, N., Gough, S., Schurman, K.M., Patras, J., Mahony, B.S., and Andersen, M.R. (2007). Development of an ovarian cancer symptom index: possibilities for earlier detection. *Cancer* *109*, 221-227.

Gram, I.T., Lukanova, A., Brill, I., Braaten, T., Lund, E., Lundin, E., Overvad, K., Tjonneland, A., Clavel-Chapelon, F., Chabbert-Buffet, N., *et al.* (2012). Cigarette smoking and risk of histological subtypes of epithelial ovarian cancer in the EPIC cohort study. *International journal of cancer Journal international du cancer* *130*, 2204-2210.

Grant, S., Easley, C., and Kirkpatrick, P. (2007). Vorinostat. *Nature reviews Drug discovery* *6*, 21-22.

Gras, E., Cortes, J., Diez, O., Alonso, C., Matias-Guiu, X., Baiget, M., and Prat, J. (2001). Loss of heterozygosity on chromosome 13q12-q14, BRCA-2 mutations and lack of BRCA-2 promoter hypermethylation in sporadic epithelial ovarian tumors. *Cancer* 92, 787-795.

Hamstra, D.A., Page, M., Maybaum, J., and Rehemtulla, A. (2000). Expression of endogenously activated secreted or cell surface carboxypeptidase A sensitizes tumor cells to methotrexate-alpha-peptide prodrugs. *Cancer research* 60, 657-665.

Han, J., Lee, Y., Yeom, K.H., Nam, J.W., Heo, I., Rhee, J.K., Sohn, S.Y., Cho, Y., Zhang, B.T., and Kim, V.N. (2006). Molecular basis for the recognition of primary microRNAs by the Drosha-DGCR8 complex. *Cell* 125, 887-901.

Hankinson, S.E., Hunter, D.J., Colditz, G.A., Willett, W.C., Stampfer, M.J., Rosner, B., Hennekens, C.H., and Speizer, F.E. (1993). Tubal ligation, hysterectomy, and risk of ovarian cancer. A prospective study. *JAMA : the journal of the American Medical Association* 270, 2813-2818.

Hantke, B., Harbeck, N., Schmalfeldt, B., Claes, I., Hiller, O., Luther, M.O., Welk, A., Kuhn, W., Schmitt, M., Tschesche, H., *et al.* (2003). Clinical relevance of matrix metalloproteinase-13 determined with a new highly specific and sensitive ELISA in ascitic fluid of advanced ovarian carcinoma patients. *Biological chemistry* 384, 1247-1251.

Haruki, S., Imoto, I., Kozaki, K., Matsui, T., Kawachi, H., Komatsu, S., Muramatsu, T., Shimada, Y., Kawano, T., and Inazawa, J. Frequent silencing of protocadherin 17, a candidate tumour suppressor for esophageal squamous cell carcinoma. *Carcinogenesis* 31, 1027-1036.

Herceg, Z. (2007). Epigenetics and cancer: towards an evaluation of the impact of environmental and dietary factors. *Mutagenesis* 22, 91-103.

Herceg, Z., and Ushijima, T. (2010). Introduction: epigenetics and cancer. *Advances in genetics* 70, 1-23.

Herceg, Z., and Vaissiere, T. (2011). Epigenetic mechanisms and cancer: an interface between the environment and the genome. *Epigenetics : official journal of the DNA Methylation Society* 6, 804-819.

Herman, J.G., Graff, J.R., Myohanen, S., Nelkin, B.D., and Baylin, S.B. (1996). Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 9821-9826.

Heyn, H., and Esteller, M. (2012). DNA methylation profiling in the clinic: applications and challenges. *Nature reviews Genetics* 13, 679-692.

- Hilton, J.L., Geisler, J.P., Rathe, J.A., Hattermann-Zogg, M.A., DeYoung, B., and Buller, R.E. (2002). Inactivation of BRCA1 and BRCA2 in ovarian cancer. *Journal of the National Cancer Institute* 94, 1396-1406.
- Hishikawa, K., Oemar, B.S., Tanner, F.C., Nakaki, T., Luscher, T.F., and Fujii, T. (1999). Connective tissue growth factor induces apoptosis in human breast cancer cell line MCF-7. *The Journal of biological chemistry* 274, 37461-37466.
- Ho, E.S., Lai, C.R., Hsieh, Y.T., Chen, J.T., Lin, A.J., Hung, M.H., and Liu, F.S. (2001). p53 mutation is infrequent in clear cell carcinoma of the ovary. *Gynecologic oncology* 80, 189-193.
- Ho, Y.P., Au-Yeung, S.C., and To, K.K. (2003). Platinum-based anticancer agents: innovative design strategies and biological perspectives. *Medicinal research reviews* 23, 633-655.
- Hoerl, H.D., and Hart, W.R. (1998). Primary ovarian mucinous cystadenocarcinomas: a clinicopathologic study of 49 cases with long-term follow-up. *The American journal of surgical pathology* 22, 1449-1462.
- Hofstetter, B., Niemierko, A., Forrer, C., Benhattar, J., Albertini, V., Pruschy, M., Bosman, F.T., Catapano, C.V., and Ciernik, I.F. (2010). Impact of genomic methylation on radiation sensitivity of colorectal carcinoma. *International journal of radiation oncology, biology, physics* 76, 1512-1519.
- Hoglund, M., Gisselsson, D., Hansen, G.B., Sall, T., and Mitelman, F. (2003). Ovarian carcinoma develops through multiple modes of chromosomal evolution. *Cancer research* 63, 3378-3385.
- Hollander, M.C., Kovalsky, O., Salvador, J.M., Kim, K.E., Patterson, A.D., Haines, D.C., and Fornace, A.J., Jr. (2001). Dimethylbenzanthracene carcinogenesis in Gadd45a-null mice is associated with decreased DNA repair and increased mutation frequency. *Cancer research* 61, 2487-2491.
- Holschneider, C.H., and Berek, J.S. (2000). Ovarian cancer: epidemiology, biology, and prognostic factors. *Seminars in surgical oncology* 19, 3-10.
- Horard, B., Eymery, A., Fourel, G., Vassetzky, N., Puechberty, J., Roizes, G., Lebrigand, K., Barbry, P., Laugraud, A., Gautier, C., *et al.* (2009). Global analysis of DNA methylation and transcription of human repetitive sequences. *Epigenetics : official journal of the DNA Methylation Society* 4, 339-350.
- Houshdaran, S., Hawley, S., Palmer, C., Campan, M., Olsen, M.N., Ventura, A.P., Knudsen, B.S., Drescher, C.W., Urban, N.D., Brown, P.O., *et al.* (2010). DNA methylation profiles of ovarian epithelial carcinoma tumors and cell lines. *PloS one* 5, e9359.

Huang, X., Peng, J.W., Speck, N.A., and Bushweller, J.H. (1999). Solution structure of core binding factor beta and map of the CBF alpha binding site. *Nature structural biology* 6, 624-627.

Huang, Y.W., Liu, J.C., Deatherage, D.E., Luo, J., Mutch, D.G., Goodfellow, P.J., Miller, D.S., and Huang, T.H. (2009). Epigenetic repression of microRNA-129-2 leads to overexpression of SOX4 oncogene in endometrial cancer. *Cancer research* 69, 9038-9046.

Huang, Z., Cheng, Y., Chiu, P.M., Cheung, F.M., Nicholls, J.M., Kwong, D.L., Lee, A.W., Zabarovsky, E.R., Stanbridge, E.J., Lung, H.L., *et al.* (2012). Tumor suppressor Alpha B-crystallin (CRYAB) associates with the cadherin/catenin adherens junction and impairs NPC progression-associated properties. *Oncogene* 31, 3709-3720.

Hubbert, C., Guardiola, A., Shao, R., Kawaguchi, Y., Ito, A., Nixon, A., Yoshida, M., Wang, X.F., and Yao, T.P. (2002). HDAC6 is a microtubule-associated deacetylase. *Nature* 417, 455-458.

Hutvagner, G., McLachlan, J., Pasquinelli, A.E., Balint, E., Tuschl, T., and Zamore, P.D. (2001). A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA. *Science* 293, 834-838.

Ibanez de Caceres, I., Battagli, C., Esteller, M., Herman, J.G., Dulaimi, E., Edelson, M.I., Bergman, C., Ehya, H., Eisenberg, B.L., and Cairns, P. (2004). Tumor cell-specific BRCA1 and RASSF1A hypermethylation in serum, plasma, and peritoneal fluid from ovarian cancer patients. *Cancer research* 64, 6476-6481.

Ichikawa, Y., Nishida, M., Suzuki, H., Yoshida, S., Tsunoda, H., Kubo, T., Uchida, K., and Miwa, M. (1994). Mutation of K-ras protooncogene is associated with histological subtypes in human mucinous ovarian tumors. *Cancer research* 54, 33-35.

Illingworth, R.S., and Bird, A.P. (2009). CpG islands--'a rough guide'. *FEBS letters* 583, 1713-1720.

Inoue, T., Eguchi, T., Oda, Y., Nishiyama, K., Fujii, K., Izumi, H., Kohno, K., Yamaguchi, K., Tanaka, M., and Tsuneyoshi, M. (2007). Expression of GalNAc-T3 and its relationships with clinicopathological factors in 61 extrahepatic bile duct carcinomas analyzed using stepwise sections - special reference to its association with lymph node metastases. *Mod Pathol* 20, 267-276.

Iozzo, R.V., Buraschi, S., Genua, M., Xu, S.Q., Solomides, C.C., Peiper, S.C., Gomella, L.G., Owens, R.C., and Morrione, A. (2011). Decorin antagonizes IGF receptor I (IGF-IR) function by interfering with IGF-IR activity and attenuating downstream signaling. *The Journal of biological chemistry* 286, 34712-34721.

Issa, J.P., and Kantarjian, H.M. (2009). Targeting DNA methylation. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 15, 3938-3946.

- Ivanov, M., Kacevska, M., and Ingelman-Sundberg, M. (2012). Epigenomics and interindividual differences in drug response. *Clinical pharmacology and therapeutics* 92, 727-736.
- Iwamoto, Y., Robey, F.A., Graf, J., Sasaki, M., Kleinman, H.K., Yamada, Y., and Martin, G.R. (1987). YIGSR, a synthetic laminin pentapeptide, inhibits experimental metastasis formation. *Science* 238, 1132-1134.
- Izutsu, N., Maesawa, C., Shibazaki, M., Oikawa, H., Shoji, T., Sugiyama, T., and Masuda, T. (2008). Epigenetic modification is involved in aberrant expression of class III beta-tubulin, TUBB3, in ovarian cancer cells. *International journal of oncology* 32, 1227-1235.
- Jacobs, I.J., Kohler, M.F., Wiseman, R.W., Marks, J.R., Whitaker, R., Kerns, B.A., Humphrey, P., Berchuck, A., Ponder, B.A., and Bast, R.C., Jr. (1992). Clonal origin of epithelial ovarian carcinoma: analysis by loss of heterozygosity, p53 mutation, and X-chromosome inactivation. *Journal of the National Cancer Institute* 84, 1793-1798.
- Jaenisch, R., and Bird, A. (2003). Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nature genetics* 33 *Suppl*, 245-254.
- Jin, S.G., Kadam, S., and Pfeifer, G.P. (2010). Examination of the specificity of DNA methylation profiling techniques towards 5-methylcytosine and 5-hydroxymethylcytosine. *Nucleic acids research* 38, e125.
- Johnstone, R.W., Gerber, M., Landewe, T., Tollefson, A., Wold, W.S., and Shilatifard, A. (2001). Functional analysis of the leukemia protein ELL: evidence for a role in the regulation of cell growth and survival. *Mol Cell Biol* 21, 1672-1681.
- Jones, M.B. (2006). Borderline ovarian tumors: current concepts for prognostic factors and clinical management. *Clinical obstetrics and gynecology* 49, 517-525.
- Jones, P.A., and Baylin, S.B. (2002). The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nature reviews Genetics* 3, 415-428.
- Jones, P.A., and Baylin, S.B. (2007). The epigenomics of cancer. *Cell* 128, 683-692.
- Jones, S., Wang, T.L., Shih Ie, M., Mao, T.L., Nakayama, K., Roden, R., Glas, R., Slamon, D., Diaz, L.A., Jr., Vogelstein, B., *et al.* (2010). Frequent mutations of chromatin remodeling gene ARID1A in ovarian clear cell carcinoma. *Science* 330, 228-231.
- Jordan, S., Green, A., and Webb, P. (2006). Benign epithelial ovarian tumours-cancer precursors or markers for ovarian cancer risk? *Cancer Causes Control* 17, 623-632.
- Joulie, M., Miotto, B., and Defossez, P.A. (2010). Mammalian methyl-binding proteins: what might they do? *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* 32, 1025-1032.



Jovanovic, J., Ronneberg, J.A., Tost, J., and Kristensen, V. (2010). The epigenetics of breast cancer. *Molecular oncology* 4, 242-254.

Kaern, J., Trope, C.G., and Abeler, V.M. (1993). A retrospective study of 370 borderline tumors of the ovary treated at the Norwegian Radium Hospital from 1970 to 1982. A review of clinicopathologic features and treatment modalities. *Cancer* 71, 1810-1820.

Kaku, T., Ogawa, S., Kawano, Y., Ohishi, Y., Kobayashi, H., Hirakawa, T., and Nakano, H. (2003). Histological classification of ovarian cancer. *Med Electron Microsc* 36, 9-17.

Kaminskas, E., Farrell, A.T., Wang, Y.C., Sridhara, R., and Pazdur, R. (2005). FDA drug approval summary: azacitidine (5-azacytidine, Vidaza) for injectable suspension. *The oncologist* 10, 176-182.

Kanamori, Y., Matsushima, M., Minaguchi, T., Kobayashi, K., Sagae, S., Kudo, R., Terakawa, N., and Nakamura, Y. (1999). Correlation between expression of the matrix metalloproteinase-1 gene in ovarian cancers and an insertion/deletion polymorphism in its promoter region. *Cancer research* 59, 4225-4227.

Kaneuchi, M., Sasaki, M., Tanaka, Y., Shiina, H., Verma, M., Ebina, Y., Nomura, E., Yamamoto, R., Sakuragi, N., and Dahiya, R. (2004). Expression and methylation status of 14-3-3 sigma gene can characterize the different histological features of ovarian cancer. *Biochemical and biophysical research communications* 316, 1156-1162.

Kaneuchi, M., Sasaki, M., Tanaka, Y., Shiina, H., Yamada, H., Yamamoto, R., Sakuragi, N., Enokida, H., Verma, M., and Dahiya, R. (2005). WT1 and WT1-AS genes are inactivated by promoter methylation in ovarian clear cell adenocarcinoma. *Cancer* 104, 1924-1930.

Kang, J.U., Koo, S.H., Kwon, K.C., and Park, J.W. Frequent silence of chromosome 9p, homozygous DOCK8, DMRT1 and DMRT3 deletion at 9p24.3 in squamous cell carcinoma of the lung. *Int J Oncol* 37, 327-335.

Kantarjian, H.M., O'Brien, S., Shan, J., Aribi, A., Garcia-Manero, G., Jabbour, E., Ravandi, F., Cortes, J., Davisson, J., and Issa, J.P. (2007). Update of the decitabine experience in higher risk myelodysplastic syndrome and analysis of prognostic factors associated with outcome. *Cancer* 109, 265-273.

Karam, A., and Dorigo, O. (2012). MMPs in ovarian cancer as therapeutic targets. *Anti-cancer agents in medicinal chemistry* 12, 764-772.

Karnezis, T., Shayan, R., Fox, S., Achen, M.G., and Stacker, S.A. (2012). The connection between lymphangiogenic signalling and prostaglandin biology: a missing link in the metastatic pathway. *Oncotarget* 3, 893-906.

- Kayed, H., Jiang, X., Keleg, S., Jesnowski, R., Giese, T., Berger, M.R., Esposito, I., Lohr, M., Friess, H., and Kleeff, J. (2007). Regulation and functional role of the Runt-related transcription factor-2 in pancreatic cancer. *Br J Cancer* *97*, 1106-1115.
- Khraiwesh, B., Arif, M.A., Seumel, G.I., Ossowski, S., Weigel, D., Reski, R., and Frank, W. (2010). Transcriptional control of gene expression by microRNAs. *Cell* *140*, 111-122.
- Kim, D.J., Akiyama, T.E., Harman, F.S., Burns, A.M., Shan, W., Ward, J.M., Kennett, M.J., Gonzalez, F.J., and Peters, J.M. (2004). Peroxisome proliferator-activated receptor beta (delta)-dependent regulation of ubiquitin C expression contributes to attenuation of skin carcinogenesis. *The Journal of biological chemistry* *279*, 23719-23727.
- Kim, J.E., Kim, S.J., Jeong, H.W., Lee, B.H., Choi, J.Y., Park, R.W., Park, J.Y., and Kim, I.S. (2003). RGD peptides released from beta ig-h3, a TGF-beta-induced cell-adhesive molecule, mediate apoptosis. *Oncogene* *22*, 2045-2053.
- King, M.C., Marks, J.H., and Mandell, J.B. (2003). Breast and ovarian cancer risks due to inherited mutations in BRCA1 and BRCA2. *Science* *302*, 643-646.
- Kinjo, K., Sandoval, S., Sakamoto, K.M., and Shankar, D.B. (2005). The role of CREB as a proto-oncogene in hematopoiesis. *Cell cycle* *4*, 1134-1135.
- Klose, R.J., and Bird, A.P. (2006). Genomic DNA methylation: the mark and its mediators. *Trends in biochemical sciences* *31*, 89-97.
- Kobel, M., Kalloger, S.E., Boyd, N., McKinney, S., Mehl, E., Palmer, C., Leung, S., Bowen, N.J., Ionescu, D.N., Rajput, A., *et al.* (2008). Ovarian carcinoma subtypes are different diseases: implications for biomarker studies. *PLoS Med* *5*, e232.
- Kolasa, I.K., Rembiszewska, A., Janiec-Jankowska, A., Dansonka-Mieszkowska, A., Lewandowska, A.M., Konopka, B., and Kupryjanczyk, J. (2006). PTEN mutation, expression and LOH at its locus in ovarian carcinomas. Relation to TP53, K-RAS and BRCA1 mutations. *Gynecologic oncology* *103*, 692-697.
- Komori, T., Yagi, H., Nomura, S., Yamaguchi, A., Sasaki, K., Deguchi, K., Shimizu, Y., Bronson, R. T., Gao, Y. H., Inada, M., Sato, M., Okamoto, R., Kitamura, Y., Yoshiki, S. & Kishimoto, T. (1997) Targeted disruption of Cbfa1 results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts, *Cell*. **89**, 755-64.
- Korah, R.M., Sysounthone, V., Golowa, Y., and Wieder, R. (2000). Basic fibroblast growth factor confers a less malignant phenotype in MDA-MB-231 human breast cancer cells. *Cancer research* *60*, 733-740.
- Krause, D.S., Fackler, M.J., Civin, C.I., and May, W.S. (1996). CD34: structure, biology, and clinical utility. *Blood* *87*, 1-13.

Kulis, M., and Esteller, M. (2010). DNA methylation and cancer. *Advances in genetics* 70, 27-56.

Kurman, R.J., and Shih Ie, M. (2008). Pathogenesis of ovarian cancer: lessons from morphology and molecular biology and their clinical implications. *International journal of gynecological pathology : official journal of the International Society of Gynecological Pathologists* 27, 151-160.

Kwong, J., Lee, J.Y., Wong, K.K., Zhou, X., Wong, D.T., Lo, K.W., Welch, W.R., Berkowitz, R.S., and Mok, S.C. (2006). Candidate tumor-suppressor gene DLEC1 is frequently downregulated by promoter hypermethylation and histone hypoacetylation in human epithelial ovarian cancer. *Neoplasia* 8, 268-278.

Lai, E.C. (2002). Micro RNAs are complementary to 3' UTR sequence motifs that mediate negative post-transcriptional regulation. *Nature genetics* 30, 363-364.

Laird, P.W. (2003). The power and the promise of DNA methylation markers. *Nature reviews Cancer* 3, 253-266.

Landen, C.N., Jr., Birrer, M.J., and Sood, A.K. (2008). Early events in the pathogenesis of epithelial ovarian cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 26, 995-1005.

Lander, E.S., Linton, L.M., Birren, B., Nusbaum, C., Zody, M.C., Baldwin, J., Devon, K., Dewar, K., Doyle, M., FitzHugh, W., *et al.* (2001). Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409, 860-921.

Laronga, C., Yang, H.Y., Neal, C., and Lee, M.H. (2000). Association of the cyclin-dependent kinases and 14-3-3 sigma negatively regulates cell cycle progression. *The Journal of biological chemistry* 275, 23106-23112.

Leandro-Garcia, L.J., Leskela, S., Landa, I., Montero-Conde, C., Lopez-Jimenez, E., Leton, R., Cascon, A., Robledo, M., and Rodriguez-Antona, C. Tumoral and tissue-specific expression of the major human beta-tubulin isotypes. *Cytoskeleton (Hoboken)* 67, 214-223.

Lecomte, C., Andujar, P., Renier, A., Kheuang, L., Abramowski, V., Mellottee, L., Fleury-Feith, J., Zucman-Rossi, J., Giovannini, M., and Jaurand, M.C. (2005). Similar tumor suppressor gene alteration profiles in asbestos-induced murine and human mesothelioma. *Cell cycle* 4, 1862-1869.

Lee, C. W., Chuang, L. S., Kimura, S., Lai, S. K., Ong, C. W., Yan, B., Salto-Tellez, M., Choolani, M. & Ito, Y. (2011) RUNX3 functions as an oncogene in ovarian cancer, *Gynecologic oncology*. 122, 410-7.

Lee, P.S., Teaberry, V.S., Bland, A.E., Huang, Z., Whitaker, R.S., Baba, T., Fujii, S., Secord, A.A., Berchuck, A., and Murphy, S.K. (2010). Elevated MAL expression is

accompanied by promoter hypomethylation and platinum resistance in epithelial ovarian cancer. *International journal of cancer Journal international du cancer* 126, 1378-1389.

Lee, Y., Ahn, C., Han, J., Choi, H., Kim, J., Yim, J., Lee, J., Provost, P., Radmark, O., Kim, S., *et al.* (2003). The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* 425, 415-419.

Lee, Y., Miron, A., Drapkin, R., Nucci, M.R., Medeiros, F., Saleemuddin, A., Garber, J., Birch, C., Mou, H., Gordon, R.W., *et al.* (2007). A candidate precursor to serous carcinoma that originates in the distal fallopian tube. *The Journal of pathology* 211, 26-35.

Lee, Y.H., Heo, J.H., Kim, T.H., Kang, H., Kim, G., Kim, J., Cho, S.H., and An, H.J. (2011). Significance of cell cycle regulatory proteins as malignant and prognostic biomarkers in ovarian epithelial tumors. *International journal of gynecological pathology : official journal of the International Society of Gynecological Pathologists* 30, 205-217.

Lehtinen, L., Ketola, K., Makela, R., Mpindi, J.P., Viitala, M., Kallioniemi, O., and Iljin, K. (2013). High-throughput RNAi screening for novel modulators of vimentin expression identifies MTHFD2 as a regulator of breast cancer cell migration and invasion. *Oncotarget* 4, 48-63.

Lengyel, E. (2010). Ovarian cancer development and metastasis. *The American journal of pathology* 177, 1053-1064.

Levanon, D., Bettoun, D., Harris-Cerruti, C., Woolf, E., Negreanu, V., Eilam, R., Bernstein, Y., Goldenberg, D., Xiao, C., Fliegau, M., Kremer, E., Otto, F., Brenner, O., Lev-Tov, A. & Groner, Y. (2002) The Runx3 transcription factor regulates development and survival of TrkC dorsal root ganglia neurons, *The EMBO journal*. 21, 3454-63.

Li, H., Bitler, B.G., Vathipadiekal, V., Maradeo, M.E., Slifker, M., Creasy, C.L., Tummino, P.J., Cairns, P., Birrer, M.J., and Zhang, R. (2012a). ALDH1A1 is a novel EZH2 target gene in epithelial ovarian cancer identified by genome-wide approaches. *Cancer prevention research* 5, 484-491.

Li, J., Wood, W.H., 3rd, Becker, K.G., Weeraratna, A.T., and Morin, P.J. (2007). Gene expression response to cisplatin treatment in drug-sensitive and drug-resistant ovarian cancer cells. *Oncogene* 26, 2860-2872.

Li, L.C., and Dahiya, R. (2002). MethPrimer: designing primers for methylation PCRs. *Bioinformatics* 18, 1427-1431.

Li, W., and Giancotti, F.G. (2010). Merlin's tumor suppression linked to inhibition of the E3 ubiquitin ligase CRL4 (DCAF1). *Cell cycle* 9, 4433-4436.

Li, W., Xu, S., Lin, S., and Zhao, W. (2012b). Overexpression of runt-related transcription factor-2 is associated with advanced tumor progression and poor prognosis in epithelial ovarian cancer. *Journal of biomedicine & biotechnology* 2012, 456534.

Li, Y., Hu, W., Shen, D.Y., Kavanagh, J.J., and Fu, S. (2009). Azacitidine enhances sensitivity of platinum-resistant ovarian cancer cells to carboplatin through induction of apoptosis. *American journal of obstetrics and gynecology* 200, 177 e171-179.

Lindsey, J.C., Anderton, J.A., Lusher, M.E., and Clifford, S.C. (2005). Epigenetic events in medulloblastoma development. *Neurosurgical focus* 19, E10.

Lister, R., Pelizzola, M., Downen, R.H., Hawkins, R.D., Hon, G., Tonti-Filippini, J., Nery, J.R., Lee, L., Ye, Z., Ngo, Q.M., *et al.* (2009). Human DNA methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences. *Nature* 462, 315-322.

Litkouhi, B., Kwong, J., Lo, C.M., Smedley, J.G., 3rd, McClane, B.A., Aponte, M., Gao, Z., Sarno, J.L., Hinners, J., Welch, W.R., *et al.* (2007). Claudin-4 overexpression in epithelial ovarian cancer is associated with hypomethylation and is a potential target for modulation of tight junction barrier function using a C-terminal fragment of *Clostridium perfringens* enterotoxin. *Neoplasia* 9, 304-314.

Lokshin, A.E. (2012). The quest for ovarian cancer screening biomarkers: are we on the right road? *International journal of gynecological cancer : official journal of the International Gynecological Cancer Society* 22 Suppl 1, S35-40.

Lopez-Serra, P., and Esteller, M. (2012). DNA methylation-associated silencing of tumor-suppressor microRNAs in cancer. *Oncogene* 31, 1609-1622.

Lorincz, M.C., Schubeler, D., and Groudine, M. (2001). Methylation-mediated proviral silencing is associated with MeCP2 recruitment and localized histone H3 deacetylation. *Molecular and cellular biology* 21, 7913-7922.

Lu, K.H., Patterson, A.P., Wang, L., Marquez, R.T., Atkinson, E.N., Baggerly, K.A., Ramoth, L.R., Rosen, D.G., Liu, J., Hellstrom, I., *et al.* (2004). Selection of potential markers for epithelial ovarian cancer with gene expression arrays and recursive descent partition analysis. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 10, 3291-3300.

Lu, Z.Y., Dong, R., Li, D., Li, W.B., Xu, F.Q., Geng, Y., and Zhang, Y.S. (2012). SNAIL overexpression induces stemness and promotes ovarian cancer cell invasion and metastasis. *Oncology reports* 27, 1587-1591.

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., *et al.* (2008). A microRNA DNA methylation signature for human cancer metastasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 13556-13561.

Lutz, A.M., Willmann, J.K., Drescher, C.W., Ray, P., Cochran, F.V., Urban, N., and Gambhir, S.S. (2011). Early diagnosis of ovarian carcinoma: is a solution in sight? *Radiology* 259, 329-345.

- Lynch, H.T., Casey, M.J., Snyder, C.L., Bewtra, C., Lynch, J.F., Butts, M., and Godwin, A.K. (2009). Hereditary ovarian carcinoma: heterogeneity, molecular genetics, pathology, and management. *Molecular oncology* 3, 97-137.
- Madsen, C.V., Steffensen, K.D., Olsen, D.A., Waldstrom, M., Sogaard, C.H., Brandslund, I., and Jakobsen, A. (2012). Serum platelet-derived growth factor and fibroblast growth factor in patients with benign and malignant ovarian tumors. *Anticancer research* 32, 3817-3825.
- Mandai, M., Konishi, I., Kuroda, H., Komatsu, T., Yamamoto, S., Nanbu, K., Matsushita, K., Fukumoto, M., Yamabe, H., and Mori, T. (1998). Heterogeneous distribution of K-ras-mutated epithelia in mucinous ovarian tumors with special reference to histopathology. *Human pathology* 29, 34-40.
- Mann, A.P., Somasunderam, A., Nieves-Alicea, R., Li, X., Hu, A., Sood, A.K., Ferrari, M., Gorenstein, D.G., and Tanaka, T. (2010). Identification of thioaptamer ligand against E-selectin: potential application for inflamed vasculature targeting. *PloS one* 5.
- Mansour, M., Palese, P., and Zamarin, D. (2011). Oncolytic specificity of Newcastle disease virus is mediated by selectivity for apoptosis-resistant cells. *Journal of virology* 85, 6015-6023.
- Marks, P., Rifkind, R.A., Richon, V.M., Breslow, R., Miller, T., and Kelly, W.K. (2001). Histone deacetylases and cancer: causes and therapies. *Nature reviews Cancer* 1, 194-202.
- Marks, P.A. (2010). The clinical development of histone deacetylase inhibitors as targeted anticancer drugs. *Expert opinion on investigational drugs* 19, 1049-1066.
- Martin, J.W., Zielenska, M., Stein, G.S., van Wijnen, A.J., and Squire, J.A. (2011). The Role of RUNX2 in Osteosarcoma Oncogenesis. *Sarcoma* 2011, 282745.
- Massad, L.S., Jr., Hunter, V.J., Szpak, C.A., Clarke-Pearson, D.L., and Creasman, W.T. (1991). Epithelial ovarian tumors of low malignant potential. *Obstetrics and gynecology* 78, 1027-1032.
- Matei, D.E., and Nephew, K.P. (2010). Epigenetic therapies for chemoresensitization of epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 116, 195-201.
- May, W.S., Hoare, K., Hoare, S., Reinhard, M.K., Lee, Y.J., and Oh, S.P. Tnk1/Kos1: a novel tumor suppressor. *Trans Am Clin Climatol Assoc* 121, 281-292; discussion 292-283.
- Mayr, D., and Diebold, J. (2000). Grading of ovarian carcinomas. *International journal of gynecological pathology : official journal of the International Society of Gynecological Pathologists* 19, 348-353.

Mayr, D., Hirschmann, A., Lohrs, U., and Diebold, J. (2006). KRAS and BRAF mutations in ovarian tumors: a comprehensive study of invasive carcinomas, borderline tumors and extraovarian implants. *Gynecologic oncology* *103*, 883-887.

McGarvey, K.M., Van Neste, L., Cope, L., Ohm, J.E., Herman, J.G., Van Criekinge, W., Schuebel, K.E., and Baylin, S.B. (2008). Defining a chromatin pattern that characterizes DNA-hypermethylated genes in colon cancer cells. *Cancer Res* *68*, 5753-5759.

McLean, K., Gong, Y., Choi, Y., Deng, N., Yang, K., Bai, S., Cabrera, L., Keller, E., McCauley, L., Cho, K.R., *et al.* (2011). Human ovarian carcinoma-associated mesenchymal stem cells regulate cancer stem cells and tumorigenesis via altered BMP production. *The Journal of clinical investigation* *121*, 3206-3219.

Meissner, A., Gnirke, A., Bell, G.W., Ramsahoye, B., Lander, E.S., and Jaenisch, R. (2005). Reduced representation bisulfite sequencing for comparative high-resolution DNA methylation analysis. *Nucleic acids research* *33*, 5868-5877.

Meng, S., Arbit, T., Veeriah, S., Mellinghoff, I.K., Fang, F., Vivanco, I., Rohle, D., and Chan, T.A. (2009a). 14-3-3sigma and p21 synergize to determine DNA damage response following Chk2 inhibition. *Cell cycle* *8*, 2238-2246.

Meng, Y., Gu, C., Wu, Z., Zhao, Y., Si, Y., Fu, X., and Han, W. (2009b). Id2 promotes the invasive growth of MCF-7 and SKOV-3 cells by a novel mechanism independent of dimerization to basic helix-loop-helix factors. *BMC cancer* *9*, 75.

Menon, U., and Jacobs, I.J. (2000). Recent developments in ovarian cancer screening. *Current opinion in obstetrics & gynecology* *12*, 39-42.

Mera, H., Kawashima, H., Yoshizawa, T., Ishibashi, O., Ali, M.M., Hayami, T., Kitahara, H., Yamagiwa, H., Kondo, N., Ogose, A., *et al.* (2009). Chondromodulin-1 directly suppresses growth of human cancer cells. *BMC Cancer* *9*, 166.

Milde-Langosch, K., Ocon, E., Becker, G., and Loning, T. (1998). p16/MTS1 inactivation in ovarian carcinomas: high frequency of reduced protein expression associated with hypermethylation or mutation in endometrioid and mucinous tumors. *International journal of cancer Journal international du cancer* *79*, 61-65.

Miller, S., Rogers, H.A., Lyon, P., Rand, V., Adamowicz-Brice, M., Clifford, S.C., Hayden, J.T., Dyer, S., Pfister, S., Korshunov, A., *et al.* Genome-wide molecular characterization of central nervous system primitive neuroectodermal tumor and pineoblastoma. *Neuro Oncol* *13*, 866-879.

Modesitt, S.C., Sill, M., Hoffman, J.S., and Bender, D.P. (2008). A phase II study of vorinostat in the treatment of persistent or recurrent epithelial ovarian or primary peritoneal carcinoma: a Gynecologic Oncology Group study. *Gynecologic oncology* *109*, 182-186.

Mok, S.C., Bell, D.A., Knapp, R.C., Fishbaugh, P.M., Welch, W.R., Muto, M.G., Berkowitz, R.S., and Tsao, S.W. (1993). Mutation of K-ras protooncogene in human ovarian epithelial tumors of borderline malignancy. *Cancer research* 53, 1489-1492.

Momparler, R.L. (2003). Cancer epigenetics. *Oncogene* 22, 6479-6483.

Montavon, C., Gloss, B.S., Warton, K., Barton, C.A., Statham, A.L., Scurry, J.P., Tabor, B., Nguyen, T.V., Qu, W., Samimi, G., *et al.* (2012). Prognostic and diagnostic significance of DNA methylation patterns in high grade serous ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 124, 582-588.

Moore, R.G., Miller, M.C., Steinhoff, M.M., Skates, S.J., Lu, K.H., Lambert-Messerlian, G., and Bast, R.C., Jr. (2012). Serum HE4 levels are less frequently elevated than CA125 in women with benign gynecologic disorders. *American journal of obstetrics and gynecology* 206, 351 e351-358.

Moreno-Bueno, G., Gamallo, C., Perez-Gallego, L., de Mora, J.C., Suarez, A., and Palacios, J. (2001). beta-Catenin expression pattern, beta-catenin gene mutations, and microsatellite instability in endometrioid ovarian carcinomas and synchronous endometrial carcinomas. *Diagn Mol Pathol* 10, 116-122.

Morrow, K.A., Das, S., Metge, B.J., Ye, K., Mulekar, M.S., Tucker, J.A., Samant, R.S., and Shevde, L.A. (2011). Loss of tumor suppressor Merlin in advanced breast cancer is due to post-translational regulation. *The Journal of biological chemistry* 286, 40376-40385.

Muller, H.M., Millinger, S., Fiegl, H., Goebel, G., Ivarsson, L., Widschwendter, A., Muller-Holzner, E., Marth, C., and Widschwendter, M. (2004). Analysis of methylated genes in peritoneal fluids of ovarian cancer patients: a new prognostic tool. *Clinical chemistry* 50, 2171-2173.

Murphy, S.K., Huang, Z., Wen, Y., Spillman, M.A., Whitaker, R.S., Simel, L.R., Nichols, T.D., Marks, J.R., and Berchuck, A. (2006). Frequent IGF2/H19 domain epigenetic alterations and elevated IGF2 expression in epithelial ovarian cancer. *Molecular cancer research : MCR* 4, 283-292.

Nagaraja, G. M., Othman, M., Fox, B. P., Alsaber, R., Pellegrino, C. M., Zeng, Y., Khanna, R., Tamburini, P., Swaroop, A. & Kandpal, R. P. (2006) Gene expression signatures and biomarkers of noninvasive and invasive breast cancer cells: comprehensive profiles by representational difference analysis, microarrays and proteomics, *Oncogene*. 25, 2328-38.

Nakanishi, K., Yoshimoto, T., Tsutsui, H., and Okamura, H. (2001). Interleukin-18 is a unique cytokine that stimulates both Th1 and Th2 responses depending on its cytokine milieu. *Cytokine & growth factor reviews* 12, 53-72.

Naora, H. (2005). Developmental patterning in the wrong context: the paradox of epithelial ovarian cancers. *Cell Cycle* 4, 1033-1035.



Nash, M.A., Deavers, M.T., and Freedman, R.S. (2002). The expression of decorin in human ovarian tumors. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 8, 1754-1760.

Ness, R.B., and Cottreau, C. (1999). Possible role of ovarian epithelial inflammation in ovarian cancer. *Journal of the National Cancer Institute* 91, 1459-1467.

Nicosia, S.V., Bai, W., Cheng, J.Q., Coppola, D., and Kruk, P.A. (2003). Oncogenic pathways implicated in ovarian epithelial cancer. *Hematology/oncology clinics of North America* 17, 927-943.

Nimmo, R. & Woollard, A. (2008) Worming out the biology of Runx, *Developmental biology*. 313, 492-500.

Niu, D.F., Kondo, T., Nakazawa, T., Oishi, N., Kawasaki, T., Mochizuki, K., Yamane, T., and Katoh, R. (2012). Transcription factor Runx2 is a regulator of epithelial-mesenchymal transition and invasion in thyroid carcinomas. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 92, 1181-1190.

Obata, K., Morland, S.J., Watson, R.H., Hitchcock, A., Chenevix-Trench, G., Thomas, E.J., and Campbell, I.G. (1998). Frequent PTEN/MMAC mutations in endometrioid but not serous or mucinous epithelial ovarian tumors. *Cancer research* 58, 2095-2097.

Okada-Ban, M., Moens, G., Thiery, J.P., and Jouanneau, J. (1999). Nuclear 24 kD fibroblast growth factor (FGF)-2 confers metastatic properties on rat bladder carcinoma cells. *Oncogene* 18, 6719-6724.

Okuda, T., Otsuka, J., Sekizawa, A., Saito, H., Makino, R., Kushima, M., Farina, A., Kuwano, Y., and Okai, T. (2003). p53 mutations and overexpression affect prognosis of ovarian endometrioid cancer but not clear cell cancer. *Gynecologic oncology* 88, 318-325.

Okuda, T., van Deursen, J., Hiebert, S. W., Grosveld, G. & Downing, J. R. (1996) AML1, the target of multiple chromosomal translocations in human leukemia, is essential for normal fetal liver hematopoiesis, *Cell*. 84, 321-30.

Oliva, E., Sarrio, D., Brachtel, E.F., Sanchez-Estevez, C., Soslow, R.A., Moreno-Bueno, G., and Palacios, J. (2006). High frequency of beta-catenin mutations in borderline endometrioid tumours of the ovary. *The Journal of pathology* 208, 708-713.

Olson, S.H., Mignone, L., Nakraseive, C., Caputo, T.A., Barakat, R.R., and Harlap, S. (2001). Symptoms of ovarian cancer. *Obstetrics and gynecology* 98, 212-217.

Ono, K., Tanaka, T., Tsunoda, T., Kitahara, O., Kihara, C., Okamoto, A., Ochiai, K., Takagi, T., and Nakamura, Y. (2000). Identification by cDNA microarray of genes involved in ovarian carcinogenesis. *Cancer research* 60, 5007-5011.

Otto, F., Thornell, A. P., Crompton, T., Denzel, A., Gilmour, K. C., Rosewell, I. R., Stamp, G. W., Beddington, R. S., Mundlos, S., Olsen, B. R., Selby, P. B. & Owen, M. J. (1997)

Cbfa1, a candidate gene for cleidocranial dysplasia syndrome, is essential for osteoblast differentiation and bone development, *Cell*. 89, 765-71.

Ouellet, V., Provencher, D.M., Maugard, C.M., Le Page, C., Ren, F., Lussier, C., Novak, J., Ge, B., Hudson, T.J., Tonin, P.N., *et al.* (2005). Discrimination between serous low malignant potential and invasive epithelial ovarian tumors using molecular profiling. *Oncogene* 24, 4672-4687.

Pang, R.T., Leung, C.O., Ye, T.M., Liu, W., Chiu, P.C., Lam, K.K., Lee, K.F., and Yeung, W.S. (2010). MicroRNA-34a suppresses invasion through downregulation of Notch1 and Jagged1 in cervical carcinoma and choriocarcinoma cells. *Carcinogenesis* 31, 1037-1044.

Papacleovoulou, G., Critchley, H.O., Hillier, S.G., and Mason, J.I. (2011). IL1alpha and IL4 signalling in human ovarian surface epithelial cells. *The Journal of endocrinology* 211, 273-283.

Paroo, Z., Ye, X., Chen, S., and Liu, Q. (2009). Phosphorylation of the human microRNA-generating complex mediates MAPK/Erk signaling. *Cell* 139, 112-122.

Pattamadilok, J., Huapai, N., Rattanatanyong, P., Vasurattana, A., Triratanachat, S., Tresukosol, D., and Mutirangura, A. (2008). LINE-1 hypomethylation level as a potential prognostic factor for epithelial ovarian cancer. *International journal of gynecological cancer : official journal of the International Gynecological Cancer Society* 18, 711-717.

Pejovic, T., Heim, S., Mandahl, N., Elmfors, B., Furgyik, S., Floderus, U.M., Helm, G., Willen, H., and Mitelman, F. (1991). Bilateral ovarian carcinoma: cytogenetic evidence of unicentric origin. *International journal of cancer Journal international du cancer* 47, 358-361.

Petrocca, F., Iliopoulos, D., Qin, H.R., Nicoloso, M.S., Yendamuri, S., Wojcik, S.E., Shimizu, M., Di Leva, G., Vecchione, A., Trapasso, F., *et al.* (2006). Alterations of the tumor suppressor gene ARLTS1 in ovarian cancer. *Cancer research* 66, 10287-10291.

Pfeifer, G.P. (2006). Mutagenesis at methylated CpG sequences. *Current topics in microbiology and immunology* 301, 259-281.

Planaguma, J., Diaz-Fuertes, M., Gil-Moreno, A., Abal, M., Monge, M., Garcia, A., Baro, T., Thomson, T.M., Xercavins, J., Alameda, F., *et al.* (2004). A differential gene expression profile reveals overexpression of RUNX1/AML1 in invasive endometrioid carcinoma. *Cancer research* 64, 8846-8853.

Planaguma, J., Liljestrom, M., Alameda, F., Butzow, R., Virtanen, I., Reventos, J., and Hukkanen, M. (2011). Matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9 codistribute with transcription factors RUNX1/AML1 and ETV5/ERM at the invasive front of endometrial and ovarian carcinoma. *Human pathology* 42, 57-67.

Plante, I., Stewart, M.K., Barr, K., Allan, A.L., and Laird, D.W. (2011). Cx43 suppresses mammary tumor metastasis to the lung in a Cx43 mutant mouse model of human disease. *Oncogene* 30, 1681-1692.

Plumb, J.A., Finn, P.W., Williams, R.J., Bandara, M.J., Romero, M.R., Watkins, C.J., La Thangue, N.B., and Brown, R. (2003). Pharmacodynamic response and inhibition of growth of human tumor xenografts by the novel histone deacetylase inhibitor PXD101. *Molecular cancer therapeutics* 2, 721-728.

Plumb, J.A., Strathdee, G., Sludden, J., Kaye, S.B., and Brown, R. (2000). Reversal of drug resistance in human tumor xenografts by 2'-deoxy-5-azacytidine-induced demethylation of the hMLH1 gene promoter. *Cancer research* 60, 6039-6044.

Pollock, A.S., Turck, J., and Lovett, D.H. (2003). The prodomain of interleukin 1alpha interacts with elements of the RNA processing apparatus and induces apoptosis in malignant cells. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 17, 203-213.

Pomraning, K.R., Smith, K.M., and Freitag, M. (2009). Genome-wide high throughput analysis of DNA methylation in eukaryotes. *Methods* 47, 142-150.

Porter, L.A., Singh, G., and Lee, J.M. (2000). Abundance of cyclin B1 regulates gamma-radiation-induced apoptosis. *Blood* 95, 2645-2650.

Prat, J., Ribe, A., and Gallardo, A. (2005). Hereditary ovarian cancer. *Human pathology* 36, 861-870.

Pratap, J., Javed, A., Languino, L.R., van Wijnen, A.J., Stein, J.L., Stein, G.S., and Lian, J.B. (2005). The Runx2 osteogenic transcription factor regulates matrix metalloproteinase 9 in bone metastatic cancer cells and controls cell invasion. *Molecular and cellular biology* 25, 8581-8591.

Press, J.Z., De Luca, A., Boyd, N., Young, S., Troussard, A., Ridge, Y., Kaurah, P., Kalloger, S.E., Blood, K.A., Smith, M., *et al.* (2008). Ovarian carcinomas with genetic and epigenetic BRCA1 loss have distinct molecular abnormalities. *BMC cancer* 8, 17.

Prince, H.M., Bishton, M.J., and Harrison, S.J. (2009). Clinical studies of histone deacetylase inhibitors. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 15, 3958-3969.

Provencher, D.M., Finstad, C.L., Saigo, P.E., Rubin, S.C., Hoskins, W.J., Federici, M.G., Stockert, E., Lloyd, K.O., and Lewis, J.L., Jr. (1993). Comparison of antigen expression on fresh and cultured ascites cells and on solid tumors of patients with epithelial ovarian cancer. *Gynecologic oncology* 50, 78-83.

Pruitt, K., Ulku, A.S., Frantz, K., Rojas, R.J., Muniz-Medina, V.M., Rangnekar, V.M., Der, C.J., and Shields, J.M. (2005). Ras-mediated loss of the pro-apoptotic response protein Par-

4 is mediated by DNA hypermethylation through Raf-independent and Raf-dependent signaling cascades in epithelial cells. *The Journal of biological chemistry* 280, 23363-23370.

Pufulete, M., Al-Ghnaniem, R., Leather, A.J., Appleby, P., Gout, S., Terry, C., Emery, P.W., and Sanders, T.A. (2003). Folate status, genomic DNA hypomethylation, and risk of colorectal adenoma and cancer: a case control study. *Gastroenterology* 124, 1240-1248.

Puiffe, M.L., Le Page, C., Filali-Mouhim, A., Zietarska, M., Ouellet, V., Tonin, P.N., Chevrette, M., Provencher, D.M., and Mes-Masson, A.M. (2007). Characterization of ovarian cancer ascites on cell invasion, proliferation, spheroid formation, and gene expression in an in vitro model of epithelial ovarian cancer. *Neoplasia* 9, 820-829.

Qu, G., Dubeau, L., Narayan, A., Yu, M.C., and Ehrlich, M. (1999). Satellite DNA hypomethylation vs. overall genomic hypomethylation in ovarian epithelial tumors of different malignant potential. *Mutation research* 423, 91-101.

Rakyan, V.K., Down, T.A., Thorne, N.P., Flicek, P., Kulesha, E., Graf, S., Tomazou, E.M., Backdahl, L., Johnson, N., Herberth, M., *et al.* (2008). An integrated resource for genome-wide identification and analysis of human tissue-specific differentially methylated regions (tDMRs). *Genome research* 18, 1518-1529.

Rask, K., Nilsson, A., Brannstrom, M., Carlsson, P., Hellberg, P., Janson, P.O., Hedin, L., and Sundfeldt, K. (2003). Wnt-signalling pathway in ovarian epithelial tumours: increased expression of beta-catenin and GSK3beta. *Br J Cancer* 89, 1298-1304.

Rauch, T., Wang, Z., Zhang, X., Zhong, X., Wu, X., Lau, S.K., Kernstine, K.H., Riggs, A.D., and Pfeifer, G.P. (2007). Homeobox gene methylation in lung cancer studied by genome-wide analysis with a microarray-based methylated CpG island recovery assay. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 5527-5532.

Reed, N., Millan, D., Verheijen, R., and Castiglione, M. (2010). Non-epithelial ovarian cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 21 Suppl 5, v31-36.

Reik, W., Dean, W., and Walter, J. (2001). Epigenetic reprogramming in mammalian development. *Science* 293, 1089-1093.

Riessland, M., Ackermann, B., Forster, A., Jakubik, M., Hauke, J., Garbes, L., Fritzsche, I., Mende, Y., Blumcke, I., Hahnen, E., *et al.* (2010). SAHA ameliorates the SMA phenotype in two mouse models for spinal muscular atrophy. *Human molecular genetics* 19, 1492-1506.

Rivera, A., Mavila, A., Bayless, K.J., Davis, G.E., and Maxwell, S.A. (2006). Cyclin A1 is a p53-induced gene that mediates apoptosis, G2/M arrest, and mitotic catastrophe in renal, ovarian, and lung carcinoma cells. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 63, 1425-1439.

- Robak, T. (2011). New nucleoside analogs for patients with hematological malignancies. *Expert opinion on investigational drugs* 20, 343-359.
- Robinson, H. M., Broadfield, Z. J., Cheung, K. L., Harewood, L., Harris, R. L., Jalali, G. R., Martineau, M., Moorman, A. V., Taylor, K. E., Richards, S., Mitchell, C. & Harrison, C. J. (2003) Amplification of AML1 in acute lymphoblastic leukemia is associated with a poor outcome, *Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, UK.* 17, 2249-50.
- Rosen, D.G., Yang, G., Liu, G., Mercado-Uribe, I., Chang, B., Xiao, X.S., Zheng, J., Xue, F.X., and Liu, J. (2009). Ovarian cancer: pathology, biology, and disease models. *Front Biosci* 14, 2089-2102.
- Roumier, C., Fenaux, P., Lafage, M., Imbert, M., Eclache, V., and Preudhomme, C. (2003). New mechanisms of AML1 gene alteration in hematological malignancies. *Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, UK* 17, 9-16.
- Rountree, M.R., Bachman, K.E., Herman, J.G., and Baylin, S.B. (2001). DNA methylation, chromatin inheritance, and cancer. *Oncogene* 20, 3156-3165.
- Russell, P. (1979). The pathological assessment of ovarian neoplasms. III: The malignant "epithelial" tumours. *Pathology* 11, 493-532.
- Saito, Y., Liang, G., Egger, G., Friedman, J.M., Chuang, J.C., Coetzee, G.A., and Jones, P.A. (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.
- Salani, R., Kurman, R.J., Giuntoli, R., 2nd, Gardner, G., Bristow, R., Wang, T.L., and Shih, I.M. (2008). Assessment of TP53 mutation using purified tissue samples of ovarian serous carcinomas reveals a higher mutation rate than previously reported and does not correlate with drug resistance. *International journal of gynecological cancer : official journal of the International Gynecological Cancer Society* 18, 487-491.
- Sandi, M.J., Hamidi, T., Malicet, C., Cano, C., Loncle, C., Pierres, A., Dagorn, J.C., and Iovanna, J.L. (2011). p8 expression controls pancreatic cancer cell migration, invasion, adhesion, and tumorigenesis. *Journal of cellular physiology* 226, 3442-3451.
- Santi, D.V., Norment, A., and Garrett, C.E. (1984). Covalent bond formation between a DNA-cytosine methyltransferase and DNA containing 5-azacytosine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 81, 6993-6997.
- Sauve, A.A. (2010). Sirtuin chemical mechanisms. *Biochimica et biophysica acta* 1804, 1591-1603.

Sauve, A.A., Wolberger, C., Schramm, V.L., and Boeke, J.D. (2006). The biochemistry of sirtuins. *Annual review of biochemistry* 75, 435-465.

Saxena, A., and Carninci, P. (2011). Long non-coding RNA modifies chromatin: epigenetic silencing by long non-coding RNAs. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* 33, 830-839.

Scheitz, C.J., Lee, T.S., McDermitt, D.J., and Tumbar, T. (2012). Defining a tissue stem cell-driven Runx1/Stat3 signalling axis in epithelial cancer. *The EMBO journal* 31, 4124-4139.

Scheitz, C. J. & Tumbar, T. (2012) New insights into the role of Runx1 in epithelial stem cell biology and pathology, *Journal of cellular biochemistry*.

Scully R, E.; Sobin, L. H. (1999). Histologic Typing of Ovarian Tumors. *World Health Organization International Classification of Tumors*, 2 edn. Springer-Verlag: Berlin, Heidelberg.

Sellar, G.C., Watt, K.P., Rabiasz, G.J., Stronach, E.A., Li, L., Miller, E.P., Massie, C.E., Miller, J., Contreras-Moreira, B., Scott, D., *et al.* (2003). OPCML at 11q25 is epigenetically inactivated and has tumor-suppressor function in epithelial ovarian cancer. *Nature genetics* 34, 337-343.

Senner, C.E. (2011). The role of DNA methylation in mammalian development. *Reproductive biomedicine online* 22, 529-535.

Serov SFS, R. E.; Sobin, L.H. (1973). Histological Typing of Ovarian Tumours. *International Histologic Classification of Tumours No. 9*. World Health Organization: Geneva.

Serre, D., Lee, B.H., and Ting, A.H. (2010). MBD-isolated Genome Sequencing provides a high-throughput and comprehensive survey of DNA methylation in the human genome. *Nucleic acids research* 38, 391-399.

Sharma, S., Kelly, T.K., and Jones, P.A. (2010). Epigenetics in cancer. *Carcinogenesis* 31, 27-36.

Shi, H., Wei, S.H., Leu, Y.W., Rahmatpanah, F., Liu, J.C., Yan, P.S., Nephew, K.P., and Huang, T.H. (2003). Triple analysis of the cancer epigenome: an integrated microarray system for assessing gene expression, DNA methylation, and histone acetylation. *Cancer research* 63, 2164-2171.

Shield, K., Ackland, M.L., Ahmed, N., and Rice, G.E. (2009). Multicellular spheroids in ovarian cancer metastases: Biology and pathology. *Gynecologic oncology* 113, 143-148.

Shih Ie, M., and Kurman, R.J. (2004). Ovarian tumorigenesis: a proposed model based on morphological and molecular genetic analysis. *The American journal of pathology* *164*, 1511-1518.

Shimizu, Y., Kamoi, S., Amada, S., Hasumi, K., Akiyama, F., and Silverberg, S.G. (1998). Toward the development of a universal grading system for ovarian epithelial carcinoma. I. Prognostic significance of histopathologic features--problems involved in the architectural grading system. *Gynecologic oncology* *70*, 2-12.

Sieben, N.L., Macropoulos, P., Roemen, G.M., Kolkman-Uljee, S.M., Jan Fleuren, G., Houmadi, R., Diss, T., Warren, B., Al Adnani, M., De Goeij, A.P., *et al.* (2004). In ovarian neoplasms, BRAF, but not KRAS, mutations are restricted to low-grade serous tumours. *J Pathol* *202*, 336-340.

Silverman, L.R., Demakos, E.P., Peterson, B.L., Kornblith, A.B., Holland, J.C., Odchimar-Reissig, R., Stone, R.M., Nelson, D., Powell, B.L., DeCastro, C.M., *et al.* (2002). Randomized controlled trial of azacitidine in patients with the myelodysplastic syndrome: a study of the cancer and leukemia group B. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* *20*, 2429-2440.

Sincic, N., and Herceg, Z. (2011). DNA methylation and cancer: ghosts and angels above the genes. *Current opinion in oncology* *23*, 69-76.

Singer, G., Kurman, R.J., Chang, H.W., Cho, S.K., and Shih Ie, M. (2002). Diverse tumorigenic pathways in ovarian serous carcinoma. *The American journal of pathology* *160*, 1223-1228.

Singer, G., Oldt, R., 3rd, Cohen, Y., Wang, B.G., Sidransky, D., Kurman, R.J., and Shih Ie, M. (2003). Mutations in BRAF and KRAS characterize the development of low-grade ovarian serous carcinoma. *Journal of the National Cancer Institute* *95*, 484-486.

Skirnisdottir, I., Garmo, H., Wilander, E., and Holmberg, L. (2008). Borderline ovarian tumors in Sweden 1960-2005: trends in incidence and age at diagnosis compared to ovarian cancer. *International journal of cancer Journal international du cancer* *123*, 1897-1901.

Slattery, M.L., Lundgreen, A., Herrick, J.S., Caan, B.J., Potter, J.D., and Wolff, R.K. (2011). Associations between genetic variation in RUNX1, RUNX2, RUNX3, MAPK1 and eIF4E and risk of colon and rectal cancer: additional support for a TGF-beta-signaling pathway. *Carcinogenesis* *32*, 318-326.

Slotkin, R.K., and Martienssen, R. (2007). Transposable elements and the epigenetic regulation of the genome. *Nature reviews Genetics* *8*, 272-285.

Song, C.X., and He, C. (2011). The hunt for 5-hydroxymethylcytosine: the sixth base. *Epigenomics* *3*, 521-523.

Soslow, R.A. (2008). Histologic subtypes of ovarian carcinoma: an overview. *International journal of gynecological pathology : official journal of the International Society of Gynecological Pathologists* 27, 161-174.

Sparmann, A., and van Lohuizen, M. (2006). Polycomb silencers control cell fate, development and cancer. *Nature reviews Cancer* 6, 846-856.

Squazzo, S.L., O'Geen, H., Komashko, V.M., Krig, S.R., Jin, V.X., Jang, S.W., Margueron, R., Reinberg, D., Green, R., and Farnham, P.J. (2006). Suz12 binds to silenced regions of the genome in a cell-type-specific manner. *Genome research* 16, 890-900.

Steele, N., Finn, P., Brown, R., and Plumb, J.A. (2009). Combined inhibition of DNA methylation and histone acetylation enhances gene re-expression and drug sensitivity in vivo. *British journal of cancer* 100, 758-763.

Stefanska, B., Huang, J., Bhattacharyya, B., Suderman, M., Hallett, M., Han, Z.G., and Szyf, M. (2011). Definition of the landscape of promoter DNA hypomethylation in liver cancer. *Cancer Res* 71, 5891-5903.

Sternlicht, M.D., and Werb, Z. (2001). How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annual review of cell and developmental biology* 17, 463-516.

Stone, B., Schummer, M., Paley, P.J., Thompson, L., Stewart, J., Ford, M., Crawford, M., Urban, N., O'Briant, K., and Nelson, B.H. (2003). Serologic analysis of ovarian tumor antigens reveals a bias toward antigens encoded on 17q. *International journal of cancer Journal international du cancer* 104, 73-84.

Strathdee, G., MacKean, M.J., Illand, M., and Brown, R. (1999). A role for methylation of the hMLH1 promoter in loss of hMLH1 expression and drug resistance in ovarian cancer. *Oncogene* 18, 2335-2341.

Strathdee, G., Vass, J.K., Oien, K.A., Siddiqui, N., Curto-Garcia, J., and Brown, R. (2005). Demethylation of the MCJ gene in stage III/IV epithelial ovarian cancer and response to chemotherapy. *Gynecologic oncology* 97, 898-903.

Stresemann, C., and Lyko, F. (2008). Modes of action of the DNA methyltransferase inhibitors azacytidine and decitabine. *International journal of cancer Journal international du cancer* 123, 8-13.

Su, H.Y., Lai, H.C., Lin, Y.W., Chou, Y.C., Liu, C.Y., and Yu, M.H. (2009). An epigenetic marker panel for screening and prognostic prediction of ovarian cancer. *International journal of cancer Journal international du cancer* 124, 387-393.

Su, H.Y., Lai, H.C., Lin, Y.W., Liu, C.Y., Chen, C.K., Chou, Y.C., Lin, S.P., Lin, W.C., Lee, H.Y., and Yu, M.H. (2010). Epigenetic silencing of SFRP5 is related to malignant phenotype and chemoresistance of ovarian cancer through Wnt signaling pathway. *International journal of cancer Journal international du cancer* 127, 555-567.



- Subramaniam, M. M., Chan, J. Y., Yeoh, K. G., Quek, T., Ito, K. & Salto-Tellez, M. (2009) Molecular pathology of RUNX3 in human carcinogenesis, *Biochimica et biophysica acta*. 1796, 315-31.
- Sundfeldt, K., Ivarsson, K., Carlsson, M., Enerback, S., Janson, P.O., Brannstrom, M., and Hedin, L. (1999). The expression of CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP) in the human ovary in vivo: specific increase in C/EBPbeta during epithelial tumour progression. *Br J Cancer* 79, 1240-1248.
- Suter, C.M., Martin, D.I., and Ward, R.L. (2004). Hypomethylation of L1 retrotransposons in colorectal cancer and adjacent normal tissue. *International journal of colorectal disease* 19, 95-101.
- Syed, V., Mukherjee, K., Lyons-Weiler, J., Lau, K.M., Mashima, T., Tsuruo, T., and Ho, S.M. (2005). Identification of ATF-3, caveolin-1, DLC-1, and NM23-H2 as putative antitumorigenic, progesterone-regulated genes for ovarian cancer cells by gene profiling. *Oncogene* 24, 1774-1787.
- Symowicz, J., Adley, B.P., Gleason, K.J., Johnson, J.J., Ghosh, S., Fishman, D.A., Hudson, L.G., and Stack, M.S. (2007). Engagement of collagen-binding integrins promotes matrix metalloproteinase-9-dependent E-cadherin ectodomain shedding in ovarian carcinoma cells. *Cancer research* 67, 2030-2039.
- Tahiliani, M., Koh, K.P., Shen, Y., Pastor, W.A., Bandukwala, H., Brudno, Y., Agarwal, S., Iyer, L.M., Liu, D.R., Aravind, L., *et al.* (2009). Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1. *Science* 324, 930-935.
- Takai, N., and Narahara, H. (2007). Human endometrial and ovarian cancer cells: histone deacetylase inhibitors exhibit antiproliferative activity, potently induce cell cycle arrest, and stimulate apoptosis. *Current medicinal chemistry* 14, 2548-2553.
- Tamura, K., Hua, B., Adachi, S., Guney, I., Kawauchi, J., Morioka, M., Tamamori-Adachi, M., Tanaka, Y., Nakabeppu, Y., Sunamori, M., *et al.* (2005). Stress response gene ATF3 is a target of c-myc in serum-induced cell proliferation. *The EMBO journal* 24, 2590-2601.
- Taniguchi, T., Tischkowitz, M., Ameziane, N., Hodgson, S.V., Mathew, C.G., Joenje, H., Mok, S.C., and D'Andrea, A.D. (2003). Disruption of the Fanconi anemia-BRCA pathway in cisplatin-sensitive ovarian tumors. *Nature medicine* 9, 568-574.
- Tapper, J., Butzow, R., Wahlstrom, T., Seppala, M., and Knuutila, S. (1997). Evidence for divergence of DNA copy number changes in serous, mucinous and endometrioid ovarian carcinomas. *British journal of cancer* 75, 1782-1787.
- Taraboletti, G., Rusnati, M., Ragona, L., and Colombo, G. (2010). Targeting tumor angiogenesis with TSP-1-based compounds: rational design of antiangiogenic mimetics of endogenous inhibitors. *Oncotarget* 1, 662-673.

Taylor, H.S., Vanden Heuvel, G.B., and Igarashi, P. (1997). A conserved Hox axis in the mouse and human female reproductive system: late establishment and persistent adult expression of the Hoxa cluster genes. *Biol Reprod* 57, 1338-1345.

Templeman, C.L., Fallat, M.E., Lam, A.M., Perlman, S.E., Hertweck, S.P., and O'Connor, D.M. (2000). Managing mature cystic teratomas of the ovary. *Obstet Gynecol Surv* 55, 738-745.

Teodoridis, J.M., Hall, J., Marsh, S., Kannall, H.D., Smyth, C., Curto, J., Siddiqui, N., Gabra, H., McLeod, H.L., Strathdee, G., *et al.* (2005). CpG island methylation of DNA damage response genes in advanced ovarian cancer. *Cancer research* 65, 8961-8967.

Terasawa, K., Sagae, S., Toyota, M., Tsukada, K., Ogi, K., Satoh, A., Mita, H., Imai, K., Tokino, T., and Kudo, R. (2004). Epigenetic inactivation of TMS1/ASC in ovarian cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 10, 2000-2006.

Teschendorff, A.E., Menon, U., Gentry-Maharaj, A., Ramus, S.J., Gayther, S.A., Apostolidou, S., Jones, A., Lechner, M., Beck, S., Jacobs, I.J., *et al.* (2009). An epigenetic signature in peripheral blood predicts active ovarian cancer. *PloS one* 4, e8274.

Tommasi, S., Karm, D.L., Wu, X., Yen, Y., and Pfeifer, G.P. (2009). Methylation of homeobox genes is a frequent and early epigenetic event in breast cancer. *Breast Cancer Res* 11, R14.

Trimble, C.L., Kosary, C., and Trimble, E.L. (2002). Long-term survival and patterns of care in women with ovarian tumors of low malignant potential. *Gynecologic oncology* 86, 34-37.

Trimble ELK, C. A.; Cornelison, T. L. (1999). Improved survival for women with ovarian cancer. *Proceedings of the Society for Gynecologic Oncology (abstract)* 136.

Truong, M., Yang, B., Wagner, J., Kobayashi, Y., Rajamanickam, V., Brooks, J., and Jarrard, D.F. (2012). Even-skipped homeobox 1 is frequently hypermethylated in prostate cancer and predicts PSA recurrence. *Br J Cancer*.

Tsai, K.W., Wu, C.W., Hu, L.Y., Li, S.C., Liao, Y.L., Lai, C.H., Kao, H.W., Fang, W.L., Huang, K.H., Chan, W.C., *et al.* (2011). Epigenetic regulation of miR-34b and miR-129 expression in gastric cancer. *International journal of cancer Journal international du cancer* 129, 2600-2610.

Ueda, H., Watanabe, Y., Nakai, H., Hemmi, H., Koi, M., and Hoshiai, H. (2005). Microsatellite status and immunohistochemical features of ovarian clear-cell carcinoma. *Anticancer research* 25, 2785-2788.

van Steensel, B., and Henikoff, S. (2003). Epigenomic profiling using microarrays. *BioTechniques* 35, 346-350, 352-344, 356-347.

Vogelstein, B., and Kinzler, K.W. (1993). The multistep nature of cancer. *Trends in genetics* : TIG 9, 138-141.

Voisin, S.N., Krakovska, O., Matta, A., DeSouza, L.V., Romaschin, A.D., Colgan, T.J., and Siu, K.W. (2011). Identification of novel molecular targets for endometrial cancer using a drill-down LC-MS/MS approach with iTRAQ. *PloS one* 6, e16352.

Waddington, C.H. (2012). The epigenotype. 1942. *International journal of epidemiology* 41, 10-13.

Wang, R.Y., Gehrke, C.W., and Ehrlich, M. (1980). Comparison of bisulfite modification of 5-methyldeoxycytidine and deoxycytidine residues. *Nucleic acids research* 8, 4777-4790.

Wang, C. Q., Jacob, B., Nah, G. S. & Osato, M. (2010) Runx family genes, niche, and stem cell quiescence, *Blood cells, molecules & diseases*. 44, 275-86.

Wang, Q., Stacy, T., Binder, M., Marin-Padilla, M., Sharpe, A. H. & Speck, N. A. (1996) Disruption of the Cbfa2 gene causes necrosis and hemorrhaging in the central nervous system and blocks definitive hematopoiesis, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 93, 3444-9.

Weber, M., Davies, J.J., Wittig, D., Oakeley, E.J., Haase, M., Lam, W.L., and Schubeler, D. (2005). Chromosome-wide and promoter-specific analyses identify sites of differential DNA methylation in normal and transformed human cells. *Nature genetics* 37, 853-862.

Weber, M., Hellmann, I., Stadler, M.B., Ramos, L., Paabo, S., Rebhan, M., and Schubeler, D. (2007). Distribution, silencing potential and evolutionary impact of promoter DNA methylation in the human genome. *Nature genetics* 39, 457-466.

Wei, S.H., Chen, C.M., Strathdee, G., Harnsomburana, J., Shyu, C.R., Rahmatpanah, F., Shi, H., Ng, S.W., Yan, P.S., Nephew, K.P., *et al.* (2002). Methylation microarray analysis of late-stage ovarian carcinomas distinguishes progression-free survival in patients and identifies candidate epigenetic markers. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 8, 2246-2252.

Welsh, J.B., Zarrinkar, P.P., Sapinoso, L.M., Kern, S.G., Behling, C.A., Monk, B.J., Lockhart, D.J., Burger, R.A., and Hampton, G.M. (2001). Analysis of gene expression profiles in normal and neoplastic ovarian tissue samples identifies candidate molecular markers of epithelial ovarian cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 1176-1181.

Whittemore, A.S. (1994). Characteristics relating to ovarian cancer risk: implications for prevention and detection. *Gynecologic oncology* 55, S15-19.

Widschwendter, M., Fiegl, H., Egle, D., Mueller-Holzner, E., Spizzo, G., Marth, C., Weisenberger, D.J., Campan, M., Young, J., Jacobs, I., *et al.* (2007). Epigenetic stem cell signature in cancer. *Nature genetics* 39, 157-158.

Widschwendter, M., Jiang, G., Woods, C., Muller, H.M., Fiegl, H., Goebel, G., Marth, C., Muller-Holzner, E., Zeimet, A.G., Laird, P.W., *et al.* (2004). DNA hypomethylation and ovarian cancer biology. *Cancer research* *64*, 4472-4480.

Wilcox, C.B., Baysal, B.E., Gallion, H.H., Strange, M.A., and DeLoia, J.A. (2005). High-resolution methylation analysis of the BRCA1 promoter in ovarian tumors. *Cancer genetics and cytogenetics* *159*, 114-122.

Wiley, A., Katsaros, D., Chen, H., Rigault de la Longrais, I.A., Beeghly, A., Puopolo, M., Singal, R., Zhang, Y., Amoako, A., Zelterman, D., *et al.* (2006). Aberrant promoter methylation of multiple genes in malignant ovarian tumors and in ovarian tumors with low malignant potential. *Cancer* *107*, 299-308.

Williams, K., Christensen, J., and Helin, K. (2012). DNA methylation: TET proteins-guardians of CpG islands? *EMBO reports* *13*, 28-35.

Wong, W. F., Kohu, K., Chiba, T., Sato, T. & Satake, M. (2011) Interplay of transcription factors in T-cell differentiation and function: the role of Runx, *Immunology*. *132*, 157-64.

Wotton, S., Stewart, M., Blyth, K., Vaillant, F., Kilbey, A., Neil, J. C. & Cameron, E. R. (2002) Proviral insertion indicates a dominant oncogenic role for Runx1/AML-1 in T-cell lymphoma, *Cancer research*. *62*, 7181-5.

Wu, Q., Lothe, R.A., Ahlquist, T., Silins, I., Trope, C.G., Micci, F., Nesland, J.M., Suo, Z., and Lind, G.E. (2007). DNA methylation profiling of ovarian carcinomas and their in vitro models identifies HOXA9, HOXB5, SCGB3A1, and CRABP1 as novel targets. *Mol Cancer* *6*, 45.

Wu, X., Rauch, T.A., Zhong, X., Bennett, W.P., Latif, F., Krex, D., and Pfeifer, G.P. (2010). CpG island hypermethylation in human astrocytomas. *Cancer Res* *70*, 2718-2727.

Xu, K., Zhou, Y., Qiu, W., Liu, X., Xia, M., Liu, L., Liu, X., Zhao, D., and Wang, Y. (2011). Activating transcription factor 3 (ATF3) promotes sublytic C5b-9-induced glomerular mesangial cells apoptosis through up-regulation of Gadd45alpha and KLF6 gene expression. *Immunobiology* *216*, 871-881.

Yamaoka, T., Fujimoto, M., Ogawa, F., Yoshizaki, A., Bae, S.J., Muroi, E., Komura, K., Iwata, Y., Akiyama, Y., Yanaba, K., *et al.* (2011). The roles of P- and E-selectins and P-selectin glycoprotein ligand-1 in primary and metastatic mouse melanomas. *Journal of dermatological science* *64*, 99-107.

Yan, C., and Boyd, D.D. (2006). ATF3 regulates the stability of p53: a link to cancer. *Cell cycle* *5*, 926-929.

Yang, M.H., Lin, B.R., Chang, C.H., Chen, S.T., Lin, S.K., Kuo, M.Y., Jeng, Y.M., Kuo, M.L., and Chang, C.C. (2012). Connective tissue growth factor modulates oral squamous

cell carcinoma invasion by activating a miR-504/FOXP1 signalling. *Oncogene* 31, 2401-2411.

Yao, X., Hu, J.F., Li, T., Yang, Y., Sun, Z., Ulaner, G.A., Vu, T.H., and Hoffman, A.R. (2004). Epigenetic regulation of the taxol resistance-associated gene TRAG-3 in human tumors. *Cancer genetics and cytogenetics* 151, 1-13.

Yegnasubramanian, S., Kowalski, J., Gonzalgo, M.L., Zahurak, M., Piantadosi, S., Walsh, P.C., Bova, G.S., De Marzo, A.M., Isaacs, W.B., and Nelson, W.G. (2004). Hypermethylation of CpG islands in primary and metastatic human prostate cancer. *Cancer research* 64, 1975-1986.

Yeh, H.Y., Cheng, S.W., Lin, Y.C., Yeh, C.Y., Lin, S.F., and Soo, V.W. (2009). Identifying significant genetic regulatory networks in the prostate cancer from microarray data based on transcription factor analysis and conditional independency. *BMC medical genomics* 2, 70.

Yemelyanova, A.V., Vang, R., Judson, K., Wu, L.S., and Ronnett, B.M. (2008). Distinction of primary and metastatic mucinous tumors involving the ovary: analysis of size and laterality data by primary site with reevaluation of an algorithm for tumor classification. *The American journal of surgical pathology* 32, 128-138.

Yi, R., Qin, Y., Macara, I.G., and Cullen, B.R. (2003). Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes & development* 17, 3011-3016.

Yoo, C.B., and Jones, P.A. (2006). Epigenetic therapy of cancer: past, present and future. *Nature reviews Drug discovery* 5, 37-50.

Yoshikawa, R., Yanagi, H., Shen, C.S., Fujiwara, Y., Noda, M., Yagyū, T., Gega, M., Oshima, T., Yamamura, T., Okamura, H., *et al.* (2006). ECA39 is a novel distant metastasis-related biomarker in colorectal cancer. *World J Gastroenterol* 12, 5884-5889.

Yuecheng, Y., Hongmei, L., and Xiaoyan, X. (2006). Clinical evaluation of E-cadherin expression and its regulation mechanism in epithelial ovarian cancer. *Clinical & experimental metastasis* 23, 65-74.

Zanetta, G., Rota, S., Chiari, S., Bonazzi, C., Bratina, G., and Mangioni, C. (2001). Behavior of borderline tumors with particular interest to persistence, recurrence, and progression to invasive carcinoma: a prospective study. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 19, 2658-2664.

Zhang, S., Wei, L., Zhang, A., Zhang, L. & Yu, H. (2009) RUNX3 gene methylation in epithelial ovarian cancer tissues and ovarian cancer cell lines, *Omics : a journal of integrative biology*. 13, 307-11.

Zerbini, L.F., Wang, Y., Czibere, A., Correa, R.G., Cho, J.Y., Ijiri, K., Wei, W., Joseph, M., Gu, X., Grall, F., *et al.* (2004). NF-kappa B-mediated repression of growth arrest- and DNA-damage-inducible proteins 45alpha and gamma is essential for cancer cell survival.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *101*, 13618-13623.

Zhang, L., Huang, J., Yang, N., Greshock, J., Megraw, M.S., Giannakakis, A., Liang, S., Naylor, T.L., Barchetti, A., Ward, M.R., *et al.* (2006). microRNAs exhibit high frequency genomic alterations in human cancer. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *103*, 9136-9141.

Zhao, H., Yang, Z., Wang, X., Zhang, X., Wang, M., Wang, Y., Mei, Q., and Wang, Z. (2012). Triptolide inhibits ovarian cancer cell invasion by repression of matrix metalloproteinase 7 and 19 and upregulation of E-cadherin. Experimental & molecular medicine *44*, 633-641.

Ziogas, A., Gildea, M., Cohen, P., Bringman, D., Taylor, T.H., Seminara, D., Barker, D., Casey, G., Haile, R., Liao, S.Y., *et al.* (2000). Cancer risk estimates for family members of a population-based family registry for breast and ovarian cancer. Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology *9*, 103-111.