

# Thèse de doctorat de

L'UNIVERSITE DE NANTES

Ecole Doctorale n° 605

*Biologie Santé*

Spécialité : Cancérologie

Par

**Manon DUFORESTEL**

**Étude des mécanismes et dynamiques épigénétiques dans le glioblastome multiforme au cours de l'acquisition de la résistance au témozolomide.**

Thèse présentée et soutenue à Nantes, le 17 Septembre 2021

Unité de recherche : INSERM UMR 1232, CRCINA

## Rapporteurs avant soutenance :

Philippe ARNAUD      Directeur de Recherche, CNRS, Université Clermont Auvergne (UCA)  
Paule SEITE      Professeur des Universités, Université de Poitiers

## Composition du Jury :

Président :      Jean-Pierre SEGAIN  
Examinateurs : Monique DONTENWILL      Directeur de Recherche, INRAE, Université de Nantes  
Philippe ARNAUD      Directeur de Recherche, CNRS, Université de Strasbourg  
Paule SEITE      Directeur de Recherche, CNRS, Université Clermont Auvergne (UCA)  
                    Professeur des Universités, Université de Poitiers

Dir. de thèse : Pierre-François CARTRON      Chargé de Recherche, INSERM, Université de Nantes



# RESUMÉ

**Titre :** Étude des mécanismes et dynamiques épigénétiques dans le glioblastome multiforme au cours de l'acquisition de la résistance au témozolomide.

**Mots clés :** glioblastome, témozolomide, résistance, épigénétique, transcriptome, biomarqueur

**Résumé :** Le glioblastome multiforme (GBM) est le cancer du cerveau le plus fréquent et le plus agressif chez l'adulte. La thérapie standard des glioblastomes nouvellement diagnostiqués comprend la chirurgie suivie d'une radiothérapie concomitante à de la chimiothérapie avec le témozolomide (TMZ) et d'un traitement adjuvant par le témozolomide seul. La grande hétérogénéité cellulaire et la plasticité des GBM et de leur microenvironnement tumoral entraînent rapidement l'apparition d'une résistance au TMZ, menant malheureusement à une impasse thérapeutique. Il se trouve que les dynamiques épigénétiques et les mécanismes d'adaptation transcriptomique tiennent un rôle majeur dans la résistance acquise des GBM au TMZ. Dans ce sens, des expériences ont été menées sur une lignée cellulaire de GBM à l'état sensible, tolérante et résistante au TMZ.

Premièrement, l'intégration de l'évolution du profil H3K27ac à celui du transcriptome a permis de prédire la surexpression de gènes/protéines candidats à des thérapies ciblées. Une partie de ces prédictions ont été validées *in vitro* par l'utilisation d'inhibiteurs sur des cellules tolérantes et résistantes au TMZ. Certaines, dosées dans le sérum de patients, ont révélées un potentiel biomarqueur. Deuxièmement, nos expériences d'invalidation CRISPR ont mis en évidence BCL11A comme acteur de la sensibilité au témozolomide des cellules de glioblastome. Dans leur ensemble, ces travaux appuient l'importance des biomarqueurs et leur utilité pour répondre à la nécessité d'une prise en charge personnalisée adaptée à la plasticité intra-tumorale. Ils ouvrent aussi des perspectives de de traitement pour lever la résistance au TMZ.

---

**Title:** Study of mechanisms and epigenetics dynamics in glioblastoma multiforme during the acquisition of temozolomide resistance.

**Keywords:** glioblastoma, temozolomide, resistance, epigenetics, transcriptome, biomarker

**Abstract:** Glioblastoma multiforme (GBM) is the most common and aggressive brain cancer in adults. Standard therapy for newly diagnosed glioblastoma includes surgery followed by radiotherapy with concurrent chemotherapy with temozolomide (TMZ) and adjuvant treatment with temozolomide alone. The high cellular heterogeneity and plasticity of GBMs and their tumour microenvironment rapidly lead to the development of resistance to TMZ, unfortunately conduced to a therapeutic impasse. It turns out that epigenetic dynamics and transcriptomic adaptation mechanisms play a major role in the acquired resistance of GBMs to TMZ. In this way, experiments were conducted on a TMZ-sensitive, tolerant and resistant GBM cell line.

Firstly, the integration of the evolution of the H3K27ac profile with that of the transcriptome allowed the prediction of the overexpression of candidate genes/proteins for targeted therapies. Some of these predictions were validated *in vitro* using inhibitors on TMZ tolerant and resistant cells. Several were also measured in patient serum and revealed a biomarker potential. Secondly, our CRISPR invalidation experiments highlighted BCL11A as a player in temozolomide sensitivity of glioblastoma cells. Taken together, this work supports the importance of biomarkers and their usefulness in addressing the need for personalised management adapted to intra-tumour plasticity. It also opens up prospects for treatment to overcome TMZ resistance.



# REMERCIEMENTS

Ce travail de thèse a été réalisé au sein de l'équipe 9 du laboratoire Centre de Recherche en Cancérologie et Immunologie Nantes Angers (CRCINA) U1232 – Laboratoire de Biologie des Cancers et Théranostic (LaBCT) – Institut de Cancérologie de l'Ouest (ICO) René Gauducheau.

En premier lieu je remercie **Marc GREGOIRE** pour m'avoir accueilli au sein du CRCINA ainsi que **François VALLETTE** en tant que responsable de l'équipe 9. J'adresse également mes remerciements à **Mario CAMPONE**, directeur de l'ICO.

Je suis très reconnaissante à **Paule SEITE** et **Philippe ARNAUD** qui ont accepté d'être les rapporteurs de cette thèse, même en plein mois d'août, et qui à l'heure où j'écris ces lignes ne se doutent pas de la contribution précieuse qu'ils apporteront à ce manuscrit. Je pense aussi à **Monique DONTENWILL** et **Jean-Pierre SEGAIN** qui feront d'excellents jurys.

Merci aussi à **Eric HERVOUET** et **Christophe BLANQUART**, pour leurs conseils et leur écoute lors des comités de suivi.

J'exprime aussi toute ma gratitude à la **région Pays De la Loire**, pour avoir financé ces trois années de thèse.

Je remercie la plate-forme **GenoBird** pour le séquençage Illumina ainsi que l'installation **MicroPICell**, SFR-Santé, INSERM, CNRS, UNIV Nantes, CHU Nantes, Nantes, France, membre de l'infrastructure nationale France-BioImaging soutenue par l'Agence nationale française de la recherche (ANR-10-INBS-04) et particulièrement **Magalie**, qui m'a bien aidé pour ma macro !

Et puis un grand merci à **Pierre François CARTRON** mon directeur de thèse sans qui, rien n'aurait été possible. Tu m'as accepté comme doctorante sans préjugé, et j'espère que tu ne le regrettes pas. Grâce à toi, j'ai pu évoluer dans le monde de l'épigénétique qui me plaît tant et participer à plein d'évènements scientifiques. Merci aussi pour tes conseils, tes corrections, et ton aide précieuse pour la rédaction des articles.

Durant ces trois années, j'ai eu la chance d'être entourée de personnes formidables, que je tiens à remercier, sans en oublier j'espère !

**Shankar**, alias shanshan, big brother, vieux cul, technicien de classe exceptionnelle. Moi, ta Mireille, la grosse dondon je te serai éternellement reconnaissante. Après trois ans on est presque comme un vieux couple. Jamais l'un sans l'autre. Je ne compte plus les fois où j'ai eu besoin de toi et j'ai crié ton nom dans les labos. Merci de m'avoir tout appris, ou presque. Merci de m'avoir écouté, de m'avoir soutenu et d'avoir cru en moi. Merci de m'avoir aidé pour les manips et d'avoir joué le service après-vente, si tu vois ce que je veux dire. Je n'oublierai rien de tous les moments passés, de ton rire machiavélique, de tes imitations, de tes chemises à carreaux, de tes cornichons, de tes musiques indiennes de ton humour douteux. Mais tout ça ce n'est qu'un début j'espère !

**Marie-Pierre**, ou devrais-je dire Mawie-Piewe. On a mis un peu plus de temps à s'apprivoiser, et c'est sans regrets. Je ne crois pas te l'avoir déjà dit mais tu as été un peu

comme une deuxième maman pour moi. Toujours là pour réponse à mes questions urgentes, un peu comme « maman, il est où mon jean noir préféré ? ». Plus sérieusement, merci pour tes conseils et ton soutien. Nos débriefs sur des émissions de télé très intellectuelles me manqueront aussi.

**Joséphine**, josiane, josy. Un an et demi à peine passé à tes côtés et tu laisses une marque indélébile dans ma vie (et je ne parle pas de ta date d'anniversaire que tu m'as rabachée 100 fois). Tu m'as passé le relais, au sens figuré comme au sens propre (les clefs tmfc) et avec tu m'as laissé une petite part de ta zétinude. Merci pour ton soutien, ton aide, tes conseils même à l'autre bout du monde. Pas besoin de plus de mots, sinon ma langue va changer de couleur.

**Florestan**, le petit nouveau, mais plus très nouveau maintenant. Merci d'avoir formé avec moi ce binôme de doctorants. On a traversé les mêmes choses tous les deux, et rien que ça c'est rassurant. Merci pour les francs moments de rigolade, tes qualités de monteur vidéo, de pizzaïolo et de pâtissier. Je te souhaite plein de réussite dans cette dernière année. Je serai à ton écoute si tu as besoin de moi, et sans oublier, une petite pensée pour Freya !

**Adrien**, que j'ai connu stagiaire pioupiou, et qui est maintenant technicien. Je te l'ai dit mille fois et ce sera la dernière, on dirait mon frère ! Merci d'avoir rendu mes journées plus légères avec tes histoires rocambolesques. Cette dernière année sans toi n'aurait pas eu la même saveur. Comme une vraie sœur je terminerai par un conseil « moins de tatouages plus d'attention ». Merci pour tout, Adridri, big up !

**Gwen**, merci pour ta bonne humeur, tes conseils, tes relectures et tes encouragements.

**Aurélien**, même si tout n'a pas été simple, merci de m'avoir fait confiance pour encadrer Amine. Merci pour tes conseils, tes relectures (surtout en anglais) et puis tes jeux de mots, dignes des plus grands. Je te souhaite bonne continuation dans ta nouvelle équipe.

**Amine, Elen, Yuna, Raphaël, Louis, Garance** merci pour avoir été des stagiaires de haute voltige. **Amine** tu as été mon bras droit pendant 6 mois et tu finis premier de ton master, et je n'y suis pas pour grand-chose, tu es doué, voilà tout. **Yuna**, on ne s'est pas vu beaucoup, la faute au virus, mais même à distance tes compétences en bioinformatiques ne m'ont pas échappées. **Elen**, jamais facile de prendre le relais mais tu l'as fait avec brio et je t'en remercie. Tu es un petit rayon de soleil dans le bureau et je compte bien continuer à faire des insolations (tu seras fière de cette métaphore). Vous m'avez tous grandement facilité la tâche et vous avez un bel avenir devant vous j'en suis persuadée !

Une pensée également pour **Marion** et **Delphine**, Marionoss et Delphinoss, entre vous et moi c'était un coup de foudre amical. Je n'ai plus qu'à espérer que ce soit réciproque. Merci d'avoir participé à mon bonheur quotidien, j'espère vous recroiser, uniquement en dehors du cadre professionnel évidemment (elles sont radiothérapeutes).

**Marie**, on a fait la route ensemble, et quelle route ! On est passé par toutes les émotions, tu m'as soutenu, tu m'as écouté, sans jugements, tu m'as fait rire aux larmes. Avec Joséphine vous avez relu mon intro et rien que pour ça vous méritez une médaille. Je te suis si reconnaissante, tu es unique, une personne formidable, tu es ma Marieeeeehhh

Cadeyyy. J'espère que quand tu lis ces lignes tu te dis « j'suis bin d'accord avec la grosse ! ».

**Nina**, ninouche, entre nous ce fut court mais intense ! Je veux dire par là que tu as quitté le labo bien trop vite. Toutes nos discussions sans tabous avec Josy me manquent. Je suis si heureuse d'avoir croisé ta route et d'en faire encore partie aujourd'hui.

Sans oublier tous mes collègues, ou plutôt amis, du bureau des étudiants. Cet antre, d'où personne ne ressort comme il entré. Je pense à **Camille**, jubelin, tête de piaf, tu as su combler le vide que Josy a laissé à côté de moi. Je ne saurais comment te remercier de m'avoir écouté pendant des heuuuuuuures parler de ma vie alors que tu avais sans doute mieux à faire. Merci de m'avoir soutenu, de m'avoir conseillé judicieusement, de m'avoir tant fait rire. Rappelle-toi bien que tu es une personne exceptionnelle et n'en doute jamais. C'est l'amour vache entre nous, mais surtout l'amour ! Je pense à **Aurélie**, une battante, une guerrière, tu traverses les épreuves avec tant d'acharnement, tu m'as tiré vers le haut. Toujours pleine de bienveillance, merci d'être ce que tu es et de nous avoir rassemblé plusieurs fois autour d'une bonne table ! Je pense à **Antoine B**, je te connais peu finalement, mais t'as une bonne tête. Sans rires, tu as beaucoup participé à rendre mes journées plus fun et rien que pour ça je te remercie. **Perrine**, si tu n'es pas dans le bureau physiquement tu l'es dans nos cœurs, on n'a pas eu l'occasion de beaucoup apprendre à se connaître mais on a au moins la danse en commun alors on est des gens bien ! Je n'oublie pas **Luc** et **Gaëlle**, avec qui j'ai partagé tant de déjeuners exceptionnels. Luc, je t'admire par ta volonté et ta motivation, croiser ton chemin m'a fait grandir. Gaëlle, j'ai pu constater que tu ne lâches jamais rien même dans les épreuves, je te souhaite de trouver la voie qui te convient et de t'épanouir. A vous deux merci pour vos sourires qui ont illuminés mes journées. Je remercie également **Matisse** pour nos discussions sur l'avenir et l'énorme service que tu m'as rendu ! Ainsi que **Maxime** et **Marjorie**, vous avez été de bons compagnons de route !

Et à tous les membres de l'équipe 9. **Nolwen**, pour les moments discussion/décompression qu'on a eu et pour l'aide que tu m'as apporté, ne change rien surtout. **Manon P**, qui a quitté l'équipe mais avec qui j'ai partagé de très bons moments. Sans oublier **Lisenn**, **Vincent**, **Axelle**, **Edith**, vous m'avez tous rendu des services et on a partagé d'agréables moments aux déjeuners quand c'était encore possible de manger tous ensemble. Y compris ceux que j'ai moins eu l'occasion de voir mais avec qui, quand on se croisait, tout était si naturel, j'aurai aimé partager plus de moments avec vous **Dominique**, **Denis**, **Emilie**, **Alhem**, **Antoine A**, **Javier** (me encantaba hablar contigo incluso cuando te burlabas de mí). Sans oublier le service technique **Stéphane**, **Nico**, **Jimmy**, **Greg**, **Christian Matthieu**, l'économat **Kévin** et **Quentin** ainsi que **Karim**. Merci les gars pour tous les services que vous m'avez rendu et votre humour qui va sans nul doute me manquer.

Je terminerai par mes amis et ma famille, les personnes de l'ombre qui sans s'en rendre compte ont joué un rôle prépondérant. Parmis elles mes amis de master, **Aurélien**, **Gaël**, **Grace** et **Manon** que je ne vois pas beaucoup mais qui tiennent une place importante dans mon cœur. Ce sera bientôt votre tour de défendre votre thèse et ensuite on sera une belle bande de docteurs !!! **Marine** et **Rémi**, les chouchous, vivement qu'on se refasse une virée en camping ! **Amaël**, joker, tu m'as donné du courage, tu m'as remonté le moral et tu m'as tellement fait rire, merci pour tout ce que tu es. **Tina** et **Nico**, vous, avec qui j'ai passé tant de bonnes soirées, et qui savez mieux que quiconque ce que je vis, un

énorme merci pour tout. Mention spéciale pour Tina, c'est grâce à toi que tout a commencé le jour où tu m'as fait parvenir l'offre de thèse de PEF ! **Johanna**, ma Jojo, même si tout ne s'est pas passé comme prévu et qu'on vit une période délicate, je n'y serait sans doute jamais arrivé sans toi, merci de rendre ma vie plus simple depuis plus de 10 ans. **Lena, Leslie et Célia**, mes spéculums, peu importe la distance, vous êtes dans mon cœur, nos souvenirs ensemble sont inoubliables. **Guillaume**, mon gui, on se connaît depuis qu'on existe, on a passé un nombre incalculable de moments ensemble, tu me connais par cœur, tu es ma bouée de sauvetage, mon pilier, mon grand frère. Evidemment je pense à tes parents **Brigitte et Dominique**, mes parents d'adoption. Une pensée aussi pour **Alice**, on se connaît depuis l'enfance, on tirait des plans sur la comète, et maintenant je suis marraine de ton fils, la boucle est bouclée. **Bastien, Leslie, Nico, Juliette, Clément, Laure, Sophie, Marion, Julie** mes fifous pour toujours, même si nos chemins se séparent, c'est avec vous que je me suis construite.

A mes parents, **Pascale et Pascal**, sans qui je n'en serai pas là. Premièrement parce que vous avez eu la bonne idée de me mettre au monde. Deuxièmement parce que vous avez eu les épaules assez larges pour nous supporter, moi et mon caractère, sans jamais me renier (vous en avez peut-être eu l'envie néanmoins). Enfin, parce que vous m'avez donné tout ce dont j'avais besoin pour réussir, une belle éducation et beaucoup d'amour. Vous n'avez jamais douté de moi, vous m'avez relevé quand j'étais au plus bas. Il n'y a pas de mots pour exprimer la reconnaissance et l'amour éternel que j'ai pour vous. A **Alexandre**, mon frère, mon existence n'aurait pas de sens sans toi. Te savoir près de moi, à Nantes, m'a considérablement facilité la vie. Je suis si fière de toi, de ce que tu es devenu, de ton humanité, de ta curiosité, de ton humour. Le seul problème, c'est que tu as toujours été plus intelligent que moi (je rigole, tu n'es qu'un ingénieur). A **Jacqueline**, ma petite mamie, merci d'avoir été là toute mon enfance pour m'aider à faire mes devoirs et apprendre mes leçons, jusqu'à la thèse où tu as contribué à la correction même si comme tu m'as dit « je ne comprenais pas grand-chose ». Tu es merveilleuse, j'ai tant de chance de t'avoir comme grand-mère. A mes oncles et tantes **Fred, Aurélie, Patrick et Melly**, mes cousins **Jaël, Alwen, Nimenia** et toute ma famille plus éloignée que j'aime tant. Je réalise la chance que j'ai d'avoir une famille aussi belle et unie. Vivement que quelqu'un se marie pour que l'on soit tous réunis (ce message s'adresse à Quentin).

A **Quentin**, mon coupé, tu as partagé ma vie pendant ces trois années de thèse et on a encore un bel avenir devant nous. Merci d'avoir été l'épaule sur laquelle j'ai pleuré, les oreilles dans lesquelles j'ai crié. Merci de m'accepter comme je suis, d'être si fier de moi et de me le montrer au quotidien. Tu m'as beaucoup appris, j'ai beaucoup évolué à tes côtés. Je vais t'aimer plus loin que tes rêves ont imaginés !

A **Claire**, belle maman, merci pour toutes nos discussions psychologiques et tout le soutien moral que tu m'as apporté. A toute ma belle famille en or, **Philippe, Marie, Dominique, Gildas, Zabeth, Paul, Marie-Françoise, Matthis, Pauline, Caro, Victor, Juliette, Gab, Augustin, Emile et Angèle**. Merci de m'avoir si bien intégrée, merci pour tous les moments que l'on a partagés et que l'on partagera à l'avenir.

Enfin, j'ai une pensée émue pour toutes mes bonnes étoiles. **Michel, René et Marie-Josée**, mes grands-parents, vous me manquez, j'espère vous rendre fiers. **Delphine**, un fifou parmi les anges. **Michel Guillaudeux**, je ne vous ai pas connu mais Quentin me parle tellement de vous, j'espère être à la hauteur de votre petit fils.

# ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES

---

## 2

2-OG - 2-oxoglutarate · ,

---

## 3

3D - Trois dimensions ·

---

## 5

5caC - 5-carboxylcytosine ·

5fC - 5-formylcytosine · ,

5hmC- 5-hydroxyméthylcytosine · ,

5mC - 5-methylCytosine ·

---

## A

A - adénosine ·

Ac - acétylation ·

acétyl-CoA - acetyl-coenzyme A ·

ADD - ATRX, DNMT3, DNMT3L ·

ADD - ATRX-DNMT3A-DNMT3L domain ·

ADN - acide désoxyribonucléique ·

AGO - Argonaute ·

AIC - 5-amino-imidazole-4-carboxamide ·

AID - Activation-induced deaminase ·

APOBEC - apolipo protein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like ·

ARN - acide ribonucléique ·

ARNm - ARN messager ·

ARNr - ARN risosomique ·

ARNr - ARN de transfert ·

ATP - Adenosine triphosphate ·

AXIN2 - axis inhibition protein 2 ·

---

## B

BAH - Bromo adjacent homology ·

BAX - BCL2-Associated X Protein ·

BCL-2 - B-cell lymphoma 2 ·

BER - Base exision repair ·

BHE - barrière hémato-encéphalique ·

BrD - bromodomain ·

---

## C

C - cytosine ·

CBP - CREB-binding protein ·

cDMR - cancer Differentially Methylated

Regions ·

CGIs – CpG islands ·

CH3 - méthyle ·

CIRC - Centre International de Recherche sur le

Cancer ·

CpG - cytosine phosphate guanine ·

CTCF - CCCTC-binding factor ·

CXXC - zinc finger binding site ·

---

## D

DNMTs – DNA methyltransferases ·

DPF - double PHD finger ·

DSBH - Double Stranded Beta Helix · ,

---

## E

E2F6 - E2F Transcription Factor 6 ·

EGFR - Epidermal growth factor receptor ·

ELP3 - Elongator complex protein 3 ·

ERK - Extracellular signal-regulated kinase ·

EV - extracellular vesicles ·

EZH2 - Enhancer Of Zeste 2 Polycomb

Repressive Complex 2 Subunit ·

---

## F

FAD - flavine adenine dinucleotide ·

FDA - Food and Drug Agency ·

FOXM1 - Forkhead box protein M1 ·

---

## G

G - guanine ·

G9a - Euchromatic Histone Lysine

Methyltransferase 2 ·

Gadd45 - Growth Arrest and DNA Damage-

inducible 45 ·

GBM - glioblastome multiforme ·

G-CIMP - glioma-CpG island methylator

phenotype ·

Gcn5 - General Control Non-repressed 5

protein ·

gDMR - germline differentially methylated  
regions ·

GSCs - glioblastoma stem cells ·

---

## H

H2A - histone 2A ·

H2B - histone 2B ·

H3 - histone 3 ·

H4 - histone 4 ·

HAT - histones acetyltransferases ·

HDAC - histone deacetylase ·

HDAC - Histone Desacetylase ·

HKMT - histones lysines methyltransferases ·

HP1 - heterochromatin protein 1 ·

---

## I

ICM - Inner cellular mass ·

IDAX - inhibition dvl and axine complex ·

IDH - isocitrate déshydrogénase ·

INK4 - Inhibitor of Cyclin-Dependent Kinase 4 ·

---

**J**

JAK - Janus Kinase · 88

JmjC - Jumonji C ·

---

**K**

K - lysine ·

KAT - lysine acetyltransferases ·

KDM - histones lysines demethylase ·

---

**L**

LADs - lamina-associated domains ·

LINEs - Long interspersed nuclear element ·

lncARN - long ARN non codant ·

LTRs - Long terminal repeats ·

---

**M**

m6A - N6-Methyl-Adenosine ·

m7G - N7-Methylguanosine ·

MBD - methyl-CpG binding domain ·

MBT - Malignant Brain Tumor ·

MDM2 - Mouse double minute 2 homolog ·

MDM4 - Mouse double minute 4 homolog ·

Me - méthylation ·

me1 - mono-méthylation ·

me2 - di-méthylation ·

me3 - tri-méthylation ·

MeCP2 - ethyl-CpG Binding Protein 2 ·

MED - mediator complex ·

MGMT - O6-méthylguanine-ADN

méthyltransférase ·

miR - microARN ·

MLL - mixed-lineage leukemia ·

MMR - mismatch repair ·

MTIC - 5-(3-méthyltriazén-1-yl) imidazole-4-carboxamide ·

MYC - cellular myelocytomatosis ·

MYC - Myelocytomatosis ·

MYST - MOZ Ybf2 Sas2 TIP60 ·

---

**N**

NAD - nicotinamide adenine dinucleotide ·

ncARNs - ARNs non-codant ·

NER - nucleotide excision repair ·

NF1 - Neurofibromin 1 ·

NOS - not otherwise specified ·

NSCs - neural stem cells · r

---

**O**

OCT4 - octamer-binding transcription factor 4 ·

OMS - l'organisation mondiale de la santé ·

---

**P**

P - phosphorylation ·

p21 - cyclin-dependent kinase inhibitor 1 ·

PAF15 - proliferating cell nuclear antigen

(PCNA)-Associated Factor,15 ·

PBD - PCNA binding domain ·

PCAF - P300/CBP-associated factor ·

PcG - polycomb gene complex ·

PCNA - Proliferating cell nuclear antigen ·

PD-1 - Programmed cell death protein 1 ·

P-E - promoteur-enhancer ·

PGCs – primordial germ cells ·

PHD - Pleckstrin Homology Domain ·

PI3K - Phosphatidylinositol-3-Kinase ·

PML - Promyelocytic leukemia protein ·

pol II - polymerase 2 ·

pre-miR - precursor miR ·

pri-miR - primary miR ·

PTEN - Phosphatase And Tensin Homolog ·

PTMs – post-translational modifications ·

PWWP - Proline, Tryptophan, Tryptophan,

Proline ·

---

## R

RAR - Retinoic acid receptor alpha ·

RARRES3 - Retinoic acid receptor responder  
protein 3 ·

RB1 - retinoblastoma protein ·

RFT - replication foci targeting ·

RISC - RNA-induced silencing complex ·

Rpd3 - reduced potassium dependency 3 ·

RTK - receptor tyrosine kinase ·

Rtt109 - regulator of Ty1 transposition 109 ·

RUNX1 - Runt-related transcription factor 1 ·

---

## S

SAH - S-adénosylhomocystéine ·

SAM - S-adénosylmethionine ·

SE - super-enhancer ·

SET - Su(var)3-9, Enhancer of Zeste, and

Trithorax ·

SINEs - Short interspersed nuclear element ·

Sir2 - sirtuin 2 ·

SMUG1 - Single-strand selective

monofunctional uracil DNA glycosylase,1 ·

SNC - système nerveux central ·

SP1 - Specificity protein 1 ·

SRA - SET and RING associated ·

STAT - signal transducer and activator of  
transcription ·

Sumo - sumoylation ·

SUV39H1 - Suppressor Of Variegation 3-9  
Homolog 1 ·

---

## T

T - thymine ·

TADs - topological-associated domains ·

TCGA - The Cancer Genome Atlas ·

TDG - thymine DNA glycosylase ·

TET - Ten-eleven-translocation ·

TGF $\beta$  - Transforming Growth Factor beta ·

TME - Tumor Microenvironnement ·

TMZ - témozolomide ·

TSS - Transcription starting site ·

TTF1 - The trefoil factor 1 ·

---

***U***

U - uracil ·

Ub - ubiquitinylation ·

UHRF1 - Ubiquitin-like, containing PHD and RING  
finger domains, 1 ·

UTR - untranslated region ·

---

***V***

VEGF-A - Vascular endothelial growth factor A ·

---

***W***

WD40 - tryptophan-aspartic acid 40 ·

WT1 - Wilms' tumor 1 ·

---

***X***

XAF1 - XIAP-associated factor 1 ·

---

***Z***

ZGA – zygotic genome activation ·

zn-CW - zinc finger-Cystein, tryptophan ·

# TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1. Le paysage épigénétique de Conrad Waddington	21
Figure 2. Distribution de la méthylation de l'ADN dans le génome humain	24
Figure 3. Réinitialisation épigénétique au cours du développement des mammifères	27
Figure 4. Structure des enzymes de la famille DNMT chez les mammifères	29
Figure 5. Réaction catalytique de méthylation par les DNMTs	30
Figure 6. Schéma des principaux types de complexes incluant les DNMTs	35
Figure 7. Cycle de méthylation de l'ADN pendant l'embryogenèse précoce	38
Figure 8. Principale voie de déméthylation active de l'ADN	39
Figure 9. Réactions d'oxydation de la 5mC par les protéines TETs	41
Figure 10. Structure des enzymes de la famille TET chez les mammifères	42
Figure 11. Les différents niveaux de compaction de l'ADN	46
Figure 12. Principaux sites de modifications post-traductionnelles des histones	48
Figure 13. Distribution des modifications d'histones sur les gènes actifs et silencieux	52
Figure 14. Le génome en 3D	54
Figure 15. Illustration schématique des boucles promoteurs-enhancers	56
Figure 16. Les différents types d'ARNs non-codant transcrits à partir du génome humain	58
Figure 17. Illustration de la biogénèse et du mode d'action canoniques des miRs	60
Figure 18. Le cancer dans le monde en 2020	63
Figure 19. Les cellules du microenvironnement tumoral	66
Figure 20. Les principales caractéristiques du cancer et leurs ciblages thérapeutiques	67
Figure 21. Méthylation de l'ADN et cancer	69
Figure 22. Principales altérations moléculaires responsables de la gliomagenèse	78
Figure 23. Les cellules souches neurales et la gliomagenèse	80
Figure 24. Caractéristiques génotypiques des quatre sous-types de gliomes de haut grade	82
Figure 25. Les tumeurs et leurs phénotypes de méthylation (CIMP)	83

Figure 26. Traitement standard des glioblastomes : protocole Stupp	86
Figure 27. Métabolisme du témozolomide et méthylation de l'ADN associée.	88
Figure 28. Aperçu des mécanismes impliqués dans la résistance au TMZ des GBM	94
Figure 29. Illustration du protocole de RIME (Mohammed et al., 2016)	104
Figure 30. Exemple de profil de librairie NGS avec le 2100 Bioanalyzer instrument	106
Figure 31. Illustration de la réaction d'hybridation Infinium MethylationEPIC Array	108

# TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION	20
Chapitre 1 : qu'est-ce que l'épigénétique ?	21
1. Définition	21
2. La méthylation de l'ADN des génomes de mammifères	23
2.1 Généralités	23
2.1.1 Les dinucléotides CpG : les cibles de la méthylation de l'ADN.	23
2.1.2 Méthylation de l'ADN et développement embryonnaire	26
2.2 Les ADN méthyltransférases	28
2.2.1 DNMT3A et DNMT3B : piliers de la méthylation de novo	31
2.2.2 DNMT1 et son rôle dans la méthylation de maintenance	32
2.2.3 Recrutement des DNMTs à la chromatine	34
2.3 La déméthylation de l'ADN	36
2.3.1 La déméthylation passive	37
2.3.2 La déméthylation active	38
2.3.3 Les enzymes TETs	41
3. Les modifications post-traductionnelles des histones	44
3.1 Une affaire de nucléosome (inspiré de la revue Epigenomics)	44
3.2 Le code des histones	46
3.3 L'acétylation des histones	48
3.4 La méthylation des histones	50
4. Architecture 3D du génome	53

5. Les ARNs non codants	57
5.1 Généralités	57
5.2 Les microARNs	58
5.3 Mécanismes d'action des miRs	60
Chapitre 2 : Epimutations et cancers : une relation toxique	62
1. Le cancer	62
1.1 Tous concernés	62
1.2 Les fondements de l'oncogenèse	64
2. Le paysage épigénétique du cancer	68
2.1 Hypométhylation globale et hyperméthylation locales	68
2.2 Aberrations des PTMs d'histones	71
2.4 Modification de l'expression des miRs	75
Chapitre 3 : le glioblastome multiforme	77
1. Définition	77
2. Origine cellulaire du glioblastome	79
3. Origines moléculaires des glioblastomes	81
4. Symptômes et facteurs de risques	84
5. Traitements	85
5.1 Généralités	85
5.2 Mécanisme d'action du témozolamide	87
6. Résistance	89
6.1 Généralités	89
6.2 La résistance au témozolamide	91

6.2.1 Généralités	91
6.2.2 Le rôle de l'épigénétique	95
<b>OBJECTIFS</b>	<b>99</b>
<b>MATÉRIELS ET MÉTHODES</b>	<b>102</b>
Culture cellulaire	103
RIME	103
Immunoprécipitation de Chromatine (ChIP)	105
Analyse ChIP-seq	106
Infinium MethylationEPIC Array	107
Interférence par ARN	109
Western blot	109
Test de viabilité cellulaire au MTT	110
Génération d'une lignée stable U251 Cas9	110
Criblage CRISPR Knock-Out	110
RT-qPCR	111
Proximity Ligation Assay	111
Séquençage ARN	112
Analyse ARN-seq	112
Test d'activité apoptotique	113
Isolation des exosomes et analyses ELISA	113
ELISA	114
Patients et échantillons	114
Analyse statistique	114

RÉSULTATS ET DISCUSSION	115
Chapitre 1 : Etude des dynamiques transcriptionnelle et chromatiniennes pendant le traitement du glioblastome par le témozolamide pour la prédition de vulnérabilités thérapeutiques.	116
1. Préambule	116
2. Article (en cours de rédaction)	117
3. Discussion	118
CHAPITRE 2 : Identification, par cible CRISPR KO, de BCL11A comme acteur de la résistance des cellules de glioblastome au témozolamide par reprogrammation transcriptomique et épigénétique.	125
1. Préambule	125
2. Article (en cours de rédaction)	126
3. Discussion	127
CONCLUSION	132
TRAVAUX ANNEXES	135
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	136

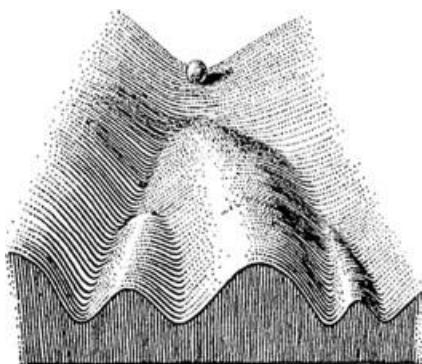
## INTRODUCTION

---

## Chapitre 1 : qu'est-ce que l'épigénétique ?

### 1. Définition

C'est en 1939, dans son livre d'introduction à la génétique moderne, que le célèbre embryologiste britannique Conrad Waddington introduit pour la première fois la notion d'épigénétique (*An Introduction to Modern Genetics*, s. d.). Pour tenter de comprendre comment un être pluricellulaire complexe se construit à partir d'une cellule unique, il évoque le paysage épigénétique, se situant à la frontière entre génotype et phénotype (Figure 1). Cet "épigénotype" comme il l'appelle, serait le reflet de l'enchevêtrement des relations entre gènes et environnement. A partir d'un seul génome aux innombrables potentialités développementales, les gènes sont façonnés en de multiples caractères observables.



**Figure 1. Le paysage épigénétique de Conrad Waddington**

Décrit en 1939, le paysage épigénétique se situe à la frontière entre génotype et phénotype.

Néanmoins, la définition sur laquelle reposent les bases de la conception actuelle de l'épigénétique moléculaire appartient à Robin Holliday qui dans sa revue « *Epigenetics: An overview* », parue en 1994, parle de changements dans l'expression des gènes qui ne sont pas basés sur des différences de séquence d'ADN (Holliday, 1994). Il intègre par la même occasion le principe d'hérabilité épigénétique se traduisant par l'héritage d'un profil d'expression de gènes au cours des divisions cellulaires ou à travers les générations (Holliday, 1987).

Avec le recul dont nous disposons et l'intérêt grandissant porté aux interactions entre stimuli environnementaux et génotype, la définition avangardiste de Waddington qu'il donna à travers le prisme du développement, prend aujourd'hui plus d'ampleur. Nous savons maintenant qu'épigénétique et environnement sont intimement liés. Que ce soit à l'échelle d'un organisme entier et ses interactions tout au long de son vécu (Kanherkar et al., 2014; Toraño et al., 2016) ou à l'échelle cellulaire dans un microenvironnement (S. Chen et al., 2020; Fane & Weeraratna, 2020) l'impact des facteurs externes est réel.

L'identité cellulaire est inexorablement liée à l'épigénome dès les premiers stades de la vie. Tout au long de l'embryogenèse les mécanismes épigénétiques participent à l'établissement des phénotypes cellulaires (Li 2002), et plus tard ils agiront pour leur maintien ou leur renouvellement. La régulation rigoureuse des manifestations épigénétiques est garante de la stabilité cellulaire germinale et somatique. Néanmoins, des dérégulations de la machinerie épigénétique encourant à des altérations de l'épigénome peuvent survenir et participer à l'établissement de phénotypes pathologiques. Comme évoqué précédemment, l'environnement à ses différents échelons influence l'apparition de ces "épimutations", mais elles peuvent aussi se produire comme des phénomènes stochastiques (Feinberg & Irizarry, 2010). Ces modifications épigénétiques sont une des clefs de voûte de la cancérogenèse (Feinberg et al., 2006; Takeshima & Ushijima, 2019), de la progression et de l'hétérogénéité tumorale (Easwaran et al., 2014) et de son échappement thérapeutique (Brown et al., 2014; Wilting & Dannenberg, 2012). Mais le caractère réversible de l'épigénome fait de lui une cible de choix dans le traitement du cancer et d'un large éventail de pathologies (T. K. Kelly et al., 2010; Mau & Yung, 2014).

Quelle que soit la définition qu'on lui donne, les protagonistes moléculaires du théâtre épigénétique sont : la méthylation de l'ADN, les ARNs non-codant (ncARNs) et les

modifications post-traductionnelles (PTMs) d'histones, le tout capable à la fois d'influencer et d'être influencé par une architecture nucléaire plus globale (Allis et al., 2015).

## 2. La méthylation de l'ADN des génomes de mammifères

### 2.1 Généralités

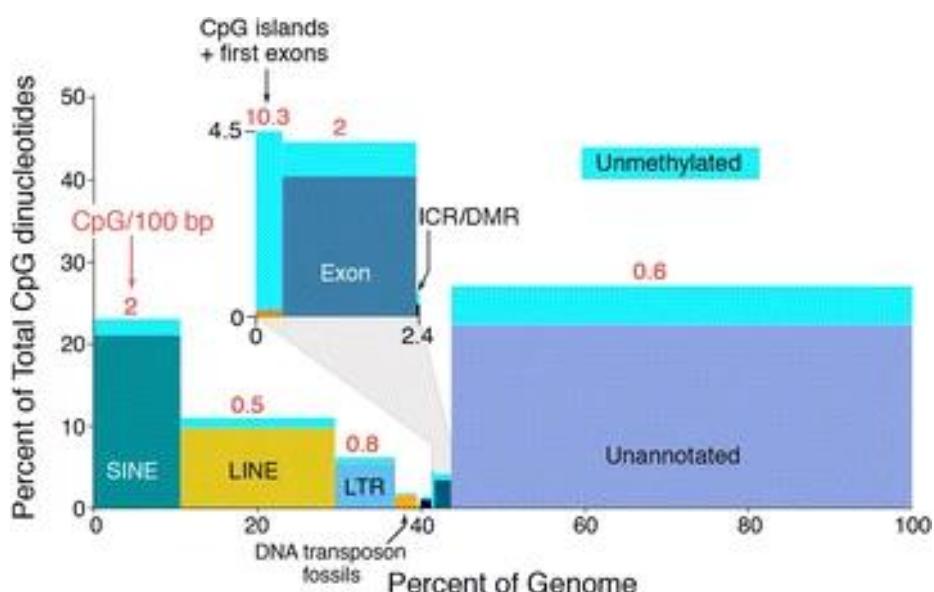
La méthylation de l'ADN est considérée comme le premier niveau de régulation épigénétique, et sans doute le plus étudié. Elle participe au mécanisme d'empreinte génomique et à la régulation des gènes (Allis et al., 2015). Elle est garante du bon déroulement de processus cellulaires fondamentaux au cours du développement et de la différenciation. Inévitablement, des patterns de méthylation aberrants sont impliqués dans le développement de maladies, et particulièrement dans la croissance tumorale (Feinberg & Vogelstein, 1983; Laird, 1997).

#### 2.1.1 *Les dinucléotides CpG : les cibles de la méthylation de l'ADN.*

De façon très générale, la méthylation de l'ADN désigne l'ajout, par des enzymes spécifiques, de groupements méthyles (CH<sub>3</sub>) aux bases d'une séquence ADN. Cette modification covalente se surimpose à l'information génétique originelle mais ne dénature en rien sa séquence (Allis et al., 2015). Selon les espèces, les taux et les profils de méthylation sont très hétérogènes (Head, 2014).

Chez l'Homme et les autres mammifères, la méthylation de l'ADN consiste en l'ajout d'un groupement CH<sub>3</sub> spécifiquement sur le cinquième carbone d'un résidu cytosine (C), aboutissant à la formation d'une 5-methylCytosine (5mC). Les 5mC sont principalement retrouvées dans un contexte de dinucléotide cytosine suivi d'une guanine, 5'-CG-3', ou autrement appelés doublets CpG. Très occasionnellement, notamment dans le corps des gènes de cellules souches embryonnaires, l'apposition du groupement méthyle se produit

dans un contexte non CpG (Lister et al., 2009; Ramsahoye et al., 2000). En se basant sur la teneur en CpG du génome humain, l'abondance en 5mC devrait être plus ou moins équivalente, mais la mutabilité inhérente aux cytosines méthylées fait chuter la quantité de CpGs méthylés estimée (Sved & Bird, 1990). Les CpGs sont au nombre de 28 millions dans le génome humain, et 60 à 80% d'entre eux sont méthylés (Babenko et al., 2017; Strichman-Almashanu et al., 2002; Ziller et al., 2013) (Figure 2).



**Figure 2. Distribution de la méthylation de l'ADN dans le génome humain**

L'axe vertical indique le pourcentage du total des dinucléotides CpG dans chaque compartiment génomique ; l'axe horizontal indique le pourcentage que représente chaque compartiment dans le génome total ; le bleu clair en haut de chaque compartiment indique la fraction non méthylée. Les chiffres en rouge indiquent le nombre moyen de dinucléotides CpG pour 100 pb (Edwards et al., 2017).

Les CpGs ne sont pas distribués uniformément dans notre génome, mais sont enrichis dans des "îlots" CpG (CGIs). Ceux-ci font en moyenne 1000 paires de bases de long et leur nombre est estimé entre 30000 et 45000 dans le génome humain (Antequera & Bird, 1993). Les CGIs ont pour particularité d'être majoritairement non-méthylés (Edwards et al., 2017).

Pour résumer, notre paysage génomique est globalement pauvre en CpG, mais ceux-ci sont majoritairement méthylés, à l'exception de courtes régions intercalées, les CGIs, qui à l'inverse sont très riches en CpG mais très peu méthylés (Lister et al., 2009; Meissner et al., 2008; Straussman et al., 2009).

Avec l'avènement des technologies omics à grande échelle est venue la cartographie de ces CGIs, révélant une localisation dans les zones promotrices autour du TSS (Transcription Starting Site) pour 50% d'entre eux, mais aussi dans les régions intragéniques (exons, introns) et intergéniques (Deaton & Bird, 2011). Ce raisonnement a conduit les chercheurs à l'utilisation des CGIs dans la prédiction des promoteurs. En réalité les promoteurs pourraient être séparés en deux classes : 72% à forte teneur en CpG et 28% à faible teneur en CpG (Saxonov et al., 2006). Parmi les promoteurs à forte teneur en CpG, une grande partie régule des gènes ubiquitaires et du développement. Finalement les CGIs sont particulièrement adaptés à la fonction des régions promotrices en favorisant un état chromatinien permissif car non méthylé. En effet, classiquement la méthylation est associée à la répression transcriptionnelle (Siegfried et al., 1999). Parmi les régions densément méthylées se trouvent les éléments répétés, SINEs, LINEs et LTRs (Eckhardt et al., 2006; Weber et al., 2005) ou la méthylation joue un rôle de verrou, notamment en inhibant la mobilité d'éléments transposables (Schulz et al., 2006). Très exceptionnellement, la méthylation a été associée à une transcription active, comme dans le cas du chromosome X (Hellman & Chess, 2007; Spruijt & Vermeulen, 2014).

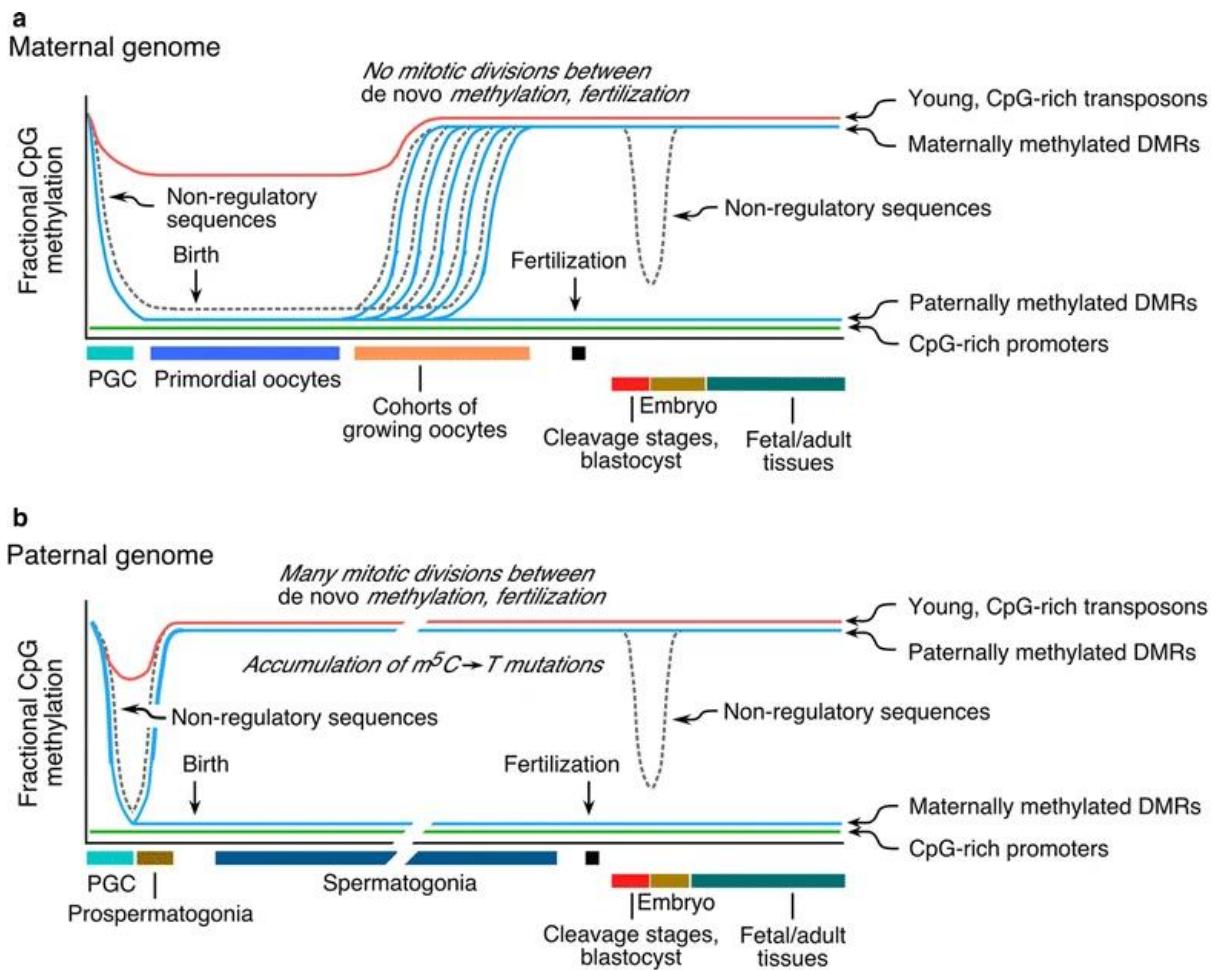
Bien que la répartition de la méthylation au sein du génome soit relativement stable et capable de perdurer à travers les divisions cellulaires successives, elle ne doit pas pour autant être considérée comme immuable. Il s'avère que le schéma de méthylation de l'ADN dans une cellule donnée est le résultat de processus dynamiques de méthylation et de déméthylation susceptibles d'être perturbés en réponse à différents stimuli. Aussi, il faut

prendre en considération qu'à l'origine, les profils de méthylation des cellules ne peuvent être établis qu'après une vaste reprogrammation au stade embryonnaire.

### 2.1.2 Méthylation de l'ADN et développement embryonnaire

Des études menées chez la souris ont mis en évidence au cours du développement embryonnaire une réinitialisation épigénétique progressive avec différentes vagues de déprogrammation et reprogrammation (Figure 3). La première vague survient immédiatement après la fécondation: les génomes maternels et paternels subissent des reprogrammations épigénétiques asymétriques pour convertir les épigénomes des gamètes en un épigénome du zygote totipotent, conduisant à l'activation du génome zygotique (ZGA) (Jukam et al., 2017) et à l'établissement de deux populations cellulaires différemment méthylées, le trophectoderme et la masse cellulaire interne (ICM) (Canovas & Ross, 2016). Le gommage progressif des marques de méthylation de l'ADN conduit à un blastocyste globalement hypométhylé au stade préimplantatoire tout en épargnant les régions d'empreinte parentale et certaines familles de séquences répétées. Bien que les allèles maternels et paternels de la majorité des gènes contribuent à niveaux égaux au phénotype, à l'heure actuelle, plusieurs dizaines de gènes humains concernés par l'empreinte parentale ont été découverts (Morison et al., 2005; Tucci et al., 2019). Dans cet état très transitoire, les cellules embryonnaires sont libérées de la plupart des contraintes épigénétiques et chez les femelles les deux chromosomes X sont réactivés. Enfin, après l'implantation du blastocyste dans la muqueuse utérine, l'accessibilité de la chromatine est progressivement restreinte avec le dépôt de marques épigénétiques répressives spécifiques du type cellulaire. Les

profils de méthylation sont nouvellement établis à partir de l'ADN vierge, on parle alors de méthylation de novo.



**Figure 3. Réinitialisation épigénétique au cours du développement des mammifères**

Dynamique de la déméthylation et de la méthylation de novo des génomes maternel (a) et paternel (b) dans les cellules germinales et au cours du développement embryonnaire des mammifères (Edwards et al., 2017).

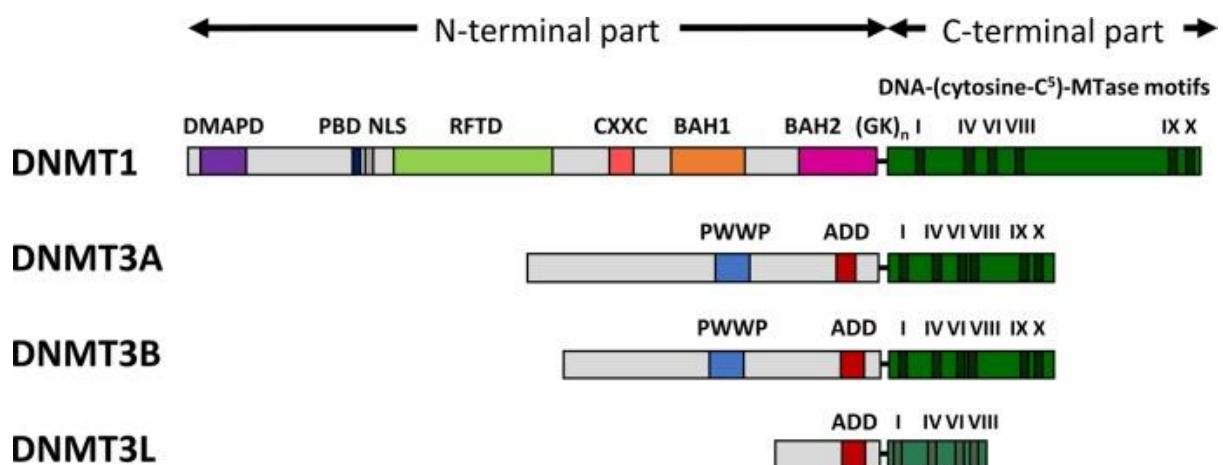
Un certain nombre de cellules vont subir un second tour de déméthylation plus drastique pour former les cellules germinales primordiales (PGCs) nécessaires à l'obtention de spermatozoïdes et d'ovocytes fonctionnels (Atlasi & Stunnenberg, 2017). En effet, ces PGCs qui ont commencé à adopter un destin somatique nécessitent un remodelage approfondi du profil de méthylation pour répondre aux exigences des futures cellules

germinales. Cette reprogrammation se produit en deux étapes. Pendant leur migration vers ce qui deviendra les gonades (crête génitale,) la déméthylation principalement passive, fait chuter le niveau de méthylation global à moins de 10% (Popp et al., 2010) comparé aux 70% dans l'embryon entier. A l'issue de la deuxième étape, qui allie méthylation passive et active, les PGCs ont un niveau basal de méthylation où seul quelques transposons et régions intergéniques restent méthylés. Suite à la colonisation des futurs organes génitaux par les PGCs et à la détermination du sexe de l'embryon, des schémas de méthylation distincts sont élaborés *de novo* et de façon asymétrique, après la naissance dans les ovocytes et avant dans les spermatozoïdes (Sasaki & Matsui, 2008).

## 2.2 Les ADN méthyltransférases

Le maintien des statuts de méthylation à travers les divisions cellulaires résulte de la préservation de la méthylation symétrique sur les deux brins de l'ADN, mais aussi de la méthylation *de novo* (Allis et al., 2015). Ces deux actions sont exécutées par des enzymes spécifiques de la famille des ADN méthyltransférases (DNMTs) (Gujar et al., 2019). Le génome humain code pour cinq DNMTs : DNMT1, DNMT2, DNMT3A, DNMT3B et DNMT3L. Toutes ces ADN méthyltransférases possèdent un domaine catalytique hautement conservé (Jeltsch & Jurkowska, 2016), cependant, deux d'entre elles, DNMT2 et DNMT3L ne possèdent pas directement d'activité ADN méthyltransférase (Figure 4). Les fonctions biologiques de DNMT2 ne sont pas complètement élucidées (Jeltsch et al., 2016, p. 2; Schaefer & Lyko, 2010). Elle serait principalement impliquée dans la méthylation de l'ARN par transfert d'un groupe méthyle de la position C5 vers la position C38 des ARNs de transfert asparagine (Goll et al., 2006; Jurkowski et al., 2008). DNMT3L est quant à elle considérée comme un variant inactif des DNMT3s, tronquée en C-terminal, elle est dépourvue du motif catalytique qui caractérise les autres ADN cytosine-5-méthyltransférases (Aapola et al., 2000). Mais elle n'est pas inutile pour autant, DNMT3L

est capable de stimuler l'activité de méthylation de DNMT3A et DNMT3B (Chedin et al., 2002; Gowher et al., 2005; Suetake et al., 2004).

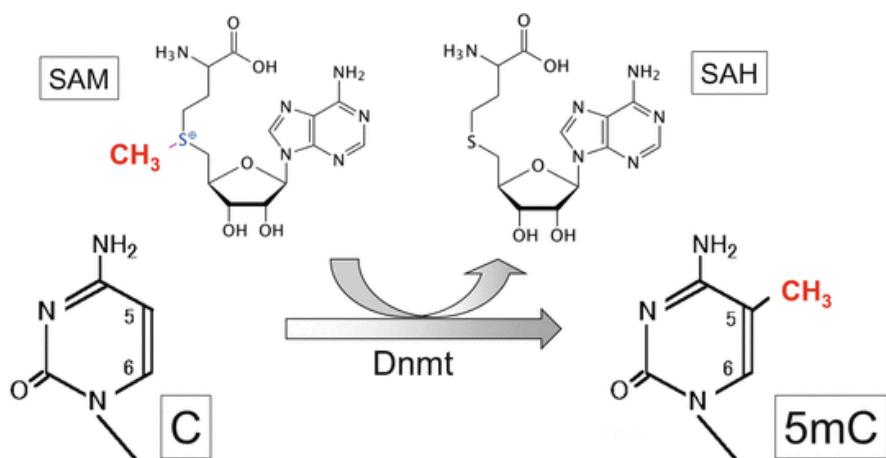


**Figure 4. Structure des enzymes de la famille DNMT chez les mammifères**

DNMT1, DNMT3A, DNMT3B et DNMT3L sont les quatre principales ADN méthyltransférases. Elles possèdent toutes un domaine régulateur (N-terminale) et un domaine catalytique hautement conservé (C-terminale). Abréviations utilisées : DMAPD - domaine d'interaction de la protéine 1 associée à la méthyltransférase de l'ADN, PBD - domaine de liaison à PCNA, NLS - signal de localisation nucléaire, RFTD - domaine de ciblage des foyers de réPLICATION, CXXC - domaine CXXC, BAH1 et BAH2 - domaines d'homologie bromo-adjacents 1 et 2, GK<sub>n</sub> - répétitions de glycine lysine, PWWP - domaine PWWP, ADD - domaine ATRX-DNMT3-DNMT3L (Jeltsch et al., 2016).

Chez les animaux, la structure des DNMTs se compose d'un domaine de régulation de taille très variable en N-terminal et une région catalytique C-terminale. Exception faite encore une fois de DNMT2, composée uniquement d'un domaine catalytique de 415 acides aminés. Le domaine N-terminal régule les interactions moléculaires de ces enzymes avec leurs partenaires protéiques et l'ADN. Il a été montré que leurs activités catalytiques sont sous contrôle allostérique (fonction auto-inhibitrice) des domaines RFT (replication foci targeting) et CXXC (zinc finger binding site) dans DNMT1 et ADD (ATRX-DNMT3A-DNMT3L domain) pour DNMT3 (Jeltsch & Jurkowska, 2016). La réaction catalytique de méthylation se produit lorsque l'un des résidus cystéine de la DNMT initie

une attaque nucléophile sur le carbone 6 d'une cystéine de l'ADN. Après cette attaque s'ensuit le transfert d'un groupe méthyle depuis le cofacteur de la réaction, S-adénosylmethionine (SAM), vers le carbone 5 de la cystéine cible puis la déprotonation de ce dernier pour former la 5-méthylcytosine et la libération du métabolite S-adénosylhomocystéine (SAH) (Figure 5).



**Figure 5. Réaction catalytique de méthylation par les DNMTs**

La réaction catalytique de méthylation se produit lorsque l'un des résidus cystéine de la DNMT initie une attaque nucléophile sur le carbone 6 d'une cystéine de l'ADN (Suetake et al., 2017).

En modifiant préférentiellement l'ADN hémi-méthylée, DNMT1 est responsable du transfert du profil de méthylation au brin nouvellement synthétisé lors de la réplication (Jeltsch, 2006). On parle alors de méthylation de maintenance. DNMT3A et DNMT3B agissent aussi bien sur les CpGs nus que les CpGs hémi-méthylés, elles participent toutes les deux à la méthylation de novo. Il existe tout de même quelques exceptions à ce modèle binaire de répartition des tâches (Walton et al., 2011).

En plus de leurs motifs de fixation aux acides nucléiques (Qiu et al., 2002; J. Song et al., 2012) les domaines non catalytiques des DNMTs sont riches en motifs gouvernant des interactions protéine-protéine, permettant aux DNMTs de participer à des complexes

multiprotéiques. Les enzymes sont capables de former des homo et hétéro-oligomères, comme c'est le cas entre DNMT3A et DNMT3L (D. Jia et al., 2007), et de surcroît peuvent intégrer des complexes protéiques plus conséquents (Vertino et al., 2002). Il est nécessaire de garder à l'esprit que le recrutement d'une DNMT ne rime pas toujours avec méthylation selon qu'il s'agisse de la forme catalytiquement active ou auto-inhibée de l'enzyme (Rajavelu et al., 2018). Enfin, si la méthylation de l'ADN semble être l'activité principale des DNMTs, il ne faut pas exclure qu'elles puissent posséder d'autres fonctions, intrinsèques ou par l'intermédiaire de leur interactome (Clements et al., 2012).

### 2.2.1 DNMT3A et DNMT3B : piliers de la méthylation de novo

L'inactivation des gènes codant pour DNMT3A et DNMT3B entraîne l'arrêt de la méthylation de novo de l'ADN dans les cellules souches embryonnaires ainsi que chez les jeunes embryons de souris, qui par conséquent ne se développent pas normalement. Ces résultats, obtenus il y a plus de 20 ans par Okano et son équipe, furent les premiers à mettre en évidence que DNMT3A et DNMT3B fonctionnent comme des méthyltransférases de novo et jouent un rôle crucial dans le développement physiologique comme pathologique (Okano et al., 1999).

DNMT3A et DNMT3B sont étroitement liées par leur séquence en acides aminés. Ce degré élevé de similitudes leur confère des fonctions en commun, bien qu'elles aient également des fonctions distinctes (Challen et al., 2014). Il existe plusieurs isoformes de chacune d'elles, de tailles variables, avec ou sans activité catalytique, produits en quantités hétérogènes selon le stade de développement et les tissus concernés (S. Chen et al., 2020; Duymich et al., 2016). Des études sur l'expression de ces deux enzymes chez l'homme et la souris les montrent fortement exprimées autour du stade blastocyste et pendant le développement de la lignée germinale, deux périodes pendant lesquelles, comme

expliqué en amont, la méthylation de l'ADN subit un remodelage drastique (E. Li, 2002). Comme décrit précédemment, les DNMT3A et DNMT3B ciblent principalement les sites CpG des cellules somatiques, mais elles sont aussi à l'origine des méthylations non-CpG retrouvées principalement dans le corps des gènes de cellules souches (Lister et al., 2009; Ramsahoye et al., 2000)

Même si les fonctions de ces deux enzymes sont partiellement redondantes, plusieurs études de knock-out individuel ont montré que l'abolition de DNMT3A est responsable d'une létalité postnatale chez la souris, tandis que les souris déplétées en DNMT3B n'arrivent pas à terme, prouvant leurs distinctions fonctionnelles (T. Chen et al., 2003). Il semble que DNMT3A soit responsable de la méthylation des satellites majeurs (péri-centromériques) chez la souris, et des empreintes parentales au cours de la gaméto-génèse ; alors que DNMT3B joue un rôle essentiel dans la méthylation au cours du développement embryonnaire précoce et dans la méthylation des satellites mineurs (centromériques) (Kaneda et al., 2004; Kato et al., 2007). Néanmoins ces particularités fonctionnelles et les rôles spécifiques de chacune de ces enzymes restent à élucider. C'est ce qu'ont tenté de faire Gao et son équipe dans leur étude publiée en 2020 (Gao et al., 2020). Par des approches enzymologiques poussées, l'étude a permis la caractérisation des préférences de séquence flanquante de DNMT3A et DNMT3B, qui manifestent des taux de CpG méthylation très différents. L'étude révèle aussi des différences de conformation de l'interface homodimérique en contact avec l'ADN ainsi qu'une spécificité plus faible de DNMT3B pour les CpG méthylés.

### 2.2.2 DNMT1 et son rôle dans la méthylation de maintenance

La méthylation de maintenance est aussi indispensable qu'elle se doit d'être efficace pour transmettre fidèlement des schémas de méthylation spécifiques à travers les générations. Ce rôle fut très vite attribué à DNMT1 suite à des expériences de knockout

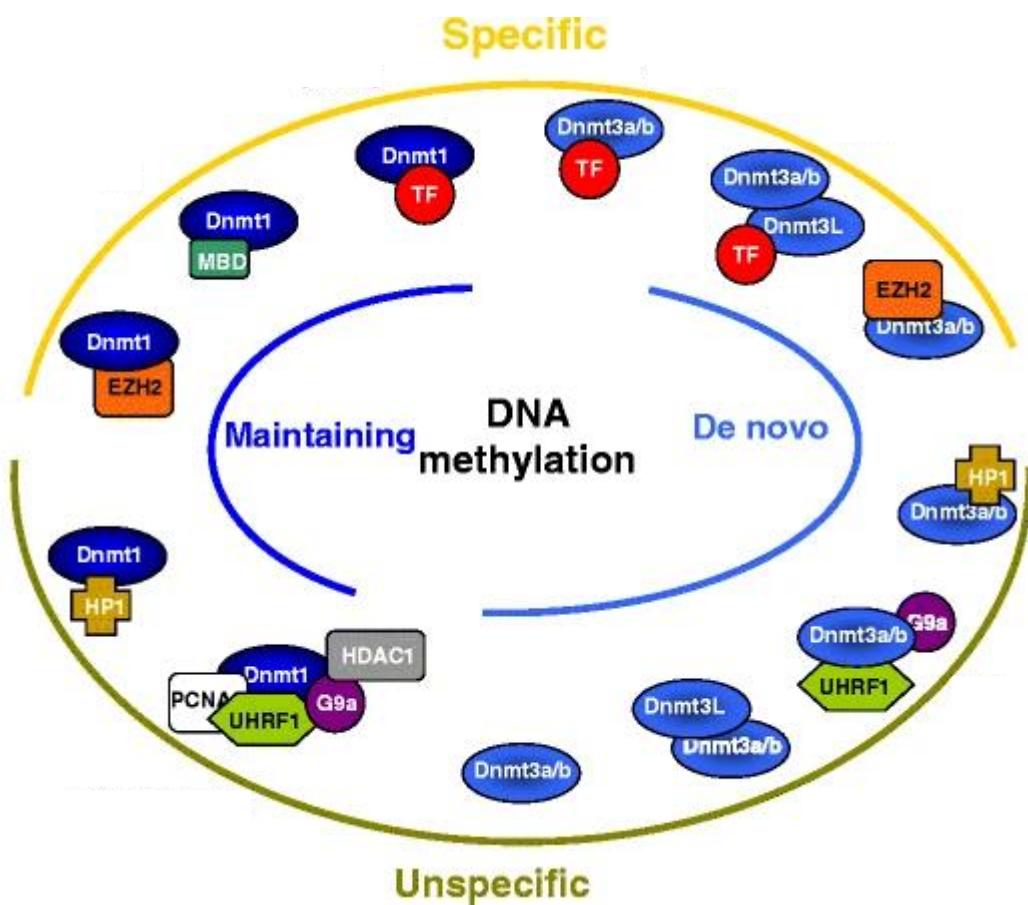
chez la souris en 1992 (E. Li et al., 1992). Peu de temps après, une étude montra la présence de l'enzyme au niveau des fourches de réPLICATION pendant la phase S (Leonhardt et al., 1992). Pour ces raisons, l'affinité de DNMT1 pour l'ADN hémiméthylé fut admise sans que les fondements moléculaires de cette préférence ne soit déterminés. Finalement, en 2011, Song et son équipe ont identifié l'existence d'une fonction auto-inhibitrice du domaine CXXC, capable de se fixer aux CpG non méthylés et de leur occlure l'accès au site actif de l'enzyme et ainsi inhiber la méthylation *de novo* (J. Song et al., 2012). Un autre mécanisme permet de garantir que seuls les dinucléotides CpG hémiméthylés subissent une méthylation et il implique un partenaire protéique : UHRF1 (Ubiquitin-like, containing PHD and RING finger domains, 1). En effet, le domaine RFT de DNMT1 interagit avec la protéine UHRF1 qui elle-même contient un domaine SRA (SET and RING associated) reconnaissant spécifiquement les dinucléotides CpG hémiméthylés (Bostick et al., 2007).

Classiquement et depuis de nombreuses années maintenant, il est admis que le recrutement de DNMT1 sur la machinerie de réPLICATION pendant la phase S nécessite donc UHRF1 mais aussi PCNA (Proliferating cell nuclear antigen) et son associé PAF15 (proliferating cell nuclear antigen (PCNA)-Associated Factor,15) (Iida et al., 2002; Leonhardt et al., 1992). DNMT1 possède en effet un domaine de liaison directe à PCNA (PBD). Cependant les modes de recrutement de DNMT1 et la régulation allostérique de son activité semble impliquer des mécanismes plus variés et complexes, avec de potentielles spécificités spatio-temporelle (Jeltsch, 2006; Petryk et al., 2021) encore floues pour les chercheurs. A titre d'exemple, selon une récente étude, UHRF1, en plus de son interaction directe, facilite le recrutement de DNMT1 aux fourches de réPLICATION par ubiquitination de PAF15 (Nishiyama et al., 2020) et ce, préférentiellement au début de la phase S. Qui plus est, des études ont prouvées que l'interaction DNMT1/PCNA n'est pas indispensable pour le maintien du niveau de méthylation global de l'ADN, suggérant soit que ce recrutement aux fourches n'est pas suivi systématiquement par le dépôt de

marques de méthylation, soit que des voies parallèles de recrutement de DNMT1 puissent exister (Spada et al., 2007). Ceci étant, le maintien du complexe DNMT1/PCNA/UHRF1 est très important pour garantir la méthylation puisque d'une fois perturbé, cela résulte en une hypométhylation globale de l'ADN et l'apparition de tumeurs (Pacaud et al., 2014). Enfin, des modifications post-traductionnelles de l'enzyme elle-même sont susceptibles d'affecter sa stabilité et son activité. Ces modifications déterminent où et quand DNMT1 peut être active et ont un impact direct sur le maintien de la méthylation de l'ADN (Estève et al., 2011; H. Zhang, Gao, et al., 2019).

### 2.2.3 Recrutement des DNMTs à la chromatine

Si le statut de méthylation des promoteurs contribue directement à la régulation de la transcription par recrutement de facteur de transcription, l'inverse est aussi vrai. Les facteurs de transcriptions liés à l'ADN sont capables de mobiliser les complexes de méthylation (Hervouet et al., 2009; Marchal & Miotto, 2015). En effet, par opposition aux activités non spécifiques de méthylation globale (pas de séquences préférentielles), les DNMTs peuvent aussi être engagées aux seins de complexes protéiques sur des séquences d'ADN ciblées (Hervouet et al., 2018) (Figure 5). Cette particularité fut décrite pour la première fois par Di Croce et collaborateurs dans un contexte pathologique. Ils rapportaient que la protéine de fusion PML-RAR induit une hyperméthylation et l'extinction de gènes en recrutant des ADN méthyltransférases sur certains promoteurs, expliquant en partie son potentiel leucémogène (Di Croce, 2002). Cet exemple a rapidement été étendu au contexte physiologique, comme le recrutement de DNMT1 par SP1 (Hervouet, Vallette, et al., 2010), celui de DNMT3A par MYC pour réprimer le promoteur p21 (Brenner et al., 2005) ou encore le recrutement de DNMT3B via le répresseur transcriptionnel E2F6 pour verrouiller des gènes de la lignée germinale dans les tissus somatiques murins (Velasco et al., 2010).



**Figure 6. Schéma des principaux types de complexes incluant les DNMTs**

La méthylation de maintenance est principalement catalysée par DNMT1 : courbe bleu foncé. La méthylation de novo est principalement catalysée par DNMT3A et DNMT3B : courbe bleu clair. Les DNMTs peuvent former de nombreux complexes pour catalyser la méthylation de l'ADN de manière non spécifique (courbe verte) ou spécifique (courbe jaune) (Hervouet et al., 2018).

Les DNMTs sont aussi susceptibles de coopérer avec d'autres régulateurs épigénétiques tels que les protéines de liaison aux histones. Le principal exemple est celui de l'interaction entre DNMT1 et la méthyltransférase d'histones G9a (Esteve et al., 2006) facilitant la coordination de la méthylation de l'ADN et des histones pendant la réPLICATION de l'ADN. En effet, la présence concomitante de plusieurs marques répressives est un schéma assez fréquent, particulièrement important sur des séquences répétées comme les

centromères. Les ADN méthyltransférases et les histones désacétylases agissent aussi de concert (Fuks et al., 2000). Toutes ces enzymes peuvent se retrouver au sein d'un complexe DNMT1 / PCNA / UHRF1 / HDAC1 / G9a échafaudé sur la chromatine pendant la réPLICATION (J. K. Kim et al., 2009). Les DNMT3s peuvent elles aussi être associées à UHRF1 dans un contexte particulier (Meilinger et al., 2009). Il existe aussi des preuves du recrutement de DNMT1 par les histones méthyltransférases SUV39H1 et HP1 (Fuks, 2003; Lehnertz et al., 2003) ainsi que par des protéines avec domaine de liaison aux méthyl-CpG (MBD) (Tatematsu et al., 2000). Les DNMTs sont également associées à la machinerie répressive des protéines du groupe polycomb (PcG) (Viré et al., 2006). Cette liste est non exhaustive, il existe un très grand nombre de partenaires d'interaction des DNMTs, y compris des ARNs non codants (Mohammad et al., 2010; Schmitz et al., 2010), sans compter la partie immergée de l'iceberg qui reste à découvrir. Il faut noter que les interactions et les recrutements des enzymes de méthylation à la chromatine sont dynamiques et varient au cours du cycle cellulaire (Hervouet et al., 2012). En outre, on connaît peu de choses sur la spécificité de chaque DNMT pour l'un ou l'autre de ses partenaires, mais des expériences d'invalidation nous mettent sur la piste d'une certaine redondance où la perte d'une DNMT pourrait être compensée par une autre (Elliott et al., s. d.).

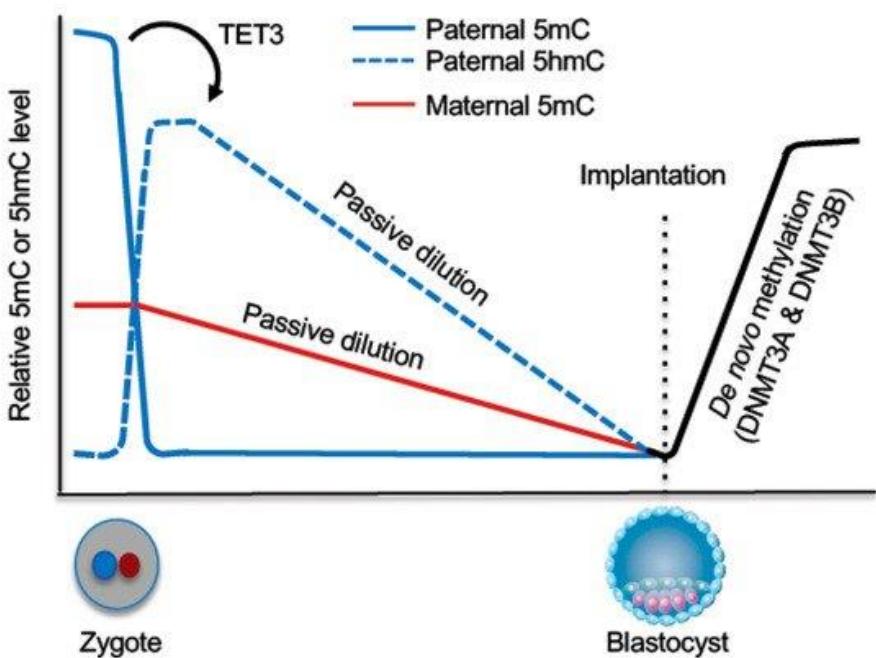
### 2.3 La déméthylation de l'ADN

Bien que stables, les 5mC peuvent retrouver leur statut non méthylé par des processus de déméthylation qui, comme leur nom l'indique, impliquent l'élimination du groupe méthyle. Elle fut en premier lieu mise en évidence chez le zygote, où des vagues de déméthylation drastiques sont indispensable à l'établissement du génome pluripotent du blastocyste et à la détermination du destin germinal des PGCs (Hajkova et al., 2002; Mayer et al., 2000; Oswald et al., 2000). Cette méthylation globale s'effectuant dans un temps très court, il est peu probable qu'elle soit le fruit d'une perte passive des 5mC aux

grés des réplications, suggérant l'existence d'activités enzymatiques responsables de l'élimination active des groupes méthyle sur les cytosines. La déméthylation de l'ADN peut donc avoir lieu de manière passive ou active et est principalement liée à l'activation transcriptionnelle. Tout comme la méthylation, la déméthylation peut aussi avoir lieu sur des locus d'ADN spécifiques. Là aussi, de nombreux partenaires protéiques sont impliqués.

### 2.3.1 *La déméthylation passive*

Comme expliqué précédemment, la méthylation de maintenance nécessite en général l'association de DNMT1 et UHRF1 aux fourches de réPLICATION pour restaurer, sur le brin naissant, le schéma de méthylation symétrique au brin originel. En ce sens, une perte d'expression ou d'activité de la protéine DNMT1 et/ou l'altération d'un complexe impliquant la protéine DNMT1 aboutissent, au fil des cycles successifs, à l'ADN non méthylé ; on parle alors de dilution des 5mC. Une dilution passive de méthylation notable est celle qui se déroule peu de temps après la fécondation, dans le génome maternel, due à l'exclusion du noyaux de DNMT1o, un isoforme de DNMT1 prédominant dans les embryons préimplantatoires (Howell et al., 2001) (Figure 7). Le génome paternel quant à lui, subit d'abord une déméthylation active médiée par TET3 (voir partie 2.3.2), puis les dérivés oxydés sont éliminés par dilution passive (Inoue et al., 2011) (Figure 7). De surcroît les bases méthylées de l'ADN peuvent faire l'objet d'une hydrolyse de la 5-méthyl-2'-désoxycytidine en 2'-désoxythymidine. C'est cette conversion spontanée qui contribue à expliquer la sous-représentation des CpGs dans le génome (J.-C. Shen et al., s. d.).

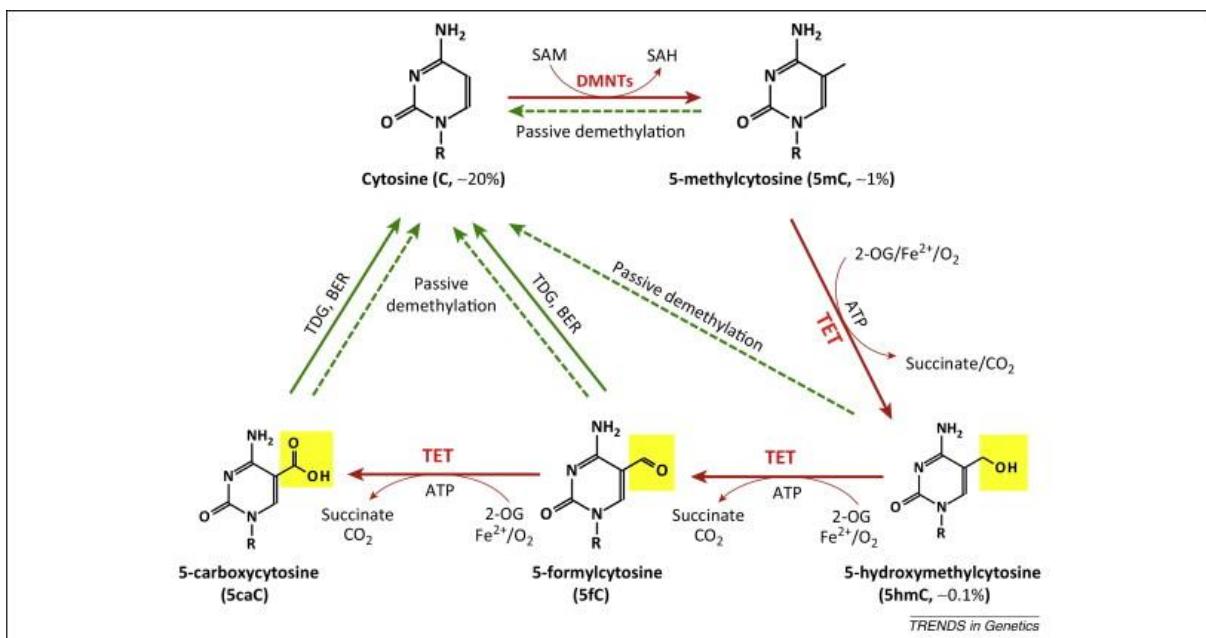


**Figure 7. Cycle de méthylation de l'ADN pendant l'embryogenèse précoce**

Au stade préimplantatoire, le génome paternel subit à la fois une déméthylation active médiée par TET3 et une déméthylation par dilution passive. Le génome maternel subit principalement une déméthylation passive. Lors de l'implantation, une vague de méthylation de novo établit le schéma de méthylation de l'embryon (Y. Zeng & Chen, 2019)

### 2.3.2 La déméthylation active

La principale voie de déméthylation active de l'ADN fait intervenir les enzymes de la famille TET (Ten-eleven-translocation) (Y. Huang & Rao, 2014). Les 5mC peuvent être hydroxylés par les TETs en 5-hydroxyméthylcytosine (5hmC), puis en fonction du nombre d'oxydation successives, converties en 5-formylcytosine (5fC) ou 5-carboxylcytosine (5caC). S'en suit une excision des 5fC et 5caC par l'action de la thymine ADN glycosylase (TDG) couplée à une réparation par le système BER (Base exision repair) capable de reconnaître le mésappariement (Figure 8). Il est important de noter que les bases 5hmC, 5fC et 5CaC préalablement oxydées par TETs peuvent aussi faire l'objet d'une déméthylation passive, comme c'est le cas dans le génome paternel du zygote (voir partie 2.3.1).



**Figure 8. Principale voie de déméthylation active de l'ADN**

Elle fait intervenir les enzymes de la famille TET (Ten-eleven-translocation). Les 5mC peuvent être hydroxylées par les TETs en 5-hydroxyméthylcytosine (5hmC), puis, en fonction du nombre d'oxydation successives, converties en 5-formylcytosine (5fC) ou 5-carboxylcytosine (5caC) (Y. Huang & Rao, 2014)

Une autre voie de déméthylation active consiste en la déamination suivie de la réparation des bases méthylés. La déamination peut avoir lieu à la fois sur les 5mC et les 5hmC par action des protéines AID/APOBEC (Morgan et al., 2004). Cela génère des mésappariement G/T ou G/U, qui seront pris en charge par les protéines SMUG1/TDG et le système BER pour remplacer la base dépareillée par une cytosine. Toutefois, plusieurs études remettent ce processus en question étant donné la faible efficacité de AID/APOBEC sur l'ADN double brin (Pham et al., 2003) et son affinité restreinte pour les 5mC préalablement modifiées par les TETs (Schutsky et al., 2017).

De façon plus surprenante, certaines études suggèrent l'existence d'une déméthylation impliquant, dans des conditions particulières, les DNMTs. Une première expérience de biochimie menée *in vitro* montre DNMT3A et DNMT3B pouvant éliminer le groupe

hydroxyméthyle de 5hmC pour retrouver une cytosine non modifiée, tout cela en l'absence du cofacteur SAM et dans des conditions oxydantes (C.-C. Chen et al., 2013; Liutkevičiūtė et al., 2009). Une seconde, menée par Métivier et ses collaborateurs, met en évidence, durant les cycles transcriptionnels du promoteur du gène TFF1, la double action des ADN méthyltransférases : méthylation des CpGs et déméthylation active par désamination (Métivier et al., 2008). Les DNMTs pourraient aussi stimuler la déméthylation de façon indirecte via leur interaction avec la protéine TDG (Y.-Q. Li et al., 2007). Cependant, ces résultats restent à confirmer.

Plus récemment, des études ont mis en évidence que les formes 5fC et 5caC sont les cibles potentielles de conversion directe en cytosine non méthylée par déformylation et décarboxylation. Selon Schön et al., et Iwan et al., les 5fC de cellules souches sont victimes d'un clivage de la liaison C-C résultant en une cytosine simple (Iwan et al., 2018; Schön et al., 2020). Deux autres articles rapportent la décarboxylation directe de 5caC dans les cellules humaines, mais alors que le premier évoque l'implication des 5mC-méthyltransférase (Liutkevičiūtė et al., 2014) l'autre exclue la participation de DNMT1 à ce mécanisme (Y. Feng et al., 2021). Des investigations plus poussées sont donc nécessaires pour identifier de façon consensuelle les enzymes catalyseurs de ces réactions.

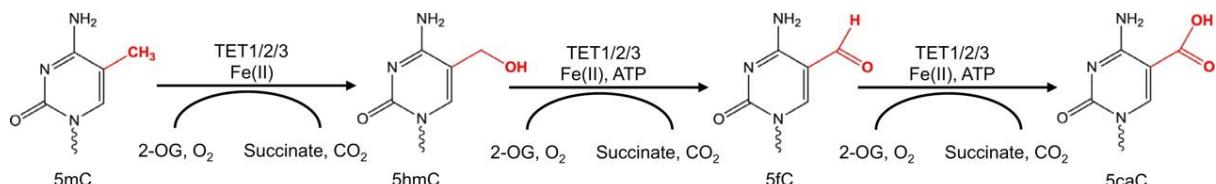
Plusieurs autres cas de figure sont proposés par la littérature, comme l'implication du système Gadd45/NER (Barreto et al., 2007; Ma, Guo, et al., 2009; Rajput et al., 2016) ou celui de protéines de la superfamille SAM Radical comme la sous-unité ELP3 du complexe d'elongation ARN polymérase II (Okada et al., 2010; Paraskevopoulou et al., 2006).

Finalement, les voies enzymatiques menant à la déméthylation de l'ADN semblent aussi foisonnantes que celles participant à sa méthylation. Ainsi, l'équilibre minutieux et les interactions entre méthylation et déméthylation sculptent le méthylome et permettent la conservation de ce flux d'informations épigénétiques à travers les générations.

### 2.3.3 Les enzymes TETs

Alors que dès 1972 des chercheurs révèlent la présence des 5-hydroxymethylcytosines dans le génome des rats (Penn et al., 1972) ce n'est que bien plus tard, en 2009, que les 5hmC attiraient l'attention, après la découverte par Tahiliani et ses collaborateurs d'une des protéines responsables de cette modification, la dioxygénase TET1 dans les cellules souches embryonnaires de souris (Tahiliani et al., 2009). Presque en même temps, une autre équipe révéla la présence de ces mêmes 5hmC dans les neurones de Purkinje (Kriaucionis & Heintz, 2009). Très rapidement, la présence de cette base modifiée fut étendue aux génomes de presque tous les types cellulaires (C.-X. Song et al., 2011) et toutes les protéines TETs (TET1, TET2, TET3) peuvent être tenues pour responsables (Ito et al., 2010). Enfin, en 2011, les TETs dévoilèrent leur capacité à catalyser, aussi, la formation de 5-formylcytosine (5fC) et 5-carboxylcytosine (5caC) (Ito et al., 2011).

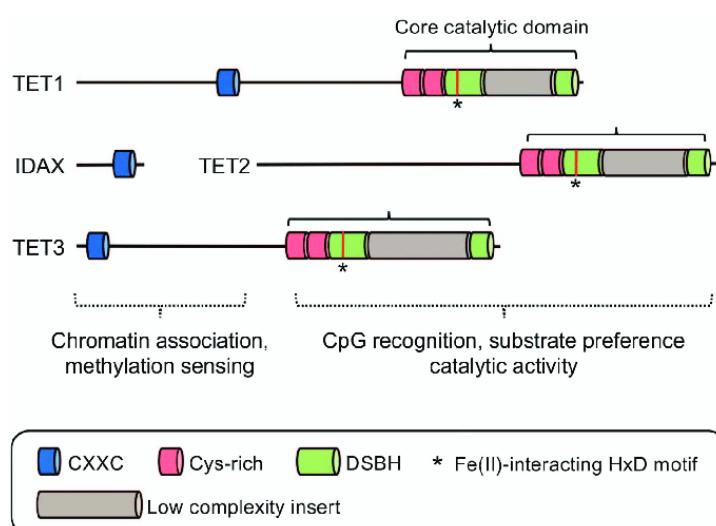
Les enzymes TETs appartiennent à la superfamille des dioxygénases  $\text{Fe}^{2+}$ /a-ketoglutarate dépendantes, et possèdent pour cette raison des sites de liaison pour le Fer II et le 2-oxoglutarate (2-OG), tous deux cofacteurs de la réaction de déméthylation (Tan & Shi, 2012)(Figure 9).



**Figure 9. Réactions d'oxydation de la 5mC par les protéines TETs**

Les protéines de la famille TET oxydent la 5mC en 5hmC (et en 5fC et 5caC) en présence de 2-OG et de fer. Abréviations : 5mC - 5-méthylcytosine ; 5hmC - 5-hydroxyméthylcytosine ; 5fC - 5-formylcytosine ; 5caC - 5-carboxylcytosine ; 2-OG - le 2-oxoglutarate (Tan & Shi, 2012).

Toutes les protéines TETs contiennent une hélice  $\beta$  double brin (DSBH) hautement conservée ainsi qu'un domaine riche en cystéine dans leur région C-terminale (Figure 10). Les formes longues des protéines TET1 et TET3 possèdent en plus de leur domaine catalytique, un domaine en doigt de zinc CXXC N-terminal leur permettant de se lier à l'ADN (Jin et al., 2016). Le domaine CXXC absent de TET2 pourrait avoir été perdu au cours de l'évolution et est maintenant codé par le locus voisin, la protéine IDAX (inhibition du complexe dvl et axine) (Ko et al., 2013). Comme c'est le cas pour la majorité des protéines, il existe plusieurs isoformes des enzymes TETs avec des expressions et des fonctions différentielles (Melamed et al., 2018). Ces isoformes se distinguent principalement par leurs tailles et leurs spécificités tissulaires.



**Figure 10. Structure des enzymes de la famille TET chez les mammifères**

Toutes les protéines TETs contiennent une hélice  $\beta$  double brin (DSBH) hautement conservée ainsi qu'un domaine riche en cystéines dans leur région C-terminale. Les formes longues des protéines TET1 et TET3 possèdent en plus un domaine en doigt de zinc CXXC dont TET2 est dépourvue (An et al., 2017).

Si l'expression des TETs dans les cellules souches et au cours du développement embryonnaire est indispensable pour le maintien de la pluripotence (J. Yang et al., 2020), les TETs ont aussi un rôle primordial dans la différenciation tissulaire et les fonctions

neuronales (Santiago et al., 2014; X. Wu & Zhang, 2017) et sont exprimées de façon ubiquitaire dans les cellules différenciées. La répartition des bases 5hmC dans le génome reflète relativement bien le rôle des TETs dans l'activation transcriptionnelle puisqu'on les retrouve principalement enrichie dans le corps des gènes activement transcrit et certains enhancers (Rodríguez-Aguilera et al., 2020; Stroud et al., 2011; Tsagaratou et al., 2014). Les TETs pourraient également être recrutés spécifiquement pour activer l'expression d'un sous-ensemble de gènes cruciaux dans la reprogrammation cellulaire (Costa et al., 2013), ou le développement tissu-spécifique (Cui et al., 2020). Tout comme la famille DNMT, les trois enzymes TETs semblent avoir à la fois des cibles en communs et distinctes dans le génome.

Cependant, beaucoup de zones d'ombres entourent ces mécanismes de recrutement et la sélectivité des séquences génomiques par les enzymes TETs. Une certitude est que le domaine CXXC de TET1 et TET3 est, au moins en partie, responsable de l'ancrage des dioxygénases sur les îlots CpG (Jin et al., 2016; H. Zhang et al., 2010). L'enrôlement des TETs par les facteurs de transcription a aussi été mis en évidence, notamment dans les cellules hématopoïétiques où RUNX1 attire les enzymes de déméthylation pour induire une déméthylation locale (T. Suzuki et al., 2017). Une partie de l'interactome de TET1 a été révélé par une technique de fluorescence, on y retrouve notamment MeCP2, HDAC1/6/7, EZH2 et PCNA. Tout comme pour l'interaction entre DNMT1 et PCNA, la perturbation du complexe TET1/PCNA entraîne un profil de méthylation aberrant fréquemment retrouvé dans les cellules cancéreuses (Cartron et al., 2013). Également peu de connaissances sont disponibles sur les modes de recrutement à l'ADN de TET2, dépourvue de domaine CXXC, ce qui a même donné lieu à des programmes de recherches pour Horizon 2020. Une étude de 2015 a néanmoins mis en évidence que WT1 interagit physiquement avec TET2 et le recrute sur des gènes cibles pour activer spécifiquement leur expression (Y. Wang et al., 2015).

Finalement, tout comme pour les DNMTs, il semblerait que les enzymes TET ne fonctionnent pas uniquement de façon indépendante mais coopèrent aussi avec de nombreux partenaires de façon contextuelle. Globalement, la distribution de la 5hmC dans le génome est donc étroitement liée à l'expression des TETs mais aussi à leurs diverses interactions protéiques et leurs régulations post-traductionnelles qui ne seront pas développés dans cette thèse. Contrairement à la 5mC, le rôle de la 5hmC reste partiellement identifié. La question « est-elle une simple base intermédiaire à la déméthylation ou tient-elle un rôle physiologique à part entière ? » n'a pas encore été totalement répondue. Pour répondre à la question, des études ont mis en évidence la présence de 5hmC dans des régions transcriptionnellement actives du génomes, enhancers et corps de gènes (Mellén et al., 2012; Stroud et al., 2011). L'étude de Mellén et ses collaborateurs a aussi permis d'identifier MeCP2 comme la principale protéine de liaison au 5hmC dans le système nerveux. D'autres protéines de liaison à 5hmC, et y compris à 5fC, ont été mis en évidence, suggérant une véritable fonction de ces bases dans la régulation de la chromatine (Iurlaro et al., 2013). Enfin, de très récent travaux sur des modèles organoïdes de la maladie d'Alzheimer mettent en avant que la 5hmC est régulée de manière dynamique pendant le développement des organoïdes, et que la communication entre 5hmC et les marques d'histones pourrait affecter l'activité des enhancers. Une distribution anormale de la 5hmC serait susceptible de perturber l'établissement du réseau neuronal précoce (Kuehner et al., 2021)

### 3. Les modifications post-traductionnelles des histones

#### 3.1 Une affaire de nucléosome (inspiré de la revue Epigenomics)

Le nucléosome a été décrit pour la première fois en 1974 par Kornberg (Kornberg, 1974). Il correspond à une unité répétitive de la structure de la chromatine et est essentiel

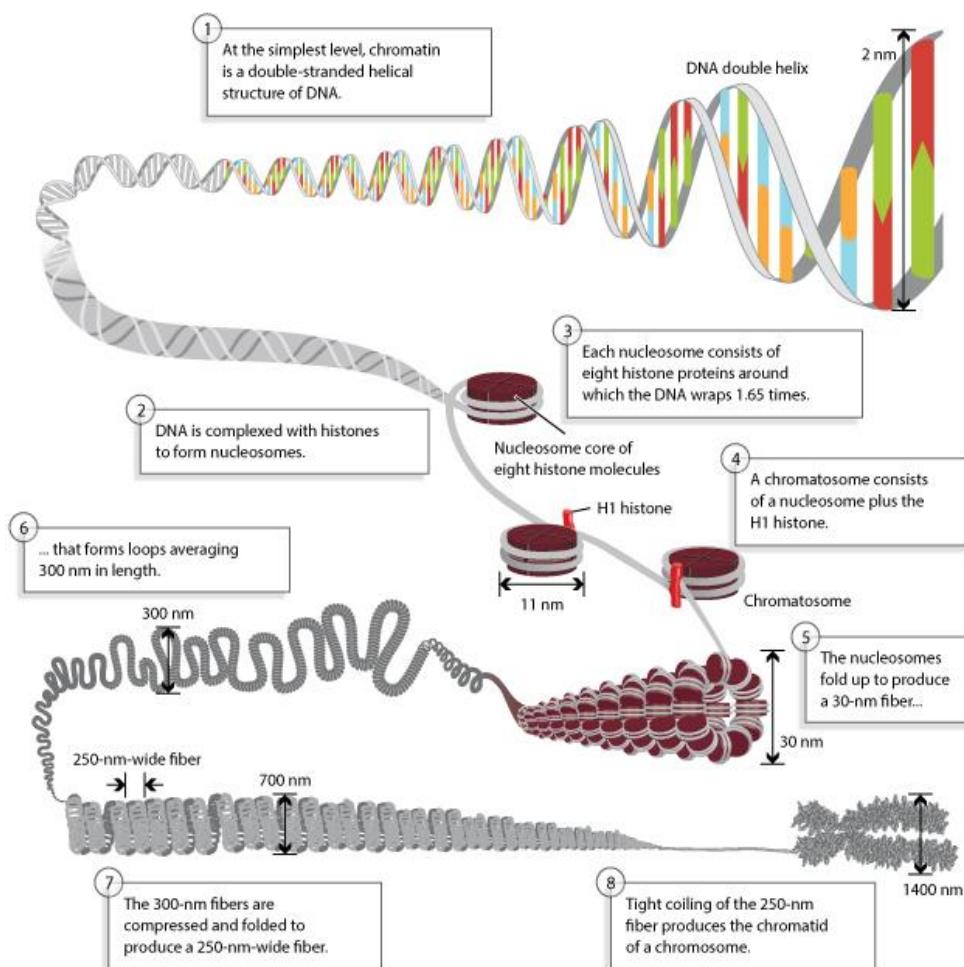
pour faciliter le compactage très serré de l'ADN en chromosome. Concrètement, l'ADN est enroulé autour des histones pour former des nucléosomes, premier niveau de compaction de l'ADN (Bednar et al., 1998). Le cœur du nucléosome est un octamère de huit protéines histones, avec 145 pb d'ADN enroulées autour (Luger et al., 1997). Cet octamère est composé de deux copies de chaque histone : H2A, H2B, H3 et H4 auxquelles s'ajoute l'histone H1 pour stabiliser l'ensemble, cette structure est appelée chromatosome (Simpson, 1978). Les histones sont de petites protéines basiques contenant un domaine globulaire et une queue N-terminale riche en résidus d'acides aminés basiques. Ces queues d'histone dépassent à l'extérieur du nucléosome assemblé et peuvent interagir avec les nucléosomes adjacents, des protéines de liaison ou des enzymes susceptibles de les modifier. Grâce à ces interactions, l'architecture en « collier de perles » atteint un niveau de compaction supplémentaire et l'ADN prend une structure 3D d'ordre supérieur pouvant s'intégrer dans le noyau (Figure 11).

Par ailleurs, les nucléosomes ne sont pas toujours positionnés (Struhl & Segal, 2013) ni distribués uniformément sur le génome, et cette répartition joue un rôle crucial dans la régulation des gènes (Bai & Morozov, 2010). En ce qui concerne leur distribution, la plupart de l'ADN génomique est occupé par des nucléosomes, mais certaines régions clés de la régulation de la transcription, comme les promoteurs et les enhancers, sont faiblement occupées, voire même transitoirement dépourvues de nucléosomes (Oruba et al., 2020). Les nucléosomes font ainsi partie des garants de la flexibilité de la chromatine grâce à leur dynamité. L'action de certaines ATPases dites de « remodelage » peuvent conduire au désassemblage/assemblage des nucléosomes, aux échanges de variants d'histones et au repositionnement des octamères (Becker & Workman, 2013). Les activités de

remodelage et de modifications post-traductionnelles d'histones sont étroitement liées pour régir localement et globalement l'accès à l'ADN.

### 3.2 Le code des histones

Les histones sont en proie à une variété de modifications post-traductionnelles capables d'influencer l'accessibilité de la chromatine directement ou indirectement, favorisant l'activation ou à la répression des gènes (Rothbart & Strahl, 2014). En raison de leur accessibilité, les acides aminés résidant dans les queues d'histones sont plus facilement soumis à des PTMs, bien que les domaines globulaires n'en soit pas dépourvus (Arnaudo & Garcia, 2013). Les PTMs désignent des réactions chimiques, les plus courantes

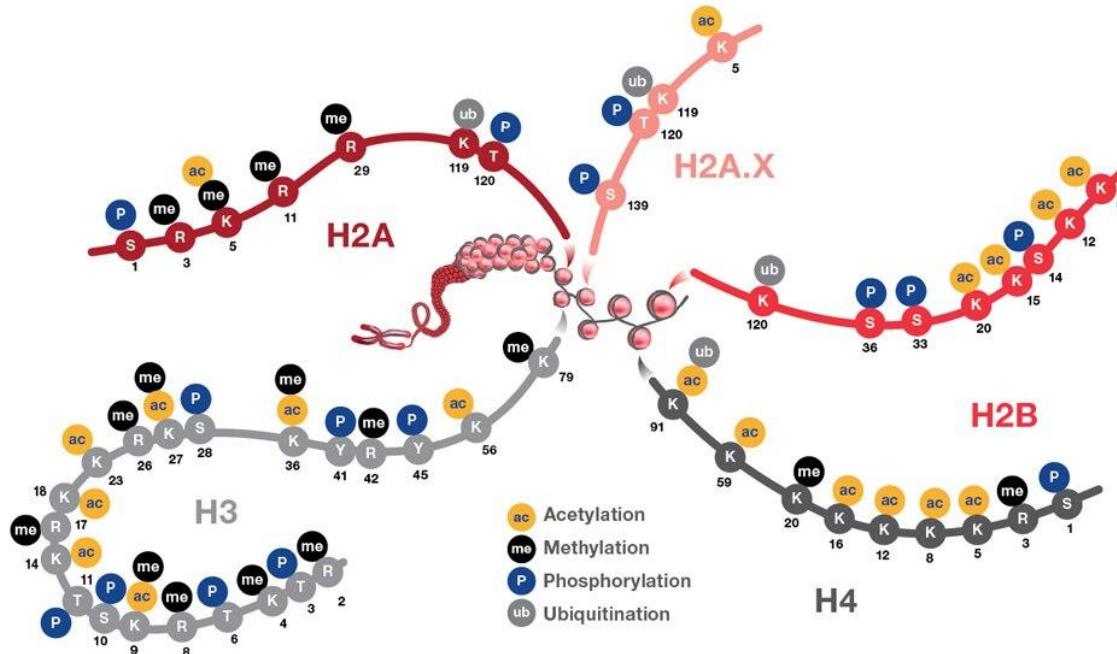


**Figure 11. Les différents niveaux de compaction de l'ADN**

De la double hélice au chromosome en passant par le « collier de perle », l'ADN subit différents niveaux de compaction, adapté de (Pierce, 2014).

étant l'acétylation (Ac), la méthylation (Me), la phosphorylation (P), l'ubiquitinylatation (Ub) et la sumoylation (Sumo) (Bannister & Kouzarides, 2011)(Figure 12). Les PTMs se produisent principalement sur la Lysine, mais également sur d'autre résidus (sérine, thréonine, tyrosine) ; ainsi qu'à plusieurs degrés (mono-, di-, tri-) sur un même acide aminé. À ce jour, plus d'une centaine de modifications distinctes ont été décrites (Zentner & Henikoff, 2013) et seules certaines d'entre elles ont une fonction bien définie aujourd'hui. C'est l'ensemble de ces marques d'histones et leurs effets combinés qui constituent le « code histone ». Les PTMs sont indispensables à de nombreux processus physiologiques tels que la différenciation cellulaire, la réparation de l'ADN (Huertas et al., 2009) et probablement d'autres mécanismes cellulaires restant à explorer, comme le maintien de la chromatine télomérique et subtélomérique (Jezek & Green, 2019).

Les marques d'histones sont déposées par une catégorie de protéines appelées éditeurs. Il est important de comprendre que les modifications d'histones et celles de l'ADN sont intimement liées. Le profil de méthylation de l'ADN sous-jacent fonctionne comme une plateforme de recrutement de protéines, les effecteurs, reconnaissant le code des histones et capables d'entraîner des effets en aval tel que la mobilisation d'autres complexes de remodelage de la chromatine (Z. Zhang et al., 2011). Enfin, les PTMs ne sont pas irréversibles et peuvent être supprimées par des effaceurs (Allis et al., 2015). Finalement, éditeurs, effecteurs et effaceurs sont considérés comme de véritables modulateurs de la transcription car recrutables par de nombreux complexes multiprotéiques, y compris par des facteurs de transcription sur les sites actifs.



**Figure 12. Principaux sites de modifications post-traductionnelles des histones**

Les PTMs les plus couramment retrouvées sur les histones H2A, H2B, H2A.X, H3 et H4. La méthylation, l'acétylation, la phosphorylation et l'ubiquitination jouent des rôles cruciaux dans la régulation des fonctions chromatiniennes (Thermo Fischer Scientific).

### 3.3 L'acétylation des histones

L'acétylation est la modification d'histones la mieux décrite par la littérature (Gräff & Tsai, 2013). Rien d'étonnant puisque de tous les éditeurs de PTMs, les enzymes responsables de l'acétylation furent les premières mises en évidence (Brownell et al., 1996; Kleff et al., 1995). Ces enzymes sont appelées histones acétyltransférases (HAT) ou parfois, plus spécifiquement, lysine acétyltransférases (KAT). Elles transfèrent le groupe acétyle du cofacteur acétyl-CoA (acétyl-coenzyme A) sur le groupe amine d'une chaîne latérale de lysine (Pietrocola et al., 2015). La grande famille des HAT est constituée de sous-familles, notamment HAT1, Gcn5 / PCAF, MYST, p300 / CBP et Rtt109, qui divergent par leurs différences de séquence dans leur domaines catalytiques. Elles utilisent aussi des

stratégies catalytiques différentes pour le transfert du groupe acétyle (Berndsen et al., 2007; X. Zhang et al., 2014).

Ces marques d'acétylation sur les résidus de lysine sont lues par une multitude de protéines grâce à leur bromodomaine (BrD). Ces domaines très conservés se retrouvent dans de nombreuses protéines associées à la chromatine, y compris certaines HAT elles-mêmes ainsi que des protéines de remodelage. Récemment, la liste des lecteurs d'acétylation d'histone s'est allongée avec la découverte de cette capacité chez des protéines porteuses de domaines à double doigt PHD (DPF) (Klein et al., 2017; L. Zeng et al., 2010). Par opposition aux HATs, l'élimination de ces groupements font intervenir les enzymes HDAC (Histone Desacetylase). Les HDAC sont au nombre de 18 chez l'homme, et utilisent des mécanismes dépendants du zinc ou du NAD<sup>+</sup> pour désacétyler leurs substrats. Elles se divisent en 4 sous-familles : les protéines Rpd3-like, les protéines Hdac1-like, les protéines Sir2-like et HDAC11 (Seto & Yoshida, 2014).

L'acétylation peut se produire sur de nombreuses lysines de queue d'histone (voir schéma) parmi lesquelles les acétylations des histones H3 et H4 sont les plus fréquentes et les mieux caractérisées (Kouzarides, 2007). Globalement, l'acétylation favorise une structure de la chromatine plus permissive à la transcription génique par effet direct sur l'architecture nucléosomique (Sims et al., 2004) en affaiblissant les interactions histone-histone et histone-ADN (Tessarz & Kouzarides, 2014). Les régions transcriptionnellement compétentes comme les promoteurs et les enhancers sont donc souvent retrouvées enrichies en histones hyperacétylées (Guillemette et al., 2011; Z. Wang et al., 2008). A titre d'exemple, les cellules souches embryonnaires subissent une vague d'acétylation globale quand débute le processus de différenciation, caractérisée par une transcription extrêmement active (Meshorer & Misteli, 2006). A l'inverse, l'acétylation de l'histone H4 est absente du chromosome X inactif chez les femelles (Jeppesen & Turner, 1993).

Classiquement, les promoteurs sont associés à la présence concomitante de H3K9ac et H3K14ac (Guenther et al., 2007; Karmodiya et al., 2012). Les enhancers quant à eux se démarquent par un enrichissement en histones acétylées sur la Lysine 27 (H3K27ac) (Heintzman et al., 2007).

### 3.4 La méthylation des histones

La méthylation des histones opère essentiellement sur les chaînes latérales des lysines et des arginines. Contrairement à l'acétylation, la méthylation des histones ne modifie pas la charge de la protéine histone. En effet, la méthylation agit de façon indirecte en influençant le recrutement de protéines qui procèdent à un remodelage de la chromatine. En revanche, il existe trois états de méthylation des lysines : mono-, di- ou tri-méthylées ; et deux des arginines : mono- ou di-méthylées, ce qui n'est pas le cas des lysines acétylées.

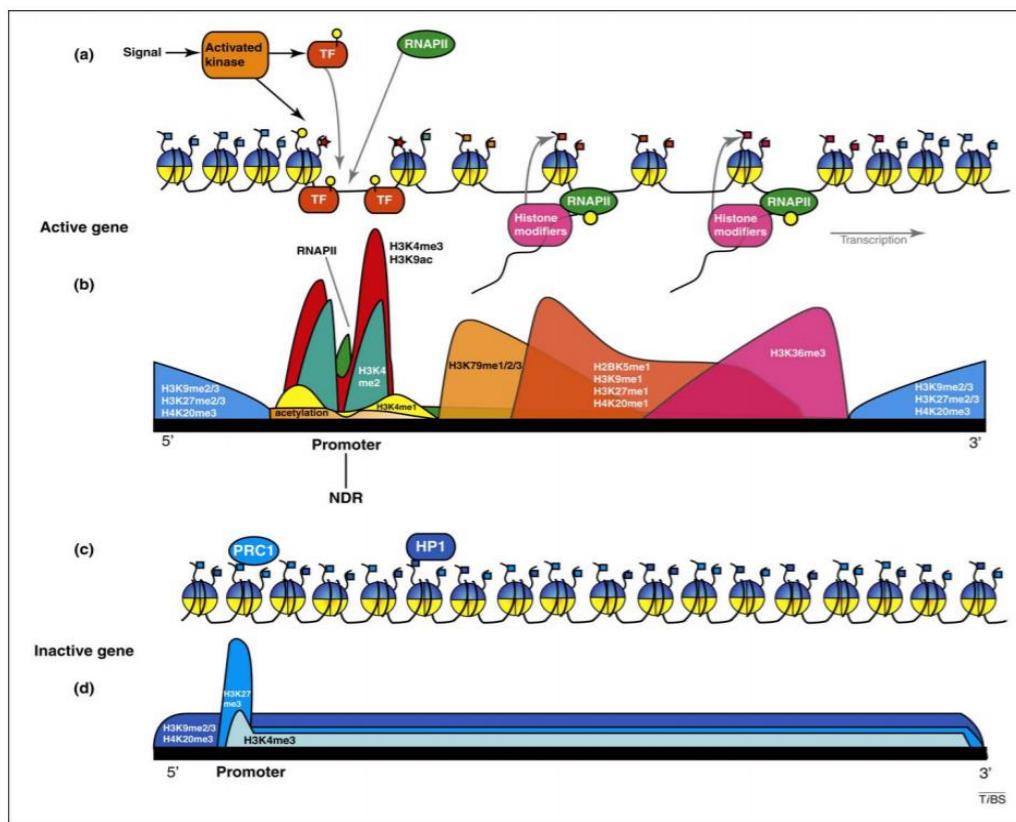
Attardons-nous sur la méthylation des lysines. Les histones lysines méthyltransférases (HKMT) sont les éditeurs des marques de méthylation et sont toutes pourvues d'un domaine catalytique SET (Su(var)3-9, Enhancer of Zeste, and Trithorax). L'exception qui confirme la règle est Dot1, aussi connu sous le nom de KMT4, une HKMT ciblant plutôt le domaine globulaire des histones et ne possédant pas de domaine SET (Q. Feng et al., 2002). Tout comme leurs cousines responsables de la méthylation de l'ADN, les HKMT catalysent le transfert d'un groupe méthyle du cofacteur SAM vers le groupe amine d'une lysine (Dillon et al., 2005). Il existe plus d'une trentaine de KMT chez l'homme (Black et al., 2012) avec des degrés élevés de spécificité enzymatique pour certains résidus de lysine et degrés de méthylation.

Les protéines susceptibles de lire les lysines méthylées sont dotées de motifs de liaison comme les domaines PHD, chromo, tudor, PWWP, WD40, BAH, ADD, répétition d'ankyrine, MBT et zn-CW, et sont également en capacité de discriminer les méthyl-lysines en fonction de leur statut de méthylation (Hyun et al., 2017).

Ces modifications sont effacées par les histones lysines déméthylases (KDM), on en dénombre pour l'instant une vingtaine chez l'homme. Ces enzymes peuvent posséder un domaine Jumonji C (JmjC) leur permettant d'oxyder les groupements méthyle. Cette catégorie est dépendante de l'a-cétoglutarate, de l'oxygène et du Fe (II) comme cofacteurs (Z. Chen et al., 2006). Ou alors, elles sont pourvues d'un domaine amine oxydase dépendant de la flavine adénine dinucléotide (FAD) (Y. Shi et al., 2004). Les KDM sont également sensibles aux statuts de méthylation de leurs cibles.

La méthylation est principalement connue pour réguler négativement l'expression génique en recrutant des inhibiteurs transcriptionnels (Strahl & Allis, 2000). Mais contrairement à d'autres modifications d'histones ayant un effet binaire sur l'état transcriptionnel chromatinien, le statut de méthylation des lysines (mono, bi, tri) ajoute un niveau de complexité.

Les méthylations H3K9, H3K27 et H4K20 sont communément associées à des états répressifs. Les tri-méthylation de H3K9 et H4K20 sont impliquées dans la compaction de régions répétées et de ce fait sont très enrichies dans l'hétérochromatine constitutive (Kidder et al., 2017; Nicetto & Zaret, 2019)(Figure 13). Il a d'ailleurs été démontré que H3K9me3 interagit indirectement avec DNMT1, permettant ainsi le maintien de la méthylation de l'ADN dans ces régions (Rothbart et al., 2012). Les méthylations de H3K27 marquent quant à elle l'hétérochromatine facultative et permettent le maintien de la répression transcriptionnelle au début du développement embryonnaire (Wiles & Selker, 2017). H3K27me3 peut aussi être associée aux enhancers inactifs et aux silencers (Cai et al., 2021).



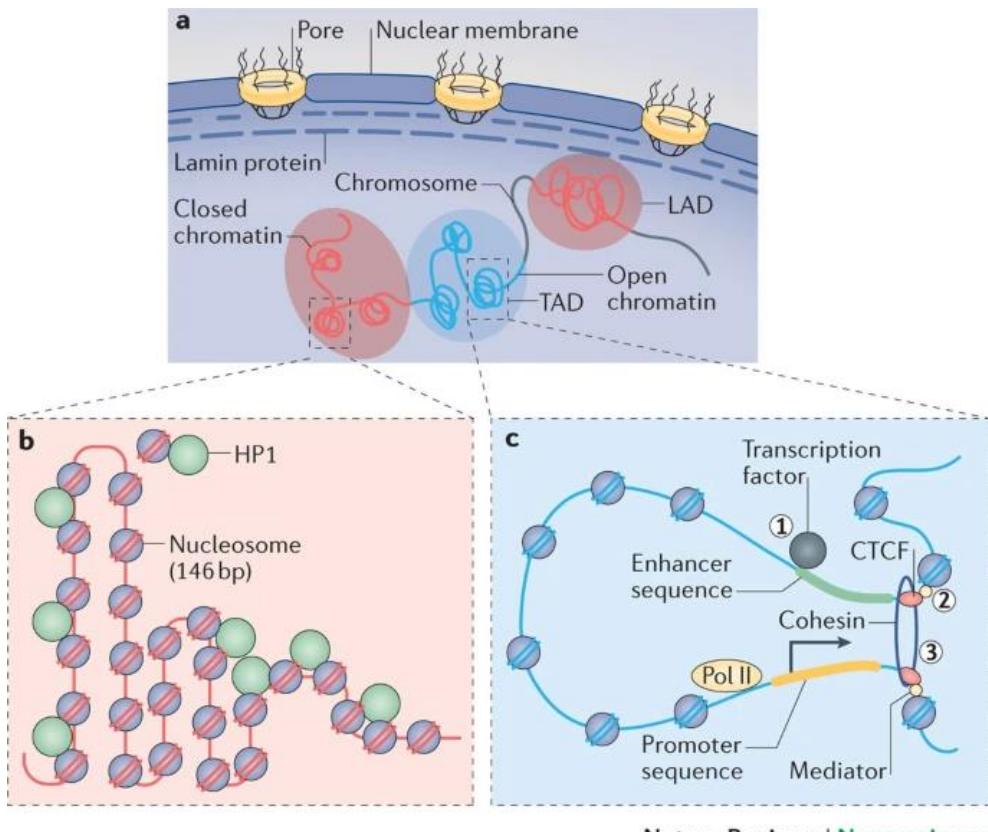
**Figure 13. Distribution des modifications d'histones sur les gènes actifs et silencieux**

Les distributions de PTMs d'histones diffèrent selon qu'il s'agit de gènes activement transcrits ou de gènes silencieux (b et d), les complexes protéiques recrutés par les nucléosomes de l'euchromatine et de l'hétérochromatine diffèrent également (b et d). Abréviations utilisées : TF – facteur de transcription, RNAPII – ARN polymérase II (Barth et Imhof, 2010).

A contrario, les méthylations H3K4, H3K36 et H3K79 sont considérées comme marquant la chromatine permissive (Figure 13). La di et la tri-méthylation de la Lysine 36 de l'histone H3 (H3K36me2/3) sont retrouvées sur le corps des gènes actifs. Il s'avère que la distribution des H3K36 méthylés colocalise avec l'ARN pol II. En effet, les KMT responsables de ces marques interagissent avec le complexe d'elongation (B. Li et al., 2007). Les enhancers actifs des cellules de mammifères sont identifiables par la présence de l'histone H3 mono-méthylé sur sa lysine 4 (H3K4me1) (Local et al., 2018) alors que des niveaux élevés de tri-méthylation (H3K4me3) marquent essentiellement les promoteurs actifs (Sharifi-Zarchi et al., 2017).

#### 4. Architecture 3D du génome

Comme décrit précédemment, l'ADN humain est orné de modifications épigénétiques diverses et variées qui régulent, *a priori*, le génome humain de façon linéaire. En réalité, la compaction de la chromatine au sein du noyau n'est pas seulement un gain de place mais une véritable architecture 3D favorisant le contournement de la régulation linéaire de l'expression des gènes. Comme évoqué plus haut, la chromatine est retrouvée sous deux états : décondensée, on parle alors d'euchromatine ; et condensée, c'est l'hétérochromatine (Huiszinga et al., 2006). On distingue ces deux états par leur densité en nucléosome, les PTMs qui s'y trouvent et la présence ou l'absence de protéines régulatrices de la transcription. D'un point de vue linéaire, la transcription se produit sur une séquence d'euchromatine, grâce à un complexe de transcription démarrant d'un point A en direction d'un point B sur un gène donné. Alors que d'un point de vue tridimensionnel, les chromosomes se regroupent en territoires au sein desquels existent des milliers d'interactions réunissant des régions éloignées. Premièrement, les régions euchromatinien et hétérochromatinien sont rassemblés en compartiments, que l'on nomme A et B respectivement. Au sein de ces compartiments on retrouve des TADs (topological-associated domains), qui sont des secteurs génomiques enrichis en contact ADN-ADN (Dixon et al., 2012) (Figure 14). La taille des TADs est variable mais avoisine généralement 100 kilobases. Les bordures de TADs sont très souvent fournies en protéines CTCF (CCCTC-binding factor) et en cohésines (J. Yang & Corces, 2011), mais peuvent aussi être composées uniquement de séquences répétées (Bonev et al., 2017)(Figure 14). L'organisation 3D du génome inclue aussi des LADs (lamina-associated domains), des régions d'hétérochromatines retrouvées à la périphérie du noyau et en contact avec la membrane nucléaire (N. Briand & Collas, 2020)(Figure 14).



Nature Reviews | Neuroscience

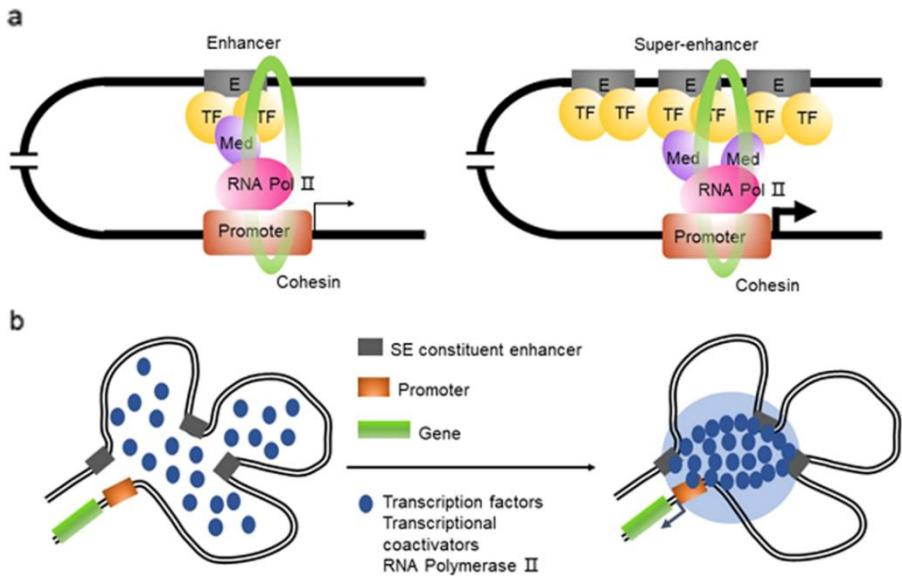
Figure 14. Le génome en 3D

Dans les "compartiments A" (en bleu), la chromatine est dans une conformation ouverte, ou active, et permet la transcription. Dans les "compartiments B" (rouge), la chromatine est condensée. Les domaines topologiques associés (TAD) peuvent exister dans les compartiments A et B. L'organisation 3D du génome comprend également des domaines associés à la lamina (LAD). Les TADs sont délimités par la formation de boucles chromosomiques, qui incluent les boucles promoteur-enhancers, facilitées par la protéine CTCF, les cohésines et d'autres protéines qui servent à réguler la conformation 3D du génome (Rajarajan et al., 2016)

Ces dernières années, l'intérêt porté aux contacts chromatiniens s'est fait grandissant. Ils sont mesurés principalement par deux approches : les techniques basées sur la capture de conformation chromosomique (3C) (Han et al., 2018) et les méthodes d'imagerie nucléaire telles que la fluorescence par hybridation *in situ* (Abbas et al., 2019). Globalement, la formation de contacts est favorisée par des protéines se fixant à la chromatine qui peuvent se lier simultanément à deux ou plusieurs régions génomiques. Les boucles promoteurs-enhancer sont de loin les interactions chromatiniennes les plus

étudiées. Les promoteurs comme les enhancers sont des séquences cis-régulatrices. Classiquement, le promoteur inclut le core promoteur, responsable d'un niveau de transcription basal (Juven-Gershon & Kadonaga, 2010), et le promoteur proximal, le tout contenu dans une région de 1000 paires de bases en amont du TSS (Transcription starting site). Les enhancers quant à eux sont positionnés au minimum au-delà de 1000 paires de bases du TSS le plus proche (Vernimmen & Bickmore, 2015) et peuvent être éloignés de plusieurs dizaines de milliers de bases du core promoteur (Lettice et al., 2003). Ces derniers sont responsables de la régulation distale de la transcription, rendue possible par la formation de boucle rapprochant les régions cis-régulatrices. Il semblerait néanmoins que certains enhancer puissent agir sans contact avec les promoteurs (Schoenfelder & Fraser, 2019). Encore aujourd'hui, peu d'informations sont disponibles sur ces contacts promoteur-enhancer (P-E) mais ils sont indéniablement responsables de la régulation de la transcription. Certaines études ont permis de constater que les contacts P-E sont interrompus lorsque les gènes sont réprimés (Bonev et al., 2017). Certains enhancers rejoignent plusieurs promoteurs, et inversement certains promoteurs sont régulés par plusieurs enhancers. Pour avoir un ordre d'idée, une étude basée sur l'atlas d'expression FANTOM5CAGE englobant 432 cellules primaires, 135 tissus et 241 lignées cellulaires a identifié 43011 enhancers potentiels, certains ubiquitaires et d'autres spécifiques du type cellulaire (Andersson et al., 2014).

Les enhancers fonctionnent comme des plates-formes de recrutement de facteurs de transcription. Les facteurs de transcription peuvent eux même employer des coactivateurs, tels que les complexes Mediator (MED), la protéine CBP et p300. Les MED ont pour rôle de faciliter l'enrôlement des cohésines pour former la structure en anneaux autour des boucles P-E (Kagey et al., 2010) (Figure 15).



**Figure 15. Illustration schématique des boucles promoteurs-enhancers**

Les enhancers et les super-enhancers sont occupés par une forte densité de régulateurs transcriptionnels. Les complexes Mediator ont pour rôle de faciliter l'enrôlement des cohésines pour former la structure en anneaux autour des boucles. Abréviations utilisées : TF – facteur de transcription, Med – complexe Mediator, E – enhancer, SE – super-enhancer, RNA pol II – ARN polymérase II (Q. Jia et al., 2020).

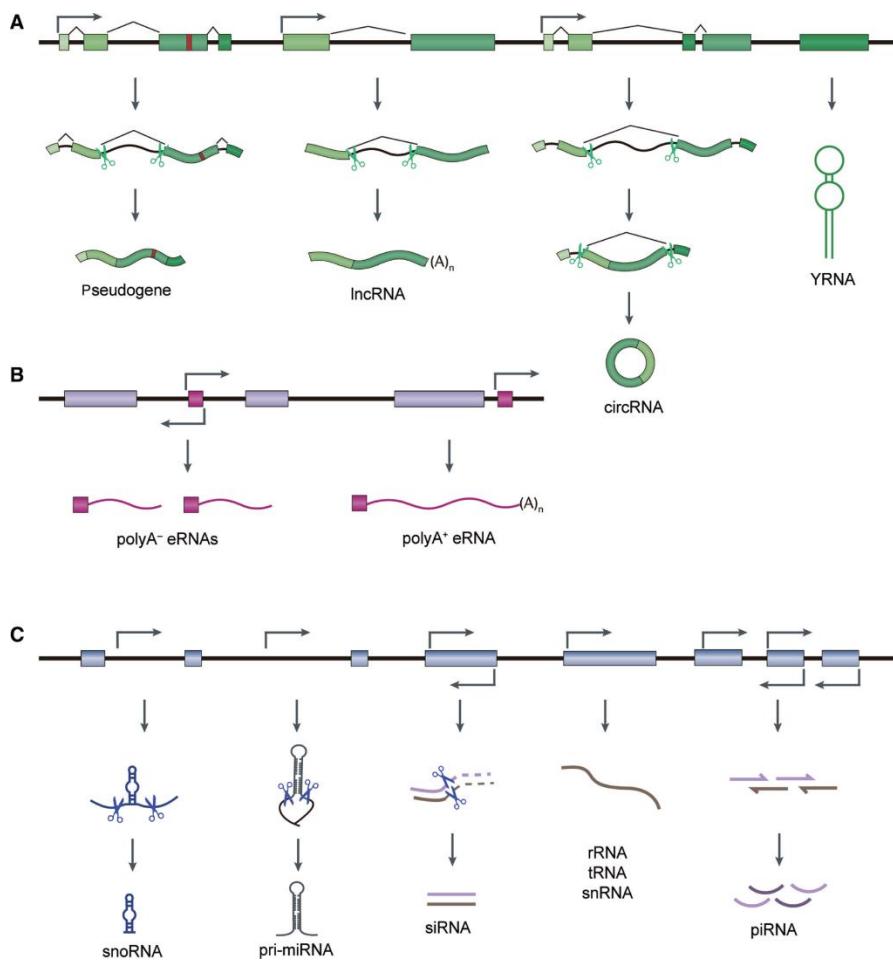
La présence et la mise en place des régions enhancer est intimement lié aux dynamiques des PTMs d'histones et de méthylation de la chromatine (Calo & Wysocka, 2013; Luo & Lin, 2016). Les enhancers actifs sont traditionnellement discriminés par un ratio H3K4me1/H3K4me3 élevé et un niveau de H3K27ac accru, même si certaines revues très récentes prônent la déconstruction de ce modèle (Andersson & Sandelin, 2020). En 2013, une équipe a fait la découverte des « super-enhancers » (SE) (Chapuy et al., 2013). Bien que leur définition et leur rôle soient encore mal décrits et controversés, les SE sont pour l'heure considérés comme de grands groupes d'éléments régulateurs ( $> 20$  kb en moyenne) exceptionnellement fournis en coactivateurs transcriptionnels (p300, BRD4) (Pott & Lieb, 2015) (Figure 15). Les SE ont été montrés comme sensibles aux dérégulations épigénétiques, aux altérations spatiales et aux polymorphismes nucléotidiques et pourraient participer activement à l'apparition des cancers et autres maladies complexes (Y. Jia et al., 2019; Niederriter et al., 2015)

## 5. Les ARNs non codants

### 5.1 Généralités

Dans les années 1960, rapidement après la découverte des ARN messagers (ARNm), intermédiaires purs de l'information génétique, la dissection progressive de la machinerie traductionnelle a permis la découverte des ARN de transfert (ARNr) et des ARN ribosomiques (ARNr) (Crick, 1958; Hoagland et al., 1958; Holley et al., 1965). Probablement pour des raisons technologiques, les chercheurs ont mis de nombreuses années à reconsidérer le dogme selon lequel l'ARN ne peut être que messager, de transfert ou ribosomique. Autrement dit, pendant plusieurs années, ce qui n'était pas un ARNr ou un ARNr était par défaut, classé comme ARNm. Dans les années 80, la partie immergée de l'iceberg fit surface avec la découverte de petits ARNs ayant des activités de régulation. La première publication du séquençage du génome humain en 2001 révélant que seulement 1,2% du génome code pour des protéinesachevait la mise en lumière du génome non codant (Lander et al., 2001).

Depuis, des études ont mis en évidence une multitude d'ARNs non codants (ncARNs), séparés en deux grandes classes, répartis en fonction de leur longueur : les petits ARN non codants inférieurs à 200 nucléotides et les longs ARN non codants (lncARNs) supérieurs à 200 nucléotides (Cech & Steitz, 2014) (Figure 16). Au sein de ces deux familles, les ncARNs se distinguent principalement en fonction de leur biogenèse et de leur type de cible. A ces familles d'ARN non codants linéaires s'ajoutent des ncARNs circulaires, plus stables mais moins exprimés, leurs fonctions sont encore mal décrites (Shang et al., 2019). Ce qui unit tous ces ncARNs ce sont leurs fonctions régulatrices, suffisamment diverses pour affecter tous les mécanismes moléculaires : architecture nucléaire, transcription, stabilité des transcrits, traduction et même activité protéique (Hombach & Kretz, 2016). Seuls les microARNs (miRs) seront introduits dans ce manuscrit.



**Figure 16. Les différents types d'ARNs non codants transcrits à partir du génome humain**

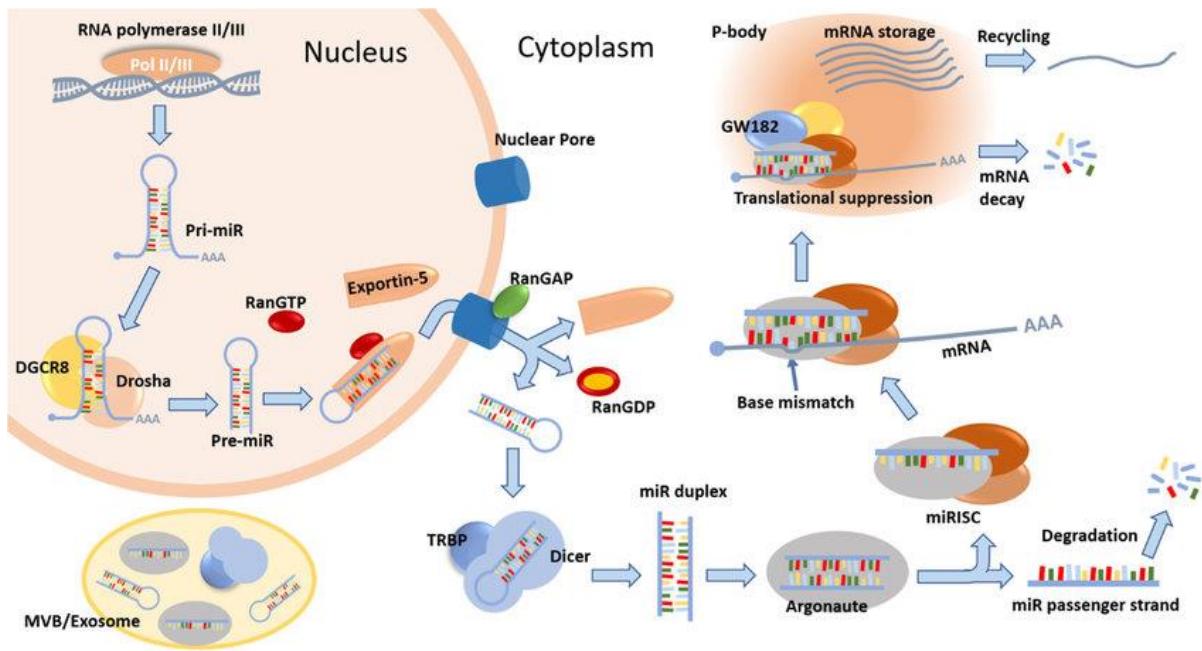
- (A) Les exons des gènes codants pour des protéines peuvent être transcrits en pseudogènes, lncARN et circARN
- (B) Les régions enhancers peuvent être transcrites en eARN. (C) Les séquences introniques ou intergéniques peuvent donner lieu aux snoARNs, miARNs et piARNs. Les transposons peuvent être transcrits en siRNA. Les ARNr, les ARNt ou les snARN sont transcrits à partir de gènes spécifiques (P. Zhang, Wu, et al., 2019)

## 5.2 Les microARNs

Les miRs sont la deuxième classe d'ARNs non codants régulateurs la plus répandue, avec environ 2000 miRs annotés, mais la classe la plus étudiée par la communauté scientifique (Seal et al., 2020). Les miRs ont été découverts pour la première fois chez *C. elegans* par Lee RC et ses collègues en 1993 (R. C. Lee et al., 1993). Ce sont des ARNs endogènes d'une longueur comprise entre 21 et 24 nucléotides. Ils jouent un rôle majeur dans l'interférence ARN par appariement partiel ou complet avec les bases de leurs

ARNm cibles et sont des régulateurs clés de nombreux processus physiologiques et pathologiques. Ils s'hybrident principalement dans les régions 3'UTR de leurs cibles, ce qui conduit à une répression traductionnelle ou à une dégradation de l'ARNm (Carthew & Sontheimer, 2009).

À quelques exceptions près, la transcription des miRs est réalisée par l'ARN pol II (DeRoetth, 1969) et est régulée par divers facteurs de transcription ainsi que des cofacteurs épigénétiques modifiant l'ADN et les histones au niveau des promoteurs de miRs (Z. Wang et al., 2013). Les miRs sont transcrits sous forme de longs miARNs primaires contenant des structures en épingles à cheveux (pri-miR), flanqués d'une 7-méthyl-guanosine en 5' et d'une queue poly-A. Ils subissent ensuite un traitement post-transcriptionnel en plusieurs étapes. Ils sont d'abord morcelés par le complexe microprocesseur (DROSHA et DGCR8) en de petits fragments en forme d'épingle à cheveux appelés précurseurs-miRs (pre-miRs). Ceux-ci sont ensuite exportés vers le cytoplasme par l'exportine 5 à travers les pores nucléaires (H. Wu et al., 2000; Yi et al., 2003). Les pre-miRs rencontrent la protéine DICER et ses cofacteurs dans le cytoplasme qui coupent leurs boucles et libèrent les produits finaux : des ARNs double brin de 21 à 24 nucléotides (Bernstein et al., 2001). Le complexe de silencing induit par les pre-miRs (pre-RISC) contenant la protéine AGO est maintenant capable d'ancrer le miR mature sur sa cible d'ARNm. L'un des brins du miR est dégradé tandis que l'autre sert de guide pour la protéine AGO dans le complexe RISC mature. Tout au long de ce processus, les protéines de maturation des miRs sont soumises à des modifications post-traductionnelles (acétylation, phosphorylation, etc.) essentielles au contrôle rigoureux de leur localisation, leur activité et leur affinité (Krol et al., 2010).



**Figure 17. Illustration de la biogénèse et du mode d'action canonique des miRs**

Les miRs sont transcrits par des ARN polymérasées pour produire des pri-miRs, qui sont ensuite transformés par le complexe microprocesseur (composé au minimum de Drosha et de DGCR8) en miRs précurseurs (pre-miR). Ces pré-miRs sont pris en charge par l'exportin-5 et transportés vers le cytoplasme. Les pré-miRs sont maturés par l'endoribonucléase Dicer en duplex de miR qui sont ensuite incorporés dans les protéines Argonaute (AGO). Les protéines Argonaute (AGO1-4 chez l'homme), ainsi que le miR monocaténaire mature, et plusieurs autres protéines, forment le miRISC, au sein duquel l'ARNm cible se lie au miR (Zhao et al., 2019)

### 5.3 Mécanismes d'action des miRs

Si certaines études ont révélé des modes de liaison non canoniques (Helwak et al., 2013), dans la majorité des cas les interactions entre les miRs et leur cible sont médiées par la région « seed », un fragment de 6 à 8 nucléotides de long à l'extrémité 5'- du micro ARN complémentaire du brin ciblé (Baek et al., 2008; Bartel, 2009). Le miR se positionne principalement en 3'UTR de sa cible mais un petit nombre modulent l'expression en ciblant les régions 5'UTR et / ou codante de certains ARNm (I. Lee et al., 2009). A noter qu'un seul

et même miR est capable de cibler plusieurs gènes (Goljanek-Whysall et al., 2012; Subramanyam et al., 2011).

Il semble que plusieurs éléments influencent le résultat biologique de l'interaction miARN-ARNm. Le facteur le plus mentionné est la complémentarité des bases entre la région seed et l'ARN messager (X. Wang, 2014). Selon la littérature les miARNs provoquent une répression traductionnelle en cas de complémentarité imparfaite, ou une dégradation de l'ARNm cible en cas de complémentarité parfaite. Les conséquences de l'hybridation peuvent aussi varier en fonction de la position et de l'accessibilité de la séquence cible ou bien du nombre de sites cibles pour un même miR. A ce jour, les mécanismes d'action des miRs ne sont pas bien décrits, plusieurs modèles ont été proposés, ne s'excluant pas mutuellement, ce qui laisse à penser qu'ils peuvent co-exister (Valinezhad Orang et al., 2014). D'après plusieurs études l'extinction médiée par les miRs peut se produire avant, pendant et après la traduction. Parmi les modèles proposés on retrouve, de façon non exhaustive, le recrutement par les miRs d'enzymes de dégradation (déadénylase, exo et endonucléase) (Nishihara et al., 2013; L. Wu et al., 2006), l'interférence avec les sous-unités du ribosome pour éviter sa jonction ou favoriser sa dissociation, ou encore la séquestration et le stockage pour une dégradation ultérieure (Y. Zhang et al., 2017). Si pendant longtemps les miRs ont été considérés exclusivement comme des inhibiteurs de la traduction, ce n'est plus le cas aujourd'hui. Plusieurs observations indiquent que les miARN sont à double tranchant et oscillent entre la répression et la stimulation de la traduction en réponse à des conditions moléculaires spécifiques (Buchan & Parker, 2007; Vasudevan et al., 2007).

Au-delà de leur rôle dans la régulation de l'expression génique, les miARNs pourraient fonctionner comme ligand pour activer certaines voies de signalisation, notamment les récepteurs Toll-like (Fabbri et al., 2012). Une étude de 2015 a aussi démontré l'interférence de miRs avec la protéine DNMT1. La liaison des miRs avec la protéine, plus

particulièrement le miR-155-5p, entraîne l'inhibition de son activité enzymatique et par conséquent des anomalies de méthylation (G. Zhang et al., 2015).

Les miRs sont donc des acteurs majeurs de la régulation des mécanismes intracellulaires, dont les fonctions ne sont, *a priori*, pas toutes décrites. Comme évoqué dans la partie précédente, les voies de régulation de la biogenèse des miRs assurent un macrocontrôle indispensable à l'équilibre transcriptomique physiologique (Slezak-Prochazka et al., 2010). La méthylation/déméthylation de l'ADN peut aussi diriger la transcription des miRs (Glaich et al., 2019; Ramalho-Carvalho et al., 2017). Mais même une fois transcrits, les microARNs peuvent être sujets à des modifications chimiques de leur bases pendant ou après leur biogenèse. Ces modifications épitranscriptomiques, N6-Methyl-Adenosine (m6A), 5-Methylcytosine, N7-Methylguanosine (m7G), sont encore peu étudiées mais semblent avoir un impact sur l'activité des miRs (Cheray et al., 2020; EPITRANSCRIPTOMICS., 2021; Pandolfini et al., 2019; Si et al., 2020) et peuvent participer à la survenue de pathologies comme le cancer (De Paolis et al., 2021). A l'inverse, le statut épitranscriptomique des ARNm cibles peut aussi influencer le fonctionnement des miRs (J. Cheng et al., 2020).

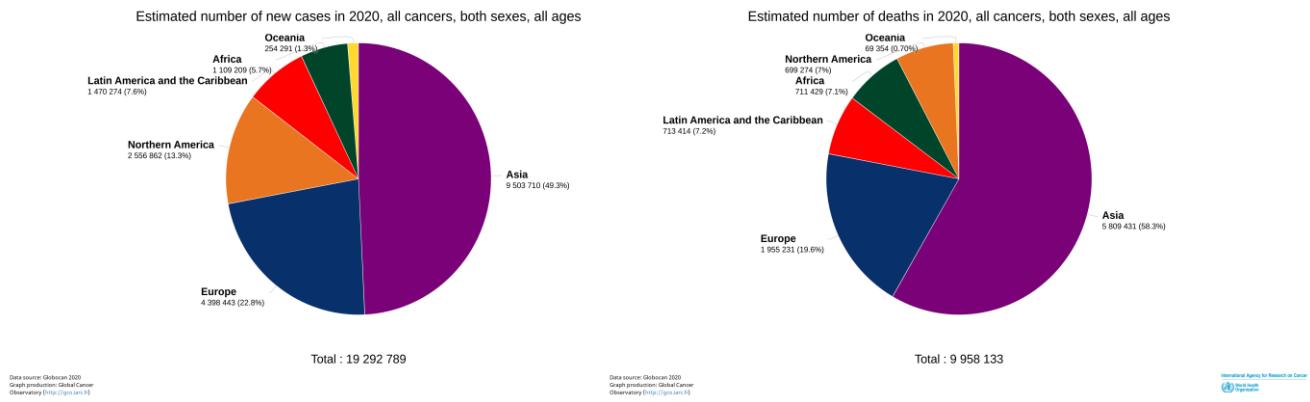
## Chapitre 2 : Epimutations et cancers : une relation toxique

### 1. Le cancer

#### 1.1 Tous concernés

Le cancer est la deuxième cause de décès dans le monde (Ferlay et al., 2018): il était à l'origine de près de 10 millions de décès en 2020 (Figure 18). En France, le cancer est depuis de nombreuses années maintenant, la première cause de mortalité prématurée devant les maladies cardiovasculaires. On estime que 3,8 millions de personnes vivent en France aujourd'hui avec un diagnostic de cancer (*Le cancer en chiffres | Fondation ARC pour la recherche sur le cancer, s. d.*). Le Centre international de recherche sur le cancer

(CIRC) estime que dans le monde, 1 personne sur 5 développera un cancer au cours de sa vie et parmi eux, un homme sur 8 et une femme sur 11 en mourront. De ce fait, cette maladie nous concerne tous, directement, ou indirectement par le biais notre entourage.



**Figure 18. Le cancer dans le monde en 2020**

A gauche, nombre estimé de nouveaux cas de cancers en 2020 selon les régions du monde. A droite, nombré estimé de morts par cancer en 2020 selon les régions du monde. Les données incluses tous les cancers et toute la population sans distinction de sexe et d'âge (GLOBOCAN 2020. Graph IARC, WHO).

Une partie des décès par cancer est imputable à des facteurs de risques majeurs comme le tabagisme (Jacob et al., 2018), un indice de masse corporelle élevé (De Pergola & Silvestris, 2013), une forte consommation d'alcool (Bagnardi et al., 2015) ou encore la pollution de air (Turner et al., 2020). Des infections à la fois virales par l'hépatite et le papillomavirus humain et bactérienne par Helicobacter pylori sont aussi à l'origine de cancers (de Oliveria Andrade et al., 2009; Padda et al., 2021; zur Hausen, 2002). Mais rappelons que le facteur de risque le plus important dans l'apparition des cancers dans leur ensemble est le vieillissement, et si nous ne fumons pas tous, nous vieillissons tous.

Pour plusieurs raisons, y compris l'exposition aux facteurs de risques et l'accès aux soins, la mortalité attribuable au cancer dans le monde n'est pas homogène, 70 % des décès par cancer surviennent dans les pays à revenus faibles ou intermédiaires. C'est aussi dans ces

pays que, d'après les estimations de l'organisation mondiale de la santé (OMS), la plus grosse augmentation de l'incidence des cancers d'ici 2040 pourrait avoir lieu.

Les répercussions psychologiques et économiques du cancer à l'échelle mondiale sont considérables. En dépit de l'amélioration et de la démocratisation des campagnes de dépistages au fil des années, la pandémie fit de l'année 2020 une année sombre avec un recul de 23% des diagnostics rien qu'en France. Sans compter les traitements qui se sont vus repoussés.

En parallèle, même s'il existe une disparité entre cancers dits de bon et de mauvais pronostic, le taux de mortalité est en constante diminution depuis 25 ans (Siegel et al., 2021). Grâce aux chercheurs et aux cliniciens du monde entier, la prise en charge des cancers a fait l'objet de progrès majeurs, à la fois pour sa prévention, son diagnostic, son traitement et la prise en charge des rechutes. Parmi les succès de la recherche émergente ces 10 derniers années on retrouve notamment : l'immunothérapie, la généralisation de la médecine de précision, le développement et l'utilisation des biopsies liquides et l'avènement du « machine learning ».

## 1.2 Les fondements de l'oncogenèse

Dans le Larousse, le cancer est défini comme la maladie qui résulte d'un « Ensemble de cellules indifférenciées qui, échappant au contrôle de l'organisme, se multiplient indéfiniment, envahissent les tissus voisins en les détruisant, et se répandent dans l'organisme en métastases ». Autrement dit, le cancer est une tumeur maligne, pouvant atteindre toutes les parties du corps :

- Les carcinomes prennent naissance dans la peau ou dans les tissus tapissant/recouvrant les organes internes.
- Les sarcomes atteignent les os, le cartilage, la graisse, les muscles, les vaisseaux sanguins ou tout autre tissu conjonctif ou de soutien.

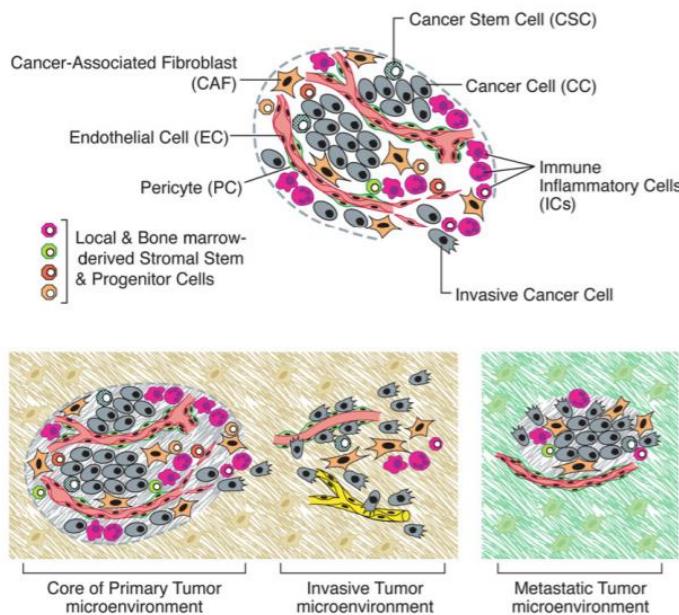
- Les gliomes touchent le système nerveux central.
- Les cancers dit « liquides » avec les leucémies qui commencent dans les tissus hématopoïétiques, ainsi que les lymphomes et le myélome multiple qui prennent naissance dans les cellules du système immunitaire.

Jusque dans les années 2010, le cancer était pensé comme le fruit de la mutagenèse (Loeb & Loeb, 2000). Une cellule dans laquelle une mutation « driver » confère un avantage sélectif de croissance (Bozic et al., 2010) puis l'accumulation d'une cascade de mutations « passagers » qui permettent aux cellules cancéreuses de contourner les processus de régulation de l'hôte qui contrôlent la localisation, la division et la mort cellulaire programmée entre autres. Même si cette théorie de l'accumulation d'altérations génétiques n'est pas complètement obsolète, on sait aujourd'hui que la tumorigène est un processus avec beaucoup plus de reliefs.

Il n'existe pas deux cancers identiques, mais de surcroît, il existe une diversité complexe de cellules enchevêtrées au sein même d'une tumeur (Williams, 2015). La tumeur n'est pas une simple masse isolée de cellules mais un véritable organe avec son microenvironnement propre. Le processus de formation et de progression de la tumeur est donc influencé à la fois par les changements génétiques et épigénétiques de la cellule tumorale, ainsi que par le réarrangement des composants du microenvironnement tumoral (TME), entre lesquels existent des interactions dynamiques (Baghban et al., 2020).

Le TME est donc un réseau complexe qui peut comprendre en plus des cellules tumorales, des cellules stromales comme des fibroblastes et des cellules endothéliales, des cellules immunitaires et inflammatoires telles que des macrophages, des lymphocytes, des neutrophiles, etc. (Farc & Cristea, 2020). Enfin, le niveau ultime d'hétérogénéité est atteint par la présence intra-tumorale de populations cancéreuses sous-clonales (Dagogo-Jack

& Shaw, 2018) aux profils moléculaires différents, comme les cellules souches cancéreuses (Greten, 2017) (Figure 19).



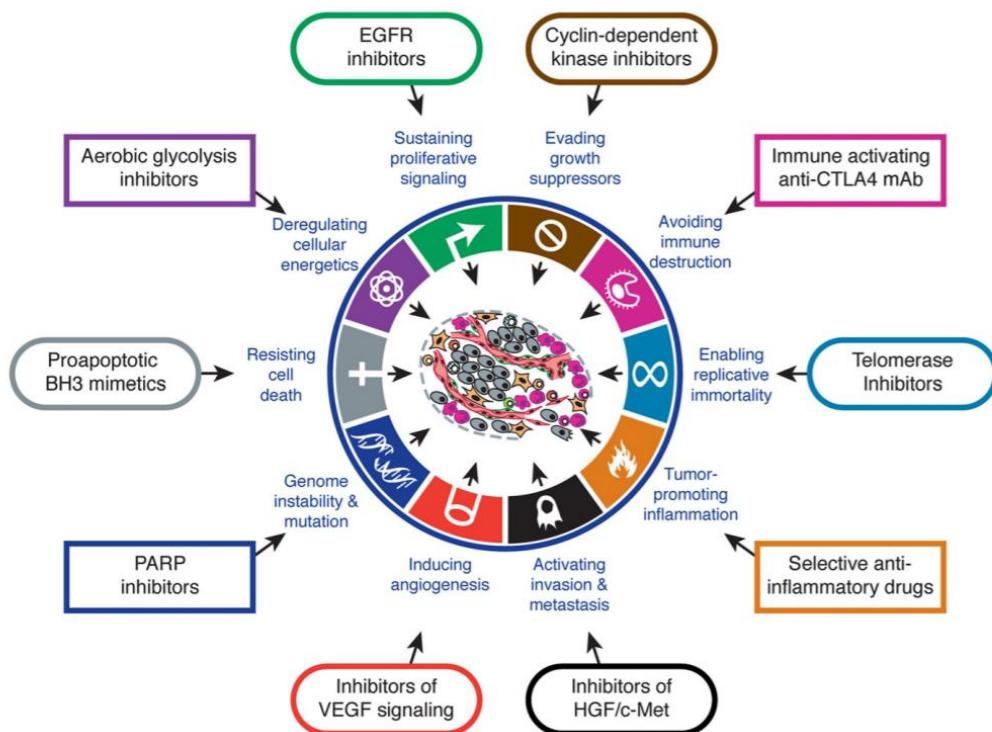
**Figure 19. Les cellules du microenvironnement tumoral**

Le TME est un réseau complexe qui peut comprendre en plus des cellules tumorales, des cellules stromales comme des fibroblastes et des cellules endothéliales, des cellules immunitaires et inflammatoires et des cellules aux profils moléculaires différents, comme les cellules souches cancéreuses (Hanahan et Weinberg, 2011).

C'est en tenant compte de cette hétérogénéité tumorale multidimensionnelle que Hanahan et Weinberg ont pu mettre à jour leur célèbre « Hallmarks of cancer » (Hanahan & Weinberg, 2011) (Figure 20), qui comprend désormais 10 caractéristiques phénotypiques propres aux tumeurs et à leur micro-environnement :

- Un pouvoir inflammatoire
- Une capacité d'invasion tissulaire et de formation de métastases
- Un pouvoir angiogénique
- Une instabilité génomique
- Un échappement à l'apoptose

- Une reprogrammation du métabolisme énergétique
- Un maintien de la signalisation proliférative
- Une insensibilité aux signaux antiprolifératifs
- Un échappement au système immunitaire
- Un potentiel répliquatif illimité



**Figure 20. Les principales caractéristiques du cancer et leurs ciblages thérapeutiques**

Des thérapies qui ciblent chacune des capacités acquises nécessaires à la croissance et à la progression tumorale ont été développées et font toujours l'objet de recherches. Les médicaments énumérés ne sont que des exemples illustratifs ; il existe un large éventail de candidats médicaments avec des cibles moléculaires et des modes d'action différents (Hanahan et Weinberg, 2011).

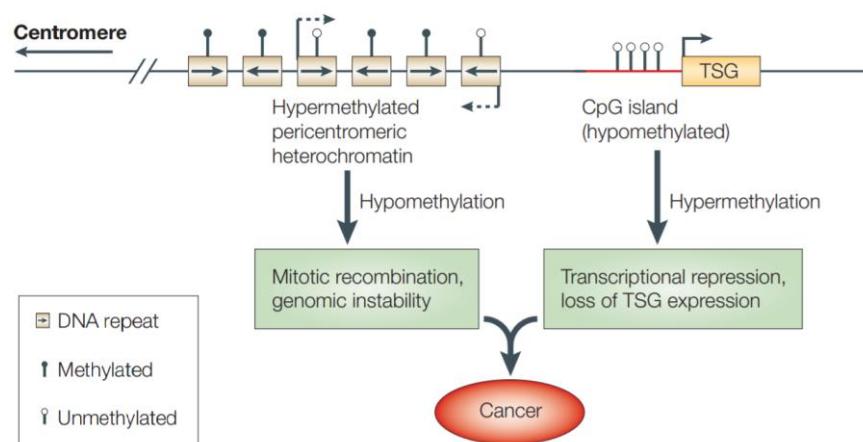
Finalement, tout l'enjeu de la cellule cancéreuse est d'acquérir une plasticité cellulaire poussée à l'extrême pour reprogrammer et modifier son identité phénotypique à volonté. C'est en cela que pour certains, la tumorigénèse s'apparente à l'embryogénèse (Shenoy, 2020). Et si l'embryogenèse implique une interaction complexe de mécanismes génétiques et épigénétiques, il en est de même pour la plasticité qui incombe aux cellules néoplasiques (Feinberg et al., 2006). Les cellules tumorales font donc aussi l'objet de ce que je nommerai des épimutations, soit des anomalies épigénétiques acquises qui participent à provoquer les dérégulations de l'expression des gènes et des fonctions moléculaires (Jones & Baylin, 2007). L'épigénome est donc tout aussi bien impliqué dans le maintien de l'intégrité du génome que dans son altération (Takeshima & Ushijima, 2019).

## 2. Le paysage épigénétique du cancer

### 2.1 Hypométhylation globale et hyperméthylation locales

Il ne fait aucun doute que le méthylome subit des changements à la fois globaux et localisés dans de nombreux cancers, ce qui contribue à la fois à faciliter les mutations génétiques par instabilité génomique et à modifier le profil d'expression des gènes (Jones & Baylin, 2007). Les troubles de la méthylation peuvent aussi bien apparaître très tôt dans le déroulement de la carcinogenèse et participer à son initiation, que réguler les nombreuses facettes des stades plus tardifs de la physiopathologie du cancer, à savoir la résistance au traitement, la dissémination ou la rechute (McMahon et al., 2017). On distingue classiquement deux sortes d'altérations du méthylome dans le génome des cellules cancéreuses : l'hypométhylation globale et les régions différemment méthylées spécifiques du cancer (cCDMR).

Premièrement, les tissus tumoraux présentent un profil de méthylation globalement moins enrichi en CpG méthylés que les tissus sains (Pogribny & Beland, 2009) et ce dans presque tous les types de cancers (Jackson et al., 2004; Y.-I. Kim et al., 1994; C. H. Lin et al., 2001; K. Suzuki et al., 2006; W. Zhang et al., 2020). Dans leur étude menée chez la souris, Gaudet et son équipe ont entraîné l'hypométhylation globale de l'ADN dans tous les tissus en réduisant l'expression de DNMT1 ; cela s'en est suivi par l'apparition de diverses pathologies y compris des tumeurs (Gaudet et al., 2003). Cette hypométhylation affecte particulièrement les régions où les CpG sont naturellement présents, c'est-à-dire les séquences répétées du génome : régions péri-centromériques (Tsuda et al., 2002) et éléments transposables (Zamudio & Bourc'his, 2010). Le relâchement de ces zones d'hétérochromatine a pour conséquence l'augmentation de l'instabilité chromosomique et des cassures de l'ADN (Eden, 2003) (Figure 21). Parmi les rétrotransposons hypométhylés fréquemment impliqués dans la carcinogenèse on retrouve : les répétitions Alu et les longs éléments nucléaires intercalés de classe 1 (LINE1) (M.-J. Kim et al., 2009; Rodriguez et al., 2008). (Robertson, 2005)



**Figure 21. Méthylation de l'ADN et cancer**

La région génomique physiologique représentée contient de l'hétérochromatine péricentromérique hyperméthylée et riche en éléments répétés, ainsi qu'un gène suppresseur de tumeur activement transcrit, associé à un îlot CpG hypométhylé. Dans les cellules tumorales, l'hétérochromatine devient hypométhylée, ce qui contribue à l'instabilité génomique. L'hyperméthylation des îlots CpG se produit également, et peut entraîner le blocage transcriptionnel des gènes régulateurs. Ces événements concourent à la tumorigenèse (Robertson, 2005)

Deuxièmement, outre l'affectation globale du méthylome, des erreurs plus localisées participent aussi à la transformation cellulaire. A l'inverse de l'hypométhylation globale, les cDMR sont en grande majorité des régions régulatrices de la transcription. Sur ces régions, l'hypométhylation semble beaucoup moins fréquente que l'hyperméthylation (Ehrlich, 2009) mais elle n'est pas exclue. Dans les deux cas, les cibles privilégiées sont les îlots CpG (Doi et al., 2009; Irizarry et al., 2009).

L'hyperméthylation conduit généralement à l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs (Herman & Baylin, 2003) (Figure 21). Elle touche divers promoteurs contrôlant à la fois des gènes de régulation du cycle cellulaire (p16), de la réparation de l'ADN (MGMT), et de l'apoptose entre autres (Dong et al., 2001; Harden et al., 2003). Si jusqu'à présent ces hyperméthylation aberrantes étaient principalement attribuées aux promoteurs, depuis quelques années les enhancers sont aussi au cœur des études méthylomiques. Dans une étude de 2020 portant sur le cancer du poumon, Cho et son équipe différencient bien les régions différentiellement méthylées chevauchant des promoteurs (pDMR) ou des enhancers (eDMR), et identifièrent 1007 pDMR et 607 eDMR associés à la réponse anti-PD-1 (Cho et al., 2020). Les aberrations de méthylation des enhancers contribuent aussi bien à la plasticité cellulaire que celles des promoteurs et à ce titre sont des facteurs aggravants (Bell et al., 2016).

Même s'il est impossible d'évaluer avec précision et de généraliser un pourcentage du génome concerné par les altérations du méthylome dans le cadre d'un cancer, une étude conséquente parue en 2011 permet *a minima* de se rendre compte de l'étendue du problème. En comparant 1600 échantillons humains, Fernandez et ses collaborateurs mirent en évidence 729 sites CpG (55% des 1322 CpG étudiés) avec une méthylation différentielle en comparant chaque tissu tumoral avec son tissu sain correspondant. Parmi eux 68% étaient hyperméthylés et 32% étaient hypométhylés, ils précisent aussi que

l'hyperméthylation des dinucléotides CpG s'est produite à 78% dans les îlots CpG (Fernandez et al., 2012).

Contrairement aux mutations génétiques, la labilité des épimutations telles que les hyper ou hypométhylation facilite nos moyens d'actions. C'est pourquoi ces dernières années le domaine de la pharmaco(epi)génomique a émergé. Plusieurs drogues capables de reprogrammer le profil épigénétique acquis au cours de la tumorigenèse ont vu le jour, ce sont les epidrogues (Miranda Furtado et al., 2019). Parmi elles, le premier agent hypométhylant approuvé par la Food and Drug Agency (FDA) en 2004 est l'azacitidine, pour le traitement de tous les sous-types du syndrome myélodysplasique (Kaminskas et al., 2005). Depuis, cet inhibiteur de DNMTs et ses analogues sont également utilisés pour traiter d'autres tumeurs (Christman, 2002; Füller et al., 2015; Idrissou et al., 2020). Mais certain alertent sur les effets globaux, peu spécifiques, de cette épithérapie, qui ne sont pas encore totalement compris et qui peuvent entraîner des effets secondaires délétères (Greville et al., 2021).

## 2.2 Aberrations des PTMs d'histones

La fonction globale des PTMs d'histones étant de réguler l'accès à l'ADN et par conséquent l'expression des gènes, la présence de modifications aberrantes sur les histones est souvent une des bases moléculaires de la tumorigenèse (Audia & Campbell, 2016). La sur-expression, la sous-expression, ou les mutations des protéines éditrices et effaceurs de PTMs peuvent conduire à des altérations du code histones (Portela & Esteller, 2010). Étant donné la variété de ces enzymes, elles sont parmi les cibles les plus fréquemment mutées et dérégulées dans les cancers (H. Shen & Laird, 2013). La complexité et parfois la multifonctionnalité de ces modificateurs d'histones en font des protéines à double tranchant, oncogènes ou suppresseurs de tumeur selon le contexte. Au même titre que pour le profil de méthylation, ces modifications du schéma des PTMs peuvent apparaître à la fois globalement et spécifiquement. Puisque ce sont les plus

représentés dans le génome, la majeure partie de la littérature se concentre sur les altérations d'acétylation, de méthylation et de phosphorylation mais il en existe d'autres, plus atypiques.

Comme expliqué dans un précédent chapitre, d'un point de vue fonctionnel, l'acétylation des histones est largement associée à la conformation permissive de la chromatine et par conséquent à l'activation de la transcription (Allis et al., 2015). De ce fait, des changements globaux du niveau d'acétylation des histones sont des signes souvent associés à la survenue de cancers, comme c'est le cas pour la perte globale d'acétylation sur la Lysine 16 (Fraga et al., 2005). Autres exemples, l'acétylation de H3K27 est significativement plus représentée dans les tissus de cancers colorectaux par rapport aux tissus normaux (Karczmarski et al., 2014) et le taux global d'histones H3 acétylées diminue chez les patients atteints de cancers de la vessie (Ellinger et al., 2016). Plus spécifiquement, lorsqu'une hyperacétylation se produit, elle peut entraîner l'expression d'un locus oncogénique, et inversement pour l'hypoacétylation sur un locus suppresseur de tumeur. Selon Juan et al., la désacétylation des histones pourrait expliquer en partie la sous expression de p53 dans les cancers (Juan et al., 2000). Les altérations de HATs et de HDACs responsables d'acétylations différentielles sont de natures très variées et plusieurs revues en font l'état des lieux (Barneda-Zahonero & Parra, 2012; Di Cerbo & Schneider, 2013). Parmi les enzymes les plus fréquemment impliquées, il y a les acétyltransférases p300/CBP et tous les membres de la classe I des HDACs. Outre des changements d'expression ou perte de fonction, les HATs et HDACs peuvent aussi être recrutés de façon anormale sur des promoteurs à la suite d'une translocation chromosomique par exemple (Cheung & So, 2011).

Globalement, tout ce qui est valable pour l'acétylation l'est aussi pour la méthylation, si ce n'est que cette dernière n'a pas d'effets directs sur la structure de la chromatine et qu'il existe des subtilités dans le degré de méthylation (mono, di, tri). Parmi les KMT souvent

citées dans la littérature comme impliquées dans les cancers, on retrouve les enzymes de la famille MLL avec une perte ou dérégulation de fonction entraînant une perte de méthylation sur H3K4 (Meeks & Shilatifard, 2017). Les enzymes responsables de la méthylation H3K9 sont aussi régulièrement tenues pour responsables, comme la très connue G9a, capable par exemple de désactiver épigénétiquement le gène suppresseur de tumeur RARRES3 dans le cancer du foie (Wei et al., 2017). La répression génique médiée par la surexpression de G9a a également été rapportée dans le cancer du sein (Wozniak et al., 2007), comme dans la fuite immunitaire et la chimiorésistance du carcinome du côlon (Paschall et al., 2015). Concernant les KDM, KDM1A, spécifique des résidus H3K4 et H3K9, est communément qualifiée d'oncogène (Majello et al., 2019). On peut aussi citer KDM5A, qui attire particulièrement l'attention ces dernières années, dont l'expression anormalement élevée dans divers cancers solides et liquides réprime la différenciation, favorise l'angiogenèse et la résistance aux médicaments notamment (G.-J. Yang et al., 2021).

Du fait de l'interconnexion entre modification d'histones et état de la chromatine, il n'est pas rare que des histones hypoacétylées et hyperméthylées soient associées à des îlots CpGs hyper-méthylés, une autre caractéristique des cellules transformées (Fahrner et al., 2002). L'étude de Kondo et al. illustre bien ce schéma. Ils ont rapporté que G9a est plus exprimée dans le carcinome hépatocellulaire que dans les tissus hépatiques non cancéreux. Ils expliquent que l'hyperméthylation des histones H3K9 par G9a associée à la méthylation des CpGs du promoteur sont responsables de la perte du suppresseur de tumeur p16 (Kondo et al., 2007).

Moins étudiée, la phosphorylation des histones tient pourtant des rôles importants dans les processus physiologiques de réparation de l'ADN (Millan-Zambrano et al., 2018), de transcription et de ségrégation chromosomique pendant la mitose (Seibert et al., 2019) et est, de toute évidence, impliquée dans la tumorigenèse (Y. Liu et al., 2019, p. 6; Mahajan

et al., 2017; W. Yang et al., 2012, p. 2). C'est aussi le cas pour d'autres modifications plus atypiques comme la citrination des histones (Yuzhalin, 2019).

Même si les recherches sur le sujet abondent, la mise en évidence des modifications d'histones conductrices de la tumorigénèse n'est pas chose facile. Cette difficulté d'identification est en partie due à la grande variété de protéines qui agissent au niveau de la chromatine, souvent agencés en complexes dont font partie les modificateurs d'histones. Les HATs, HDACs, KMT et KDM coopèrent entre elles en plus de se fixer à l'ADN. Par ailleurs, la présence de certaines PTMs peut affecter la capacité d'autres marques à être déposées (Suganuma & Workman, 2008). Enfin, les protéines effectrices capables de lire les PTMs sont elles aussi susceptibles de subir des altérations jouant un rôle dans la transformation cellulaire. L'interprétation du code histones dans les cellules cancéreuses devrait donc se faire essentiellement de manière contextuelle, une même mosaïque pouvant entraîner des dysfonctions biologiques distinctes selon les acteurs moléculaires engagés. Toutefois les études montrant l'impact des aberrations locales de PTMs et leurs rôles dans l'expression génique et les phénotypes cellulaires sont peu nombreuses, souvent par manque d'outils expérimentaux adaptés permettant l'édition épigénomique spécifique au locus (Kwon et al., 2017).

En accord avec l'implication des PTMs d'histones dans le processus de carcinogenèse, les recherches sur les thérapies anticancéreuses se tournent de plus en plus vers l'utilisation d'épidrogues pour lesquelles les acteurs des PTMs sont d'excellentes cibles. Le nombre d'études sur les inhibiteurs d'HDAC a augmenté ces dernières années et certains sont déjà approuvés et utilisés en clinique dans diverses pathologies (Yoon & Eom, 2016). Les inhibiteurs d'HDAC sont des médicaments anticancéreux relativement nouveaux, et bien qu'il puisse paraître contre-productif d'inhiber toute une classe de protéines ayant un rôle majeur dans la régulation de la transcription, ce sont les agents anti-PTM les plus utilisés, et beaucoup sont encore au cœur d'essais cliniques comme recensé par Li et al., (G. Li

et al., 2020). La restauration ou l'inhibition de l'activité des HMTs font également partie de la stratégie antitumorale. Différents inhibiteurs de HMT font l'objet d'essais cliniques à différents stades comme le Tazémétostat, un inhibiteur de l'EZH2 (Sun et al., 2018). Une très récente étude a même réussi à synthétiser une drogue capable d'inhiber simultanément les histones désacétylases, la lysine méthyltransférase G9a et DNMT1 avec un effet antitumoral sur un modèle de souris (Rabal et al., 2021). Alors, si aujourd'hui la relation entre les modifications d'histones et le cancer est clairement établi et que le manque de thérapies efficaces n'est plus un frein, l'utilisation de l'acétylome et du méthylome des histones comme biomarqueurs du cancer montre un réel potentiel, notamment avec l'émergence de la biopsie liquide (Chai et al., 2021).

## 2.4 Modification de l'expression des miRs

Les premières preuves de l'implication des miARNs dans le cancer datent de 2002, révélées par le groupe du Dr Croce dans la leucémie lymphoïde chronique (Calin et al., 2002). L'abondance de preuves qui suivit, notamment grâce au progrès du séquençage, permis d'établir avec certitude un lien direct entre la dérégulation des miRs et le cancer. Les miARNs sont fréquemment séparés en deux catégories les « oncomiRs » et les « oncosuppressor miRs », mais, cette binarité est régulièrement ébranlée par l'existence de miRs bivalent aux fonctionnalités dépendantes du contexte. D'un point de vue très global, une étude d'expression de miARNs par cytométrie en flux sur 217 candidats à partir de 334 échantillons révèle une sous expression des miRs dans les tumeurs par rapport aux tissus sains (J. Lu et al., 2005). Il est également impossible généraliser, puisqu'il existe des dérégulations spécifiques de certains miRs, qui sont soit surexprimés soit sous-exprimés, et qui peuvent même servir de signature de certains cancers et refléter la progression de la tumeur.

La biogenèse des miARNs est rigoureusement contrôlée à plusieurs niveaux. Depuis leur transcription, en passant par leur interaction avec les processeurs, leur transport, leur

liaison au complexe RISC jusqu'à leur dégradation. Il peut s'agir de régulation épigénétiques aux locus des miRs (méthylation de l'ADN) (Xin et al., 2020), de modifications chimiques au sein même des miRs affectant leur biogenèse et leur capacité d'interaction (J. Briand et al., 2020; Cheray et al., 2020; Konno et al., 2019) ou encore une régulation indirecte par l'intermédiaire des protéines processeurs. Quels qu'ils soient, ces mécanismes de régulation sont autant de facteurs susceptibles d'être dérégulés et de participer à la transformation cellulaire (Ali Syeda et al., 2020).

Les mutations stochastiques ne sont pas réservées aux régions codantes du génome, mais sont aussi à même de se produire dans des régions dites « non codantes » à l'origine des miRs. Une étude pan-cancer de 2020 a réussi à identifier 10000 mutations somatiques sur les séquences des miRs, dans 33 types de cancers. Parmi les miRs concernés on retrouve les bien connus let-7, miR-21 et miR-205, mais également des dizaines de séquences significativement sur-mutées et des positions nucléotidiques préférentiellement mutées, de façon spécifique ou dans l'ensemble des cancers (Urbanek-Trzeciak et al., 2020).

Les miRs sont mis en cause à tous les stades du cancer et dans divers mécanismes moléculaires. A titre d'exemple, en inhibant AXIN2, les miRs-103/107 activent la voie de signalisation Wnt /  $\beta$ -caténine et ainsi participent à maintenir la pluripotence des cellules du cancer colorectal (H.-Y. Chen et al., 2019). L'activation par MYC et OCT4 du promoteur du miR-9 entraîne sa surexpression dans les cellules de gliomes qui, via des exosomes, est exporté dans les cellules endothéliales vasculaires pour favoriser l'angiogenèse (X. Chen et al., 2019). A l'inverse, le miR-199b-5p a un effet anti-angiogénique dans le cancer du sein (X. Lin et al., 2020). Certains sont impliqués dans la progression métastatique (J. Lee et al., 2020), d'autres au contraire empêchent l'initiation des métastases par inhibition des protéines de la transition épithélio-mésenchymateuse (Korpal & Kang, 2008). L'expression de certains miRs ne sont pas oncogéniques à elles seules mais peuvent être des facteurs de risques, qui associés à un deuxième événement

oncogéniques induisent le développement de tumeur, comme c'est le cas de la combinaison du glyphosate avec la surexpression du miR-182-5p (Duforestel et al., 2019).

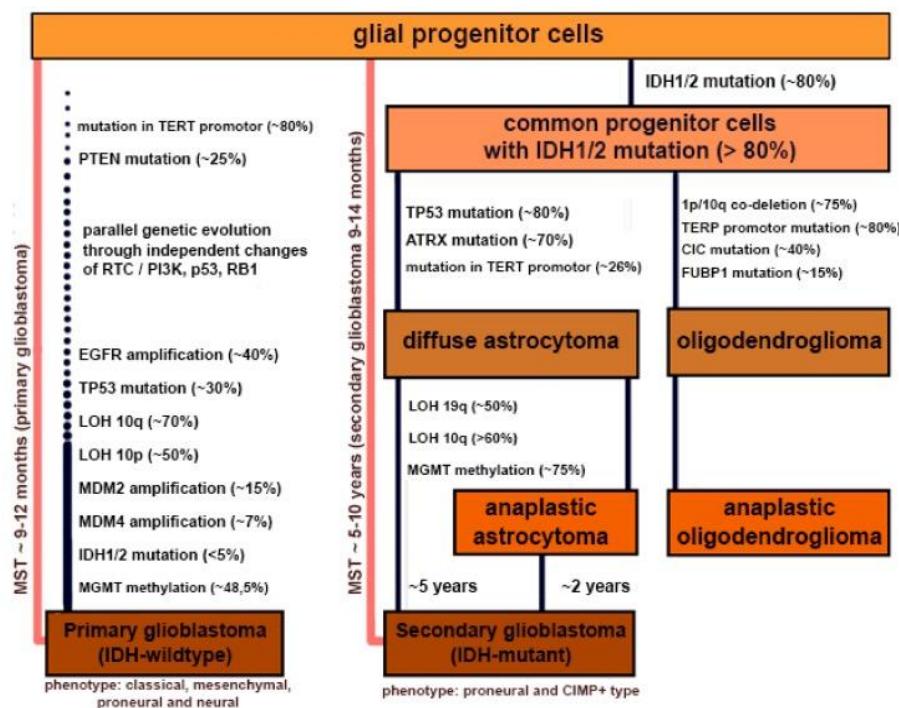
## Chapitre 3 : le glioblastome multiforme

### 1. Définition

Le cerveau est un organe complexe, une véritable mosaïque cellulaire composée à la fois de neurones et de cellules gliales de différents types. Autrement appelé névroglie, cet ensemble de cellules gliales se compose dans le système nerveux central (SNC) des astrocytes, des oligodendrocytes et des cellules microgliales qui sont en fait des macrophages. Selon les régions du cerveau, la glie abrite aussi des progéniteurs et des cellules souches neurales (NSCs) (Ma, Bonaguidi, et al., 2009). La névroglie est considérée comme un tissu de soutien des neurones en participant au bon fonctionnement des synapses et au contrôle de la qualité de l'environnement extracellulaire. Néanmoins, la transformation spontanée de ces cellules peut être à l'origine de la formation de tumeurs dont font partie les glioblastomes multiformes.

Les glioblastomes multiformes (GBM) sont classifiés par l'OMS comme des tumeurs astrocytaires et oligodendrogliales diffuses (Louis et al., 2016). Il s'agit de tumeurs de grade IV, extrêmement malignes : elles se développent rapidement et sont difficilement résécables dans leur intégralité (Lara-Velazquez et al., 2017). Les GBM sont aussi les tumeurs primaires malignes du SNC les plus fréquentes, elles représentent 45,2% du total (Ostrom et al., 2013). A titre d'exemple, l'incidence annuelle des GBM en France s'élève à 3,3 cas pour 100000 habitants (Darlix et al., 2017).

Depuis 2016, on sépare les GBM en 3 sous-groupes, basés sur le statut de mutation de deux protéines, l'isocitrate déshydrogénase 1 (IDH1) et 2 (IDH2) (figure 2). On retrouve ainsi les GBM IDH mutant, IDH sauvage et NOS (non spécifié autrement) (Louis et al., 2016). Le classement comme NOS est réservé aux tumeurs pour lesquelles l'évaluation IDH est irréalisable. La grande majorité des glioblastomes sont des tumeurs primaires, qui se développent de *novo* sans lésions malignes précurseurs. Ils représentent environ 90% des cas et sont, le plus souvent, des tumeurs IDH sauvages retrouvées chez des patients de plus de 55 ans (Ohgaki & Kleihues, 2013). Les GBM secondaires quant à eux évoluent à partir d'un astrocytome de plus bas grade, se manifestent chez des patients plus jeunes et sont distinguables des glioblastomes primaires principalement par leur statut IDH muté (Yan et al., 2009) (Figure 22).



**Figure 22. Principales altérations moléculaires responsables de la gliomagenèse**

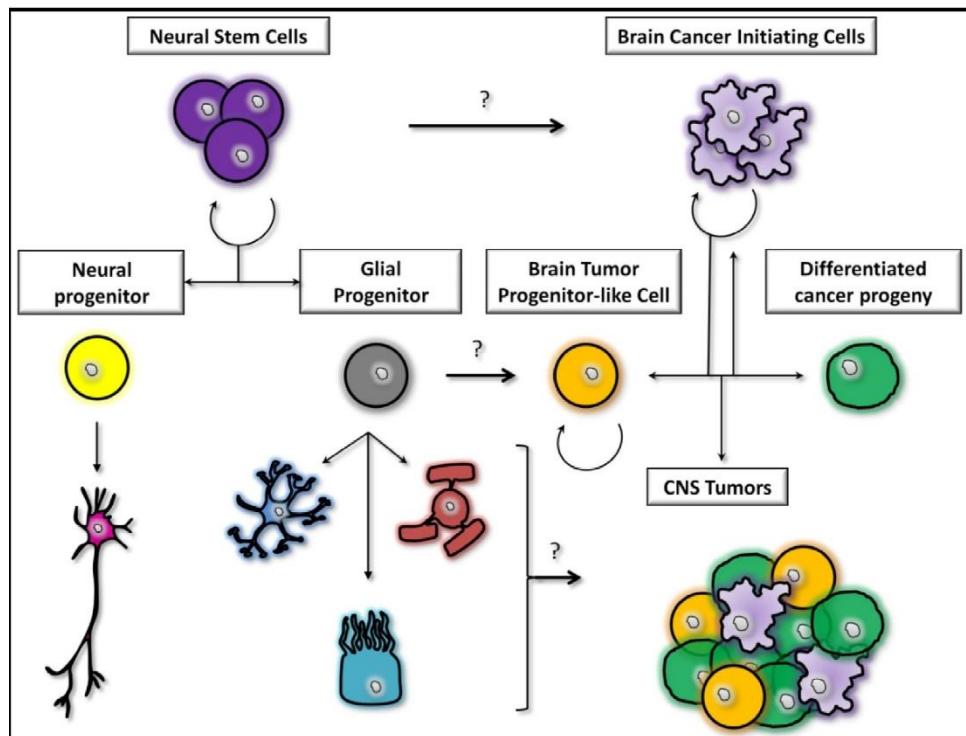
Principales altérations moléculaires apparaissant au cours de la gliomagenèse. La grande majorité des glioblastomes sont des tumeurs primaires, qui se développent de *novo* sans lésions malignes précurseurs. Les GBM secondaires quant à eux évoluent à partir d'un astrocytome de plus bas grade et sont distinguables des glioblastomes par leur statut IDH muté (Silantyev et al., 2019).

Depuis 2005, la norme de prise en charge des glioblastomes nouvellement diagnostiqués consiste en une résection de la tumeur dans la mesure du possible, suivie par des séances de radiothérapie et un traitement chimiothérapeutique concomitant (Stupp et al., 2005). Néanmoins, les glioblastomes sont pour l'heure considérés comme incurables, et en 2005 la médiane de survie n'excédait pas 15 mois (Koshy et al., 2012). Selon une méta-analyse populationnelle, la survie globale à long terme des patients aurait doublée depuis 2005 pour atteindre 18 % à 2 ans et 11 % à 3 ans (Poon et al., 2020), et ce, sûrement grâce au développement de thérapies innovantes (Silantyev et al., 2019). Toutefois, la survie à plus long terme reste médiocre et la survie à 5 ans ne semble pas s'améliorer (Poon et al., 2020). Voilà pourquoi, le besoin de cibles médicamenteuses spécifiques de la tumeur et d'agents pharmacologiques pour inhiber la migration et la dispersion du GBM se fait indéniablement pressant.

## 2. Origine cellulaire du glioblastome

Une des principales raisons du manque d'avancées cliniques pour lutter contre le GBM est l'ignorance de l'origine cellulaire de la tumeur, ce qui nuit à la capacité d'anticiper de manière fiable son comportement et notamment l'apparition de résistances. L'origine cellulaire est un facteur déterminant de la diversité moléculaire des GBM et par conséquent de leur agressivité (Alcantara Llaguno et al., 2015; Ghazi et al., 2012).

Comme évoqué précédemment, la glie et la variété de cellules qu'elle renferme constitue un excellent substrat pour la gliomagenèse. Voilà pourquoi, concernant l'identité de la cellule à l'origine des GBM, la bibliographie ne fait pas consensus, et ce, depuis l'état des lieux fait par Goffart et al., en 2013 (Figure 23).



**Figure 23. Les cellules souches neurales et la gliomagenèse**

Les NSCs (mauvies) sont capables de se différencier en progéniteurs gliaux (gris) et neuraux (jaune). Les progéniteurs neuraux donnent naissance aux neurones (rose), tandis que les progéniteurs gliaux sont engagés dans les oligodendrocytes (rouge), les cellules épendymaires (bleu clair) et les astrocytes (bleu foncé). Les NSCs seraient susceptibles de se différencier en cellules souches de glioblastomes (violet clair) qui, à leur tour, donnent naissance à une population de cellules cancéreuses plus différenciées (vert). L'ensemble des progéniteurs (orange) et des cellules matures du cerveau sont également considérés comme des candidats potentiels impliqués dans la gliomagenèse (Goffart et al., en 2013)

La principale hypothèse, qui prend de l'ampleur depuis le début des années 2000, est celle des cellules souches tumorales (J. H. Lee et al., 2018; Sanai et al., 2005). En considérant la capacité des NSCs à se renouveler et à proliférer, elles seraient les principaux sièges des mutations “drivers” qui, en s’accumulant, entraînent leur transformation en cellules souches de glioblastomes (GSCs) (Ayob & Ramasamy, 2018; Galli et al., 2004). Certaines études plaident en faveur de l’existence de quelques cellules souches pluripotentes “dormantes” abritées au sein même du tissu hôte de la future tumeur, comme c'est le cas dans plusieurs cancers (S. K. Singh et al., 2003; Vallette et al.,

2019). A la réception d'un signal de stimulation du microenvironnement, les NSCs quiescentes sont activées pour proliférer et toute altération moléculaire entraînant leur indépendance vis à vis des signaux de croissance entraînera une prolifération incontrôlée et une éventuelle gliomagenèse.

Certaines études mettent en évidence que les glioblastomes se développent à partir des cellules souches de la zone sous-ventriculaire (Lawlor et al., 2020; J. H. Lee et al., 2018). Cette région est considérée comme une niche physiologique de cellules souches et de progéniteurs chez l'adulte, capables de migrer sur une longue distance et de se différencier en neurones ou cellules gliales tout au long de la vie (Lois & Alvarez-Buylla, 1994). Qui plus est, toutes les cellules matures du cerveau sont également considérées comme des candidats potentiels impliqués dans la tumorigenèse, soit directement, soit en passant par un stade de dédifférenciation en progéniteurs.

### 3. Origines moléculaires des glioblastomes

De nombreuses altérations génétiques composent les voies de transformation tumorale dans le glioblastome. Parmi les plus fréquentes, les mutations atteignant la région promotrice de la reverse transcriptase de la télomérase (Y. Lee et al., 2017; X. Liu et al., 2013) confèrent aux cellules tumorales des propriétés de croissance illimitées par allongement des télomères. Une autre altération notable mais exclusive aux tumeurs oligodendrogliales, la co-délétion au niveau des régions chromosomiques 1p et 19q entraînant une translocation chromosomique t (1p; 19q) (q10; p10) (J. J. P. Kelly et al., 2010).

Comme l'illustre la figure 24, une multitude d'autres protéines peuvent être impliquées par gain ou perte de fonction, de façon récurrente ou sporadique, en voici une liste non exhaustive : le suppresseur de tumeur PTEN (J.-M. Yang et al., 2017), EGFR, les protéines de réparation de l'ADN MDM2 et MDM4, p53, les protéines inhibitrices de kinase dépendantes des cyclines (INK4)(Holland, 2001), les protéines de la voie de signalisation

PI3K (Langhans et al., 2017), NF1 et RB1 (The Cancer Genome Atlas Research Network, 2008). Les caractéristiques génomiques des glioblastomes ne sont pas tout à fait les mêmes selon le sous-type de glioblastome : proneural, classique, neural ou mésenchymal.

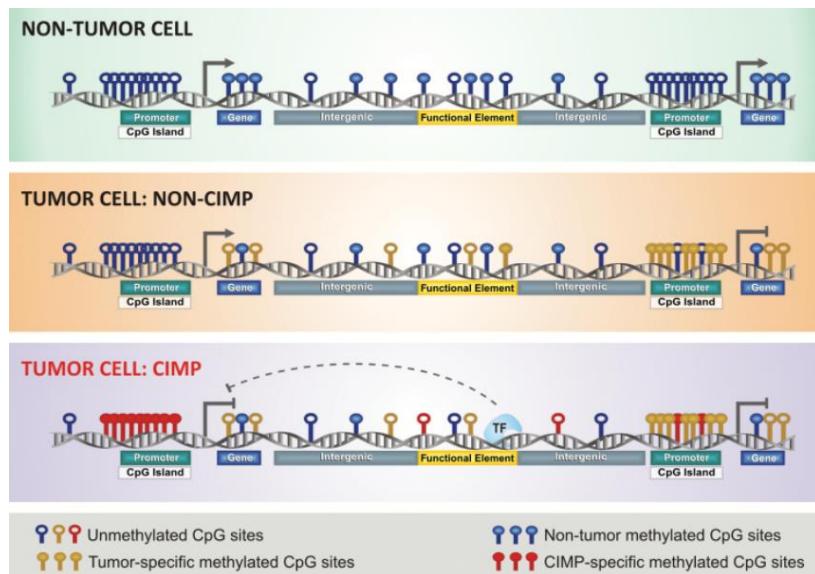
**Table 1 | Genomic characteristics of four high-grade glioma subtypes**

Glioma subtype	Genomic changes	Marker genes	Characteristic signaling pathways
Proneural	<i>PDGFRA</i> (mutation or gain) <i>IDH1</i> (mutation) <i>PIK3CA</i> or <i>PIL3R1</i> (mutation) <i>TP53</i> (mutation or loss) <i>PTEN</i> (mutation or loss) <i>CDKN2A</i> (loss)	Oligodendrocytic markers: <i>PDGFRA</i> , <i>NKX2-2</i> , <i>OLIG2</i> Proneural markers: <i>SOX</i> , <i>DCX</i> , <i>DLL3</i> , <i>ASCL1</i> , <i>TCF4</i>	PI3K and PDGFRA
Classical	<i>EGFR</i> (mutation or gain) <i>PTEN</i> (mutation or loss) <i>CDKN2A</i> (loss)	<i>NES</i>	Notch and hedgehog
Neural	<i>EGFR</i> (mutation or gain) <i>TP53</i> (mutation or loss) <i>PTEN</i> (mutation or loss) <i>CDKN2A</i> (loss)	Neuronal markers: <i>NEFL</i> , <i>GABRA1</i> , <i>SYT1</i> , <i>SLC12A5</i>	Unknown
Mesenchymal	<i>NF1</i> (mutation or loss) <i>TP53</i> (mutation or loss) <i>PTEN</i> (mutation or loss) <i>CDKN2A</i> (loss)	Mesenchymal and astrocytic markers: <i>CHI3L1</i> , <i>MET</i> , <i>CD44</i> , <i>MERTK</i>	Tumor necrosis factor and NF-κB

**Figure 24. Caractéristiques génomiques des quatre sous-types de gliomes de haut grade**

Les sous-types de gliome présentent des profils moléculaires distincts, mais qui se croisent en partie.

Enfin, les épimutations ne sont pas en reste. En 2010, une équipe a utilisé des données du TCGA (The Cancer Genome Atlas) pour identifier un sous-ensemble de glioblastomes avec des altérations de méthylation de l'ADN sur des promoteurs spécifiques. Ils ont appelé ce phénotype signature : « glioma-CpG island methylator phenotype (G-CIMP) ». Les tumeurs G-CIMP ont des caractéristiques moléculaires distinctes, y compris une fréquence élevée de mutation IDH1 et sont principalement retrouvées chez de jeunes patients avec une survie plus longue (Noushmehr et al., 2010). Il semblerait que l'on puisse distinguer deux sous-ensembles de tumeurs G-CIMP : G-CIMP-high et G-CIMP-low (Malta et al., 2018)(Figure25)



**Figure 25. Les tumeurs et leurs phénotypes de méthylation (CIMP)**

Illustration des aberrations de la méthylation de l'ADN au niveau de loci génomiques spécifiques dans les cellules tumorales comparé aux cellules normales. Les sites CpG méthylos à l'état normal sont représentés en bleu, le gain de méthylation de l'ADN des tumeurs non-CIMP en jaune et l'hyperméthylation aberrante de l'ADN dans les tumeurs-CIMP en rouge (Malta et al., 2018).

Un autre « hallmark » épigénétique du glioblastome est la sous-représentation de 5hmC. Plusieurs études ont prouvé que les GBM arborent un faible de niveau de 5hmC, à la fois dans la masse tumorale et les zones d'infiltration comparé à des tissus sains (Jin et al., 2011, p. 1; Kraus et al., 2012, 2015). Le lien entre la diminution du niveau de 5hmC et la progression tumorale n'est pas totalement élucidé mais peut être en partie expliqué par une prolifération plus rapide (Bachman et al., 2014) et une instabilité génomique accrue (Kafer et al., 2016). En plus de cette dérégulation globale du niveau de 5hmC, il pourrait exister des schémas locaux, où la perte de 5hmC particulièrement présente au sein de locus génomiques critiques décrits plus haut (EGFR, PTEN, NF1 et PIK3R1) participerait à la perte d'intégrité du génome (Johnson et al., 2016). Aussi, la présence de 5hmC dans les enhancers et super-enhancers est associée à une meilleure survie chez les patients atteints de GBM (Johnson et al., 2016).

#### 4. Symptômes et facteurs de risques

Les patients atteints de glioblastome peuvent présenter deux types de symptômes : généralisés et focaux. Les symptômes généralisés comprennent des maux de tête, des convulsions, des nausées, une perte de mémoire et des déficits neurologiques. Les symptômes focaux dépendent de la localisation et de la grosseur de la tumeur. Selon l'aire sensorielle atteinte, peuvent apparaître des difficultés de langage, des troubles auditifs et visuels, des faiblesses musculaires ou encore des troubles psychiatriques.

Concernant l'étiologie des GBM, elle reste encore aujourd'hui un mystère. On sait toutefois avec certitude que l'exposition préalable à des rayonnements ionisants à forte dose, dans l'enfance ou à l'âge adulte, est un facteur de risque (Hanif et al., 2017). La radiothérapie anti-cancéreuse et l'exposition aux rayonnements causés par les bombes atomiques en font partie. Comme pour beaucoup de cancers, le risque de développer un glioblastome augmente avec l'âge. Bien que certains types de gliomes soient prédominants chez les enfants et jeunes adultes, les glioblastomes sont plus fréquents chez les adultes âgés de 45 à 65 ans. Une étude de cohorte menée en se basant à la fois sur des mesures biologiques et données testimoniales accuse la consommation de sucre et l'exposition professionnelle au tétrachlorure de carbone (Nelson et al., 2012). Sans preuves tangibles, d'autres facteurs environnementaux sont mis en causes : l'exposition professionnelle (industrie du caoutchouc, pétro-chimique), les téléphones portables (Inskip et al., 2001), les pesticides (Carreón et al., 2005). L'exposition au diuron par exemple, un herbicide aujourd'hui interdit dans les jardins, pourrait, en combinaison avec la surexpression d'AKT, favoriser la formation de gliomes par hypométhylation de l'ADN (J. Briand et al., 2019). Les glioblastomes ne se transmettent pas dans les familles, néanmoins, il existe des prédispositions génétiques faisant augmenter le risque d'en développer un. Ce genre de cas reste très rare et mérite de plus amples recherches être confirmé (Fisher et al., 2007). Enfin, quelques maladies héréditaires rares telles que le syndrome de Turcot,

le syndrome de Li-Fraumeni et la neurofibromatose sont associées à un risque accru de glioblastome (Huttner et al., 2010).

A l'inverse, une meta-analyse incluant huit études observationnelles et au total 3450 patients diagnostiqués avec un gliome a mis en évidence un facteur protecteur surprenant : l'atopie qui se caractérise par des antécédents d'asthme, d'eczéma, de rhume des foins ou d'allergie (Linos et al., 2007).

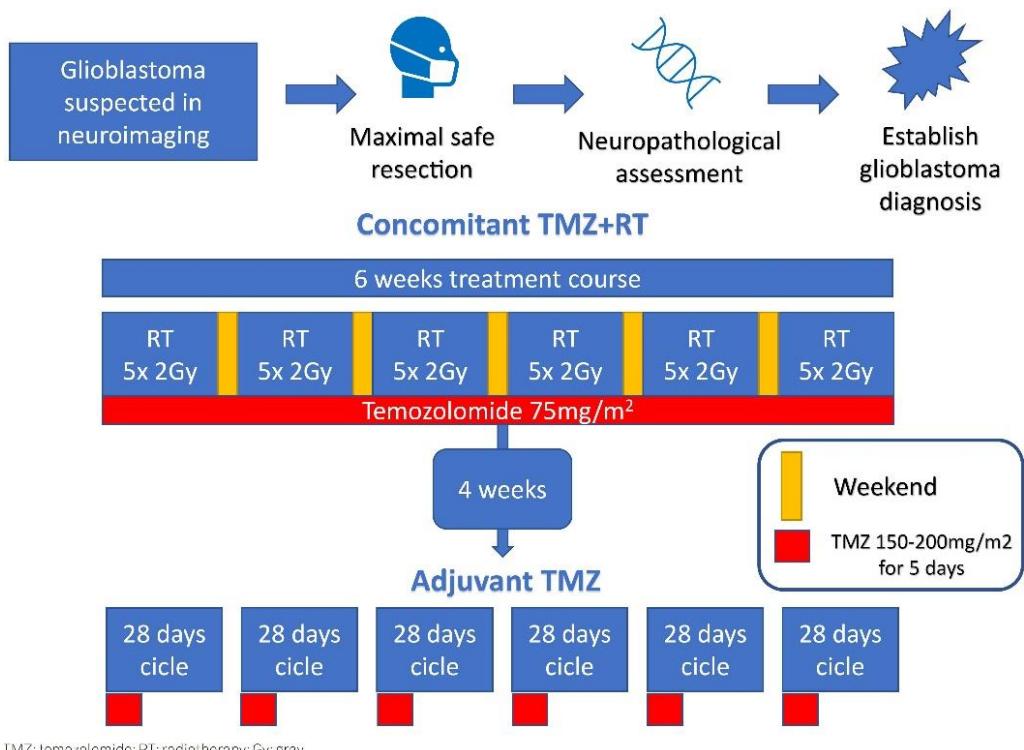
## 5. Traitements

### 5.1 Généralités

Pour les glioblastomes nouvellement diagnostiqués, et comme pour de nombreux cancers, la prise en charge commence par la chirurgie. Les objectifs de l'exérèse sont d'éliminer la tumeur, retarder l'aggravation clinique, améliorer la qualité de vie en minimisant les symptômes et obtenir des échantillons de tissu pour le diagnostic pathologique. L'étendue de la résection est un facteur pronostic de survie important, une marge de résection chirurgicale plus étendue est associée à une espérance de vie plus longue (Wolbers, 2014). Tout l'enjeu est de trouver un équilibre fin entre résection totale de la tumeur et préserver les fonctions neurologiques. Il se peut néanmoins que certains patients ne soient pas en capacité de supporter une chirurgie crânienne aussi invasive, ou que la localisation de la tumeur la rende inopérable, dans ce cas une simple une biopsie sera réalisée pour le diagnostic pathologique.

Malheureusement, si la chirurgie augmente considérablement l'espérance de vie, elle est loin d'être suffisante (Young et al., 2015). Elle est donc traditionnellement suivie par un protocole de radio-chimiothérapie simultanée : une première phase de 6 semaines avec 75 mg / m<sup>2</sup> / jour de témozolomide (TMZ) et 60 Gy de radiothérapie réparties en 30 fractions, puis six cycles d'entretien à raison de 150–200 mg / m<sup>2</sup> / jour de témozolomide pendant les 5 premiers jours d'un cycle de 28 jours (Figure 26). Ce traitement est autrement

connu sous le nom de protocole Stupp, du nom du médecin suisse ayant mené l'essai clinique en Europe qui a conduit à sa validation (Stupp et al., 2005).



**Figure 26. Traitement standard des glioblastomes : protocole Stupp**

Le protocole Stupp débute par une résection maximale de la tumeur, quand elle possible, suivie d'une chimio-radiothérapie concomitante et de six cycles de chimiothérapie adjuvante avec le témozolomide (Batistella et al., 2021).

Un autre traitement de première ligne approuvé par la FDA consiste en l'implantation, sur le site de résection, de plaquettes de carmustine biodégradables (Gliadel) fonctionnant comme une source de chimiothérapie localisée. Leur utilisation se fait rare et controversée étant donné les effets secondaires potentiels et leur bénéfice discutable sur la survie (Bregy et al., 2013).

Les tumeurs de GBM étant particulièrement vascularisées, le bevacizumab, un anticorps monoclonal anti-angiogénique ciblant VEGF-A, déjà approuvé par la FDA dans le cadre des GBM récurrents fut aussi évalué dans le cadre des GBM nouvellement diagnostiqués

(Chinot et al., 2014; Friedman et al., 2009). Aucune augmentation de la survie globale (OS) n'a été observée, mais la survie sans progression fut améliorée.

Un grand nombre d'études cliniques ont évalué la pertinence de multiples autres drogues : les inhibiteurs de l'intégrine, d'autres anti-angiogéniques, des thérapies anti EGFR, le dispositif NovoTTF-110A (Novocure, St. Helier, Jersey Isle) à champs électriques, l'immunothérapie, mais sans résultats significatifs (Gallego, 2015). La mise au point de traitements contre le GBM est un challenge épique, étant donné la grande hétérogénéité des cellules tumorales et la nécessité de traverser la barrière hémato-encéphalique (BHE) (Kizilbash et al., 2017).

Malgré tout, la récidive du GBM survient en moyenne entre 6 à 10 mois après la chirurgie initiale. L'exérèse est insuffisante compte tenu du caractère diffus de la maladie et les cellules tumorales restantes, qui acquièrent très rapidement des mécanismes de résistance aux chimio et radiothérapies. La thérapie visant les glioblastomes récurrents offre plus de possibilités compte tenu de leur utilisation comme dernier recours (Department of Medical Oncology, Centro Hospitalar de São João, Porto, Portugal et al., 2017).

## 5.2 Mécanisme d'action du témozolomide

Le TMZ ou témozolomide ou encore 3-méthyl-4-oxoimidazo [5,1-d] [1,2,3,5] tétrazine-8-carboxamide est un agent alkylant (Danson & Middleton, 2001) de petite taille aux propriétés lipophiles, capable de traverser la BHE, lui conférant une biodisponibilité complète par voie orale. Une fois administré, l'augmentation du pH provoque l'hydrolyse du TMZ en 5-(3-méthyltriazén-1-yl) imidazole-4-carboxamide (MTIC), le métabolite actif. Le MTIC est ensuite converti en 5-amino-imidazole-4-carboxamide (AIC) et en méthylhydrazine (S. Y. Lee, 2016) (Figure 27). La prise de TMZ induit l'arrêt du cycle cellulaire en G2/M des cellules cancéreuses et, dans le meilleur des cas, leur mort par apoptose.

Au niveau moléculaire, la cytotoxicité du TMZ est médiée par l'ajout de groupement méthyle sur des sites spécifiques de l'ADN simple brin, préférentiellement aux positions N7 et O6 des guanines et O3 sur les adénines. La conséquence majeure de la présence des O6-méthylguanine est leur mésappariement suite à l'insertion, lors des réplications, d'une thymine en lieu et place d'une cytosine (N. Singh et al., 2020). L'ampleur de ces mésappariements entraîne l'accumulation de cassures d'ADN simple et double brin, qui en l'absence de systèmes de réparation efficaces, conduisent à la mort programmée des cellules.

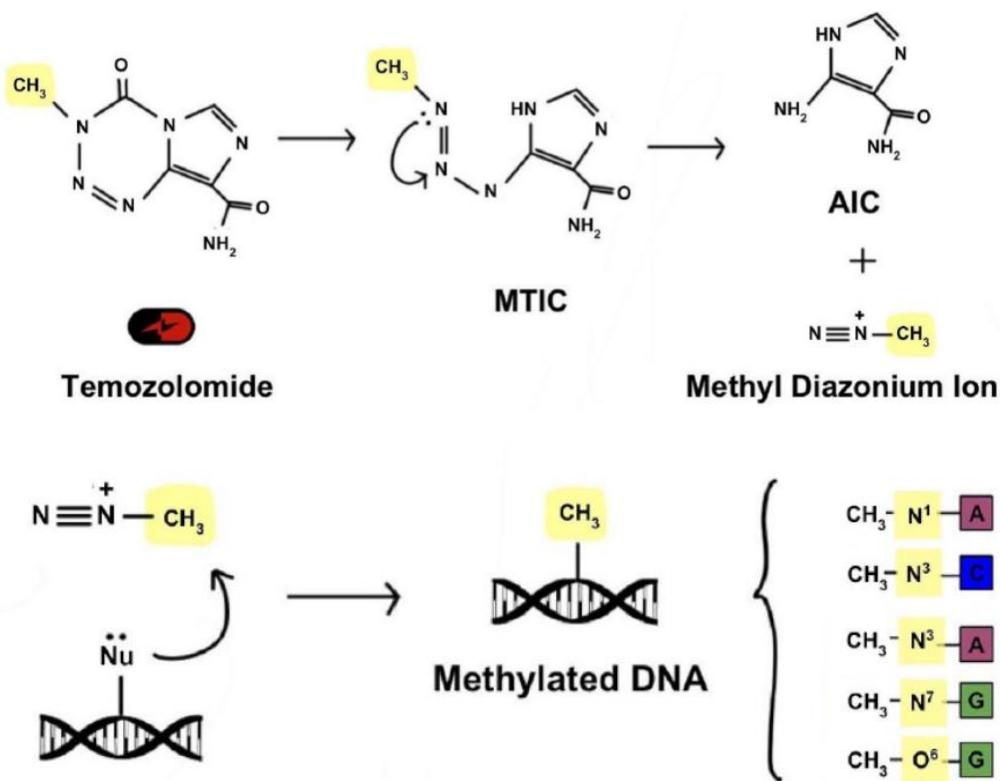


Figure 27. Métabolisme du témozolomide et méthylation de l'ADN associée.

Le TMZ est métabolisé en MTIC, puis en sa forme active, l'ion méthyl diazonium. L'ion méthyl diazonium électrophile agit comme un donneur de méthyle à l'ADN chargé négativement. Cette activité d'alkylation se produit de préférence au niveau du N7 de la guanine, du O3 de l'adénine et du O6 de la guanine (N. Singh et al., 2020).

## 6. Résistance

### 6.1 Généralités

Ce qui fait du glioblastome l'un des cancers les plus mortels malgré les traitements agressifs disponibles, c'est l'existence d'une multitude de mécanismes de résistances. Ces propriétés de résistance sont soit innées soit acquises au cours du traitement, et peuvent à la fois concerter les glioblastomes dans leur ensemble ou être plus spécifiques de certaines tumeurs. Le premier obstacle à l'efficacité des traitements est l'emplacement des GBM. Comme pour toutes les tumeurs cérébrales et du système nerveux central, les médicaments se heurtent à la BHE avant d'atteindre le GBM. Celle-ci est notamment renforcée par la présence de pompes d'efflux parmi lesquelles la cassette de liaison à l'ATP et la glycoprotéine P limitent encore davantage la pénétration des agents thérapeutiques dans les cellules tumorales (Mason, 2015).

Le GBM sait aussi tirer profit de la BHE, en effet, la tumeur est capable de perturber et s'approprier la BHE pour former une véritable barrière hémato tumorale, qui se caractérise par une réduction des jonctions serrées et donc une augmentation de la perméabilité aux cellules immunitaires circulantes qui seront de précieux alliés dans l'acquisition de la résistance. Entre autres mécanismes, la partie hypoxique de la tumeur peut libérer des exosomes contenant le facteur de croissance vasculaire VGEF-A et ainsi augmenter la perméabilité (Zhao et al., 2018). Une autre caractéristique de la barrière hémato tumorale est la distribution anarchique des péryctes. Plus précisément, les cellules néoplasiques pluripotentes sont recrutées par les cellules endothéliales des néovaisseaux tumoraux et deviennent des péryctes suite à la libération de facteur d'induction comme le TGF $\beta$  (L. Cheng et al., 2013).

Attardons-nous sur ces cellules pluripotentes ou cellules souches de glioblastome (GSCs). Leur présence laisse inévitablement présager d'une rechute, puisque certaines d'entre elles échappent à la résection de la tumeur grâce à leur propriétés invasives (L. Cheng et

al., 2011) et sont ensuite capables de reformer une masse tumorale (J. Chen et al., 2012). Plusieurs études montrent également que les GSCs participent à la résistance à la chimiothérapie (J. Chen et al., 2012) et à la radiothérapie (Bao et al., 2006). Même si certains mécanismes sont précisément décortiqués, l'aptitude des GSCs à mener la tumeur vers un état de résistance est loin d'être complètement comprise. Plusieurs études et revues récentes ont tenté d'établir un modèle dans lequel les GSCs tiennent une place prépondérante dans l'hétérogénéité tumorale grâce à leur forte entropie (Prager et al., 2020). L'état inductible et transitoire des GSCs en ferait les actrices principales de la plasticité et de l'évolution des GBM tout au long du traitement, impliquant de recourir à une prise en charge dynamique et adaptative pour lutter efficacement contre le GBM (Dirkse et al., 2019).

En effet, l'immense hétérogénéité du microenvironnement tumoral est sans doute la pierre angulaire de la résistance aux traitements, puisqu'il empêche la prise en charge de la tumeur par un seul et même agent chimique, et influence l'échappement des clones aux thérapies plus ciblées (Cruz Da Silva et al., 2021; A. P. Patel et al., 2014). La tumeur est en constante communication avec les cellules de son environnement, à la fois par libération de facteurs chimiques libres ou intra-vésiculaires et par interaction directe. Le meilleur exemple est celui de la mise en place par les cellules de GBM d'un environnement immunosuppresseur grâce à la libération de cytokines par les macrophages, ou de protéines du système complément par les cellules tumorales elles-mêmes (DeCordova et al., 2020). La diaphonie qu'il existe entre la tumeur et son environnement participe aussi à l'activation de voies de signalisation moléculaires. Par exemple, les activations des voies Wnt, Notch, c-Met, STAT3, Sonic hedgehog et NF- $\kappa$ B (Y. Kim et al., 2012; J. Wang et al., 2009) facilitent le maintien du phénotype radio-résistant de sous-population de GSCs (Ou et al., 2020).

Finalement, les mécanismes de résistances sont extrêmement variés et hétérogènes. Au-delà de ces stratégies de résistance assez générales que j'ai présentées, les tumeurs s'adaptent de façon spécifique aux différentes thérapies. Dans la prochaine partie seront développés les mécanismes de résistance au témozolomide, l'agent chimiothérapeutique de premier choix contre les GBM.

## 6.2 La résistance au témozolomide

### 6.2.1 Généralités

Suite à l'exposition de la tumeur aux fortes doses de TMZ, les glioblastomes développent systématiquement, en plus ou moins de temps, des mécanismes de résistances multiples, qui sont au cœur de beaucoup de projets de recherche. Ces recherches ont révélé l'existence de cellules intrinsèquement résistantes à l'agent chimiothérapeutique, et de cellules qui acquièrent cette résistance au cours du traitement. C'est la résistance innée qui explique que 50% des patients ne répondent pas au TMZ (S. Y. Lee, 2016). Le principal mécanisme moléculaire responsable de cette résistance innée est l'expression de la protéine MGMT (O6-méthylguanine-ADN méthyltransférase)(Dunn et al., 2009). MGMT est une protéine de réparation de l'ADN qui élimine les groupements alkyles de la position O6 de la guanine et ainsi neutralise l'efficacité du TMZ. Ainsi, rapidement après les débuts de l'utilisation du TMZ contre le GBM, une étude a démontré que la sous expression du gène MGMT par la méthylation de son promoteur était un facteur prédictif de survie prolongée en réponse au TMZ chez les jeunes patients (Hegi et al., 2005). Presque dix ans après, une méta-analyse rapporte que le statut de méthylation du promoteur de MGMT est aussi prédictif chez les patients plus âgés (A. Yin et al., 2014). Il n'existe toujours pas, pour l'heure, d'alternative thérapeutique pour les patients atteints de GBM aux promoteurs de MGMT non méthylés. Néanmoins, une étude de phase 1 sur une cohorte de 24 patients nouvellement diagnostiqués et présentant le promoteur de MGMT non méthylé, a obtenu des résultats prometteurs en associant l'acide folique avec

le témozolomide et la radiothérapie. Pour huit patients, la méthylation sur le promoteur de MGMT, détectée dans l'ADN circulant, a été restauré (Frenel et al., 2020).

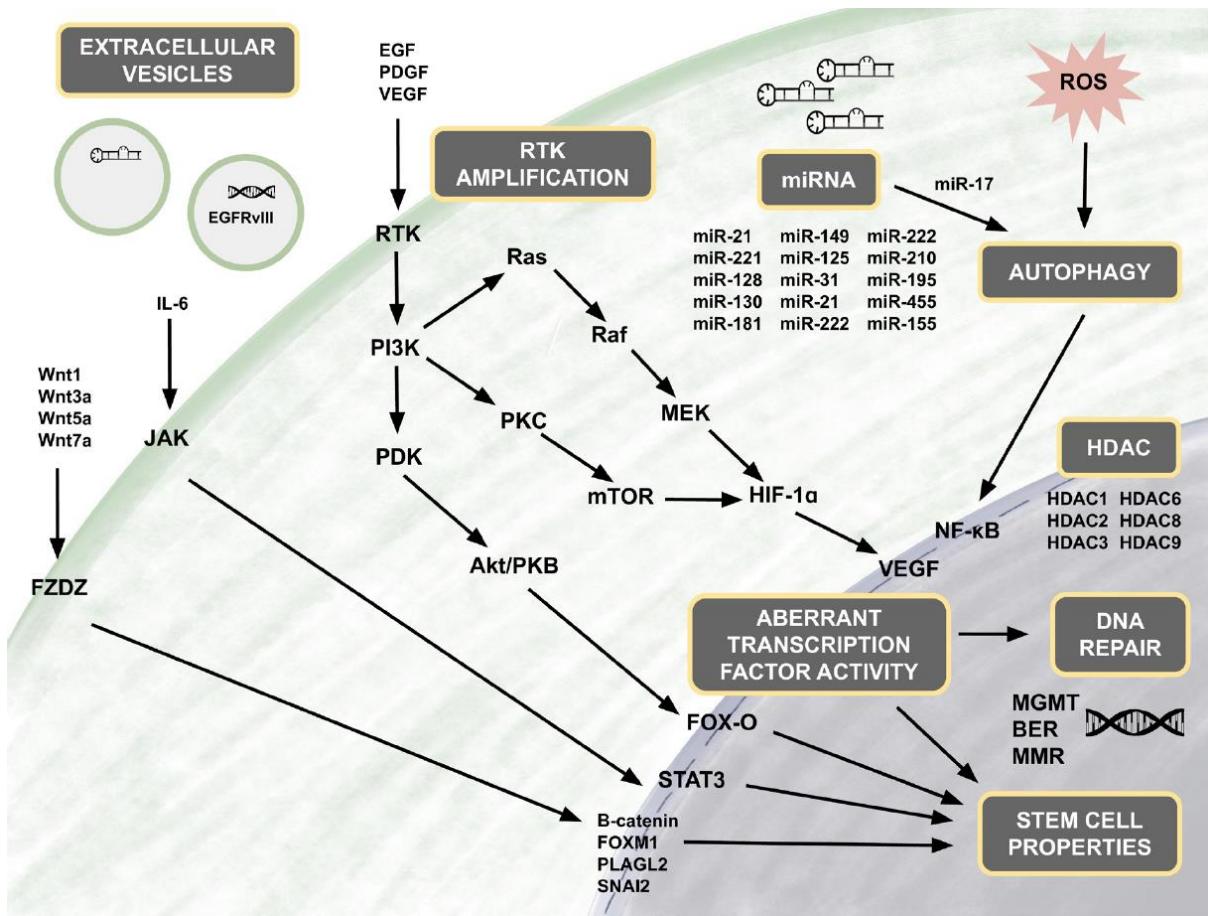
Mais l'implication de MGMT ne se limite pas à la résistance innée, elle joue aussi un rôle dans l'acquisition de la résistance. Il s'avère que le statut de méthylation du promoteur de MGMT est susceptible d'évoluer, et un nombre non négligeable de tumeurs ont un taux de méthylation plus faible lors de la récidive (Feldheim et al., 2019; Park et al., 2012). A ce jour, le mécanisme précis qui mène à l'activation du promoteur de MGMT au cours du traitement reste inconnu. Toutes les hypothèses sont possibles : l'existence d'un mécanisme actif et induit, ou simplement le résultat d'une pression de sélection pour un phénotype sous-clonal intrinsèquement tolérant. En 2019 une étude utilisant un modèle mathématique fondé, sur des données cliniques et expérimentales, a étudié la dynamique évolutive de la méthylation du promoteur de MGMT dans la résistance au TMZ au cours du traitement standard en se concentrant sur les rôles spécifiques de DNMT1, DNMT3A et 3B (Storey et al., 2019). Ils ont constaté que la chute du taux de méthylation du promoteur MGMT dans la tumeur récurrente ne peut pas être expliquée uniquement par la pression de sélection. Leur modèle suggère que le TMZ a un effet inhibiteur sur la méthylation de maintenance par DNMT1, une hypothèse soutenue par deux études expérimentales (Boldogh et al., 1998; Lavoie et al., 2011). En plus de la déméthylation de son promoteur, deux récentes études ont mis en évidence une corrélation entre la surexpression de MGMT et l'activité de plusieurs voies de signalisation comme PI3K / AKT et AKT / NF-κB (Guo et al., 2020; Harder et al., 2019).

D'autres complexes protéiques de la réparation de l'ADN sont impliqués dans la résistance au TMZ. C'est le cas de plusieurs protéines de la voie BER, responsables de la réparation des N<sup>7</sup>-guanine et N<sup>3</sup>-adenine méthylées (Agnihotri et al., 2014; Trivedi et al., 2005; Woodhouse et al., 2008). C'est aussi valable pour le complexe MMR (mismatch repair) qui, est activé en réponse au TMZ et génère les cassures d'ADN responsables de

l'apoptose. Une perte d'activité de MMR réduit le potentiel cytotoxique du TMZ et participe à l'apparition de la résistance (Stark et al., 2015).

Sans rentrer dans les détails, la dérégulation de cascades moléculaires spécifiques est une autre pierre angulaire de la résistance au TMZ. C'est le cas de la plupart des voies de signalisation enclenchées par la stimulation des récepteurs à tyrosine kinase (RTK). On notera PI3K/AKT, largement étudiée dans le GBM, dont plusieurs cibles en aval sont impliquées dans la résistance (Xu et al., 2017). Les récepteurs RTK eux même sont impliqués, comme l'EGFR (Azuaje et al., 2015; Blandin et al., 2021; Velpula et al., 2017). La voie Wnt/β-caténine joue aussi un rôle clé dans l'acquisition de la résistance à la chimiothérapie (M. Huang et al., 2020; Lan et al., 2015; C. Lu et al., 2017) tout comme la voie de signalisation JAK/STAT, souvent associée à la stimulation du caractère souche (E. Kim et al., 2013; Kohsaka et al., 2012; Lo et al., 2008) (Figure 28).

L'activation d'une partie des voies de signalisation participe, en parallèle, à la stimulation de l'autophagie. Ce mécanisme d'élimination du contenu cellulaire endommagé protège les cellules de l'apoptose et par conséquent réduit considérablement l'effet de la chimiothérapie (Sui et al., 2013). Dans ce contexte, des données indiquent que l'autophagie médiée par ERK après exposition au TMZ protège les cellules tumorales de l'apoptose et que des inhibiteurs de l'autophagie pourraient améliorer l'efficacité de la chimiothérapie (C.-J. Lin, Lee, Shih, Lin, Wang, Lin, et al., 2012). Une autre étude montre que le TMZ participe à initier l'autophagie par l'intermédiaire des mitochondries et du réticulum endoplasmique (C.-J. Lin, Lee, Shih, Lin, Wang, Chen, et al., 2012).



**Figure 28. Aperçu des mécanismes impliqués dans la résistance au TMZ des GBM**

Les mécanismes moléculaires contribuant à la résistance au TMZ dans le GBM sont très variés, mais la plupart touchent à la réparation de l'ADN, au caractère souche, à l'activité des HDACs, à l'activité des récepteurs et des facteurs de transcription, à l'autophagie, à l'activité des miRs et aux transports intercellulaires des facteurs oncogènes via les vésicules extracellulaires. Il existe des interactions importantes entre tous ces mécanismes (N. Singh et al., 2020).

Comme expliqué plusieurs fois en amont, la résistance au traitement est grandement facilitée par la communication intercellulaire. De ce fait, les vésicules extracellulaires (EV), à la fois exosomes et microvésicules, jouent un rôle prépondérant dans la chimiorésistance en facilitant le transport de facteurs de résistances d'une cellule à l'autre (Gourlay et al., 2017). Grâce à ce mécanisme, les oncoprotéines peuvent être transférées horizontalement entre les populations clonales et accélérer leur plasticité individuelle et collective (Figure 28). Dans le GBM, les EV produites par les CSGs et les cellules tumorales

peuvent contenir des oncogènes comme le gène codant pour le variant III du récepteur du facteur de croissance épidermique (EGFRvIII), on les appelle dans ce cas des «oncosomes» (D'Asti et al., 2016; Namee & O'Driscoll, 2018; A.-L. Zeng et al., 2017). Les EV transportent également des acides nucléiques et notamment des miRs, qui, nous le verrons, sont aussi des acteurs majeurs de l'acquisition de la résistance au témozolomide (Saadatpour et al., 2016; Z. Zhang et al., 2019).

Enfin, plusieurs publications insistent sur l'importance des cellules tolérantes ou persistantes(Oliver et al., 2020). La résistance pourrait provenir de cette sous-population capable de survivre en présence de l'inhibiteur et d'acquérir une résistance génétique ou épigénétique grâce à leur plasticité. Ces cellules peuvent être sélectionnées grâce à des facteurs prédisposants intrinsèques (sélection darwinienne) ou être induites sous la pression du traitement (induction lamarckienne)(Swayden et al., 2020). Les expériences menées par Rabé et ses collaborateurs ont permis d'identifier, dans les glioblastomes, une population présentant des caractéristiques de tolérance (Rabé et al., 2020).

### 6.2.2 Le rôle de l'épigénétique

L'influence du paysage épigénétique dans la carcinogenèse est sans équivoque, et il participe aussi à l'acquisition de la résistance au témozolomide. En effet, comme expliqué précédemment, la surexpression de la protéine MGMT, le principal mécanisme de résistance innée et acquise au témozolomide, est le résultat d'une dérégulation épigénétique par déméthylation de son promoteur. Il semblerait que, non seulement le promoteur, mais aussi un enhancer situé 560kb en amont de ce dernier soit impliqué dans l'expression de MGMT et la résistance au TMZ (X. Chen et al., 2018). Cet enhancer a été retrouvé activé dans des xénogreffes dérivées de patients résistants et des échantillons de tumeurs récurrentes. Cette activation naturelle ou forcée est corrélée à la

surexpression de MGMT, et à l'inverse l'inactivation de l'enhancer conduit à une réduction drastique du niveau de MGMT et à une sensibilité accrue au TMZ.

Des dérégulations du profil de méthylation se rencontrent sur d'autres locus spécifiques. C'est le cas du promoteur du lncARN SNHG12, anormalement déméthylé, le rendant accessible au facteur de transcription Sp1. Dans le cytoplasme, SNHG12 sert d'éponge pour le miR-129-5p, ce qui conduit à une activation de voies de signalisation favorisant la résistance au TMZ (C. Lu et al., 2020). Une autre étude a révélé que XAF1, initialement connu comme une protéine suppresseur de tumeur, peut paradoxalement tenir le rôle de facteur de résistance au TMZ à la fois *in vitro* et *in vivo*. L'expression de XAF1 est directement liée au statut de méthylation de son promoteur et négativement corrélée avec la survie des patients atteints de GBM (Q. Wu et al., 2019). A l'inverse, DNMT1 a été décrit comme facteur de chimio-sensibilité en réduisant la méthylation du promoteur du miR-20a dans les cellules de gliome (D. Zhou et al., 2015). Plus globalement, une étude a montré que les tumeurs primaires catégorisées G-CIMP-high donnaient lieu dans 9,5% des cas à une tumeur récurrente G-CIMP-low imitant un phénotype IDH sauvage. Ce changement de signature méthylogénique entre la tumeur primaire et la tumeur récurrente est associé à une rechute plus difficile à prendre en charge (de Souza et al., 2018).

L'expression et les fonctions des enzymes responsables des PTMs d'histones dans le GBM ne sont pas encore bien caractérisées. Néanmoins, il semblerait que l'expression aberrante des HDAC soit corrélée à un mauvais pronostic (D. H. Lee et al., 2017; S. Li et al., 2018). L'intérêt grandissant pour les inhibiteurs de HDAC et leur autorisation dans le traitement de nombreux cancers ont poussé les chercheurs à s'intéresser de plus près aux effets de ces inhibiteurs sur les glioblastomes (Auzmendi-Iriarte et al., 2020; R. Chen et al., 2020). Les résultats de ces études suggèrent que les inhibiteurs d'HDAC peuvent aider à sensibiliser les cellules résistantes au TMZ. L'inhibition des HDACs entraîne un relâchement

de l'ADN, offrant un meilleur accès au TMZ pour méthylérer ces résidus cibles, mais les mécaniques plus précises restent floues. Néanmoins, quelques études sont parvenues à décrypter l'activité spécifique de ces outils thérapeutiques, c'est le cas de l'inhibiteur RGFP109, spécifique des HDAC1 et 3, qui contre la résistance au témozolomide en bloquant la transcription des gènes en aval de la voie NF-κB (Z. Li et al., 2016). La sous-expression de HDAC2 ciblée par des siARN est capable de réduire l'invasion, la prolifération et la migration de certaines lignées de GBM et augmenter leur sensibilité au TMZ via la régulation négative de MRP1 (Z. Zhang et al., 2016). L'inhibition sélective de HDAC6, quant à elle, bloque l'activation des voies EGFR et p53 dans les cellules de GBM résistantes au TMZ tout en diminuant l'expression de MGMT (G. W. Kim et al., 2019). La sous-expression de MGMT peut aussi être obtenue par traitement avec l'acide valproïque, un pan HDAC inhibiteur (Ryu et al., 2012)

Les recherches sur la méthylation aberrante des histones dans la résistance au témozolomide ne profitent pas d'un tel engouement. A ce jour, 3 études seulement explorent l'implication des enzymes de méthylation/déméthylation des histones. Deux d'entre elles s'intéressent à KDM5A. La première relate que l'expression du gène codant pour KDM5A augmente significativement dans les cellules résistantes par rapport aux cellules naïves, et l'inactivation de l'enzyme mène à la restauration de la sensibilité (Banelli et al., 2015). La deuxième conclut que l'inhibition des histones démethylases KDM5A et KDM6B inhibe la prolifération des cellules de glioblastome rendues résistantes au témozolomide (Romani et al., 2019). Dans l'ensemble, les épидrogues ciblant les KDM ont un effet bénéfique sur la résistante au témozolomide (Banelli et al., 2017). Enfin, les résultats de la dernière étude mettent en évidence que l'utilisation d'un inhibiteur de la méthyltransférase G9a permettrait de reprogrammer les cellules de GBM et les GCSs pour augmenter leur sensibilité au TMZ et restaurer leur aptitude à l'apoptose (Ciechomska et al., 2018).

Comme évoqué précédent, les miRs interviennent dans l'initiation et la progression du glioblastome (Mizoguchi et al., 2013) tout comme dans sa résistance au traitement. La perte ou le gain d'activité des miRs peuvent avoir pour conséquence l'activation de voies catalytiques responsables de la résistance au TMZ. Des expériences comparant 83 tumeurs primaires et récurrentes correspondantes dans le but de mesurer la dynamique d'expression d'un panel de miR, mirent en évidence une augmentation de l'expression des miR-7, miR-9, miR-21, miR-26b, miR-124a, miR-199a et let-7f dans la tumeur récurrente (Matos et al., 2018). Une étude mécanistique suggère que la surexpression du miR-21 puisse limiter l'apoptose induite par le TMZ dans une lignée cellulaire de GBM, en perturbant l'équilibre BAX/BCL-2 et l'activité caspase-3 (L. Shi et al., 2010). De la même manière, mais dans une autre lignée cellulaire de GBM, l'inhibiteur du miR-21 sensibilise les cellules souches de glioblastome au témozolamide (S. Zhang et al., 2012). Une quinzaine d'autres études comme celle-ci ont démontré le rôle régulateur de plusieurs microARNs dans chimio-sensibilité au TMZ (N. Singh et al., 2020). Même si l'utilisation des miRs en thérapie clinique n'a pas encore fait ses preuves, les recherches sur ce sujet foisonnent et promettent un bel avenir à l'utilisation des miRs comme outil thérapeutique dans le GBM. A titre d'exemple, une étude *in silico* a permis d'identifier 8 miRs putativement responsables de la sous-expression de MGMT par dégradation ou répression traductionnelle. Cinq d'entre eux ont par ailleurs déjà manifesté leur capacité à augmenter la sensibilité aux agents alkylants comme le TMZ (Kirstein et al., 2020). En outre, les expériences de Nadaradjane et al, préconisent l'utilisation du miRNA-370-3p en plus du TMZ pour lutter contre le GBM. Ils ont observé une corrélation entre la diminution du volume tumoral induite par le traitement miRNA-370-3p/TMZ et la sous-expression des cibles du miR en question, FOXM1 et MGMT (Nadaradjane et al., 2018).

## OBJECTIFS

---

En 2021, la prise en charge du glioblastome multiforme constitue encore une impasse. Heureusement les chercheurs mettent tout en œuvre pour trouver de nouvelles thérapies, en témoigne la découverte très récente par une équipe allemande d'un vaccin ciblant une mutation IDH1 dans les gliomes nouvellement diagnostiqués (Platten et al., 2021) et les résultats prometteurs de l'utilisation de nouvelles molécules sur des lignées de GBM (Gade et al., 2021; Harmouch et al., 2020). Malgré tout, les glioblastomes devenus résistants à la chimiothérapie par le TMZ restent un obstacle. L'immense diversité des mécanismes moléculaires responsables de la résistance au témozolomide rendent cette tâche d'autant plus difficile et nous questionne sur la nécessité de se tourner vers une prise en charge personnalisée répondant à l'hétérogénéité intra-tumorale et inter-patient. En ce sens, l'épigénétique peut s'avérer être une arme redoutable, premièrement parce qu'elle tient un rôle majeur à la fois dans l'établissement et la résistance des GBM, mais surtout parce qu'elle peut être la source de biomarqueurs diagnostique, pronostique et clinique (Duforestel et al., 2020). Le caractère labile/réversible des modifications épigénétiques est à double tranchant. Il favorise la plasticité tumorale et donc complexifie la prise en charge, mais peut nous donner une image presque en temps réel du profil épigénétique et transcriptomique de la tumeur, et ainsi, permettre le suivi de l'évolution de la réponse au traitement des patients. Il est donc nécessaire de continuer à caractériser les mécanismes épigénétiques participant à la résistance acquise au témozolomide et en parallèle de développer des épi-drogues efficaces et spécifiques.

L'arsenal thérapeutique disponible ciblant les épimutations est pour l'heure assez limité ce qui s'explique principalement par la difficulté à cibler spécifiquement les régions touchées ou les enzymes responsables de ces modifications. Pour l'heure, seulement 7 drogues ont été approuvées par la FDA pour leur utilisation en oncologie, 2 DNMT inhibiteurs et 5 HDAC inhibiteurs (Miranda Furtado et al., 2019). Ceci étant, les altérations de profils épigénétiques sont parfois responsables d'activation transcriptionnelle de locus

spécifiques et donc, en aval, de la surexpression d'oncoprotéines. C'est le cas de MGMT dans la résistance au témozolamide. Si des difficultés sont rencontrées pour contrer ou effacer les épimutations à la base, les oncoprotéines sont des cibles de choix pour lesquelles l'inventaire d'inhibiteurs thérapeutiques est beaucoup plus fourni. En prenant en compte toutes ces considérations, les travaux menés au cours de cette thèse ont pour objectifs d'explorer les dynamiques épigénétiques et les mécanismes moléculaires associés, participant à l'induction de la résistance sous la pression thérapeutique par le TMZ. L'idéal à atteindre, à plus ou moins long terme, étant d'offrir davantage de possibilités d'intervention, suivi et traitement, dans la lutte contre le glioblastome.

## MATÉRIELS ET MÉTHODES

---

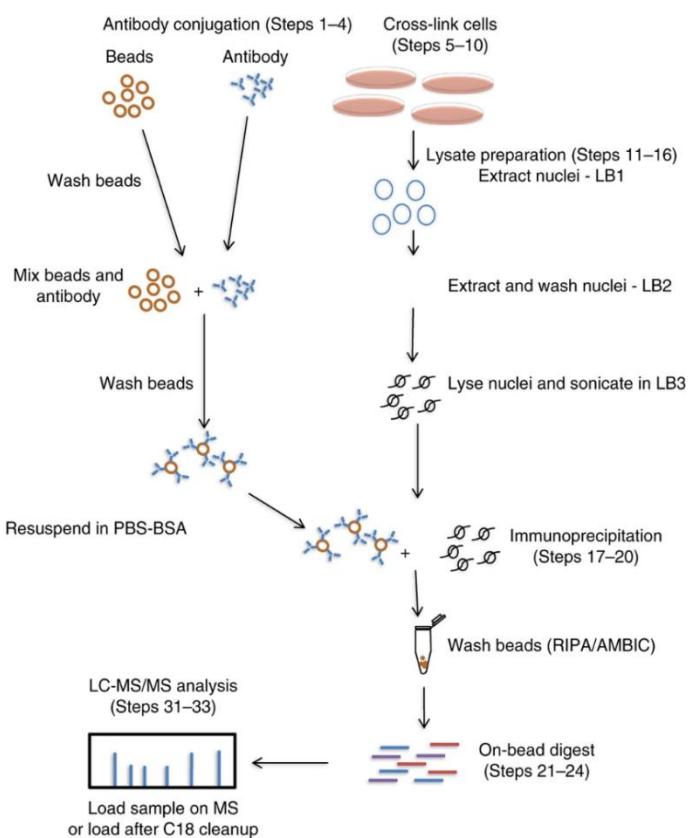
## Culture cellulaire

La lignée cellulaire humaine de glioblastome U251 a été obtenue auprès de Sigma et a été cultivée dans du milieu Dulbecco's modified Eagle's (DMEM, Gibco<sup>TM</sup>) supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal (SVF) (Eurobio), 1% de glutamine (Gibco<sup>TM</sup>) et 1% de pénicilline/streptomycine (Gibco<sup>TM</sup>). Les cellules sont maintenues dans un incubateur humide à 37 °C et 5% de CO<sub>2</sub>. Le témozolomide (CAS#, Bio-techno) a été dissous dans du diméthylsulfoxyde (DMSO ; Sigma-Aldrich) et utilisé à 50µM dans le milieu de culture.

## RIME

Environ 20 millions de cellules à 90% de confluence ont été fixées avec du formaldéhyde à 1% pendant 10 min à température ambiante. De la glycine 0,25 M final a été ajoutée pour l'arrêt de la réaction. Après deux lavages au PBS froid, les cellules ont été récoltées dans du PBS supplémenté avec un cocktail d'inhibiteurs de protéase 1X (Roche) et centrifugées à 4°C à 800 g pendant 5 minutes. Le culot cellulaire a ensuite été lysé 10 minutes à 4°C avec 10 ml de tampon LB1 (50 mM Hepes pH 7,5, 140 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10% glycérol, 0,5% NP-40 et 0,25% Triton X-100). Après 5 min de centrifugation à 2000g, le culot a ensuite été dissous dans 10 ml de tampon LB2 (Tris 10 mM pH 8,0, NaCl 200 mM, EDTA 1 mM et EGTA 0,5 mM) pendant 5 minutes à 4°C. Enfin, après une étape de centrifugation de 5 minutes à 2000g, le culot a été repris dans 300 µL de tampon LB3 (10 mM Tris pH 8,0, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0,5 mM EGTA, 0,1% Na-déoxycholate et 0,5% N-lauroylsarcosine) et soumis à sonication pendant 3 cycles de 7 minutes (30 secondes ON/30 secondes OFF) avec le Bioruptor<sup>®</sup> Plus (Diagenode Cat# B01020001). Après avoir ajouté du Triton X-100 à 1% final, le lysat a été vortexé puis clarifié par centrifugation à 20 000g pendant 10 minutes à 4°C. En parallèle les billes magnétiques appropriées (protéine G) ont été préparées. Brièvement, 100µL de suspension de billes ont été séparées de leur surnageant à l'aide d'un support magnétique pendant 1 à 2 min, le tout sur glace. Une fois le surnageant retiré, les billes ont été lavées 4 fois avec 1 ml de BSA à 5 mg/ml

(PBS/BSA). Les billes ont finalement été reprises dans 500 µl de PBS/BSA auxquels ont été ajouté 10 µg d'anticorps pour l'immunoprécipitation (BCL11A, NBP2-75455, Novus Biological ; DNMT1, Sc-10221 ; IgG, Cell Signaling, 11/2019). Le mélange a été incubé pendant 6h à 4°C sur portoir rotatif. Pour finir, les billes ont été lavées 5 fois avec 1 ml de PBS/BSA à l'aide du support magnétique, le tout sur glace. Le lysat protéique obtenu a été mélangé avec le complexe anticorps-billes et incubé à 4 °C pendant la nuit sur portoir rotatif. Le complexe anticorps-billes a ensuite été lavé 10 fois avec du tampon RIPA (radio-immunoprecipitation assay) froid et deux fois avec du tampon AMBIC (100 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>) fraîchement préparé. Une fois toutes traces de tampon retirées, les billes ont été congelées instantanément dans le l'azote liquide puis conservées à -80°C.



**Figure 29. Illustration du protocole de RIME (Mohammed et al., 2016)**

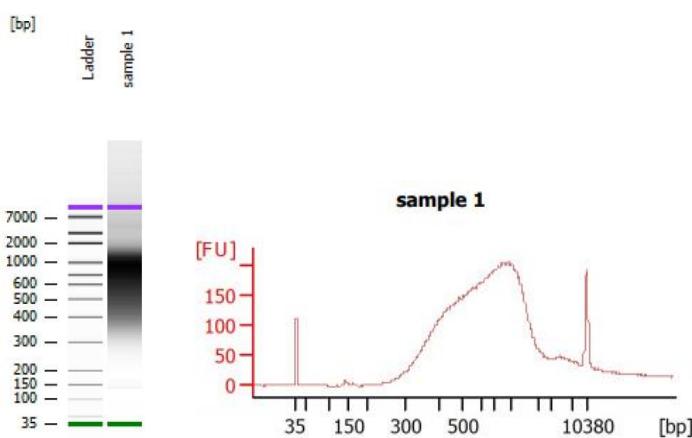
Les étapes suivantes ont été réalisées au laboratoire OSHU selon le protocole déjà décrit (Mohammed et al., 2016). Brièvement, les billes ont subi une digestion enzymatique par

ajout de trypsine, le tout à 37 °C pendant la nuit et sous agitation. Après quoi, les billes ont subi une nouvelle digestion de 4 h à 37 °C. Une fois le surnageant contenant les protéines récupéré, il a subi une dernière digestion à l'acide formique. Suite à quoi, l'échantillon et les peptides qu'il contient a été dessalé par extraction en phase solide sur colonne. Enfin, après reconstitution, l'échantillon a été soumis à analyse par LC-MS/MS. Pour chaque échantillon, 4 µl ont été injectés à un débit de 300 nl/min.

## Immunoprécipitation de Chromatine (chIP)

Les cellules ont été fixées avec du formaldéhyde à 1 % pendant 10 minutes à température ambiante, puis la réaction a été arrêtée avec de la glycine 0,25 M final pendant 2 minutes à température ambiante. Les cellules ont été rincées deux fois avec du PBS froid. Les cellules ont été récoltées dans 0,5 ml de PBS froid contenant un cocktail d'inhibiteurs de protéase 1X (Roche) et centrifugées à 4°C à 800 g pendant 5 minutes. Le culot cellulaire a ensuite été lysé pendant 10 minutes à 4°C avec 10 ml de tampon LB1 (50 mM Hepes pH 7.5, 140 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10% glycérol, 0,5% NP-40 et 0,25% Triton X-100). Après 5 min de centrifugation à 2000g, le culot a ensuite été dissous dans 10 ml de tampon LB2 (10 mM Tris pH 8,0, 200 mM NaCl, 1 mM EDTA et 0,5 mM EGTA) pendant 5 minutes à 4°C. Enfin, le lysat a été culoté par centrifugation à 2000g pendant 5 minutes à 4°C. Le culot obtenu a été remis en suspension dans le tampon LB3 (10 mM Tris pH 8.0, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0,5 mM EGTA, 0,1 % Na-deoxycholate et 0,5% N-lauroylsarcosine) et soumis à sonication pendant 3 cycles de 7 minutes (30 secondes ON / 30 secondes OFF) avec l'appareil de sonication Bioruptor® Plus (Diagenode Cat # B01020001). Après avoir ajouté du Triton X-100 à 1% final, le mélange a été clarifié par centrifugation à 20 000g pendant 10 minutes à 4°C. La chromatine de 2x10<sup>7</sup> cellules ainsi obtenue a été incubée, à 4°C pendant la nuit sous rotation, avec des billes magnétiques couplées à 5 µg d'anticorps (CTCF, lapin, C15410210 ; H3K4me2, lapin, C15410035 ; H3K36me3, lapin, C15410058 ; H4K20me1, souris, C15200147 ; Diagenode ; H3K9ac, lapin, cat#39917 ; H3K4me3, lapin, cat#39159 ; H3K4me1, mouse, cat#39635 ; Active Motif ; BCL11A, lapin, NBP2-75455,

Novus Biological). Le jour suivant, les billes ont été lavées 6 fois dans 1 ml de tampon RIPA sur glace et deux fois avec du Tris-HCl 10mM pH8. La chromatine a été éluée des billes par incubation dans 100 $\mu$ l de tampon d'élution (50 mM Tris-HCl pH 8, 10 mM EDTA, 1% SDS, 50  $\mu$ g/mL proteinase K) pendant une nuit à 65°C sous agitation. Enfin, la chromatine a été incubée avec 50  $\mu$ g/mL de RNase A pendant 30 min à 37°C. Après avoir séparé le surnageant des billes, la chromatine a été nettoyée à l'aide des billes NucleoMag NGS (Macherey-Nagel) et la préparation de la librairie a été effectuée à l'aide du kit NEBNext® Ultra™ II DNA Library Prep Kit for Illumina® (NEB) en suivant les instructions du fournisseur. La librairie NGS ainsi obtenue a été validé par lecture sur puce ADN (Agilent High Sensitivity DNA kit) et à l'aide du 2100 Bioanalyzer instrument (Agilent).



**Figure 30. Exemple de profil de librairie NGS avec le 2100 Bioanalyzer instrument**

## Analyse ChIP-seq

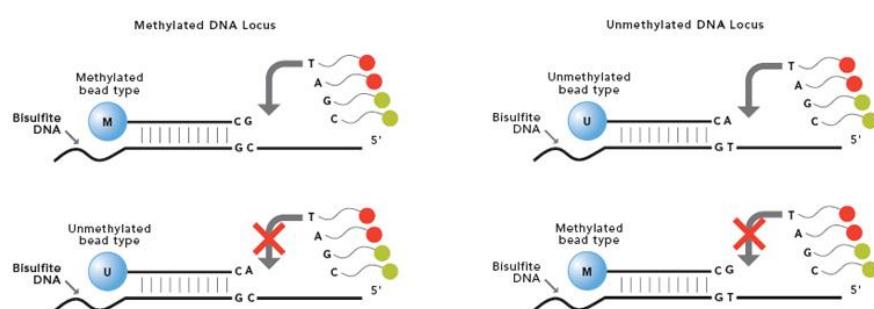
Les librairies ChIP-seq H3K27ac ont été séquencées avec l'appareil Illumina NovaSeq 6000 par la plateforme GenoBird (Nantes, France). La qualité des fichiers Fastq a été contrôlée grâce à FastQC v0.11.5 (Andrews S. (2010). FastQC : un outil de contrôle de qualité pour les données de séquence à haut débit. Disponible en ligne à l'adresse suivante : <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>). Les reads ont été séparés des séquences d'adapteurs puis filtrés à l'aide de Trim Galore v0.6.6 (Krueger F., 2015, Trim

galore : A wrapper tool around Cutadapt and FastQC to consistently apply quality and adapter trimming to FastQ files. Disponible en ligne sur [https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/trim\\_galore/](https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/trim_galore/)). Les reads ont ensuite été alignés avec bowtie2 v2.3.1 sur le génome de référence hg38 (Langmead & Salzberg, 2012). Enfin, l'identification des pics de H3K27ac a été effectuée à l'aide de MACS2 v2.2.6 (<https://doi.org/10.1186/gb-2008-9-9-r137>) avec les paramètres par défaut (Y. Zhang et al., 2008). Les pics d'acétylation ont été fusionnés en un ensemble de pics standardisés entre les réplicats et les conditions avec bedtools v2.26.0 (Quinlan & Hall, 2010). À partir de cette matrice de comptage, les pics d'acétylation ont été associés à des gènes en fonction du domaine topologiquement associé (TAD) qu'ils chevauchent et du gène le plus exprimé dans ce TAD. Les coordonnées du TAD ont été obtenues à partir des données HiC disponibles grâce au travail de Chen B. sur les cellules U251 traitées avec le TMZ (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov.ezproxy.u-pec.fr/geo/query/acc.cgi?acc=GSE125243>) et les fichiers ont été croisés à l'aide de bedtools. L'algorithme ROSE a été utilisé avec les paramètres par défaut pour distinguer les super-enhancers des enhancers (Orlova et al., 2020). Les listes d'enhancers et de super-enhancers (contenant les coordonnées et le signal de lecture) ont été traitées avec DESeq2 pour identifier les régions différentiellement actives entre les conditions.

## Infinium MethylationEPIC Array

Des cellules ayant subi une cinétique d'exposition à 50µM de TMZ ont été récoltées à différents temps. Nous disposons d'un total de 6 conditions en duplicat dont une condition contrôle, une condition résistante et des conditions intermédiaires (J4, J9, J12, J16). L'ADN génomique de ces échantillons a été extrait à l'aide du kit DNeasy Blood and Tissue (QIAGEN, Hilden, Germany) et de l'automate QIAcube (QIAGEN, Hilden, Germany). L'ADN ainsi purifié a été envoyé pour analyse Infinium MethylationEPIC Array Service (Diagenode Cat# G02090000). Infinium MethylationEPIC Array est une

technologie basée sur un séquençage Illumina® permettant la quantification de la méthylation de plus de 850 000 sites CpG. Le principe de cette technologie réside dans le séquençage au bisulfite. Tout d'abord, l'ADN est désaminé avec le kit de méthylation d'ADN EZ-96 (Zymo Research) puis soumis à un traitement au bisulfite. Le bisulfite permet la conversion des cytosines non méthylées en uracile. Après traitement au bisulfite, l'ADN est amplifié et les uraciles se transforment en thymine. L'ADN est ensuite fragmenté par voie enzymatique et appliqué sur la puce. Deux types de sondes sont utilisées : des sondes reconnaissant les sites méthylés (M) et des sondes reconnaissant les sites non méthylés (U). Une réaction d'extension d'une seule base peut avoir lieu par incorporation d'un ddNTP marqué puis activé par fluorescence. Le niveau de méthylation pour le locus interrogé est déterminé en calculant le rapport d'intensité de signaux de fluorescences entre les sondes méthylées et non méthylées. La qualité de la conversion est contrôlée par qPCR sur le locus méthytré DNAJC15 et les deux locus GNAS (un allèle méthytré et l'autre non). De l'ADN dérivé d'échantillons sanguins est amplifié en parallèle et servira de contrôle positif. Un échantillon passe le contrôle qualité lorsque la valeur de Ct (cycle threshold) enregistrée pour les deux locus GNAS ou pour le locus DNAJC15 atteint le seuil au plus tard 5 cycles après le contrôle positif.



**Figure 31. Illustration de la réaction d'hybridation Infinium MethylationEPIC Array**

A droite, le locus cible CpG est non méthylé et s'hybride parfaitement à la sonde U, permettant l'extension et la détection du signal de fluorescence. Cependant, un mésappariement G-T à lieu lorsque le locus s'hybride à la sonde M, inhibant l'extension. Si le locus CpG d'intérêt est méthylé, c'est l'inverse qui se produit, comme représenté à gauche de la figure.

## Interférence par ARN

Les cellules ont été ensemencées à  $2.10^5$  cellules par puits dans des plaques 6 puits de sorte à avoir environ 50% de confluence le jour de la transfection. Le lendemain, les cellules ont été transfectées avec les concentrations indiquées par le fournisseur en esiBCL11A (EHU145981, Sigma), ou siCT (siRLUC; EHURLUC, Sigma) en utilisant le transfectant Lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen; Thermo Fisher Scientific, Inc). La transfection a été réalisée en présence de milieu appauvri en sérum (Opti-MEM, Gibco™ Cat3#11058021). Après 5 heures, le milieu a été supplémenté avec du milieu complet. Les cellules ont été utilisées ou récoltées 24h à 48h après la transfection.

## Western blot

Les culots cellulaires ont été lysés dans du tampon RIPA pendant 1h15 sur glace puis soumis à sonication pendant 20 minutes et centrifugés afin d'extraire les protéines. La concentration protéique a ensuite été mesurée par dosage BCA (Uptima BC Assay reagent, Interchim) et une même quantité de protéines (50 µg minimum) de chaque condition a été déposée puis séparée par électrophorèse sur gel de polyacrylamide dans du tampon de migration (cat#1610772, Biorad). Les protéines ont été transférées sur une membrane de polyfluorure de vinylidène (Immobilon-P membrane, IPVH00010, Millipore). Après que la membrane ait été bloquée avec du Phosphate Buffer Saline (PBS) 0,1% Tween 20, 5% lait pendant 1 heure à température ambiante ; les protéines ont été marquées avec des anticorps primaires dilués dans du PBS 0,1% Tween 20; 1% lait (BCL11A, NBP2-75455, lapin, 1:250, Novus Biological ; Cas9, 7A9-3A3, mouse, 1:1000, Cell Signaling ; β-actine ACTN05 (C4), souris, 1:1000, ThermoFisher Scientific ; HMGN3, HPA027971, lapin, 1:50, Sigma ; β-tubuline, sc-23949, souris, 1:200, Santa Cruz). Après lavages au PBS 0,1% Tween 20, les membranes ont été incubées avec des anticorps secondaires spécifiques dilués dans du PBS 0,1% Tween 20, 1% lait (1/5000, anti-souris AB\_2338525 ou anti-lapin AB\_2337936 ; Jackson Laboratory). Les bandes protéiques ont été détectées avec du

réactif de chimiluminescence ECL (Enhanced ChemiLuminescence) (Clarity Western ECL, Biorad) en utilisant l'imageur Chemidoc MP (Biorad).

## Test de viabilité cellulaire au MTT

Les cellules ont été ensemencées à 1000 cellules par puits dans des plaques 96 trous et traitées 24h après avec une gamme de concentrations de TMZ (0; 25; 50; 100; 200; 300; 400; 500 µM) dans du milieu de culture supplémenté avec 1% de SVF. Après 72 heures, 10 µl de MTT (VWR Chemicals, France) ont été ajoutés par puits dans le milieu, suivi d'une incubation à 37°C avec 5% de CO<sub>2</sub> pendant 3 heures. Après élimination du milieu, les cristaux formés ont été dissous dans 200 µl de Diméthylsulfoxyde (DMSO). Les densités optiques ont été lues à 570 nm avec un spectrophotomètre (Victor X3, Perkin Elmer).

## Génération d'une lignée stable U251 Cas9

Les cellules U251 ont été transduites par le lentivirus lentiCas9-Blast (Addgene, réf. 52962-LV), sélectionnées avec de la blasticidine et clonées selon les instructions du fabricant. L'expression de la protéine Cas9 a été vérifiée par Western-Blot avec un anticorps anti-Cas9 (Cell Signaling, réf. 7A9-3A3).

## Ciblage CRISPR Knock-Out

La bibliothèque lentivirale prêt à l'emploi Brunello CRISPR Knock-Out pooled library a été achetée auprès d'Addgene (réf. 73178-LV ; don de David Root et John Doench (Doench et al., 2016). Un clone U251 exprimant Cas9 de manière stable a été transduit avec la librairie lentivirale avec une MOI de 0,5 et sélectionné avec de la puromycine pendant une semaine selon les instructions du fabricant. Les cellules ont été expansées et séparées en 2 sous-populations de 100 millions de cellules : une population traitée au DMSO (condition véhicule) et une population traitée au temozolamide 50µM. La population DMSO a été renouvelée tous les 3 jours afin de maintenir un minimum de 100 millions de cellules. Le milieu et le TMZ ont été renouvelés tous les 2 jours pour la population TMZ. Les

populations témoin et TMZ ont été récoltées après 18 jours de traitement. L'ADN génomique a été purifié avec le kit QIAamp DNA Maxi Blood (réf. 51192). Les bibliothèques de sgRNA ont été produites par PCR sur l'ADN génomique en utilisant les oligonucléotides personnalisés P5 et P7 (de IDT ; voir Tableau 1) et le mélange Q5 High-Fidelity 2X (NEB, réf. M0492S). Les bibliothèques ont été quantifiées par qPCR, regroupées et séquencées par Illumina HiSeq 2500. Les données de séquençage ont été analysées par MAGeCKFlute (B. Wang et al., 2019).

## RT-qPCR

L'extraction d'ARN a été réalisée à l'aide du RNeasy Mini QIAcube Kit (Qiagen, France). 500 ng d'ARN a été retro-transcrit en ADN complémentaire (ADNc) en utilisant le kit (QuantiTect Reverse Transcription kit 205313) à l'aide du Thermocycleur (MyCycler, Biorad). La PCR quantitative a été réalisée avec le SYBR green PCR Master Mix (Rotor-Gene, Qiagen) en utilisant le thermocycleur Rotor-Gene Q (Qiagen, France). La quantité relative des ARNs a été déterminée à l'aide de la méthode  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . Les transcrits des gènes ACTINE et RPLP0 ont été utilisés comme contrôles internes.

## Proximity Ligation Assay

Les cellules ont été ensemencées sur lamelles et incubées à 37°C avec 5% de CO<sub>2</sub> jusqu'à atteindre 60 % de confluence environ. Les cellules ont ensuite été fixées dans du paraformaldéhyde 4% pendant 15 minutes à température ambiante. Les cellules ont été perméabilisées dans du PBS-Triton 0,5% pendant 30 minutes à température ambiante. Le PLA a été réalisé à l'aide du kit DuoLink® in situ (Sigma) selon le protocole du fournisseur. Brièvement, après une étape de saturation de 30 minutes à 37°C, les cellules ont été marquées avec un anticorps primaires ciblant BCL11A (NBP2-75455, 1:100, rabbit, Novus Biological, ou HPA02900, 1:100 rabbit, Sigma) et un anticorps primaire ciblant DNMT1 (ab13537, 1:100, mouse, Abcam) pendant 1 heure à 37°C, suivi du marquage avec les sondes PLA ((DUO92001) Duolink® in Situ PLA® Probe Anti-Mouse PLUS, (DUO92005)

Duolink® in Situ PLA® Probe Anti-Rabbit MINUS, (DUO92004) Duolink® in Situ PLA® Probe Anti-Mouse MINUS, (DUO92002) Duolink® in Situ PLA® Probe Anti-Rabbit PLUS, SIGMA) pendant 1 heure à 37°C. Après les étapes de ligation et d'amplification, les lamelles ont été montées sur des lames de verre avec un milieu de montage contenant du DAPI (Diaminophenylindol) (cat#104139, Abcam). Dans la condition contrôle, l'omission de chacun des 2 anticorps primaires séparément a été réalisée. Les lames ont ensuite été observées au microscope confocal (Nikon A1 Rsi) et les foci ont été quantifiés sur au moins 30 cellules et 3 champs différentes à l'aide d'une macro sur le logiciel ImageJ.

## Séquençage ARN

Les cellules ont été traitées avec 50µM de TMZ et récoltées à différents temps d'une cinétique. Les culots cellulaires ont été immédiatement repris dans du buffer RLT (Qiagen) et conservés à -80°C jusqu'à utilisation. Les ARNs ont été extraits à l'aide de l'appareil Qiacube et du protocole Qiagen RNeasy Cells and tissue. L'expérience a été réalisée quatre fois de manière indépendante. Le RNAseq a été réalisé avec la technologie Illumina (Active Motif). Une fois isolés et sélectionnés, les ARNm ont été fragmentés et leurs brins complémentaires ont été synthétisés pour obtenir des ADN complémentaire (ADNc), autrement appelés « reads ». La première étape d'analyse consiste en l'alignement des reads à un génome de référence. Le génome de référence utilisé est le hg38. Le nombre de reads pour chaque gène est quantifié. L'analyse différentielle est effectuée par DESeq2 afin de calculer un fold-change et y attribuer une p-value. La p-value a été ajustée selon la procédure de Benjamini-Hochberg.

## Analyse ARN-seq

Les librairies 3'-ARN-seq ont été produites et séquencées avec l'appareil Illumina NovaSeq 6000 par la plateforme GenoBird (Nantes, France) (Charpentier et al., 2021). L'analyse de l'expression différentielle des gènes a été réalisée à l'aide de R v3.6.3 et du paquet R DESeq2 v1.24.0 (Love et al., 2014). Enfin, les paquets R ggplot2 v3.3.4 (Wickham, H., 2016.

ggplot2 : Des graphiques élégants pour l'analyse de données, Springer-Verlag New York.  
Disponible sur : <https://ggplot2.tidyverse.org>) et ggrepel v0.9.1 (Slowikowski K., 2021).  
ggrepel : Automatically Position Non-Overlapping Text Labels with 'ggplot2'. Disponible à l'adresse suivante : <https://cran.r-project.org/package=ggrepel>) ont été utilisés pour réaliser les volcano plot. Les p-value ont été corrigées par la méthode de Benjamini-Hochberg. Pour déterminer les gènes présentant une expression différentielle significative, nous avons appliqué des seuils de 2,5 fold-change et de  $10^{-10}$  p-value ajustée.

## Test d'activité apoptotique

L'activité apoptotique des cellules a été mesurée à l'aide des kits de détection de la caspase-3/7 FLICA 660 (Immunochemistry Technologies, États-Unis), conformément aux directives du fabricant. Brièvement, les cellules ont été récoltées et comptées, puis, 60 000 cellules ont été remises en suspension dans 295µL de PBS avant d'ajouter 5 µl de solution de travail FLICA 660. Après 1h30 d'incubation à 37 °C et deux lavages, les cellules ont été analysées avec le cytomètre en flux BD Accuri C6. Des cellules non marquées et des cellules soumises à un traitement à la staurosporine ont servi, respectivement, de contrôle négatif et positif.

## Isolation des exosomes et analyses ELISA

Les exosomes ont été isolés du sérum à l'aide du kit ExoEasy Maxi (Qiagen, réf. 76064). Selon les instructions du fabricant, le sérum a été centrifugé à 16000 g / 10 min / 4°C pour exclure les grandes vésicules. Ensuite, 2 mL de tampon XBP ont été ajoutés à 2 mL de sérum clarifié. Le mélange a été déposé sur colonne ExoEasy. Après une centrifugation à 500 g / 1 min / 4°C, 4 mL de tampon XWP ont été ajoutés et la colonne ExoEasy a été centrifugée à 5000 g / 5 min / 4°C (étape de lavage). La colonne a ensuite été transférée dans un nouveau tube de collecte, et 400 µL de tampon XE ont été ajoutés et centrifugés à 5000 g / 5 min / 4°C pour collecter l'éluat (exosomes). Les exosomes ont ensuite été lysés dans du tampon RIPA (Cell Signaling Technology, réf. #9806) avec un mélange

d'inhibiteurs de protéase (Roche). Les protéines exosomales ont été quantifiées à l'aide d'un kit de réactifs de dosage des protéines BCA (Uptima BC Assay reagent, Interchim). Ensuite, 15 µg de protéines ont été utilisés pour des ELISA.

## ELISA

Les kit ELISA suivant ont été utilisés sur des extraits protéiques, du sérum et des surnageants de culture en suivant les instructions des fabricants : kit ELISA Cyclin D1 humain (Abcam, France, Ab214571), kit ELISA BIRC3/cIAP2 humain (LSBio, France, LS-F56), kit EpiQuik HDAC11 (Euromedex, France, P-4054), kit ELISA JAK1 humain (NovusBio, France, NBP2-80249), kit ELISA TOP1 humain (MyBioSource, US, MBS76385), kit ELISA DuoSet MMP-2 humain (Bio-techne, France, DY902), kit ELISA DuoSet GM-CSF humain (Bio-techne, France, DY215, DY215-05), and kit ELISA RAF1 humain (LSBio, France, LS-F7688).

## Patients et échantillons

Le plasma a été collecté auprès de patients atteints de glioblastomes et traités à l'Institut de Cancérologie de l'Ouest (ICO, <http://www.ico-cancer.fr>). Tous les patients recrutés ont donné leur consentement éclairé et signé. Tous les échantillons collectés et les informations cliniques associées ont été enregistrés dans une base de données (N° DC-2018-3321) validée par le ministère français de la recherche. Les échantillons biologiques ont été stockées au "Centre de Ressources Biologiques-Tumorthèque" (Institut de Cancérologie de l'Ouest, Saint-Herblain, F44800, France).

## Analyse statistique

Les données sont représentées par la moyenne ± écart-type. Les analyses statistiques ont été effectuées avec un test non paramétrique pour petits échantillons non appariés (Mann-Whitney U Test). Les différences ont été considérées comme significatives pour une p-value inférieure à 0,05.

## RÉSULTATS ET DISCUSSION

---

# Chapitre 1 : Etude des dynamiques transcriptionnelle et chromatinienne pendant le traitement du glioblastome par le témozolomide pour la prédition de vulnérabilités thérapeutiques.

## 1. Préambule

Le glioblastome multiforme (GBM) est le cancer du cerveau le plus fréquent et le plus agressif chez l'adulte. La thérapie standard des GBM nouvellement diagnostiqués comprend la chirurgie suivie d'une radiothérapie concomitante à de la chimiothérapie avec le témozolomide (TMZ) et d'un traitement adjuvant par le témozolomide seul. La grande hétérogénéité cellulaire et la plasticité des GBM et de leur microenvironnement tumoral entraînent rapidement l'apparition de résistances, menant malheureusement à une impasse thérapeutique. Parmi les pistes de recherche visant à contourner la résistance et augmenter l'efficacité des traitements figure l'utilisation dynamique de thérapies ciblées. Sur la base de cette idée, nous avons émis l'hypothèse que l'évolution des profils épigénétique et transcriptomique, induite par le TMZ, pourrait être responsable de la surexpression de gènes/protéines candidats à une thérapie ciblée. Nous avons fait le choix de nous concentrer sur la dynamique de la marque d'histones H3K27ac. En effet les aberrations de marques d'histones sont vraisemblablement des défauts moléculaires très courants dans les gliomes, responsables d'altérations de la transcription (Court et al., 2019). Qui plus est, l'acétylation de l'histone H3 sur la lysine 27 nous indique la répartition de zones transcriptionnellement très actives que sont les enhancers et les super-enhancers. En utilisant des données de RNA-seq et de ChIP-seq qui nous renseignent sur l'évolution du transcriptome et du paysage H3K27ac chromatiniens, nous souhaitons mettre en évidence des régions transcriptionnellement actives, soit surexprimées soit hyperacétylées. En confrontant ces données avec une liste de protéines candidates à des thérapies ciblées, nous voulons isoler des gènes d'intérêts, valider leur surexpression au niveau protéique et vérifier la vulnérabilité des cellules de glioblastome aux inhibiteurs de ces protéines. La détection de ces signatures pourrait alors servir d'outil biomarqueur

pour identifier les patients susceptibles de répondre à la thérapie ciblée en question. Nos expériences ont été menées sur une lignée cellulaire de glioblastome (U251) au cours du traitement par le TMZ sur des cellules sensibles (D0), tolérantes (D9), et résistantes (D30) ainsi que sur des prélèvements sanguins de patients.

## 2. Article (en cours de rédaction)

**Transcriptional and chromatin dynamics during temozolomide treatment of glioblastoma predict therapeutic vulnerabilities for combined therapies with temozolomide**

Manon Duforestel<sup>1,2,3,4</sup>, Yuna Landais<sup>1,2,6</sup>, Elen Goujon<sup>1,2,6</sup>, Arulraj Nadaradjane<sup>1-2-3-4-5</sup>, Anaïs F. Bardet<sup>7</sup>, Gwenola Bougras-Cartron<sup>1-2-3-4</sup>, François M Vallette<sup>1-2-5</sup>, Jean-Sébastien Frenel<sup>1-8</sup>, Aurélien A. Sérandour<sup>1,2,3,4,6†</sup> and Pierre-François Cartron<sup>1-2-3-4-5\*†</sup>

<sup>1</sup> CRCINA, INSERM, Université de Nantes, Nantes, France.

<sup>2</sup> Equipe Apoptose et Progression tumorale, LaBCT, Institut de Cancérologie de l'Ouest, Saint Herblain, France.

<sup>3</sup> Cancéropole Grand-Ouest, réseau Niches et Epigénétique des tumeurs (NET).

<sup>4</sup> EpiSAVMEN network (Région Pays de la Loire).

<sup>5</sup> LabEX IGO, Université de Nantes, France.

<sup>6</sup> Ecole Centrale Nantes, Nantes, France.

<sup>7</sup> Biotechnology and Cell Signaling, CNRS UMR7242, University of Strasbourg, Strasbourg, France.

<sup>8</sup> Institut de Cancérologie de l'Ouest, Saint-Herblain, France.

<sup>†</sup> These authors contributed equally to this work

\*Correspondence: pierre-francois.cartron@inserm.fr, CRCINA, INSERM U1232, Equipe Apoptose et Progression tumorale, LaBCT, Institut de Cancérologie de l'Ouest, Boulevard du Pr Jacques Monod, Saint Herblain, 44805, France.

Running title: GBM targeted therapy based on epimark detection

Keywords: glioblastoma, targeted therapy, epimark, H3K27ac, enhancer, super-enhancer.

Glioblastoma multiforme (GBM) is the most common and aggressive brain cancer in adults. The high cellular heterogeneity and plasticity of GBM and its tumor microenvironment rapidly lead to the development of resistance to the standard chemotherapy, temozolomide. Among the ways of research aimed at countering resistance and increasing the efficacy of treatments is the use of targeted therapies. Based on this idea, our experiments were conducted on a glioblastoma cell line during treatment with TMZ on sensitive, tolerant and resistant cells. Our work shows that the acquisition of resistance is associated with H3K27ac dynamics, resulting in the activation of enhancers and super-enhancers. Furthermore, differentially expressed genes were identified using RNA-seq data generated at different resistance states. Through these three approaches combined with protein quantification, we were able to identify potential therapeutic targets appearing in resistant and tolerant cells. We show that pharmacological inhibition of BIRC3, CCND1/CDK4-6, CSF2, HDAC11, RAF1 and TOP1 participate in counteracting tolerance or resistance to TMZ in our cell model. Finally, we could detect a dynamic enrichment of the proteins BIRC3, CCND1 and HDAC11 in serum exosomes from two GBM patients during the course of their treatment. Thus, our data provide a proof of concept of detecting TMZ-induced vulnerabilities to treat patients with targeted therapies.

## **INTRODUCTION**

Glioblastoma multiforme (GBM) is the most frequent and aggressive brain cancer in adults. The standard treatment for newly diagnosed GBM includes surgery followed by radiotherapy plus concomitant alkylating agent temozolomide (TMZ) taken orally. Among the avenues of research aiming at improving treatment efficacy, there is the dynamic use of targeted therapies. The principle of targeted therapy in oncology is based on the selective inhibition of one protein or non-coding RNA which the overexpression drives a pro-cancer phenotype i.e. growth, progression and spread of cancer. Thus, the administration of targeted therapy depends on the presence of a biomarker in a specific sub-population of patients. Several examples illustrating this approach can be reported. We here mention the use of Trastuzumab (monoclonal antibody inhibiting the HER2/neu receptor) for which its administration is based on a HER2 assay because only patients tested positive for HER2-metastatic breast cancer have FDA approval to receive the drug (Commissioner, 2020). Following this example, several companion tests are available to guide the administration of targeted therapies (Health, 2021). In addition, several studies report that the more a target is expressed the more effective the therapy is. Lochmann

*et al.*, report Venetoclax (a selective BCL2 inhibitor) as a promising new therapy for high BCL2-expressing tumors (Lochmann *et al.*, 2018). Gelsomino *et al.*, report that mTOR expression could be used as a potential predictive biomarker for the use of the mTOR inhibitor Everolimus to treat advanced neuroendocrine tumors (Gelsomino *et al.*, 2020). Several studies suggest that the PARP expression or activity could be used to predict the sensitivity of human cancer cells to PARP inhibitors (Michels *et al.*, 2013; Pettitt *et al.*, 2013).

Based on this idea and in the context of GBM, we hypothesized that the detection of TMZ-induced epigenetic signatures responsible for the genes/proteins overexpression candidates for targeted therapy could be used as biomarkers to stratify cancer patients who could benefit from the targeted therapy in question. Particularly, we here postulated that TMZ-induced modifications of transcriptome, active enhancers (AE) and super-enhancers (SE) activity could be good indicators of overexpressed genes/proteins acting as biomarkers reflecting the dynamic appearance of vulnerabilities to targeted therapies during the TMZ administration.

Active enhancers and super-enhancers are specific regulatory sequences driving gene expression. The term “enhancer” was used for the first time to describe the effects of SV40 DNA on the ectopic expression of a cloned rabbit  $\beta$ -globin gene (Banerji *et al.*, 1981). Enhancers are classically defined as *cis*-acting DNA sequences that control the *cis*-activation of gene expression in an orientation-independent manner. Enhancers are typically 100 bp to 1 kbp in length. They can be located at several kb or Mb from their target promoters and have the ability to recruit transcription factors since enhancers include DNA motifs acting as transcription-factor binding sites (TFBSs) (Furlong & Levine, 2018). Active enhancers (AE) can be defined as genomic regions that interact with a promoter to enhance gene expression via the recruitment of transcription factor and/or RNAPII. Super-enhancers (SE), a term firstly used in 2013 (Lovén *et al.*, 2013; Whyte *et al.*, 2013), are described as large clusters of multiple enhancers (from 12.5 kb long) that strongly up-regulate the expression of targeted genes by forming a physical interaction with promoters due to a more important recruitment of TF, mediators and RNA Pol-II than typical enhancers. At molecular level, AE and SE can be characterized by several chromatin signatures including the acetylation of the Lysine 27 of histone H3 (H3K27ac). Super-enhancers can be distinguished from typical enhancers thanks to the bioinformatic tool ROSE (Lovén *et al.*, 2013; Whyte *et al.*, 2013).

Based on the dynamics of transcription, AE and SE occurring during the acquisition of TMZ resistance, we identify in this study several targeted therapies that could be combined with TMZ to increase the antitumor effect of TMZ. Our work also provides a proof of concept for the use

of exosomal proteins as biomarkers guiding the right time for a right patient to receive the suitable "TMZ+targeted therapy" combined therapy.

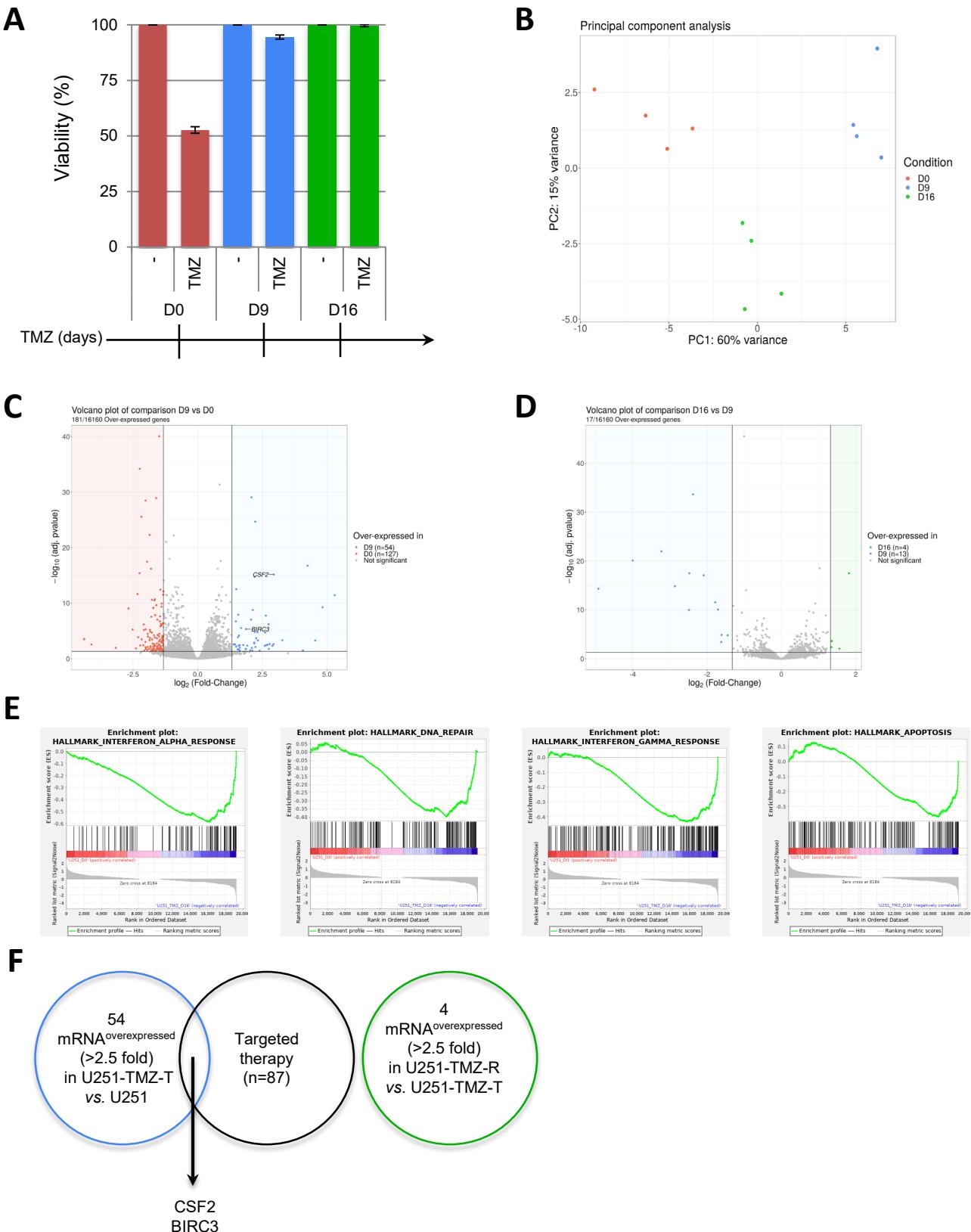
## RESULTS

### **Identification of therapeutic vulnerabilities occurring during the acquisition of TMZ resistance via RNA-seq experiments**

U251 cells were used as a model to study the dynamic appearance of vulnerabilities to targeted therapies during the TMZ treatment of glioblastoma multiforme. For this purpose, U251 cells were cultured in presence of 50 µM TMZ during 16 consecutive days (**Figure 1A**). Thus, we observed that U251 cultured during 16 consecutive days with TMZ presented a phenotype of TMZ-resistance, while cells cultured during 9 consecutive days with TMZ were weakly sensitive to TMZ that we termed TMZ tolerant (**Figure 1A**). Consequently, cells surviving at a TMZ exposure of 16 consecutive days were named U251-TMZ-R (Resistant), and cells surviving at a TMZ exposure of 9 consecutive days were named U251-TMZ-T (Tolerant). Parent cells being sensitive to TMZ, these cells were named U251-TMZ-S (Sensitive).

Four biologically independent 3'RNA-seq were firstly performed on U251-TMZ-S, U251-TMZ-T and U251-TMZ-R cells. A principal component analysis of our data showed that the quadruplicates were homogeneous between them and that each condition was distinct from the others (**Figure 1B**). Volcano-plots illustrate the differentially expressed genes between U251-TMZ-S and U251-TMZ-T (**Figure 1C**) and between U251-TMZ-T and U251-TMZ-R (**Figure 1D**). Especially, we noted that 54 genes were overexpressed in U251-TMZ-T in comparison with U251-TMZ-S (**Figure 1C and Supplementary Table T1**) and 4 genes were overexpressed in U251-TMZ-R in comparison with U251-TMZ-T (**Figure 1D and Supplementary Table T2**). We next performed a Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) to identify the biological processes affected by the acquired resistance of TMZ. GSEA analysis revealed that the most dysregulated genes during the acquired resistance of TMZ fell into α/γ interferon responses, apoptosis and DNA repair (**Figure 1E and Supplementary File 1**).

In order to identify putative therapeutic vulnerabilities occurring during the acquisition of TMZ resistance based on the RNA expression dynamics, we compared the list of up-regulated genes (at least 2.5 fold) to a list of 87 proteins for targeted therapies (**Supplementary Table T3**). In U251-TMZ-T cells, we identified both CSF2 and BIRC5 as potential targets for the development of therapies combining TMZ with drugs specifically targeting these two proteins



**Figure 1: Transcriptomics of U251 cells challenged with TMZ.**

**A.** Cell viability of U251 cells after 1 to 6 days exposure to 50 uM TMZ **B.** Principal component analysis of 3'RNA-seq libraries performed in quadruplicate in U251 cells treated for 0, 9 and 16 days. **C.** Volcano-plot representing the differential gene expression between 0 and 9 days of TMZ treatment. **D.** Volcano-plot representing the differential gene expression between 9 and 16 days of TMZ treatment. **E.** Four top biological processes enriched in TMZ-resistant cells from GSEA analysis : IFNa response, DNA repair, IFNg response and Apoptosis. **F.** Overlap between differentially expressed genes and targeted therapies.

in the context of U251-TMZ-T cells (**Figure 1F**). No vulnerability was identified with this approach for U251-TMZ-R cells.

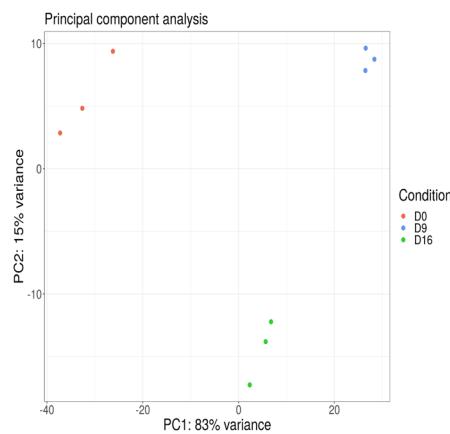
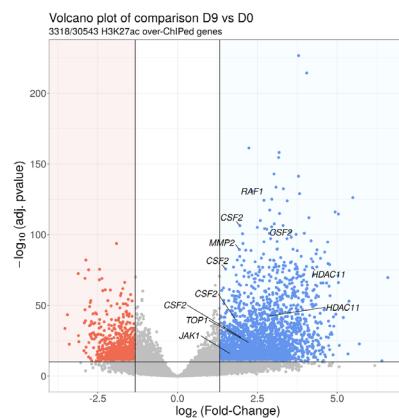
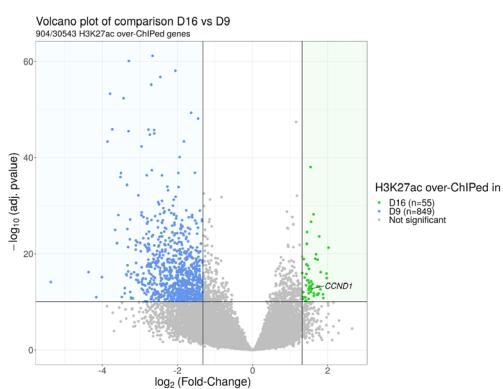
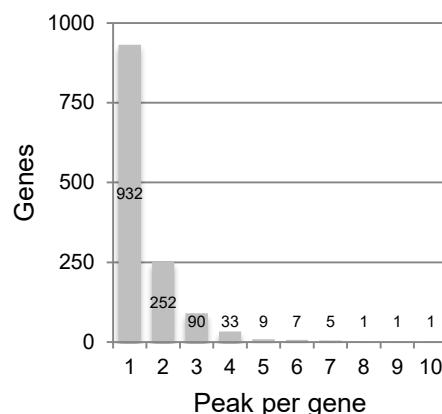
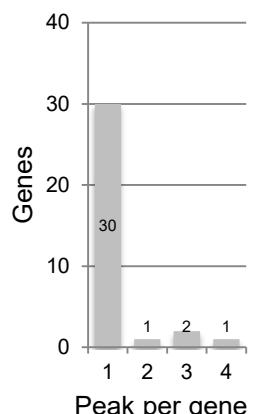
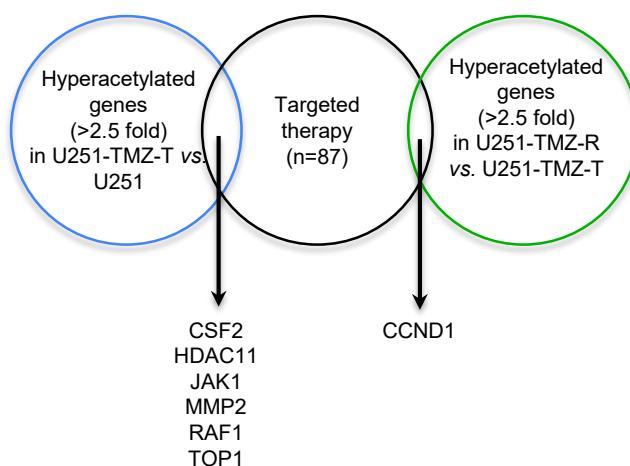
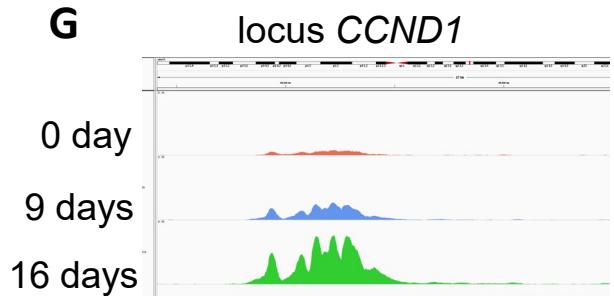
### **Identification of therapeutic vulnerabilities occurring during the acquisition of TMZ resistance via H3K27ac ChIP-seq experiments**

We then studied the histone acetylation in U251-TMZ-S, U251-TMZ-T and U251-TMZ-R using H3K27ac ChIP-seq in order to identify potential therapeutic vulnerabilities. A principal component analysis of the ChIP-seq peaks showed that each triplicate was homogeneous between them and that each condition was distinct from the others (**Figure 2A**). Volcano-plots illustrate that 2573 genomic regions showed increased H3K27ac levels in U251-TMZ-T compared to U251-TMZ-S (**Figure 2B**), while 55 genomic regions gained H3K27ac in U251-TMZ-R compared to U251-TMZ-T (**Figure 2C**). We next focused our study on the hyperacetylated regions seen in U251-TMZ-T and U251-TMZ-R. Using a method based on the consideration of topologically associating domains (TADs) to performed enhancer-to-gene annotation, we noted that 1331 genes were differentially hyperacetylated in U251-TMZ-T in comparison with U251-TMZ-S, and 1 to 10 peaks were associated with the same gene (**Figure 2D and supplementary Table T4**). 34 genes were differentially hyperacetylated in U251-TMZ-R in comparison with U251-TMZ-T, and 1 to 4 peaks were associated with the same gene (**Figure 2E supplementary Table T4**).

By comparing these genes with a list of 87 proteins for targeted therapies, we identified 6 potential therapeutic targets (CSF2, JAK1, HDAC11, MMP2, RAF1 and TOP1) in U251-TMZ-T cells and one therapeutic target (CCND1) in U251-TMZ-T cells (**Figure 2F**).

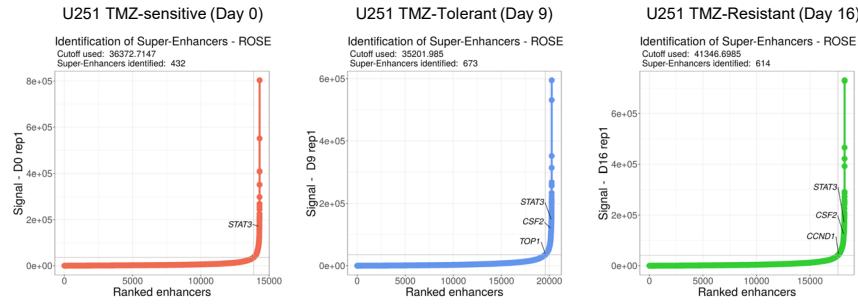
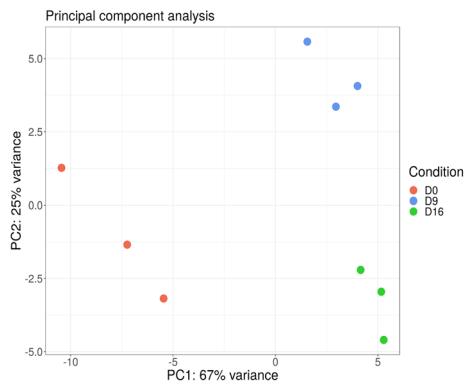
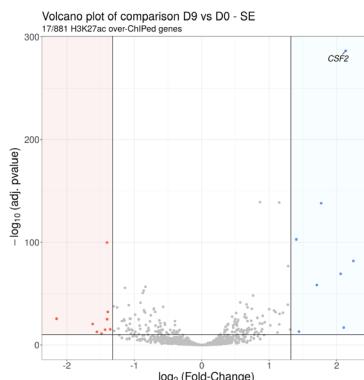
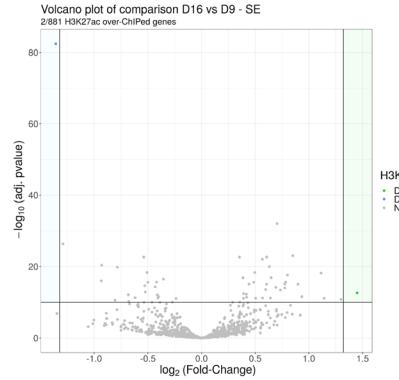
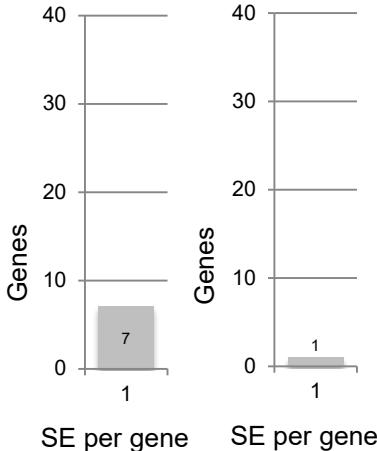
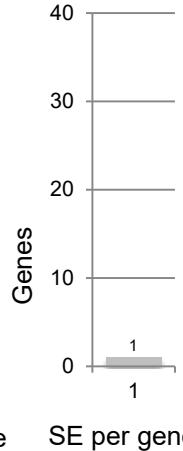
### **Identification of therapeutic vulnerabilities occurring during the acquisition of TMZ resistance via the identification of super-enhancers**

Our H3K27 ChIP-seq data were also used to identify super-enhancer (SE) using ROSE algorithm (Rank Ordering of Super-Enhancers) (**Figure 3A**). A principal component analysis of the SE showed that each triplicate was homogeneous between them and that each condition was distinct from the others (**Figure 3B**). The SE peaks were next analyzed by DESeq2 to identify differentially acetylated SE during the kinetic of acquired resistance to TMZ. Volcano plots illustrate that 17 SE were differential between U251-TMZ-T and U251-TMZ-S including 8 hyperacetylated in the U251-TMZ-T condition (**Figure 3C**). Similarly, we noted that 2 SE were differential between U251-TMZ-R and U251-TMZ-T including 1 hyperacetylated in the U251-TMZ-R condition (**Figure 3D**).

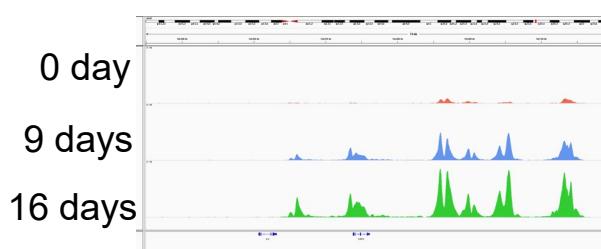
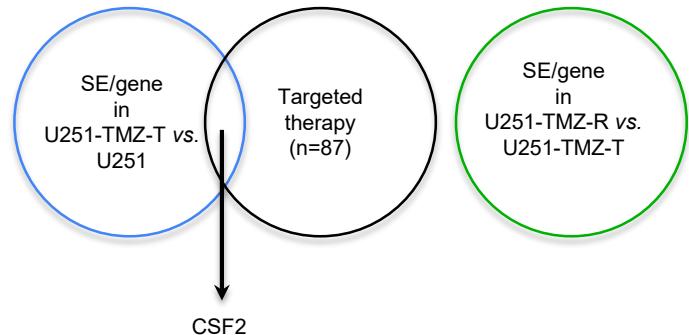
**A****B****C****D****E****F****G**

**Figure 2: Active enhancers in U251 cells challenged with TMZ.**

**A.** Principal component analysis of H3K27ac peaks from ChIP-seq performed in triplicate in U251 cells treated for 0, 9 and 16 days. **B.** Volcano-plot representing the differential H3K27ac peaks between 0 and 9 days of TMZ treatment. **C.** Volcano-plot representing the differential H3K27ac peaks between 9 and 16 days of TMZ treatment. **D.** Histogram representing the number of H3K27ac Day9-up-regulated peaks per gene. For example, 90 genes are associated with 3 H3K27ac Day9-up-regulated peaks. **E.** Histogram representing the number of H3K27ac Day16-up-regulated peaks per gene. **F.** Overlap between genes differentially associated with H3K27ac peaks and targeted therapies. **G.** Normalized H3K27ac ChIP-seq signal at the genomic locus *CCND1* after 0, 9 and 16 days of TMZ treatment.

**A****B****C****D****E****F****H**

locus CSF2

**G**

**Figure 3: Super-enhancers in U251 cells challenged with TMZ.**

**A.** ROSE plots showing super-enhancers detected at 0, 9 and 16 days of TMZ treatment. **B.** Principal component analysis of H3K27ac super-enhancers from ChIP-seq performed in triplicate in U251 cells treated for 0, 9 and 16 days. **C.** Volcano-plot representing the differential H3K27ac super-enhancers between 0 and 9 days of TMZ treatment. **D.** Volcano-plot representing the differential H3K27ac super-enhancers between 9 and 16 days of TMZ treatment. **E.** Histogram representing the number of H3K27ac super-enhancers Day9-up-regulated per gene. Each super-enhancer is associated with only one gene **F.** Histogram representing the number of super-enhancer Day16-up-regulated per gene. **G.** Overlap between genes differentially associated with H3K27ac super-enhancers and targeted therapies. **H.** Normalized H3K27ac ChIP-seq signal at the genomic locus CSF2 after 0, 9 and 16 days of TMZ treatment.

Using region-to-gene annotation, we noted that the 8 super-enhancers hyperacetylated in U251-TMZ-T cells were associated with 7 genes, with an association rate of 1 super-enhancer per gene (**Figure 3D**). The only SE hyperacetylated in U251-TMZ-R cells was associated with the *MGMT* gene (**Figure 3E**).

By comparing these SE-associated genes with a list of 87 proteins for targeted therapies, we identified only CSF2 as a potential therapeutic target in U251-TMZ-T cells (**Figure 3F**).

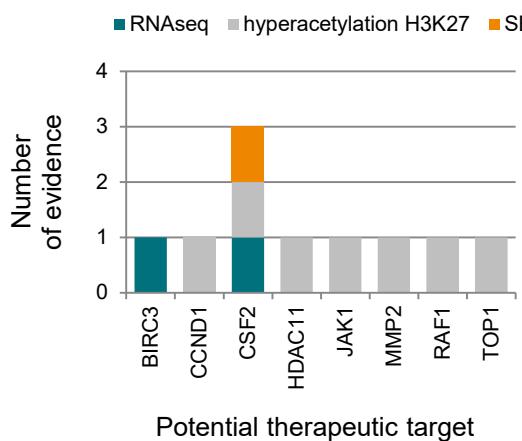
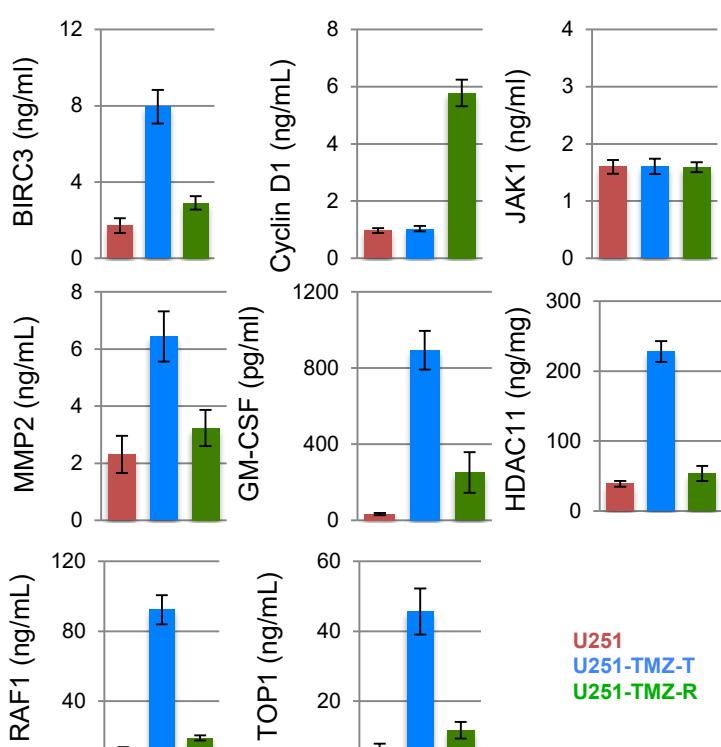
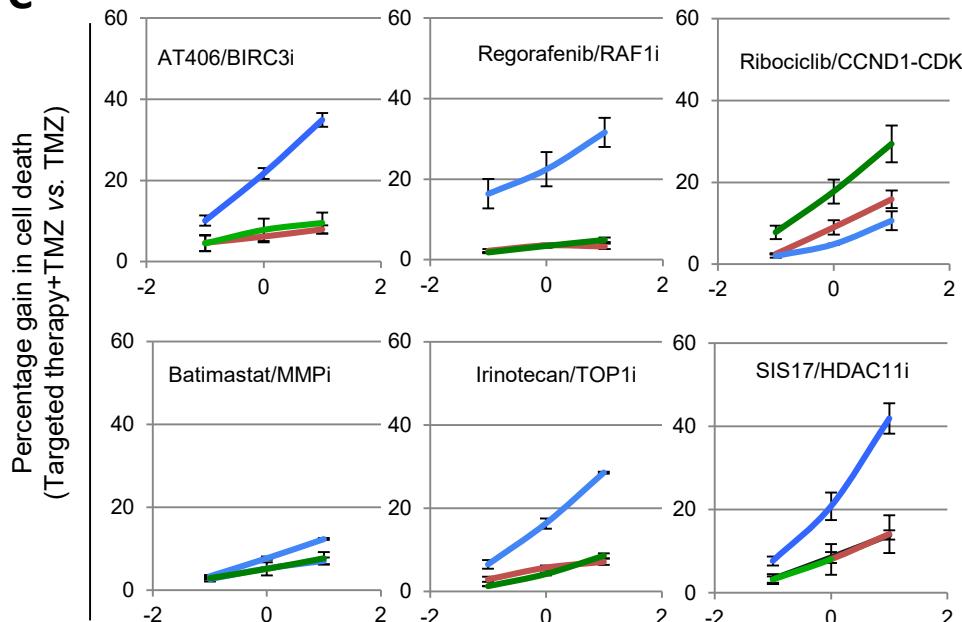
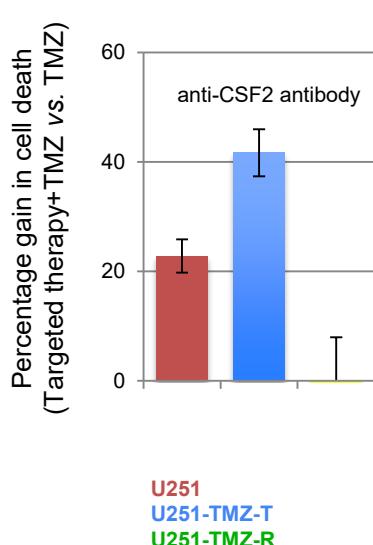
### Validation of therapeutic targets

The three approaches outlined above identified 7 potential therapeutic targets in U251-TMZ-T cells and 1 potential therapeutic target in U251-TMZ-R cells. By classifying these potential therapeutic targets according to the number of approaches having identified them, we observe that only CSF2/GM-CSF was identified by our 3 approaches (**Figure 4A**). All the others were identified by a single approach.

Analysis of the expression level of the 8 potential therapeutic targets showed that only 7 of them are overexpressed at the protein level (**Figure 4B**). Indeed, ELISA revealed that the JAK1 expression is unchanged.

We next investigated whether the overexpressed proteins could be used as therapeutic targets in order to increase the antitumor effect of the TMZ treatment. For that, U251, U251/TMZ-T and U251/TMZ-R cells were treated with TMZ and compounds targeting the 7 potential therapeutic targets identified by our study. We preferentially chose compounds already used in clinical practice: Irinotecan (CAS No: 100286-90-6, ClinicalTrials.gov Identifier: NCT00616005) as Topoisomerase 1 inhibitor, Regorafenib (CAS No: 755037-03-7, ClinicalTrials.gov Identifier: NCT04051606) as RAF1 inhibitor, AT406 (CAS No: CAS No. 1071992-99-8, ClinicalTrials.gov Identifier: NCT01078649) as BIRC3 inhibitor, Batimastat (CAS No: 130370-60-4) as MMP2 inhibitor, SIS17 (CAS No: 2374313-54-7) as HDAC11 inhibitor. Ribociclib (CDK inhibitor. CAS No: 1211441-98-3, ClinicalTrials.gov Identifier: NCT03434262) was used as a CCND1-CDK4/6 inhibitor, despite the consideration of CCND1 as a CDKi biomarker is currently debated (PMID: 31909732). Since CSF2 inhibition strategy is based on the use of blocking antibodies (Otilimab, Namilumab, Gimsilumab and Lenzilumab that bind CSF2, and Mavrilimumab that binds the CSF2-Receptor), we here studied the impact of anti-CSF2 on the TMZ-induced cell death.

By calculating the gain of cell death induced by the use of these drugs with TMZ in comparison with the one induced by TMZ only, we noted that the Regorafenib/TMZ, AT406/TMZ, Irinotecan/TMZ and SIS17/TMZ combotherapies induced a strong gain of cell death in

**A****B****C****D**

**Figure 4: Experimental validation of predicted TMZ-induced vulnerabilities.**

**A.** Number of strategies identifying each vulnerability. **B.** ELISA dosage of proteins predicted as conferring TMZ-induced vulnerability in TMZ-sensitive, TMZ-tolerant and TMZ-resistant U251 cells. **C.** Assessment of cell death by MMT assay after treatment of U251 cells (TMZ-sensitive, -tolerant, -resistant) with 0.1, 1 and 10  $\mu$ M of drug agents targeting putative vulnerabilities. **D.** Assessment of cell death by MMT assay after treatment of U251 cells (TMZ-sensitive, -tolerant, -resistant) with XX  $\mu$ M of therapeutic anti-CSF2 antibody.

comparison to the TMZ treatment alone on U251-TMZ-T cells, while the Ribociclib/TMZ combotherapy induced a strong gain of cell death in comparison to the TMZ treatment alone on U251-TMZ-R cells (**Figures 4C**). The use of anti-CSF2 was more efficient to increase cell death from U251-TMZ-T cells than from other cells (**Figure 4D**).

In other terms, these data suggest that Regorafenib, AT406, Irinotecan, SIS17 or anti-CSF2 could be used in combination with TMZ to kill the TMZ-tolerant cells, while Ribociclib could be used in combination with TMZ to kill the TMZ-resistant cells.

### **Exosomal biomarkers to predict the right time and the right combination therapy**

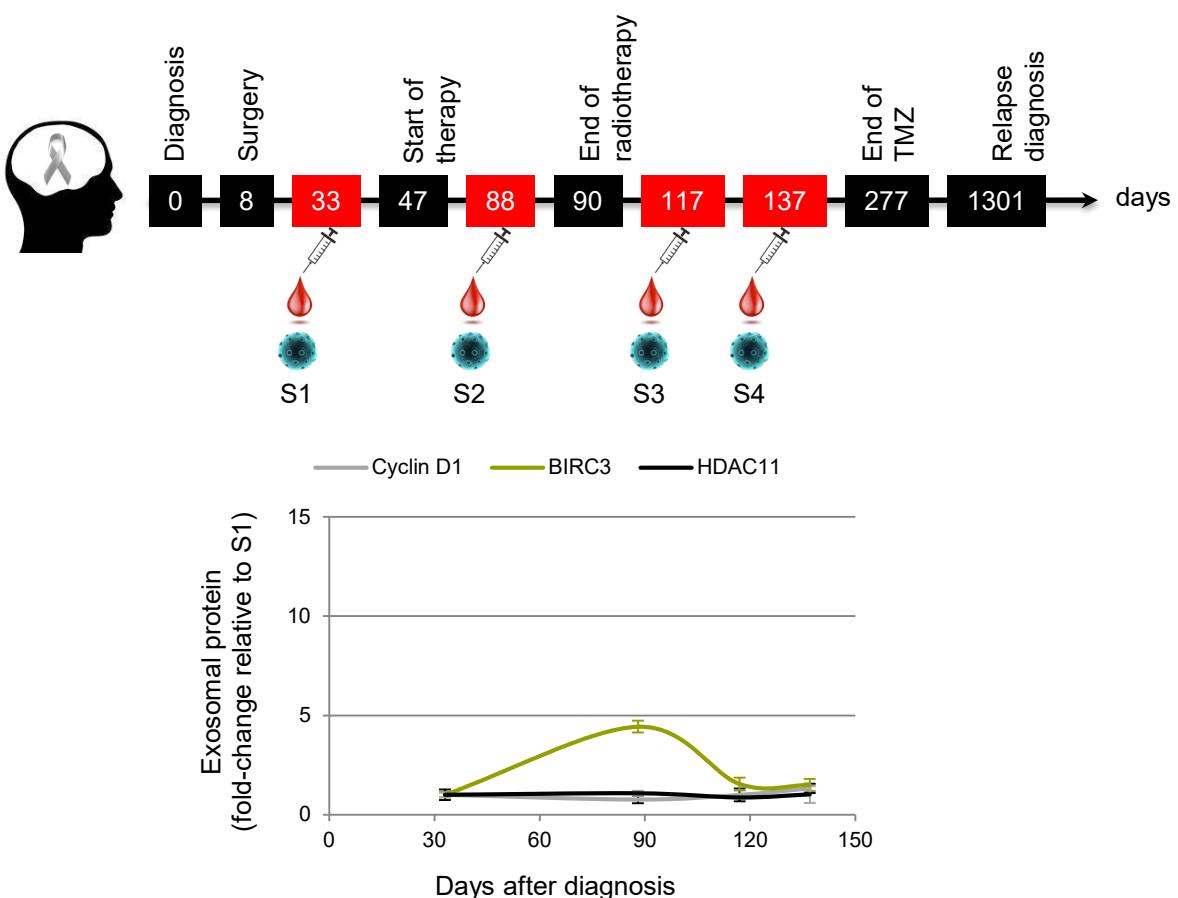
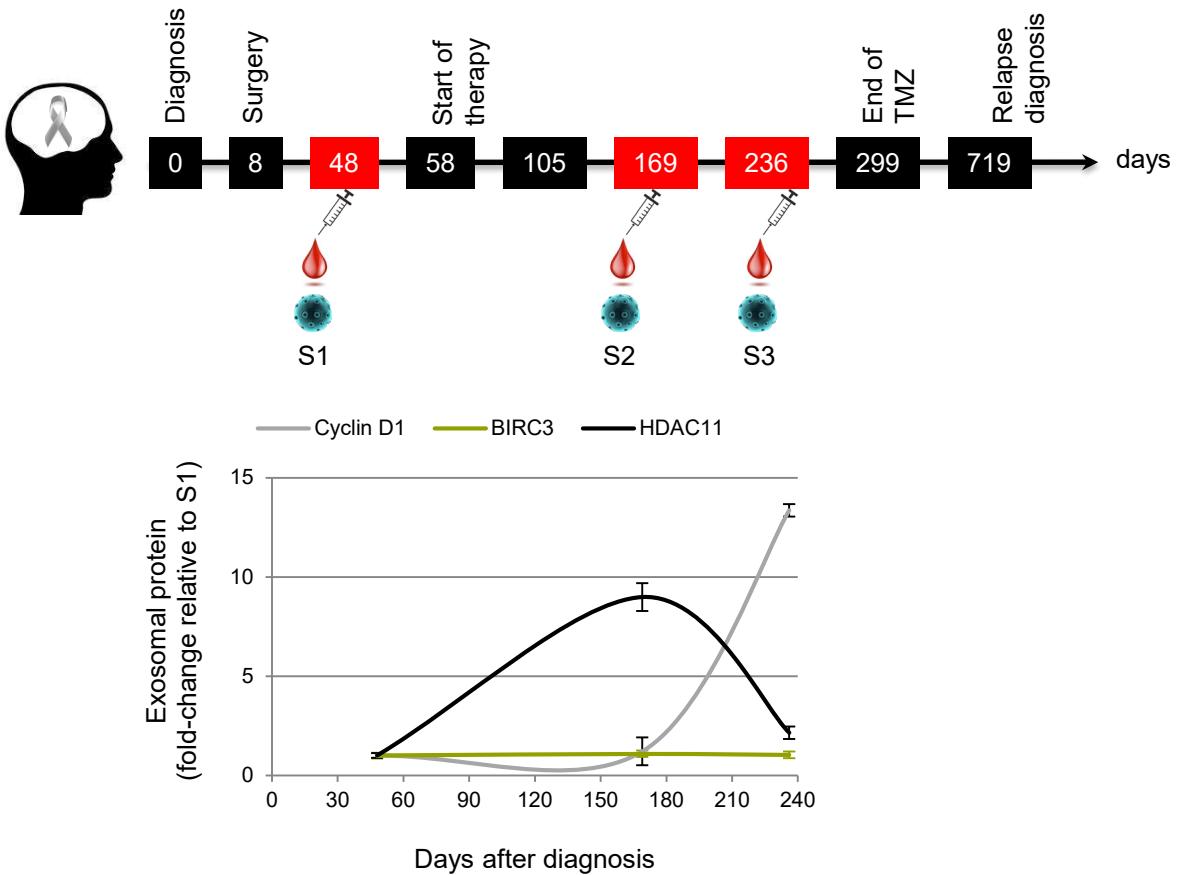
Our cellular data identified several potential targeted therapies that could be combined with TMZ during the GBM treatment. But one important issue is to identify biomarkers that could predict the right time to administer the right combotherapy for the right GBM patient.

To investigate this point, we quantified the protein CCND1/Cyclin D1, BIRC3 and HDAC11 in exosomes of two GBM patients during the course of their treatment. Interestingly, we showed that the exosomal presence of the protein CCND1, BIRC3 and HDAC11 were dynamic during the treatment of both patients. Thus, these results suggest that patients could be eligible for combotherapies associating TMZ with inhibitors targeting CCND1, BIRC3 and HDAC11 when high levels of these proteins are detected in exosomes.

## **DISCUSSION**

Since 2005, the Stupp protocol is still used to treat GBM patients combining tumor resection, radiotherapy and TMZ chemotherapy (Stupp et al., 2005). To date, no other protocol has been outperforming the Stupp protocol and in consequence the patient survival has not significantly improved. We proposed in this study to search for a FDA-approved drug that can be combined with TMZ to improve GBM cell death. We used a TMZ-sensitive cell line and studied its transcriptomic and epigenomic dynamics during the course of the TMZ treatment that led to the emergence of TMZ-resistant clones after 16 days. We hypothesized that the genes undergoing TMZ-induced activation at the transcriptional or at the chromatin level might be involved in the TMZ-tolerance or resistance, and therefore, might be potential drug targets to maintain TMZ efficacy.

We chose 3 approaches to detect potential drug targets: transcription activation, enhancer activation and super-enhancer activation. In our GBM model, we found CCND1, CSF2, JAK1, HDAC11, MMP2, RAF1 and TOP1. By protein quantification, we validated that TMZ induced

**A****B**

**Figure 5: Dosage of BIRC3, CCND1 and HDAC11 proteins in seric exosomes in two GBM patients during the course of their treatment.**

Protein dosage was performed by ELISA on exosomes purified from patients' sera.

their expression, except for the protein JAK1. We then tested FDA-approved drugs in combination with TMZ and found that inhibiting BIRC3, CCND1/CDK4-6, CSF2, HDAC11, RAF1 and TOP1 counteracts TMZ-tolerance or resistance but not MMP2 inhibition. Finally, our longitudinal studies in two GBM patients support the idea of using the exosomal levels of, BIRC3, CCND1 and HDAC11 as biomarkers for identifying (i) which patient is likely to respond to therapies targeting these proteins and (ii) the most appropriate time at which these therapies should be administered. The biomarker character of the expression level of these proteins has already been studied in the context of GBM but not only. Thus, literature describes BIRC3 as a driver of therapeutic resistance in Glioblastoma (Wang et al., 2016) and a facilitator of malignant progression in glioma (Gressot et al., 2017). Mahzouni and colleagues report that the high expression of CCND1 was observed in high-grade astrocytic tumors, particularly in GBM (Mahzouni & Taheri, 2019). It was found that CCND1 could possibly be used as a target in the treatment of tumors. Our data and the one published by Zhang et al., confirmed this idea (Zhang et al., 2018). Dali-Youcef et al., reports that HDAC11 expression levels gradually decreased with increasing tumor grade and correlated significantly with survival time among GBM patients (Dali-Youcef et al., 2015). Despite these investigations and the ones performed in other cancer types than GBM, the considerations of exosomal level of BIRC3, CCND1 and HDAC11, as therapeutic vulnerability biomarkers were not reported (in our knowledge).

The detection of CCND1 and HDAC11 in exosomes also questions the mechanisms of exosomal localization/export of nuclear proteins. Indeed, while literature reports the presence of several nuclear proteins in exosomes, their exosomal loading remains poorly understood (Ung et al., 2014). Yokoi et al., propose a mechanism involving the micronuclei-MVBs-exosomes pathway (Yokoi et al., 2019). Alternatively, nuclear proteins can translocate into cytoplasm previously to be loaded in exosomes. Literature reports that CCND1 and HDAC11 can be present in cytoplasm even if they are considered as nuclear proteins (Cemeli et al., 2019; Núñez-Álvarez & Suelves, 2021).

Usually, enhancers/super-enhancers and RNAseq screens aim to identify the molecular causes of tolerance or resistance. Indeed, Shang et al., identified SOX9 as a critical super-enhancers-regulated transcription factor (TF) that plays a critical role in acquiring and maintaining the chemoresistant state in ovarian cancer (Shang et al., 2019). Bao et al., reported that 45 super-enhancers could be closely related to drug resistance in small cell lung cancer (Bao et al., 2019). Cui et al., reported that the binding of ZNF263 on super-enhancers of endoplasmic reticulum stress associated genes affected the sensitivity of hepatocellular carcinoma to anticancer drugs (Cui et al., 2020). RNA-seq data revealed that the expression of genes associated with cancer

stem cells (*DNAJC12*, *DPPP*, *MYC*, *NES* and *TSPAN8*) was associated with stemness in metastatic prostate cancer cells selected for taxane resistance (Cajigas-Du Ross et al., 2018). In GBM, Natsume et al., reported that aberrant regulation of super-enhancers by the RFP-HDAC1 complex affected the chemoresistance level to temozolomide via changes in cell cycle and apoptosis (Natsume et al., 2019).

Here we made the choice to identify therapeutic vulnerabilities, whether causal or consequential to the resistance. This approach was already used previously. RNA-seq of sarcomas provided suitable targets for more effective treatments (Sarver et al., 2015). RNA-seq of prostate cancer CTCs obtained from patients treated with abiraterone or enzalutamide permitted the identification of therapies targeting the downstream signaling mediated by SMAD family member 3 (SMAD3) and CCND1 (such as cyclin-dependent kinase 4/6 inhibitors) as new therapeutic options (Pal et al., 2018). Krugs et al., mentioned that H3K27 acetylation promotes the enhancers' activation that confer sensitivity to epigenetic therapies of high-grade pediatric GBM with H3K27 mutations (Krug et al., 2019). In other terms, Krugs et al., reported the existence of vulnerability for HDAC inhibitors in glioma. Our present article and the one of Rabé et al., (2020, PMID: 31907355) also mention the fact that glioma cells are vulnerable to HDAC inhibitors (Rabé et al., 2020). However, our paper differs from those of Krugs and Rabé since our screening leads to the identification of a selective HDAC inhibitor of HDAC11 while the papers of Krugs et al., and Rabé et al., mention an interest for a broad-spectrum inhibitor HDAC.

The detection of the involvement of super-enhancers in tolerance or resistance to chemotherapies is frequently used to guide the administration of super-enhancers inhibitors such as BRD or histone acetylation inhibitors (G.-H. Li et al., 2021). However, this use can be disputable since super-enhancers inhibition can also induce the upregulation of oncogenes and/or tolerance or resistance-associated genes. To avoid this pitfall, we here prefer to use the super-enhancers as overexpression signatures of proteins targeted by therapies. Through this, we believe that we respond more accurately to the concept of personalized medicine, which advocates using the most selective therapeutic molecule possible.

In addition, our data open the prospect of a new positioning of targeted therapy molecules already on the market. Indeed, if the efficiencies of regorafenib, ribociclib and irinotecan were already investigated in clinical trials in GBM patients, the use of those drugs in clinical trials did not reflect the detection of biomarkers acting as “starting point or green fire” for the administration of these targeted therapies. In other terms, the clinical trial already performed did not respond to the concept of personalized medicine since they are devoid of biomarkers

for the patient stratification. The absence of biomarker consideration also leads to the non-respect of a personalized medicine, namely chemotherapy administration at the right time. To reply at this last dimension of personalized medicine, we have considered the exosomal protein expression. Indeed, for several years, exosomal proteins are considered as emerging diagnosis (Sandfeld-Paulsen, Jakobsen, et al., 2016), prognosis (Sandfeld-Paulsen, Aggerholm-Pedersen, et al., 2016) and therapeutic biomarkers (W. Li et al., 2017). More particularly, in GBM, Treps et al., reported that Glioblastoma stem-like cells secrete the pro-angiogenic VEGF-A factor in extracellular vesicles (Treps et al., 2017). Thus, the detection of high level of VEGF-A in EV or exosomes could be considered as a "green fire" guiding the use of anti-VEGF-A (Bevacizumab, sorafenib etc.) in GBM therapy. Here, our data suggest that analysis of the longitudinal evolution of the exosomal expression level of BIRC3, CCND1 and HDAC11 proteins could be used as a "green light" therapeutic biomarker signaling the right time for the administration of therapies targeting these proteins. Of course, our data can be discussed on the fact that they are generated from the study of 5 samples obtained from 2 patients. Nevertheless, our data provide a proof of concept of the feasibility of their detection and of the interest that should be given to these biomarkers.

We believe that the technological development of sequencing methods will improve the identification of therapeutic vulnerabilities occurring during the acquisition of resistance to cancer treatment. For example, Johnston et al., demonstrated that the study of 3D genome architecture by generating sub-5-kb resolution 3D genome maps by *in situ* Hi-C could provide new therapeutic vulnerabilities in GBM (Johnston et al., 2019).

## BIBLIOGRAPHY

Banerji, J., Rusconi, S., & Schaffner, W. (1981). Expression of a beta-globin gene is enhanced by remote SV40 DNA sequences. *Cell*, 27(2 Pt 1), 299-308. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(81\)90413-x](https://doi.org/10.1016/0092-8674(81)90413-x)

Bao, J., Li, M., Liang, S., Yang, Y., Wu, J., Zou, Q., Fang, S., Chen, S., & Guo, L. (2019). Integrated high-throughput analysis identifies super enhancers associated with chemoresistance in SCLC. *BMC Medical Genomics*, 12(1), 67. <https://doi.org/10.1186/s12920-019-0520-9>

Cajigas-Du Ross, C. K., Martinez, S. R., Woods-Burnham, L., Durán, A. M., Roy, S., Basu, A., Ramirez, J. A., Ortiz-Hernández, G. L., Ríos-Colón, L., Chirshev, E., Sanchez-Hernandez, E. S., Soto, U., Greco, C., Boucheix, C., Chen, X., Unternaehrer, J., Wang, C., & Casiano, C. A. (2018). RNA sequencing reveals upregulation of a transcriptomic program associated with stemness in metastatic prostate cancer cells selected for taxane resistance. *Oncotarget*, 9(54), 30363-30384. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.25744>

- Cemeli, T., Guasch-Vallés, M., Nàger, M., Felip, I., Cambray, S., Santacana, M., Gatius, S., Pedraza, N., Dolcet, X., Ferrezuelo, F., Schuhmacher, A. J., Herreros, J., & Garí, E. (2019). Cytoplasmic cyclin D1 regulates glioblastoma dissemination. *The Journal of Pathology*, 248(4), 501-513. <https://doi.org/10.1002/path.5277>
- Commissioner, O. of the. (2020, mars 24). *FDA approves new treatment option for patients with HER2-positive breast cancer who have progressed on available therapies*. FDA; FDA. <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-approves-new-treatment-option-patients-her2-positive-breast-cancer-who-have-progressed-available>
- Cui, J., Liu, J., Fan, L., Zhu, Y., Zhou, B., Wang, Y., Hua, W., Wei, W., & Sun, G. (2020). A zinc finger family protein, ZNF263, promotes hepatocellular carcinoma resistance to apoptosis via activation of ER stress-dependent autophagy. *Translational Oncology*, 13(12), 100851. <https://doi.org/10.1016/j.tranon.2020.100851>
- Dali-Youcef, N., Froelich, S., Moussallieh, F.-M., Chibbaro, S., Noël, G., Namer, I. J., Heikkinen, S., & Auwerx, J. (2015). Gene expression mapping of histone deacetylases and co-factors, and correlation with survival time and 1H-HRMAS metabolomic profile in human gliomas. *Scientific Reports*, 5, 9087. <https://doi.org/10.1038/srep09087>
- Furlong, E. E. M., & Levine, M. (2018). Developmental enhancers and chromosome topology. *Science (New York, N.Y.)*, 361(6409), 1341-1345. <https://doi.org/10.1126/science.aau0320>
- Gelsomino, F., Casadei-Gardini, A., Caputo, F., Rossi, G., Bertolini, F., Petrachi, T., Spallanzani, A., Pettorelli, E., Kaleci, S., & Luppi, G. (2020). MTOR Pathway Expression as Potential Predictive Biomarker in Patients with Advanced Neuroendocrine Tumors Treated with Everolimus. *Cancers*, 12(5), E1201. <https://doi.org/10.3390/cancers12051201>
- Gressot, L. V., Doucette, T., Yang, Y., Fuller, G. N., Manyam, G., Rao, A., Latha, K., & Rao, G. (2017). Analysis of the inhibitors of apoptosis identifies BIRC3 as a facilitator of malignant progression in glioma. *Oncotarget*, 8(8), 12695-12704. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.8657>
- Health, C. for D. and R. (2021). List of Cleared or Approved Companion Diagnostic Devices (In Vitro and Imaging Tools). *FDA*. <https://www.fda.gov/medical-devices/in-vitro-diagnostics/list-cleared-or-approved-companion-diagnostic-devices-in-vitro-and-imaging-tools>
- Johnston, M. J., Nikolic, A., Ninkovic, N., Guilhamon, P., Cavalli, F. M. G., Seaman, S., Zemp, F. J., Lee, J., Abdelkareem, A., Ellestad, K., Murison, A., Kushida, M. M., Coutinho, F. J., Ma, Y., Mungall, A. J., Moore, R., Marra, M. A., Taylor, M. D., Dirks, P. B., ... Gallo, M. (2019). High-resolution structural genomics reveals new therapeutic vulnerabilities in glioblastoma. *Genome Research*, 29(8), 1211-1222. <https://doi.org/10.1101/gr.246520.118>
- Krug, B., De Jay, N., Harutyunyan, A. S., Deshmukh, S., Marchione, D. M., Guilhamon, P., Bertrand, K. C., Mikael, L. G., McConechy, M. K., Chen, C. C. L., Khazaei, S., Koncar, R. F., Agnihotri, S., Faury, D., Ellezam, B., Weil, A. G., Ursini-Siegel, J., De Carvalho, D. D., Dirks, P. B., ... Mack, S. C. (2019). Pervasive H3K27 Acetylation Leads to ERV Expression and a Therapeutic Vulnerability in H3K27M Gliomas. *Cancer Cell*, 35(5), 782-797.e8. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2019.04.004>
- Li, G.-H., Qu, Q., Qi, T.-T., Teng, X.-Q., Zhu, H.-H., Wang, J.-J., Lu, Q., & Qu, J. (2021). Super-enhancers : A new frontier for epigenetic modifiers in cancer chemoresistance. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 40(1), 174. <https://doi.org/10.1186/s13046-021-01974-y>

Li, W., Li, C., Zhou, T., Liu, X., Liu, X., Li, X., & Chen, D. (2017). Role of exosomal proteins in cancer diagnosis. *Molecular Cancer*, 16(1), 145. <https://doi.org/10.1186/s12943-017-0706-8>

Lochmann, T. L., Floros, K. V., Naseri, M., Powell, K. M., Cook, W., March, R. J., Stein, G. T., Greninger, P., Maves, Y. K., Saunders, L. R., Dylla, S. J., Costa, C., Boikos, S. A., Leverson, J. D., Souers, A. J., Krystal, G. W., Harada, H., Benes, C. H., & Faber, A. C. (2018). Venetoclax Is Effective in Small-Cell Lung Cancers with High BCL-2 Expression. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 24(2), 360-369. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-17-1606>

Lovén, J., Hoke, H. A., Lin, C. Y., Lau, A., Orlando, D. A., Vakoc, C. R., Bradner, J. E., Lee, T. I., & Young, R. A. (2013). Selective inhibition of tumor oncogenes by disruption of super-enhancers. *Cell*, 153(2), 320-334. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.03.036>

Mahzouni, P., & Taheri, F. (2019). An Immunohistochemical Study of Cyclin D1 Expression in Astrocytic Tumors and its Correlation with Tumor Grade. *Iranian Journal of Pathology*, 14(3), 252-257. <https://doi.org/10.30699/ijp.2019.82024.1771>

Michels, J., Vitale, I., Galluzzi, L., Adam, J., Olaussen, K. A., Kepp, O., Senovilla, L., Talhaoui, I., Guegan, J., Enot, D. P., Talbot, M., Robin, A., Girard, P., Oréar, C., Lissa, D., Sukkurwala, A. Q., Garcia, P., Behnam-Motlagh, P., Kohno, K., ... Kroemer, G. (2013). Cisplatin resistance associated with PARP hyperactivation. *Cancer Research*, 73(7), 2271-2280. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-3000>

Natsume, A., Hirano, M., Ranjit, M., Aoki, K., & Wakabayashi, T. (2019). Aberrant Transcriptional Regulation of Super-enhancers by RET Finger Protein-histone Deacetylase 1 Complex in Glioblastoma : Chemoresistance to Temozolomide. *Neurologia Medico-Chirurgica*, 59(8), 293-298. <https://doi.org/10.2176/nmc.ra.2019-0049>

Núñez-Álvarez, Y., & Suelves, M. (2021). HDAC11 : A multifaceted histone deacetylase with proficient fatty deacylase activity and its roles in physiological processes. *The FEBS Journal*. <https://doi.org/10.1111/febs.15895>

Pal, S. K., Patel, J., He, M., Foulk, B., Kraft, K., Smirnov, D. A., Twardowski, P., Kortylewski, M., Bhargava, V., & Jones, J. O. (2018). Identification of mechanisms of resistance to treatment with abiraterone acetate or enzalutamide in patients with castration-resistant prostate cancer (CRPC). *Cancer*, 124(6), 1216-1224. <https://doi.org/10.1002/cncr.31161>

Pettitt, S. J., Rehman, F. L., Bajrami, I., Brough, R., Wallberg, F., Kozarewa, I., Fenwick, K., Assiotis, I., Chen, L., Campbell, J., Lord, C. J., & Ashworth, A. (2013). A genetic screen using the PiggyBac transposon in haploid cells identifies Parp1 as a mediator of olaparib toxicity. *PloS One*, 8(4), e61520. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061520>

Rabé, M., Dumont, S., Álvarez-Arenas, A., Janati, H., Belmonte-Beitia, J., Calvo, G. F., Thibault-Carpentier, C., Séry, Q., Chauvin, C., Joalland, N., Briand, F., Blandin, S., Scotet, E., Pecqueur, C., Clairambault, J., Oliver, L., Perez-Garcia, V., Nadaradjane, A., Cartron, P.-F., ... Vallette, F. M. (2020). Identification of a transient state during the acquisition of temozolomide resistance in glioblastoma. *Cell Death & Disease*, 11(1), 19. <https://doi.org/10.1038/s41419-019-2200-2>

Sandfeld-Paulsen, B., Aggerholm-Pedersen, N., Bæk, R., Jakobsen, K. R., Meldgaard, P., Folkersen, B. H., Rasmussen, T. R., Varming, K., Jørgensen, M. M., & Sorensen, B. S. (2016). Exosomal proteins as prognostic biomarkers in non-small cell lung cancer. *Molecular Oncology*, 10(10), 1595-1602. <https://doi.org/10.1016/j.molonc.2016.10.003>

- Sandfeld-Paulsen, B., Jakobsen, K. R., Bæk, R., Folkersen, B. H., Rasmussen, T. R., Meldgaard, P., Varming, K., Jørgensen, M. M., & Sorensen, B. S. (2016). Exosomal Proteins as Diagnostic Biomarkers in Lung Cancer. *Journal of Thoracic Oncology: Official Publication of the International Association for the Study of Lung Cancer*, 11(10), 1701-1710. <https://doi.org/10.1016/j.jtho.2016.05.034>
- Sarver, A. E., Sarver, A. L., Thayanthi, V., & Subramanian, S. (2015). Identification, by systematic RNA sequencing, of novel candidate biomarkers and therapeutic targets in human soft tissue tumors. *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology*, 95(9), 1077-1088. <https://doi.org/10.1038/labinvest.2015.80>
- Shang, S., Yang, J., Jazaeri, A. A., Duval, A. J., Tufan, T., Lopes Fischer, N., Benamar, M., Guessous, F., Lee, I., Campbell, R. M., Ebert, P. J., Abbas, T., Landen, C. N., Difeo, A., Scacheri, P. C., & Adli, M. (2019). Chemotherapy-Induced Distal Enhancers Drive Transcriptional Programs to Maintain the Chemoresistant State in Ovarian Cancer. *Cancer Research*, 79(18), 4599-4611. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-19-0215>
- Stupp, R., Mason, W. P., van den Bent, M. J., Weller, M., Fisher, B., Taphoorn, M. J. B., Belanger, K., Brandes, A. A., Marosi, C., Bogdahn, U., Curschmann, J., Janzer, R. C., Ludwin, S. K., Gorlia, T., Allgeier, A., Lacombe, D., Cairncross, J. G., Eisenhauer, E., & Mirimanoff, R. O. (2005). Radiotherapy plus Concomitant and Adjuvant Temozolomide for Glioblastoma. *New England Journal of Medicine*, 352(10), 987-996. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa043330>
- Treps, L., Perret, R., Edmond, S., Ricard, D., & Gavard, J. (2017). Glioblastoma stem-like cells secrete the pro-angiogenic VEGF-A factor in extracellular vesicles. *Journal of Extracellular Vesicles*, 6(1), 1359479. <https://doi.org/10.1080/20013078.2017.1359479>
- Ung, T. H., Madsen, H. J., Hellwinkel, J. E., Lencioni, A. M., & Graner, M. W. (2014). Exosome proteomics reveals transcriptional regulator proteins with potential to mediate downstream pathways. *Cancer Science*, 105(11), 1384-1392. <https://doi.org/10.1111/cas.12534>
- Wang, D., Berglund, A., Kenchappa, R. S., Forsyth, P. A., Mulé, J. J., & Etame, A. B. (2016). BIRC3 is a novel driver of therapeutic resistance in Glioblastoma. *Scientific Reports*, 6(1), 21710. <https://doi.org/10.1038/srep21710>
- Whyte, W. A., Orlando, D. A., Hnisz, D., Abraham, B. J., Lin, C. Y., Kagey, M. H., Rahl, P. B., Lee, T. I., & Young, R. A. (2013). Master transcription factors and mediator establish super-enhancers at key cell identity genes. *Cell*, 153(2), 307-319. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.03.035>
- Yokoi, A., Villar-Prados, A., Oliphint, P. A., Zhang, J., Song, X., De Hoff, P., Morey, R., Liu, J., Roszik, J., Clise-Dwyer, K., Burks, J. K., O'Halloran, T. J., Laurent, L. C., & Sood, A. K. (2019). Mechanisms of nuclear content loading to exosomes. *Science Advances*, 5(11), eaax8849. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aax8849>
- Zhang, D., Dai, D., Zhou, M., Li, Z., Wang, C., Lu, Y., Li, Y., & Wang, J. (2018). Inhibition of Cyclin D1 Expression in Human Glioblastoma Cells is Associated with Increased Temozolomide Chemosensitivity. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 51(6), 2496-2508. <https://doi.org/10.1159/000495920>

Name	log2FoldChange
SAA1	5.304037297
CXCL8	4.831888263
HLA-DPA1	4.548271753
SERPINE1	4.253217194
CD74	4.072137438
NGFR	3.276742053
CSF2	2.950056441
SGK1	2.935875334
IFI27	2.893971588
VIM-AS1	2.784780294
STRIP2	2.751745457
CD68	2.742785576
SERPINA1	2.70241406
ACSL5	2.654225776
TMEM40	2.638877981
EMP1	2.611139482
SRGAP1	2.59533091
PAX8-AS1	2.397497421
TGFBI	2.331183565
IFIT3	2.31301624
ARHGDI1B	2.26288699
TLR4	2.235892198
CD82	2.227467568
RAET1G	2.204950394
SFTA1P	2.200976551
ELL2	2.193268879
CPA4	2.186474609
GADD45A	2.134047492
SYTL2	2.114094906
PRKAR1B	2.09551811
DDIT3	2.084175428
CDKN1A	2.068865567
LOC374443	2.033950593
SNX16	1.920256702
DUSP5	1.874818571
BIRC3	1.867504749
IFIT2	1.854187385
PHLDB2	1.766935648
NT5E	1.682015791
CTSS	1.628070006
ZNF823	1.626945414
NABP1	1.625581761
ULBP2	1.600172852
SLC44A3-AS1	1.586066843
ZNF765	1.582009753
PLAU	1.574310146
SERTAD1	1.557515346
LRRC17	1.542463601
ACOX2	1.494619332
LY96	1.493626227
CBWD1	1.486245312
MIR3681HG	1.47636559
PPP1R15A	1.444146231
TMEM54	1.389846508

Name	log2FoldChange
COL14A1	1.821564216
NR2F1	1.562855506
FSD1	1.358732297
FILIP1L	1.347261937

**Supplementary Table T2:** List of genes overexpressed in U251-TMZ-R cells vs U251-TMZ-T cells according to 3'RNA-seq experiments.

Name	log2FoldChange
ADAMTSL2	1.35069079365311
ADCY9	1.49499769607159
AHCYL1	1.73350757672909
CARS2	1.45054582686094
CCND1	1.55149143722479
CD81	1.50607780496944
CHRND	1.48232731661251
COPS8	1.73448703985778
CRIP1	1.88458732012849
CRYL1	1.3255638145906
CTSD	1.43520711709456
GNAS	1.4739877017664
GNAZ	1.70865809220847
LEMD1	1.59657234155387
LMCD1-AS1	1.80892220827114
LOC101929705	1.42544679534461
ME2	1.40949814326172
MRPL44	1.67010770428087
NDRG1	1.55997273378171
OLFM1	1.97052861342218
PALD1	1.42253502077759
PCID2	1.49115179781106
PDLIM2	1.63299536051185
PDRG1	1.77665650408965
PTTG1IP	2.02182984220109
R3HCC1L	1.72539218687776
RPL10A	1.55109866975196
RPS21	1.40836312736127
SF3B3	1.49208603973369
SH3TC2	1.77554244068434
TRIP13	1.81399492121725
ZDHHC7	1.45624285992606
ZDHHC9	1.55961371063375
ZNF423	1.37366585524969

**Supplementary Table T1:** List of genes overexpressed in U251-TMZ-T cells vs U251-TMZ-S cells according to 3'RNA-seq experiments.

**Supplementary Table T4:** list of 34 genes differentially hyperacetylated in U251-TMZ-R vs with U251-TMZ-T

	87	Target	Exemples of therapeutic agents				Identification number
epidrugs	1	KMT4	Pinometostat				NCT03724084
	1	DOTL1	Pinometostat				NCT03724084
	1	LSD1	GSK287952				NCT02034123
	1	BRD4	I-BET762	JQ1	PLX51107		NCT04910152
	1	BRD3	I-BET762		PLX51107		
	1	BRD2	I-BET762		PLX51107		
	1	PADI3	Cl-amidine				
	1	EZH2	Tazemetostat				NCT02860286
	1	HDAC1					
	1	HDAC2					
	1	HDAC3		BRD3308			
	1	HDAC4					
	1	HDAC5					
	1	HDAC6	vorinostat	Ricolinostat	Tubastatin A		NCT04308330
	1	HDAC7					
	1	HDAC8		1-Naphthohydroxamic acid			
	1	HDAC9					
	1	HDAC10					
	1	HDAC11		SIS17			
apoptosis	1	DNMT1		procainamide			NCT03295552
	1	DNMT3A	decitabine	Theaflavin 3, 3'-digallate N6			
	1	DNMT3B		nanaomycinA			
	1	IDH1	Vorasidenib				NCT04164901
	1	IDH2	Énasidénil				NCT04203316
	1	BCL2	Venetoclax	Navitoclax			NCT03662724
	1	MCL1	AMG176				NCT02675452
	1	BIRC3	AT406				NCT0178649
	1	BCL-x	A-1331852	Navitoclax			NCT04041050
	1	EGFR	Afatinib	erlotinib	gefitinib	osimertinib	NCT03586453
	1	Bcr-ABL	Bosutinib	Imatinib			NCT01331291
	1	VEGFR	Sunitinib				NCT03066427
	1	MDM2	AMG-232				NCT03217266
	1	mTOR	Everolimus				NCT01773460
	1	MEK1	Trametinib				NCT03190915
	1	TOP1	Irinotecan				NCT01607554
	1	TOP2B	doxorubicin				NCT03681548
Immunotherapy	1	MET	Crizotinib				NCT04084717
	1	BTK	Ibrutinib				NCT04771507
	1	PI3K	Idelalisib				NCT03568929
	1	c-kit					NCT04138381
	1	PDGFRA					
	1	PDGFRB	Imatinib				
	1	CSF-1R					
	1	DDR1					
	1	DDR2					
	1	CDK4	Palbociclib	Abemaciclib	ribociclib		NCT02345824
	1	CDK6	Palbociclib	Abemaciclib	ribociclib		
	1	PARP	Olaparib	Talazoparib	Niraparib		NCT03367689
	1	CCND1	Ribociclib	Abemaciclib	Palbociclib		NCT02345824
	1	JAK1	Ruxolitinib				NCT02928978
	1	JAK2					
Immunotherapy	1	SMO	Sonidegib				NCT04066504
	1	FGFR	Sorafenib				NCT02122003
	1	RET	Sunitinib				NCT03905889
	1	MEK2	Trametinib				NCT03190915
	1	ERK		Vemurafenib			NCT01748149
	1	BRAF					
	1	FLT3					NCT02902484
	1	Ick	Nintedanib				
	1	lyn					
	1	Src					
	1	HER2	Trastuzumab				NCT04644237
	1	RANKL	Denosumab				NCT04034199
Immunotherapy	1	TIM3	Cobolimab				NCT04139902
	1	PD1	Nivolumab				NCT03925246
	1	PDL1/CD274	Atezolizumab				NCT03836066
	1	CTLA4	Ipilimumab				NCT04635735
	1	CD20	Rituximab				NCT00991211
	1	IDO1	NLG802				NCT03164603
	1	STAT3	TTI-101				NCT03195699
	1	HSP 90	Ganetespib				NCT02192541
	1	MMP	Batimastat (BB-94)				PMID: 8913840
	1	MMP1					NCT00040755
	1	MMP2					
	1	MMP8	Rebimastat				
	1	MMP9					
	1	MMP14					
	1	26S proteosome	Bortezomib	Carfilzomib (Kyprolis)			NCT03643549
Immunotherapy	1	AKT	Perifosine				NCT00590954
	1	RAF1	Regorafenib				NCT04476329
	1	CSF1	Sunitinib				NCT03905889
	1	CSF2	Otilimab	Lenzilumab	Namilumab	Gimsilumab	NCT04333147
	1	CSF2-Ra	Mavrilimumab				NCT04492514
	1	RARA	tamibarotene				NCT00520208
	1	Wee1	AZD1775				NCT03668340
	1	XPO1	Selinexor				NCT04811196
	1	CDK7	LY3405105				NCT03770494

**Supplementary Table T3: list of 87 proteins for targeted therapies**

Table: Gene sets enriched in phenotype U251\_D0 (4 samples) [plain text format]

	GS follow link to MSigDB	GS DETAILS	SIZE	ES	NES	NOM p-val	FDR q-val	FWER p-val	RANK AT MAX	LEADING EDGE
1	HALLMARK_cholesterol_homeostasis	Details ...	72	0.54	1.76	0.000	0.011	0.000	3475	tags=46%, list=18%, signal=56%
2	HALLMARK_mtorc1_signaling	Details ...	199	0.41	1.74	0.000	0.011	0.011	1592	tags=24%, list=8%, signal=25%
3	HALLMARK_glycolysis	Details ...	194	0.43	1.73	0.000	0.023	0.033	3094	tags=31%, list=16%, signal=37%
4	HALLMARK_unfolded_protein_response	Details ...	112	0.33	1.65	0.000	0.030	0.070	2261	tags=22%, list=12%, signal=25%
5	HALLMARK_wnt_beta_catenin_signaling	Details ...	40	0.51	1.46	0.042	0.147	0.446	3275	tags=45%, list=17%, signal=54%
6	HALLMARK_mitotic_spindle	Details ...	199	0.37	1.43	0.024	0.168	0.558	3204	tags=32%, list=17%, signal=38%
7	HALLMARK_androgen_response	Details ...	99	0.35	1.42	0.000	0.160	0.602	3548	tags=34%, list=18%, signal=42%
8	HALLMARK_hedgehog_signaling	Details ...	35	0.52	1.40	0.038	0.157	0.617	978	tags=23%, list=5%, signal=30%
9	HALLMARK_hypoxia	Details ...	190	0.39	1.37	0.032	0.187	0.708	2742	tags=33%, list=14%, signal=38%
10	HALLMARK_p38_akt_mtอร signaling	Details ...	104	0.31	1.36	0.000	0.182	0.765	3122	tags=29%, list=16%, signal=34%
11	HALLMARK_angiogenesis	Details ...	33	0.42	1.34	0.031	0.192	0.789	2834	tags=24%, list=15%, signal=28%
12	HALLMARK_adipogenesis	Details ...	192	0.30	1.33	0.031	0.189	0.835	3301	tags=27%, list=17%, signal=32%
13	HALLMARK_apical_junction	Details ...	187	0.34	1.31	0.058	0.208	0.850	2963	tags=24%, list=15%, signal=28%
14	HALLMARK_heme_metabolism	Details ...	181	0.33	1.27	0.133	0.251	0.900	3583	tags=30%, list=19%, signal=38%
15	HALLMARK_epithelial_mesenchymal_transition	Details ...	192	0.32	1.19	0.219	0.360	0.936	1741	tags=24%, list=9%, signal=27%
16	HALLMARK_notch_signaling	Details ...	31	0.40	1.17	0.242	0.379	0.936	2609	tags=32%, list=14%, signal=37%
17	HALLMARK_myogenesis	Details ...	174	0.34	1.16	0.184	0.373	0.936	3728	tags=21%, list=13%, signal=24%
18	HALLMARK_uv_response_dn	Details ...	144	0.34	1.15	0.267	0.365	0.970	2670	tags=26%, list=14%, signal=30%
19	HALLMARK_estrogen_response_early	Details ...	199	0.33	1.22	0.234	0.417	0.987	2919	tags=26%, list=15%, signal=30%
20	HALLMARK_apical_surface	Details ...	40	0.33	1.09	0.374	0.451	1.000	2633	tags=30%, list=14%, signal=35%
21	HALLMARK_myc_targets_v1	Details ...	199	0.27	1.02	0.434	0.567	1.000	5138	tags=33%, list=27%, signal=45%
22	HALLMARK_pancreas_beta_cells	Details ...	28	0.34	1.02	0.412	0.546	1.000	4401	tags=29%, list=23%, signal=37%
23	HALLMARK_bile_acid_metabolism	Details ...	100	0.27	0.97	0.429	0.610	1.000	1088	tags=11%, list=6%, signal=12%
24	HALLMARK_peroxisome	Details ...	101	0.22	0.96	0.558	0.606	1.000	3652	tags=22%, list=19%, signal=27%
25	HALLMARK_fatty_acid_metabolism	Details ...	149	0.23	0.96	0.523	0.583	1.000	2018	tags=14%, list=10%, signal=16%
26	HALLMARK_estrogen_response_late	Details ...	195	0.26	0.94	0.495	0.601	1.000	3197	tags=24%, list=17%, signal=29%
27	HALLMARK_reactive_oxygen_species_pathway	Details ...	48	0.23	0.82	0.631	0.793	1.000	3537	tags=23%, list=18%, signal=28%
28	HALLMARK_kras_signaling_dn	Details ...	161	0.21	0.72	0.955	0.910	1.000	3473	tags=19%, list=16%, signal=23%

Table: Gene sets enriched in phenotype U251\_D0 (4 samples) [plain text format]

	GS follow link to MSigDB	GS DETAILS	SIZE	ES	NES	NOM p-val	FDR q-val	FWER p-val	RANK AT MAX	LEADING EDGE
1	HALLMARK_tnf_a_signaling_via_nfkB	Details ...	194	-0.46	-1.63	0.000	0.168	0.110	1279	tags=25%, list=7%, signal=27%
2	HALLMARK_interferon_gamma_response	Details ...	189	-0.44	-1.56	0.000	0.114	0.169	3728	tags=39%, list=19%, signal=48%
3	HALLMARK_il6_jak_stat3_signaling	Details ...	80	-0.44	-1.45	0.000	0.176	0.433	3508	tags=33%, list=18%, signal=40%
4	HALLMARK_apoptosis	Details ...	155	-0.34	-1.45	0.000	0.148	0.458	1745	tags=19%, list=9%, signal=21%
5	HALLMARK_dna_repair	Details ...	150	-0.37	-1.44	0.025	0.125	0.458	3137	tags=30%, list=16%, signal=36%
6	HALLMARK_interferon_alpha_response	Details ...	96	-0.48	-1.43	0.000	0.116	0.502	3744	tags=45%, list=19%, signal=55%
7	HALLMARK_kras_signaling_up	Details ...	184	-0.42	-1.42	0.027	0.122	0.592	2169	tags=26%, list=11%, signal=29%
8	HALLMARK_complement	Details ...	180	-0.32	-1.40	0.000	0.126	0.624	3289	tags=28%, list=17%, signal=34%
9	HALLMARK_inflammatory_response	Details ...	181	-0.38	-1.38	0.057	0.140	0.703	2704	tags=25%, list=14%, signal=29%
10	HALLMARK_e2f_targets	Details ...	200	-0.33	-1.32	0.000	0.181	0.815	3276	tags=30%, list=17%, signal=36%
11	HALLMARK_uv_response_up	Details ...	155	-0.27	-1.30	0.040	0.196	0.833	3681	tags=31%, list=19%, signal=38%
12	HALLMARK_coagulation	Details ...	119	-0.34	-1.27	0.046	0.228	0.888	2262	tags=18%, list=12%, signal=21%
13	HALLMARK_protein_secretion	Details ...	96	-0.28	-1.19	0.231	0.344	0.947	3374	tags=28%, list=18%, signal=34%
14	HALLMARK_ps3_pathway	Details ...	197	-0.28	-1.13	0.153	0.403	0.976	3067	tags=25%, list=16%, signal=30%
15	HALLMARK_g2m_checkpoint	Details ...	199	-0.24	-1.11	0.304	0.423	1.000	3045	tags=24%, list=16%, signal=28%
16	HALLMARK_tgf_beta_signaling	Details ...	53	-0.32	-1.10	0.243	0.423	1.000	330	tags=9%, list=2%, signal=10%
17	HALLMARK_il2_stat5_signaling	Details ...	187	-0.27	-1.02	0.479	0.544	1.000	1819	tags=18%, list=9%, signal=20%
18	HALLMARK_myc_targets_v2	Details ...	68	-0.31	-0.97	0.561	0.622	1.000	3645	tags=31%, list=19%, signal=38%
19	HALLMARK_allograft_rejection	Details ...	172	-0.24	-0.96	0.550	0.594	1.000	4840	tags=34%, list=25%, signal=45%
20	HALLMARK_oxidative_phosphorylation	Details ...	200	-0.22	-0.96	0.494	0.570	1.000	3379	tags=20%, list=18%, signal=23%
21	HALLMARK_xenobiotic_metabolism	Details ...	180	-0.23	-0.95	0.496	0.550	1.000	2425	tags=15%, list=13%, signal=17%
22	HALLMARK_spermatogenesis	Details ...	107	-0.23	-0.95	0.566	0.529	1.000	3843	tags=25%, list=20%, signal=31%

## B

Table: Gene sets enriched in phenotype U251\_TMZ\_D9 (4 samples) [plain text format]

	GS follow link to MSigDB	GS DETAILS	SIZE	ES	NES	NOM p-val	FDR q-val	FWER p-val	RANK AT MAX	LEADING EDGE
1	HALLMARK_tnf_a_signaling_via_nekb	Details ...	194	0.56	1.81	0.000	0.021	0.000	2697	tags=41%, list=14%, signal=47%
2	HALLMARK_myc_targets_v2	Details ...	58	0.52	1.61	0.000	0.057	0.069	2656	tags=36%, list=14%, signal=42%
3	HALLMARK_inflammatory_response	Details ...	181	0.43	1.54	0.000	0.095	0.199	4300	tags=38%, list=22%, signal=48%
4	HALLMARK_tgf_beta_signaling	Details ...	53	0.50	1.50	0.000	0.109	0.290	2697	tags=38%, list=14%, signal=44%
5	HALLMARK_kras_signaling_up	Details ...	184	0.45	1.49	0.000	0.094	0.299	2581	tags=29%, list=13%, signal=34%
6	HALLMARK_complement	Details ...	180	0.33	1.45	0.000	0.111	0.432	3050	tags=26%, list=16%, signal=30%
7	HALLMARK_il6_jak_stat3_signaling	Details ...	80	0.39	1.45	0.000	0.098	0.432	3752	tags=30%, list=20%, signal=37%
8	HALLMARK_il2_stats5_signaling	Details ...	187	0.33	1.39	0.000	0.123	0.504	2810	tags=25%, list=15%, signal=29%
9	HALLMARK_epithelial_mesenchymal_transition	Details ...	192	0.35	1.39	0.000	0.115	0.518	2396	tags=24%, list=12%, signal=27%
10	HALLMARK_myc_targets_v1	Details ...	199	0.27	1.37	0.132	0.125	0.578	6682	tags=48%, list=35%, signal=73%
11	HALLMARK_unfolded_protein_response	Details ...	112	0.25	1.30	0.000	0.181	0.768	4481	tags=32%, list=23%, signal=42%
12	HALLMARK_apoptosis	Details ...	155	0.28	1.27	0.037	0.212	0.810	2184	tags=22%, list=11%, signal=25%
13	HALLMARK_ps3_pathway	Details ...	197	0.28	1.24	0.000	0.244	0.894	2440	tags=22%, list=13%, signal=25%
14	HALLMARK_uv_response_up	Details ...	155	0.26	1.20	0.141	0.306	0.934	3002	tags=25%, list=16%, signal=30%
15	HALLMARK_androgen_response	Details ...	99	0.28	1.15	0.127	0.371	0.974	2516	tags=25%, list=13%, signal=29%
16	HALLMARK_coagulation	Details ...	119	0.28	1.15	0.104	0.378	0.974	724	tags=9%, list=4%, signal=10%
17	HALLMARK_allograft_rejection	Details ...	172	0.27	1.06	0.389	0.547	0.988	4591	tags=34%, list=24%, signal=44%
18	HALLMARK_g2m_checkpoint	Details ...	199	0.21	1.05	0.352	0.537	1.000	2641	tags=15%, list=14%, signal=17%
19	HALLMARK_apical_surface	Details ...	40	0.31	1.02	0.370	0.581	1.000	3062	tags=28%, list=16%, signal=33%
20	HALLMARK_reactive_oxygen_species_pathway	Details ...	48	0.24	1.01	0.406	0.562	1.000	2697	tags=19%, list=14%, signal=22%
21	HALLMARK_interferon_gamma_response	Details ...	169	0.25	0.97	0.454	0.630	1.000	2914	tags=24%, list=15%, signal=28%
22	HALLMARK_notch_signaling	Details ...	31	0.33	0.95	0.521	0.652	1.000	854	tags=16%, list=4%, signal=17%
23	HALLMARK_uv_response_dn	Details ...	144	0.27	0.95	0.536	0.626	1.000	2642	tags=22%, list=14%, signal=26%
24	HALLMARK_angiogenesis	Details ...	33	0.27	0.89	0.717	0.720	1.000	2325	tags=18%, list=12%, signal=21%
25	HALLMARK_protein_secretion	Details ...	96	0.18	0.83	0.732	0.803	1.000	5936	tags=39%, list=31%, signal=55%

Table: Gene sets enriched in phenotype U251\_TMZ\_D16 (4 samples) [plain text format]

	GS follow link to MSigDB	GS DETAILS	SIZE	ES	NES	NOM p-val	FDR q-val	FWER p-val	RANK AT MAX	LEADING EDGE
1	HALLMARK_cholesterol_homeostasis	Details ...	72	-0.48	-1.69	0.000	0.043	0.023	2817	tags=36%, list=15%, signal=42%
2	HALLMARK_mtore1_signaling	Details ...	199	-0.32	-1.67	0.000	0.032	0.044	3589	tags=28%, list=19%, signal=34%
3	HALLMARK_glycolysis	Details ...	194	-0.35	-1.59	0.000	0.051	0.094	3300	tags=33%, list=17%, signal=39%
4	HALLMARK_p38_akt_mtอร_signaling	Details ...	104	-0.33	-1.49	0.000	0.106	0.325	2885	tags=24%, list=15%, signal=28%
5	HALLMARK_hypoxia	Details ...	190	-0.34	-1.40	0.000	0.181	0.537	2519	tags=31%, list=13%, signal=35%
6	HALLMARK_myogenesis	Details ...	174	-0.36	-1.39	0.000	0.159	0.537	3463	tags=31%, list=18%, signal=38%
7	HALLMARK_adipogenesis	Details ...	192	-0.28	-1.34	0.000	0.198	0.681	3300	tags=27%, list=17%, signal=32%
8	HALLMARK_wnt_beta_catenin_signaling	Details ...	40	-0.40	-1.30	0.090	0.231	0.713	3095	tags=33%, list=16%, signal=39%
9	HALLMARK_e2f_targets	Details ...	200	-0.19	-1.26	0.053	0.290	0.859	3487	tags=20%, list=18%, signal=24%
10	HALLMARK_fatty_acid_metabolism	Details ...	149	-0.24	-1.20	0.086	0.335	0.901	3059	tags=21%, list=16%, signal=25%
11	HALLMARK_xenobiotic_metabolism	Details ...	180	-0.28	-1.17	0.106	0.431	0.954	2439	tags=22%, list=13%, signal=25%
12	HALLMARK_peroxisome	Details ...	101	-0.27	-1.15	0.266	0.450	0.972	3059	tags=21%, list=16%, signal=25%
13	HALLMARK_oxidative_phosphorylation	Details ...	200	-0.16	-1.11	0.326	0.512	0.985	3027	tags=16%, list=16%, signal=19%
14	HALLMARK_hedgehog_signaling	Details ...	35	-0.33	-1.10	0.298	0.498	0.985	1521	tags=26%, list=8%, signal=28%
15	HALLMARK_heme_metabolism	Details								

### 3. Discussion

Dans le but de contrer l'acquisition de la résistance au témozolomide, nous avons choisi 3 approches pour détecter les cibles potentielles de médicaments existants : l'activation de la transcription, l'activation des enhancers et l'activation des super-enhancers. Dans notre modèle de GBM en cours d'acquisition de la résistance au TMZ, nous avons mis en évidence CCND1/CDK4-6, BIRC3, CSF2, JAK1, HDAC11, MMP2, RAF1 et TOP1. Par quantification du niveau protéique, nous avons validé l'induction de leur expression par le TMZ dans les cellules tolérantes ou résistantes, sauf dans le cas de la protéine JAK1. Nous avons ensuite testé des agents thérapeutiques inhibiteurs approuvés par la FDA en combinaison avec le TMZ et avons constaté que l'inhibition de BIRC3, CCND1/CDK4-6, CSF2, HDAC11, RAF1 et TOP1 participent à lever la tolérance ou la résistance au TMZ.

Il est important de souligner que les données transcriptomiques obtenues à partir des RNA-seq ont pu être séparées en 3 clusters bien distincts et homogènes (Sensibles, Tolérantes et Résistantes) comme le montre l'analyse par composante principale. Il en est de même pour les données de ChIP-seq H3K27ac. La sélection bio-informatique des transcrits, locus hyperacétylés et super-enhancers a été volontairement très stricte ( $>2,5$  fold) de façon à identifier les régions les plus spécifiquement actives. Cette exigence s'est nécessairement répercutée sur le nombre de gènes finalement identifiés, 8 seulement, mais nous a permis de garantir la précision de nos résultats. En effet, il s'avère qu'une partie des protéines que nous avons identifiées se retrouvent dans la littérature du domaine. La protéine TOP1 a été mise en évidence dans le glioblastome comme une signature moléculaire de la survie (V. N. Patel et al., 2013) et un indicateur prédictif de la sensibilité des glioblastomes à l'irinotécan (W. Wang et al., 2019). Plusieurs études montrent que l'expression accrue de MMP-2 est de mauvais pronostic dans les GBM récidivant et elle est associée aux propriétés invasives et angiogéniques (Du et al., 2008; W. Zhou et al., 2019). Il en est de même pour BIRC3, dont l'inhibition lève la résistance des cellules de GBM à la

radiothérapie dans les micro-environnements hypoxiques (D. Wang et al., 2017). Enfin, parmi les super-enhancers actifs mis en évidence dans les cellules résistantes, nous retrouvons celui associé à MGMT, une protéine de réparation de l'ADN très fréquemment retrouvée surexprimée dans les GBM résistants. Malheureusement, même si la littérature à ce sujet nous pousse à croire que MGMT est un très bon candidat biomarqueur pour le suivi du traitement et la détection précoce de la récidive, pour l'instant, aucune méthode de détection optimale ne fait consensus et les agents disponibles ciblant MGMT ont une efficacité relative et une toxicité élevée (Mansouri et al., 2019; Oldrini et al., 2020; Yu et al., 2020).

Cependant, contrairement à toutes ces études, nos expériences ont été menées sur un modèle d'acquisition de la résistance au TMZ, nous permettant de prouver *in vitro*, pour la plupart des inhibiteurs, leur efficacité en combothérapie avec le TMZ. De plus, dans 4 cas sur 5, les inhibiteurs utilisés ont, soit un effet exclusivement sur les cellules tolérantes, soit majoré dans les tolérantes par rapport aux résistantes. Nos résultats supportent l'idée de l'importance de considérer le rôle des cellules tolérantes. L'intérêt porté à ces cellules tolérantes/persistantes émerge, à en témoigner par les récentes revues à leurs sujets (Mullard, 2020; Oliver et al., 2020; Swayden et al., 2020; Vallette et al., 2019). Cette population constitue un réservoir pour l'émergence ultérieure de cellules résistantes et proliférantes. Dans cet état transitoire de persistance à la chimiothérapie, les cellules sont souvent très peu prolifératives mais leur plasticité est très élevée, et ce notamment grâce à l'intervention de facteurs épigénétiques (De Angelis et al., 2019). Les stratégies thérapeutiques visant à éliminer les cellules tolérantes se concentrent progressivement sur les modulateurs épigénétiques (KDM, HDAC, BET inhibiteurs) (De Angelis et al., 2019). Néanmoins, encore très peu d'études expérimentales ont été menées sur ces cellules induites par effet direct de la thérapie (induction lamarckienne). Des analyses plus poussées en « single-cell » par exemple, permettraient de mieux appréhender les méthodes de reprogrammation de ces sous-populations tolérantes au TMZ.

L'adaptation transcriptionnelle pendant l'induction de la résistance peut notamment résulter de l'altération de l'activité de facteurs épigénétiques clés. L'expression différentielle des protéines dans les cellules tolérantes peut donc être le résultat d'une grande variété de mécanismes épigénétiques. Ici, nous avons fait le choix d'étudier le profil H3K27ac dont la présence au niveau des promoteurs de gènes et des enhancers corrèle globalement positivement avec les niveaux d'ARNm dans les cellules de glioblastomes (Mack et al., 2019). Ainsi, la surexpression des protéines mises en évidences dans notre étude pourrait être le fruit d'un remodelage adaptatif d'enhancers (Debruyne et al., 2019). Plus précisément, les cellules tolérantes seraient capables d'activer des enhancers alternatifs conduisant à la stimulation de gènes de survie. L'une des principales caractéristiques des enhancers (simples et super-enhancers) est leur capacité à former des boucles pour réguler l'activité des facteurs de transcription. Afin de tester l'hypothèse des enhancers alternatifs, il est envisageable d'explorer la cartographie des contacts *cis* et *trans* de la chromatine dans les cellules tolérantes pour identifier des TADs spécifiques. A titre d'exemple, une récente étude menée sur le glioblastome a permis de mettre en évidence, par Hi-C *in situ*, la formation d'une nouvelle boucle SE-promoteur régulant à la hausse l'expression de CD276 dans les cellules souches de glioblastome (Johnston et al., 2019). La littérature se penche de plus en plus sur la capacité des SE à piloter la transcription d'oncogènes et leurs rôles dans la chimiorésistance (G.-H. Li et al., 2021). Des stratégies visant à perturber la communication entre les SE et leurs promoteurs cibles ont vu le jour. C'est le cas des inhibiteurs de la famille des protéines à bromodomaine, et à domaine extra-terminal (BET), qui se lient aux histones acétylées, et dont fait partie BRD4. Les études pré-cliniques sur ces inhibiteurs ont montré des effets prometteurs contre les tumeurs, et beaucoup d'entre eux font l'objet d'essais cliniques (Doroshow et al., 2017). Néanmoins, l'utilisation des BET inhibiteurs est limitée par le manque d'études mécanistiques plus poussées et leurs toxicités liées à leur manque de spécificité (Crump et al., 2021; Shorstova et al., 2021). L'utilisation de biomarqueurs prédictifs de la sensibilité

à ces inhibiteurs et le développement de nouvelles molécules plus sélectives s'avère nécessaire.

Une autre hypothèse est celle de l'altération de l'activité des enzymes modifcatrices d'histones, qui en réponse au traitement, provoquent des profils transcriptionnels favorisant la tolérance des cellules (Liau et al., 2017). Dans le cadre de notre étude il pourrait s'agir d'une activation aberrante des enzymes responsables de l'acétylation H3K27 au niveau du TSS ou des régions enhancers. Cependant, étant donné que H3K27ac est localisé, de façon antagoniste, sur les mêmes régions que H3K27me3, il n'est pas exclu que l'enrichissement en H3K27ac soit concomitant à la perte de H3K27me3, faisant intervenir d'autres enzymes. Il est concevable d'essayer d'identifier les enzymes responsables de ces altérations, afin de tester l'efficacité d'inhibiteurs spécifiques sur la réversion de cet état de tolérance au TMZ (Sharma et al., 2010; Z. Wang et al., 2020). Toutefois, rappelons que les HMT comme les HAT sont très nombreuses et certaines enzymes de ces familles ont des effets redondants ce qui pourrait avoir comme conséquence de limiter l'impact des inhibiteurs spécifiques (D. Wu et al., 2020). A l'inverse, l'utilisation de pan-inhibiteurs est freinée par l'apparition d'effets secondaires qui peuvent s'expliquer par la perte de l'équilibre précieux entre protéines écrivains et effaceurs de PTMs (Fiorentino et al., 2020). A noter que cette hypothèse n'exclue pas celle des enhancers alternatifs, elles peuvent avoir des effets synergiques. Dans le cas particulier de BIRC3, que nous avons mis en évidence par l'approche transcriptomique uniquement, toutes les hypothèses sur les mécanismes aboutissant à sa surexpression sont permises.

Parmi les protéines surexprimées dans les cellules de GBM tolérantes, seule l'inhibition de MMP-2 n'a pas eu les résultats escomptés. L'utilisation du batimastat, inhibiteur de métalloprotéases à large spectre, en combinaison avec le témozolamide, n'a pas permis de potentialiser les effets du TMZ sur la mort cellulaire des U251. Ces résultats ne sont pas pour autant aberrants puisque l'essentiel des articles évaluant l'effet de l'inhibition de

MMP-2 conluent à un impact sur l'invasion et la migration (Aroui et al., 2016; Rahme & Israel, 2015), or dans le cas notre étude, seule la mort cellulaire à court terme a été mesurée. Il serait intéressant de compléter nos résultats par des analyses de migration et d'invasion en présence d'un inhibiteur de MMP-2. Cette protéine a déjà montré son potentiel comme biomarqueur pour le suivi du traitement au bévacizumab dans le GBM et, plus récemment, des chercheurs ont rapporté que l'expression de MMP-2 dans les gliomes était étroitement liée à l'uniformité du signal IRM de la tumeur (diamètre, gravité de l'œdème péritumoral, degré de rehaussement, grade pathologique) (Tabouret et al., 2015; H. Zhang, Ma, et al., 2019). En se basant sur la littérature et sur nos résultats, il pourrait être envisagé d'utiliser le niveau plasmatique de MMP-2 et/ou les signaux IRM de la tumeur pour monitorer la délivrance de combothérapies anti-MMP-2/TMZ de façon à limiter l'invasion tumorale.

Concernant la protéine RAF1, nos données prouvent à la foi sa surexpression dans les cellules tolérantes au TMZ et l'efficacité de son inhibiteur, ce qui n'avait pas encore été démontré à ce jour. Néanmoins, la littérature mentionne RAF1 comme la cible de différents miRs. Les miR-424 et miR-7-5-p fonctionnent comme des suppresseurs de tumeurs en ciblant RAF1, respectivement pour réguler l'apoptose via la voie de signalisation ERBB, et la prolifération des cellules endothéliales pour l'angiogenèse (Gheidari et al., 2021; Z. Liu et al., 2014). Ces deux miRs sont sous représentés dans le GBM. Ici, nous proposons l'existence d'une autre voie de régulation de l'expression de RAF1, via l'activité des régions enhancers.

Nos données sur CSF2 sont particulièrement intéressantes car on le retrouve dans les trois approches. Cette protéine est d'ailleurs très enrichie dans le milieu de culture des cellules tolérantes, bien qu'à ce stade, les cellules soient peu nombreuses. Nos résultats vont dans le sens de ceux obtenus par Sielska et son équipe, qui ont découvert très récemment que le CSF2 est surexprimé dans un sous-ensemble de GBM mésenchymateux et il favorise

l'accumulation de cellules myéloïdes dans le microenvironnement des GBM ainsi que la progression tumorale (Sielska et al., 2020). Aussi, l'utilisation d'un anticorps ciblant le CSF2 a montré des résultats très satisfaisants sur les cellules de phénotype tolérante, il pourrait être intéressant de compléter cette approche par l'utilisation d'un anticorps neutralisant le récepteur au CSF2. La détection de CSF2 pourrait constituer un très bon indicateur pour l'utilisation d'une immunothérapie à son encontre chez les patients susceptibles de répondre au traitement. Dans ce contexte, nous avons réalisé des expériences de dosage à partir du sérum congelé de deux patients qui n'ont pas permis de détecter la présence de CSF2 (résultats non montrés). Plusieurs raisons peuvent expliquer ce résultat mais la plus probable reste que l'enrichissement local en CSF2 dans le microenvironnement de la tumeur ne se reflète pas dans la circulation périphérique. Pour pallier ce problème nous pourrions considérer de doser CSF2 dans le liquide cérébro-spinal, de la même façon qu'il est dosé dans le liquide synovial articulaire des patients atteints de polyarthrite rhumatoïde (Reynolds et al., 2016). Il est possible aussi que sur ces deux patients, aucun ne présentait de phénotype tumoral enrichi en CSF2, c'est-à-dire, des GBM mésenchymateux. Pour cette raison, mais aussi pour renforcer l'ensemble de nos résultats, l'échantillon de patient utilisé pour les dosages de protéines exosomales mérite d'être agrandi. Il faut aussi tenir compte du fait que l'utilisation des inhibiteurs testés sur notre modèle cellulaire pourraient se heurter, chez les patients, à la barrière hémato-encéphalique.

Nous avons fait le choix d'orienter nos travaux sur l'utilisation, comme biomarqueurs, de protéines différentiellement exprimées au cours de l'acquisition de la résistance. Il semble important de discuter, aussi, l'utilisation des nucléosomes circulant comme biomarqueurs. En effet, nos expériences soulignent l'apparition de régions enrichies en H3K27ac, et l'intérêt de ce type de PTMs comme biomarqueur sanguin fait l'objet de recherches. Comme nous l'avons expliqué dans la revue « Cell-free circulating epimarks in cancer monitoring » parue en 2020, des nucléosomes sont libérés dans les liquides biologiques après la mort cellulaire, ou, sécrétés dans le sang par des mécanismes actifs (Duforestel

et al., 2020). Le cancer peut provoquer une augmentation de la quantité de nucléosomes libres circulants et ces derniers peuvent être isolés à l'aide d'anticorps spécifiques. Si pour l'instant, aucune étude n'a pu conclure à un lien entre les niveaux de nucléosomes circulants et le diagnostic précoce des cancers, les nucléosomes peuvent être des biomarqueurs efficaces pour prédire la réponse au traitement (Fahmueller et al., 2012; Holdenrieder et al., 2004; Stoetzer et al., 2013). Dans leurs récents travaux, Van den Ackerveken et ses collaborateurs, ont développé une méthode rapide et robuste d'isolation de nucléosomes circulants dans le plasma. En comparant de façon globale les PTMs des histones de 9 patients atteints de cancers colorectaux et de 9 donneurs sains, ils ont identifiés 13 PTMs spécifiquement enrichis chez les patients malades. Parmi elles, l'acétylation de la lysine 27 de l'histone H3 était enrichie à la fois dans le tissu tumoral et le plasma des patients et pourrait refléter la signature épigénétique de la tumeur (Van den Ackerveken et al., 2021). Ainsi, nous pourrions compléter nos résultats, en parallèle des protéines exosomales, en dosant le niveau total de H3K27ac ou par ChIP-seq des nucléosomes circulants dans le plasma des patients en cours de traitement.

## CHAPITRE 2: Identification, par cible CRISPR KO, de BCL11A comme acteur de la résistance des cellules de glioblastome au témozolomide par reprogrammation transcriptomique et épigénétique.

### 1. Préambule

Toujours dans le cadre de la résistance au témozolomide acquise par les GBM, et dans le but de répondre au besoin de trouver de nouvelles thérapies efficaces et adaptées, nous avons tenté d'identifier de nouveaux mécanismes moléculaires participant à l'assimilation de la résistance au cours du traitement. A partir des résultats issus d'un criblage par la technique CRISPR KO nous avons porté notre attention sur BCL11A, une protéine très peu décrite dans le glioblastome multiforme. BCL11A est un facteur de transcription qui contient un domaine de liaison à l'ADN en doigt de zinc, se lie spécifiquement aux motifs 5'-TGACCA-3', et peut tenir le rôle de répresseur transcriptionnel via le recrutement du complexe NuRD (Nucleosome Remodeling Deacetylase) ou de l'histone méthyltransférase PRC2 (Moody et al., 2018). La sous-expression de BCL11A a été identifiée comme avantage sélectif au cours de l'acquisition de la résistance. Nous avons exploré une partie des mécanismes expliquant le rôle de BCL11A dans la sensibilité au TMZ par des méthodes de ChIP-seq pour déterminer les gènes cibles de ce facteur de transcription. Aussi, comme expliqué dans l'introduction, les facteurs de transcription une fois activés et liés aux régions régulatrices de l'ADN peuvent recruter avec eux des enzymes de remodelage de la chromatine. Des interactions aberrantes peuvent entraîner la reprogrammation localisée du profil épigénétique et participer à la dérégulation de l'expression des gènes associés. Par conséquent nous avons étudié l'interactome de BCL11A et mis en évidence la protéine DNMT1. Enfin, nous avons évalué le potentiel biomarqueur de BCL11A. Nos expériences ont été menées sur une lignée cellulaire de glioblastome (U251) au cours du traitement

par le TMZ sur des cellules sensibles (D0), tolérantes (D9), et résistantes (D30) ainsi que sur des prélèvements sanguins et du tissu tumoral de patients.

## 2. Article (en cours de rédaction)

# **CRISPR KO screen identifies BCL11A as an actor of temozolomide sensitivity of glioblastoma cells**

Manon Duforestel<sup>1,2,3,4</sup>, Yuna Landais<sup>1,2,5</sup>, Elen Goujon<sup>1,2,5</sup>, Arulraj Nadaradjane<sup>1-2-3-4-6</sup>, Hisham Mohammed<sup>7</sup>, Gwenola Bougras-Cartron<sup>1-2-3-4</sup>, François M Vallette<sup>1-2-6</sup>, Jean-Sébastien Frenel<sup>1-8</sup>, Aurélien A. Sérandour<sup>1,2,3,4,5†</sup> and Pierre-François Cartron<sup>1-2-3-4-6\*†</sup>

<sup>1</sup> CRCINA, INSERM, Université de Nantes, Nantes, France.

<sup>2</sup> Equipe Apoptose et Progression tumorale, LaBCT, Institut de Cancérologie de l'Ouest, Saint Herblain, France.

<sup>3</sup> Cancéropole Grand-Ouest, réseau Niches et Epigénétique des tumeurs (NET).

<sup>4</sup> EpiSAVMEN network (Région Pays de la Loire).

<sup>5</sup> Ecole Centrale Nantes, Nantes, France.

<sup>6</sup> LabEX IGO, Université de Nantes, France.

<sup>7</sup> Cancer Early Detection Advanced Research Center, Knight Cancer Institute, OHSU, Portland, USA.

<sup>8</sup> Institut de Cancérologie de l'Ouest, Saint-Herblain, France

<sup>†</sup> These authors contributed equally to this work

\*Correspondence: [pierre-francois.cartron@inserm.fr](mailto:pierre-francois.cartron@inserm.fr), CRCINA, INSERM U1232, Equipe Apoptose et Progression tumorale, LaBCT, Institut de Cancérologie de l'Ouest, Boulevard du Pr Jacques Monod, Saint Herblain, 44805, France.

Keywords: glioblastoma, temozolomide, CRISPR screen, BCL11A.

In an effort to address the need for novel, effective and tailored therapies to counter glioblastoma multiforme recurrence, we sought to identify novel molecular mechanisms involved in the acquisition of temozolomide (TMZ) resistance. Based on our CRISPR KO screen, we focused on BCL11A, a transcription factor that is poorly described in GBM. We found that the KO of BCL11A provides a selective advantage when U251 cells are challenged by TMZ. By ChIP-seq, we found a BCL11A super-enhancer at the *PDGFR* gene. We also discovered the existence of BCL11A/DNMT1 complex on chromatin. Furthermore, we show that the close proximity between BCL11A and DNMT1 was transiently lost in TMZ tolerant cells, and the HMGN3 protein was identified as a potential signature of this loss. Finally, by studying the expression of the mRNA *BCL11A* in patient samples we justify the need for further investigations to assert that BCL11A could be used as a non-invasive biomarker of TMZ resistance acquisition.

## INTRODUCTION

Whether used alone or in combination with radiation therapy or surgery, chemotherapy is the mainstay of treatment for many cancers at different stages of the disease. However, despite several successes, it is common to observe a phenomenon of resistance to cancer chemotherapy. This phenomenon can be considered as the innate and/or acquired capacity of cancer cells to escape the cytotoxic or cytostatic effects of chemotherapy agents, i.e. as the capacity of cancer cells to continue their growth/development (to eventually lead to the death of the patient). Thus, the understanding of the molecular mechanisms at the origin of the chemoresistance process and the development of therapeutic strategies to limit this phenomenon constitute two major challenges in cancerology.

With the improving preclinical models and the development of powerful high-throughput screening techniques, it is now known, that the chemoresistance phenomenon is the result of alterations in a multitude of molecular mechanisms (increased drug efflux, decreased drug absorption, enhanced drug detoxification, altered drug target expression, deregulation of apoptotic proteins, deregulation of the cell cycle etc.(Holohan et al., 2013), whose origins can be multiple: genetic, epigenetic, epitranscriptomic and others. In this way, echoing these multiple origins, several molecular targets can be identified to fight chemoresistance, and several "inhibitory" strategies can be imagined.

Consequently, the real challenge in this field is now threefold: i) to identify a molecular target, ii) to develop an effective and selective therapeutic strategy for the molecular target in question, and iii) to develop a companion test to detect which patients are eligible for this therapy and when they should receive the therapy in question. In other terms, the real issue is to rely on the personalized medicine concept to administer "the right molecule to the right patient at the right time".

The glioblastoma multiforme (GBM) is the most common (3.19 cases per 100,000 people per year) and the most aggressive (5-year survival rate of 5%) primary malignant brain cancer. To date, the chemotherapeutic treatment of GBM is systematically temozolomide. Current treatments cannot cure GBM patients but only prolong their overall survival. The use of immunotherapy, promising for other types of cancers, as adjuvant therapy, has proven to be ineffective in the GBM treatment. Thus, a better understanding of molecular mechanisms promoting the acquisition of TMZ resistance is necessary in the context of GBM. Based on a CRISPR KO screen, the present article attempts to identify new actors of the acquired TMZ resistance of GBM.

## RESULTS

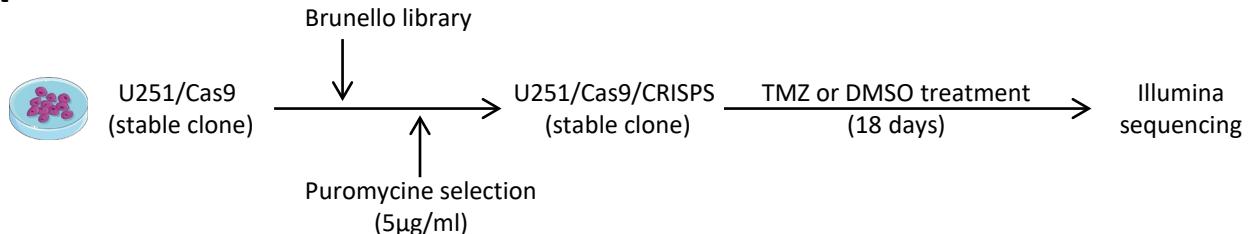
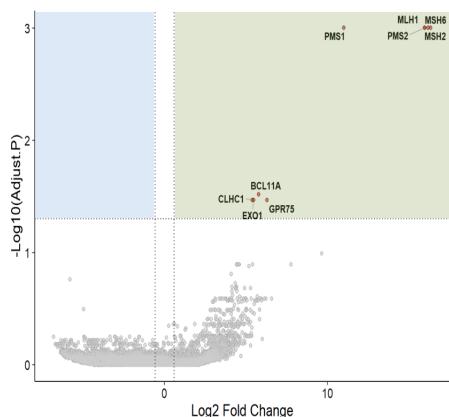
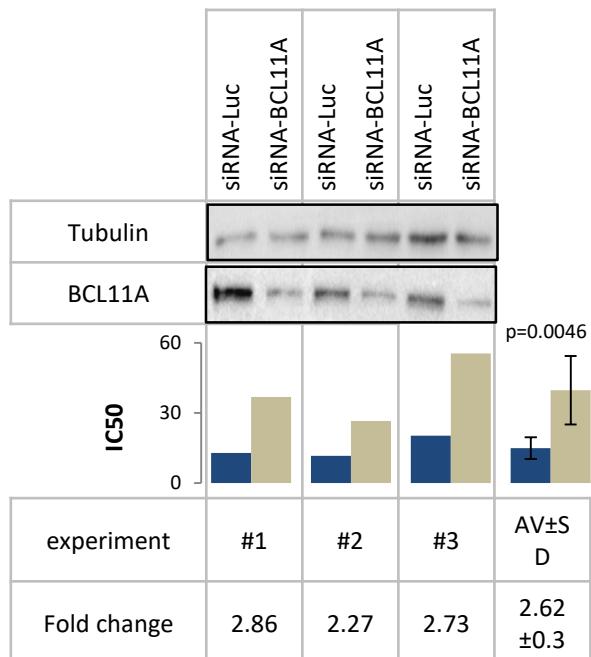
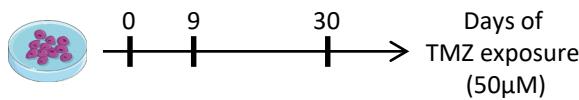
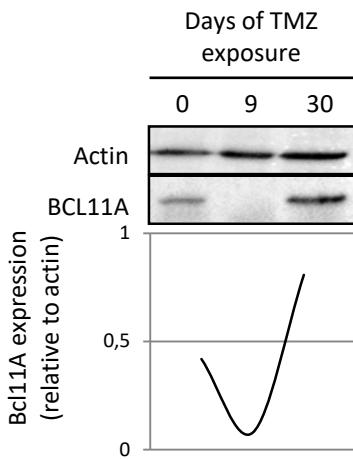
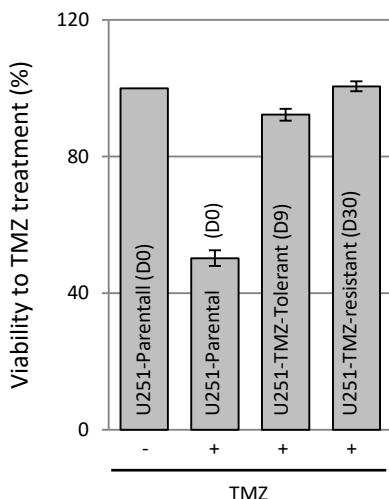
### CRISPR screen identifies the loss of BCL11A as providing a selective advantage against TMZ treatment

Among the experimental strategies that could allow the identification of protein actors playing a role in the acquisition of TMZ resistance in GBM cells, we chose here to perform a CRISPR KO screen on U251 cells challenged by TMZ (**Figure 1A**). We transduced Cas9-expressing U251 cells with the CRISPR knockout pooled library Brunello (Doench et al., 2016). After antibiotic selection, 100 million cells were treated with vehicle (DMSO) or with 50 uM TMZ. About 95% of TMZ-treated cells died after a few days and reached the confluence after 18 days. At this stage, we harvested the cells for DNA extraction, sgRNA library preparation and sequencing. Using MAGeCKflute, we identified nine genes for which the KO provided resistance to TMZ (**Figure 1B**) including BCL11A, CLHC1, GPR75 and 6 members of the MMR complex: EXO1, MLH1, MSH2, MSH6, PMS1 and PMS2. Indeed, the loss of MMR activity is a well described TMZ-resistance pathway (Lee, 2016).

Among the genes identified in the screen, we decided in this study to focus on BCL11A (transcription factor B-cell lymphoma/leukemia 11A; UniProtKB: Q9H165), a transcription

**A**

CRISPR KO screen

**B****C****D****F****E**

**Figure 1 : CRISPR screen identifies the loss of BCL11A as providing a selective advantage against TMZ treatment.**

**A.** Experimental design of the CRISPR KO screen (Brunello library) on U251 cells expressing stably the Cas9 protein to identify genes involved in TMZ tolerance/resistance. **B.** MAGeCKFlute analysis of the CRISPR data: the KO of the genes in the right-top panel are considered as providing a significant selective advantage in presence of TMZ. **C.** Impact of the knock-down of BCL11A in U251 cells on the TMZ IC50. **D.** Long term exposure of wild-type U251 cells to TMZ. **E.** Cell viability in presence of 50 µM TMZ on cells never exposed to TMZ (U251-parental) and cells exposed 9 days (Tolerant) or 30 days (Resistant). **F.** Protein expression of BCL11A in U251 cells after 0, 9 and 30 days exposure to TMZ.

factor expressed in high level in brain and involved in brain development (Dias et al., 2016). We wanted to validate with another approach that BCL11A loss induces TMZ resistance. For this purpose, three independent siRNA-mediated knock-down of BCL11A were performed (**Figure 1C**). Our data indicates that U251 cells depleted with BCL11A have a TMZ IC<sub>50</sub> 2.6 times higher than control cells ( $p=0.0046$ ) (**Figure 1C**).

Finally, BCL11A expression was analyzed during the acquisition of the TMZ resistance in wild-type U251 cells. For this purpose, the cells were cultured in presence of TMZ during 30 consecutive days (**Figure 1D**). Parental cells were named U251-TMZ-P, cells that survived a 9-day exposure to TMZ were termed tolerant (U251-TMZ-T), and cells that survived a 30-day exposure to TMZ were named resistant (U251-TMZ-R) (**Figure 1D**). This denomination was confirmed by a cell viability test showing that cells cultured for 30 consecutive days with TMZ were insensitive to TMZ (100% viability), while cells cultured for 9 consecutive days with TMZ were tolerant to TMZ with a viability of more than 90% (**Figure 1E**). WB analyses show that BCL11A expression is silenced in U251-T cells before being restored in U251-R cells (**Figure 1F and Supplementary Figure S1**). Thus, BCL11A expression tends to follow a U-curve in U251 cells during the kinetics of exposure to TMZ leading them to chemotherapy resistance (**Figure 1F**).

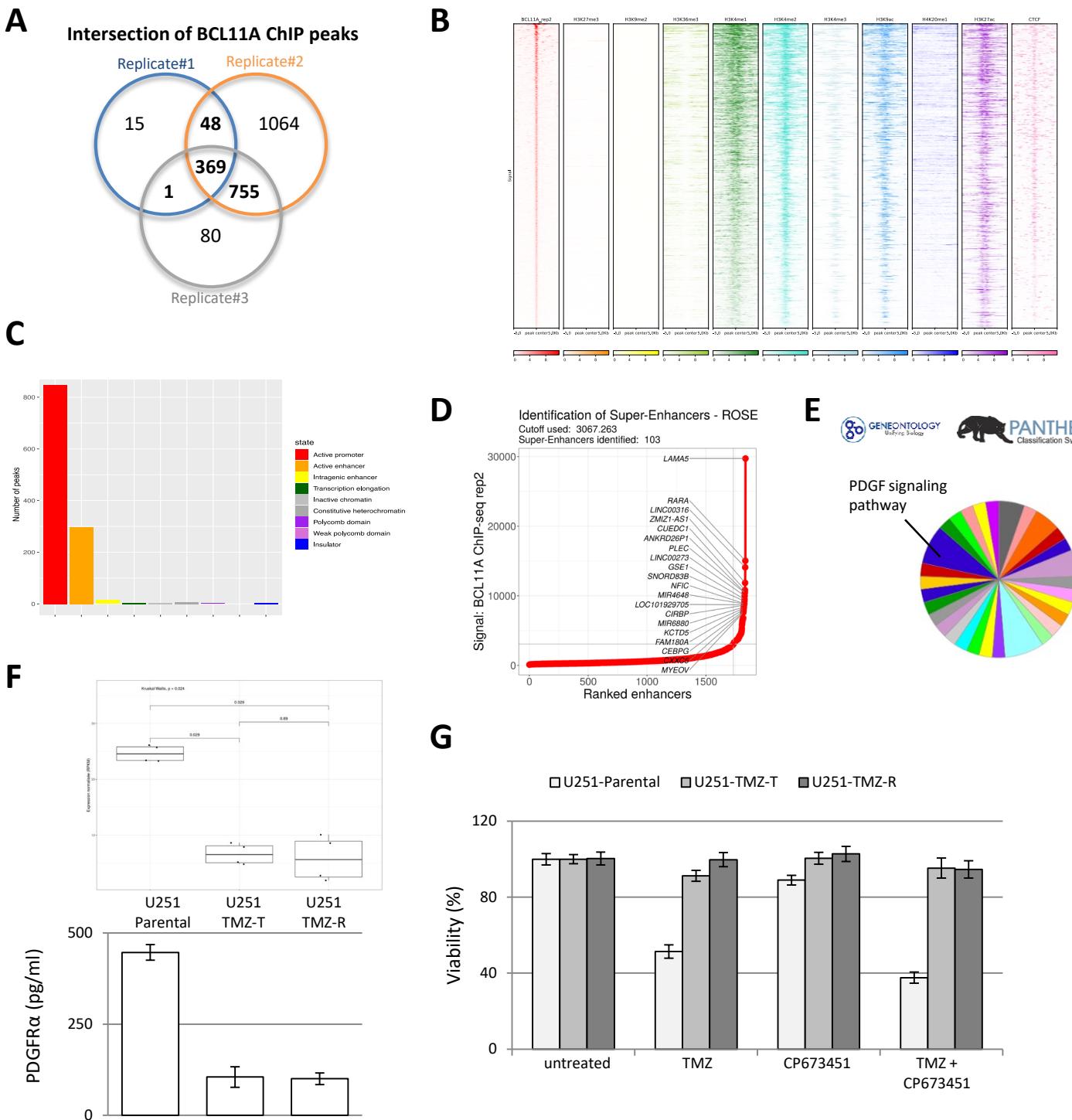
Collectively, our results show that the acquisition of TMZ resistance is accompanied by a transient decrease/silencing in BCL11A expression when the cells are TMZ-tolerant.

### **Identification of PDGFR $\alpha$ as a putative BCL11A super-enhancer-regulated gene during the acquisition of TMZ resistance**

To elucidate the role of BCL11A in TMZ-sensitivity, we aimed at identifying the BCL11A-regulated genes. For that, three independent BCL11A ChIP-seq experiments were performed in U251 cells. We found 1173 BCL11A peaks detected in at least two of our three independent replicates (**Figure 2A**). We then annotated the BCL11A peaks according to their chromatin state. For this purpose, we produced a panel of 10 ChIP-seq : CTCF, H3K4me1, H3K4me2, H3K4me3, H3K9ac, H3K9me2, H4K20me1, H3K27ac, H3K27me3 and H3K36me3. The chromatin states were defined using ChromHMM (Ernst & Kellis, 2012) (**Figure 2B**).

Our data indicated that the recruitment of BCL11A on chromatin occurred almost exclusively in active promoters and active enhancers ( $\approx 72\%$  and  $\approx 27\%$ , respectively) enriched in acetylated histones and methylated H3K4 (**Figure 2C**).

We then completed our study by identifying BCL11A super-enhancers using the bioinformatic tool ROSE (Lovén et al., 2013; Whyte et al., 2013) (**Figure 2D**). Thus, 123 BCL11A super-



**Figure 2 : Identification of PDGFR $\alpha$  as a putative BCL11A super-enhancer-regulated gene during the acquisition of TMZ resistance.**

**A.** Overlap between BCL11A peaks identified in three biological ChIP-seq replicates in U251 cells. BCL11A peaks present in at least two replicates were selected for the rest of the study. **B.** Heatmaps showing the ChIP-seq signals of various histone marks and CTCF at BCL11A peaks in U251 cells. **C.** Number of BCL11A peaks for each chromatin state determined by ChromHMM in U251 cells. **D.** Rank Ordering of Super-enhancers analysis identifies 123 BCL11A super-enhancers. The BCL11 super-enhancers with the highest signal are located on *LAMA5* and *RARA* genes. **E.** Panther ontology analysis of the genes associated with BCL11A super-enhancers. PDGF and Integrin pathways were the main identified biological processes. **F.** RNA-seq and protein expression of PDGFR $\alpha$  in U251 parental, tolerant and resistant against TMZ. **G.** Cell viability after treatment of TMZ, CP673451 (PDGFR inhibitor) and in combination on parental, TMZ-tolerant and TMZ-resistant U251 cells.

enhancers were predicted. PANTHER gene-ontology pathway categorization identified PDGF and Integrin signaling pathways as the two main pathways regulated by the BCL11A super-enhancers (**Figure 2E** and **Supplementary Figure S2**).

By focusing our study on PDGFR $\alpha$ , we then noted that PDGFR $\alpha^{\text{mRNA}}$  and PDGFR $\alpha$  protein expression decreased in U251-TMZ-T and U251-TMZ-R in comparison with U251-TMZ-P (**Figure 2F**). In parallel, we also observed that the U251-TMZ-T and U251-TMZ-R cells were unresponsive to a combination of TMZ and CP673451 (CAS number: 343787-29-1), a PDGFR $\alpha$  inhibitor, whereas an additive effect is observed for this combotherapy on U251-P cells (**Figure 2G**).

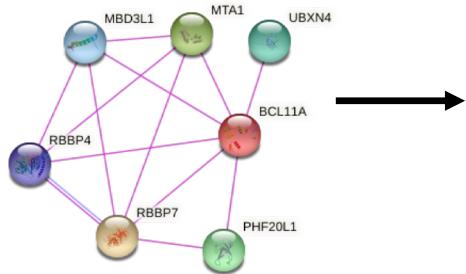
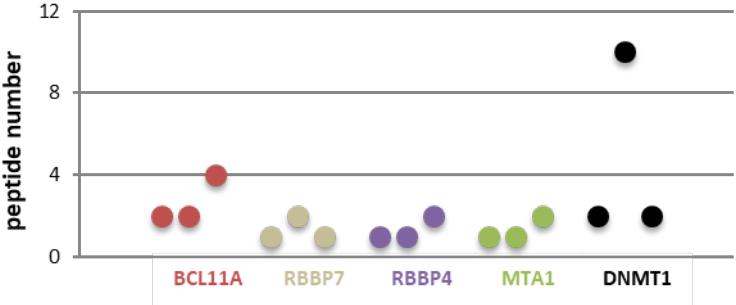
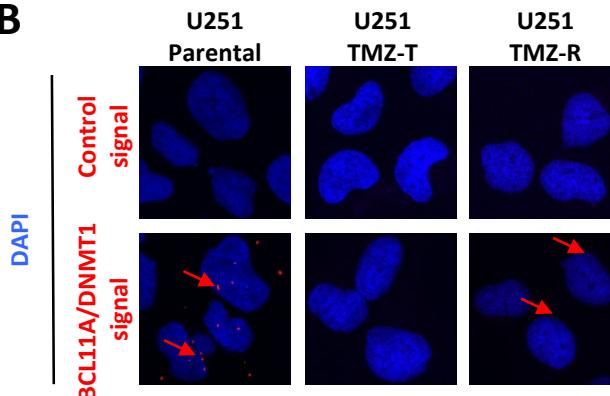
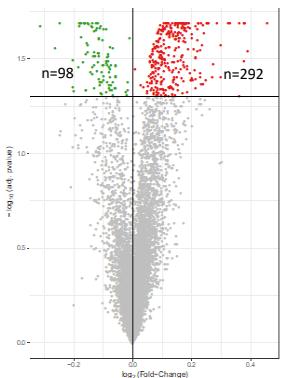
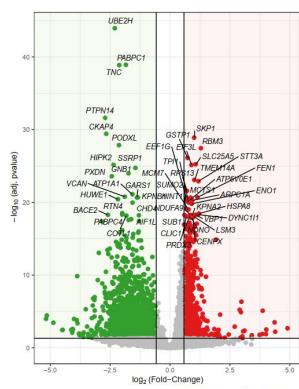
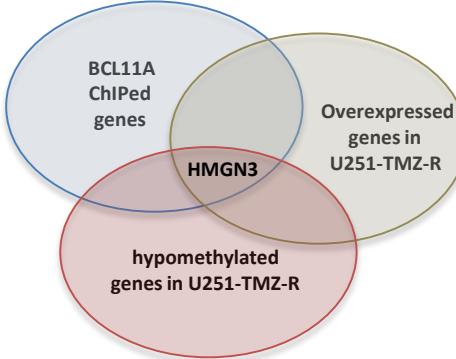
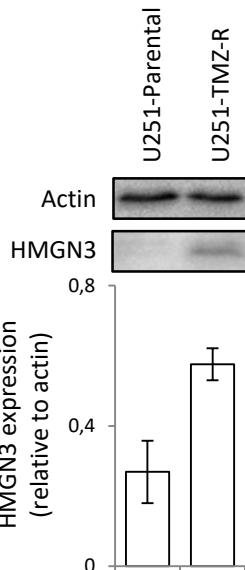
In the end, to identify the existence of BCL11A-associated super-enhancers in our model, all these data are supporting the idea that the “TMZ + PDGFR $\alpha$  inhibitor” combotherapy is ineffective when the cells are said to be tolerant and resistant to TMZ.

### **Identification of HMGN3 as a signature associated with loss of BCL11A/DNMT1 complex occurring during the TMZ resistance acquisition**

Chen et al., reporting that BCL11A can directly interact with DNMT1A in two breast cancer cell lines (SUM149 and MDA-MB-231) (Chen et al., 2018), in that respect, we first analyzed the presence of BCL11A/DNMT1 complex on chromatin of U251 cells. For that, RIME (Rapid immunoprecipitation mass spectrometry of endogenous protein) was performed with an antibody directed against BCL11A. Despite the weak number of peptides obtained, mass spectrometry analysis of the BCL11A immunoprecipitation products showed the presence of RBBP7, RBBP4 and MTA1 peptides, which are members of the BCL11A interactome according to STRING DB (**Figure 3A**). We also observed the presence of DNMT1 peptides. Thus, these data are consistent with the existence of BCL11A/DNMT1 complex on the chromatin of U251 cells.

We next studied the evolution of the DNMT1/BCL11A interaction by investigating the close proximity between BCL11A and DNMT1 using Proximity Ligation In Situ Assays (P-LISA). Our data indicated that the close proximity between BCL11A and DNMT1 was transiently lost during the acquisition of TMZ resistance by U251 cells since the evolution of the BCL11A/DNMT1 signal follows a U-curve (**Figure 3B**).

The fact that BCL11A/DNMT1 signaling decreases during the acquisition of TMZ resistance suggests that genes epigenetically regulated by the BCL11A/DNMT1 complex could be hypomethylated during the acquisition of TMZ resistance. To identify the hypomethylated genes associated with the acquisition of TMZ resistance, Infinium MethylationEPIC Array

**A****BCL11A interaction (STRING DB)****RIME analysis****B****C****DMP in U251-Parental and U251-TMZ-R cells****D****DEG in U251-Parental and U251-TMZ-R cells****E****F****Figure 3 : Identification of HMGN3 as a signature associated with loss of BCL11A/DNMT1 complex occurring during the TMZ resistance acquisition.**

- Unique peptides identified in BCL11A RIME for the protein BCL11A, RBBP4/7, MTA1 and DNMT1 in U251 cells.
- Proximity Ligation Assay identifies physical interaction between BLC11A and DNMT1 in parental and TMZ-resistant U251 cells.
- Volcano-Plot showing the Differentially Methylated Probes from Infinium MethylationEPIC array between parental and TMZ-resistant U251 cells.
- Volcano-Plot showing the differentially expressed genes in 3'RNA-seq between parental and TMZ-resistant U251 cells.
- Overlap between genes bound by BCL11A in parental cells, over-expressed genes in resistant cells and genes with hypomethylated promoters in resistant cells.
- Protein expression of HMGN3 in parental and TMZ-resistant U251 cells.

(850k) was performed. The analysis of Differential Methylated Position (DMP) from Infinium MethylationEPIC Array revealed that 388 CpGs were differentially methylated between U251-P and U251-TMZ-R cells: 96 CpGs were hypermethylated in U251-P in comparison with U251-TMZ-R and 292 CpGs were hypermethylated in U251-TMZ-R in comparison with U251-P cells (**Figure 3C**).

In parallel, 3'RNA-seq experiments identified 2847 differentially expressed genes (DEG) between U251-parental and U251-TMZ-R cells: 1014 genes were overexpressed in U251-TMZ-R in comparison with U251-P cells, and 1833 genes were overexpressed in U251-P in comparison with U251-TMZ-R cells (**Figure 3D**).

By integrating the results of BCL11A ChIP-seq with the data of RNAseq and Infinium MethylationEPIC Array, we observed that HMGN3 was the unique gene being bound by BCL11A, hypomethylated and overexpressed in U251-TMZ-R (**Figure 3E**).

Western-Blot also indicated that HMGN3 was overexpressed in U251-TMZ-R in comparison with U251-P cells (**Figure 3F and Supplementary Figure S3**).

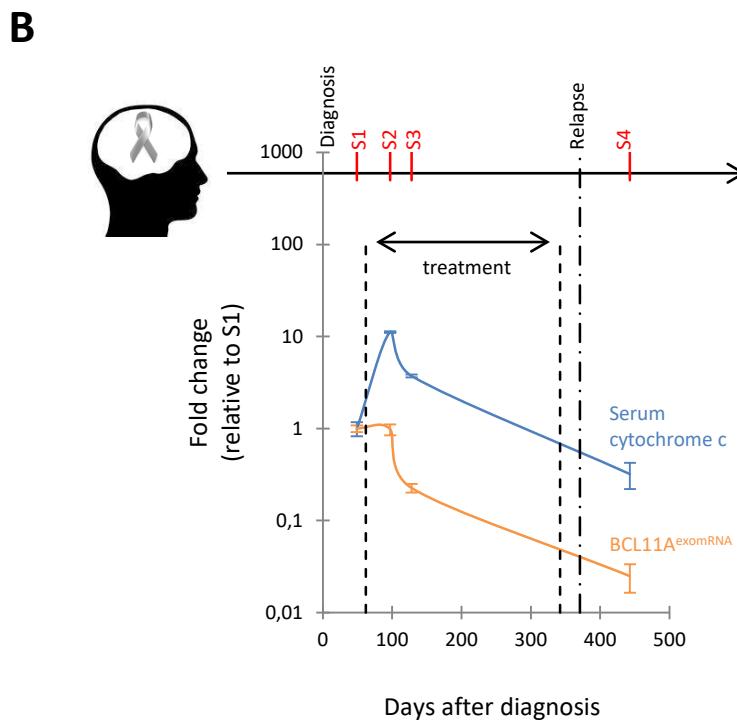
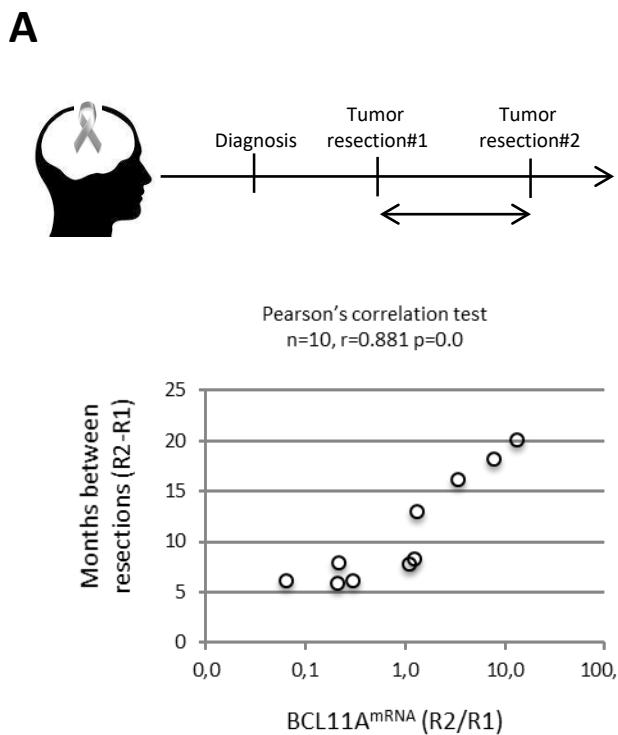
Thus, these data support the idea that HMGN3 could be a signature associated with the loss of BCL11A/DNMT1 complex occurring during the TMZ resistance acquisition.

## Investigations in GBM patients

Finally, we compared our *in cellulo* observations with GBM cases.

In a first experiment, we wondered if the variation of BCL11A expression level could be correlated with the time to relapse, which is synonymous with TMZ resistance. For this purpose, we used a cohort of 10 patients for whom we have primary and recurrent tumor resections (**Figure 4A**). For each patient, the variation of BCL11A<sup>mRNA</sup> expression within two resections was analyzed by RT-qPCR and the time to relapse was considered as the time between the two surgical resections (R2/R1) (**Supplementary Figure S4**). Our data shows that the decrease in BCL11A<sup>mRNA</sup> R2/R1 expression ratio correlated with a shorter time to relapse (**Figure 4A**). In other words, these data support the idea that the decrease in BCL11A<sup>mRNA</sup> expression in GBM patients during the temozolomide therapy could be a molecular signature associated with a faster tumor recurrence characterized by a short time between the 2 tumor resections.

In a second study, we aimed to provide evidence that it could be possible to monitor the expression of BCL11A<sup>mRNA</sup> during the therapy of a GBM patient via the longitudinal analysis of the exosomal level of BCL11A<sup>mRNA</sup> (exoBCL11A<sup>mRNA</sup>). For that, blood samples taken before and during the TMZ therapy of a GBM patient were used (**Figure 4B**). Our study indicated that exoBCL11A<sup>mRNA</sup> decreased during the TMZ therapy of GBM patients.



**Figure 4 : Investigation of BCL11A in Glioblastoma patients**

**A.** Ratio of BCL11A mRNA expression measured by RT-qPCR in second versus first tumor resections in 10 GBM patients. **B.** Evolution of cytochrome c in serum and BCL11A mRNA in serum exosomes in a GBM patient at 4 time points of its disease.

Interestingly, we observed that the decrease of exoBCL11A was parallel to the decrease of serum cytochrome C level, i.e. to the decrease of a marker reflecting the apoptosis level of the tumor cells according to a part of the literature (Barczyk et al., 2005; Kavathia et al., 2009).

## DISCUSSION

Advances in the understanding of the molecular mechanisms that govern TMZ acquired resistance could provide meaningful progress in the treatment of GBM. Indeed, GBM is one of the most aggressive human cancers, and treatment strategies for this disease have only increased survival moderately. Nevertheless, the technological development of high-throughput sequencing, genetic screening tools (such as the CRIPSR/Cas9 system) and the consideration of the concept of personalized medicine have given rise to the ambition to set up new therapeutic protocols more in line with the patient and the plasticity of these tumor cells, i.e. protocols more adapted to the evolution of the patient's tumor cells following the administration of a first so-called reference treatment.

The work presented here aims at answering this ambition by studying the adaptation of GBM cells to TMZ (i.e. to the reference anti-GBM chemotherapeutic agent). The use of a CRISPR KO screen showed that the acquisition of resistance to TMZ was accompanied, among other things, by the loss of expression of BCL11A. This result was then confirmed by a siRNA invalidation approach showing that the loss/decrease of BCL11A expression alone induced a loss of sensitivity to TMZ. To our knowledge, several CRISPR screens have already been performed in the framework of the GBM. Using a CRISPR screen targeting 5689 lncRNAs, Lui et al., were able to identify lncGRS-1 as an lncRNA involved in the radioresistance of gliomas (Liu et al., 2020). The work of Huang et al., identified E2F6 as a promising target to abrogate the TMZ resistance in GBM (Huang et al., 2019). By performing a CRISPR-Cas9 knockout (KO) screens in patient-derived GBM stem-like cells (GSCs) and human neural stem/progenitors (NSCs), Toledo et al., reports that PKMYT1 KO causes lethality in GSC (Toledo et al., 2015). In addition to BCL11A, our CRISPR screen identified several MMR genes as being involved in TMZ resistance. The result is not new and confirms several works showing that MMR is involved in TMZ resistance (Leelatian et al., 2021; Stritzelberger et al.,

2018; Yoshimoto et al., 2012).

To characterize the impact of the loss/diminution of BCL11A expression during the acquisition of TMZ resistance, we have performed two approaches. In our first approach, ChIP-seq BCL11A was coupled with the use of the bioinformatics tool ROSE to identify the list of genes whose expression could be under the control of the BCL11A super-enhancers. Interestingly, our data indicated that PDGFR $\alpha$  was on this genes list, and our results show that the loss/diminution of BCL11A expression during the acquisition of TMZ resistance is accompanied by the loss/diminution of PDGFR $\alpha$  expression making TMZ tolerant and resistant cells insensitive to therapies targeting PDGFR $\alpha$ . Thus, in addition to highlighting, for the first time, the existence of genes whose expression would be under the control of the BCL11A super-enhancers, our work provides a molecular rationale for the fact that TMZ-tolerant and TMZ-resistant cells are weakly or not sensitivity to PDGFR $\alpha$  inhibitors. The fact that the loss of BCL11A expression during the acquisition of TMZ resistance is accompanied by the loss of PDGFR $\alpha$  expression may seem paradoxical since i) PDGFR $\alpha$  is "oncogenic" in gliomagenesis and, ii) its high expression is associated with a poor survival prognosis (Phillips et al., 2013). However, this result should be qualified by the fact that the loss of BCL11A expression during the acquisition of TMZ resistance is accompanied by a transient or stable loss of tumor suppressor gene expression. In addition, gliomagenesis and the TMZ resistance acquisition phenotype are two distinct processes in which the involvement of oncogenes and tumor suppressor genes can be different. As an example, the MGMT methylation is a well-known cause of TMZ resistance, but the MGMT methylation is not described as an oncogenic event. In our second approach, RIME and P-LISA were then performed to show the transient absence of the BCL11A/DNMT1 complex during the acquisition of TMZ resistance. Thus, our work suggests that the temporary loss of this BCL11A/DNMT1 complex may play a role in the acquisition of TMZ resistance via the epigenetic regulation of certain genes such as *HMGN3*. Indeed, in theory, the transient absence of a complex including DNMT1 could induce a stable hypomethylation signature over time via a passive DNA hypomethylation process. In this case, the temporal stability of this signature (despite the restoration of the DNMT1-including complex) would be attributable to the fact that DNMT1 preferentially catalyzes maintenance DNA methylation reactions and not *de novo* DNA methylation reactions. Here, we observed that *HMGN3* gene is hypomethylated in U251-TMZ-R cells in comparison with U251 cells. *HMGN3* (High Mobility Group Nucleosome-binding domain-containing protein 3) is a nucleosome binding protein that preferentially binds enhancers and promoters to regulate gene expression (Nanduri et al., 2020). Thus, HMGN proteins are involved in the epigenetic,

transcription, DNA replication and DNA repair processes. As example, the involvement of HMGN3 in epigenetic processes is illustrated by the fact that HMGN3 regulates the Glyt1 transcription via the stimulation of its histone acetylation (Barkess et al., 2012). In addition, our data is one of the first connecting HMGN3 to cancer while other HMGN proteins were already connect to cancer since the loss of HMGN1 was associated with the increase of tumorigenesis (Birger et al., 2005), HMGN2 is described to promote breast cancer growth in response to prolactin (Schauwecker et al., 2017) and HMGN4 is described to potentiate thyroid tumorigenesis (Kugler et al., 2017). Thus, the results obtained with our two approaches suggest that BCL11A could contribute to the acquisition of TMZ resistance through, at least, two mechanisms: the regulation of the level of methylation of genes (case of HMGN3) and the existence of BCL11A super-enhancers (case of PDGFR $\alpha$ ).

To translate our *in cellulo* results to GBM cases, we performed two types of investigations based on GBM patients samples. Our first investigation shows a decrease in *BCL11A* mRNA expression in 4/10 recurrent GBM. In addition, this decrease correlates with a short time between the primary and second tumor resections. Thus, these observations suggest that the decrease of BCL11A expression could be a signature of rapid recurrence of GBM: higher the BCL11A expression is, shorter the recurrence time is. Of course, this claim needs to be validated using a largest cohort of GBM patients having two tumor resections.

Our second investigation is a proof of concept study to demonstrate the feasibility to monitor the expression level of *BCL11A*<sup>mRNA</sup> during TMZ treatment of a GBM patient by considering the level of *BCL11A*<sup>mRNA</sup> in blood circulating exosomes. Indeed, with the development of liquid biopsy investigations, the idea of tracking in real time the time of acquisition of the chemotherapy being administered to a given patient is gaining momentum. This is particularly true in solid tumors, such as glioblastoma; where serial biopsies are not a clinically feasible option. Here, using serial blood biopsies, we observed that the exosomal level of *BCL11A*<sup>mRNA</sup> (*exoBCL11A*<sup>mRNA</sup>) could decrease during the anti-GBM treatment. In addition, we observed that the *exoBCL11A*<sup>mRNA</sup> could correlate with the decrease of serum cytochrome C level, a biomarker reflecting the apopto-sensitivity of cells to the therapy. This result tends to support the idea that the loss/decrease of BCL11A expression could be used as a signature of TMZ resistance acquisition. As previously, a validation in a larger cohort of GBM patients needs to be performed previous to claim that *exoBCL11A*<sup>mRNA</sup> may be used to predict the apparition of acquired TMZ resistance in GBM patient. In this scenario, we conceive that the longitudinal *exoBCL11A*<sup>mRNA</sup> monitoring could be used as a "first line" evaluation test of relapse, opening in case of positivity on a closer monitoring of the relapse by MRI and other biopsies or more

invasive and more expensive examination.

In conclusion, our work highlights BCL11A as a novel actor of the acquired TMZ resistance in GBM and warrants further investigations to claim that exosomal BCL11A<sup>mRNA</sup> could be used as a non-invasive biomarker warning of the acquisition of resistance to TMZ.

## BIBLIOGRAPHY

Barczyk, K., Kreuter, M., Pryjma, J., Booy, E. P., Maddika, S., Ghavami, S., Berdel, W. E., Roth, J., & Los, M. (2005). Serum cytochrome c indicates in vivo apoptosis and can serve as a prognostic marker during cancer therapy. *International Journal of Cancer*, 116(2), 167-173. <https://doi.org/10.1002/ijc.21037>

Barkess, G., Postnikov, Y., Campos, C. D., Mishra, S., Mohan, G., Verma, S., Bustin, M., & West, K. L. (2012). The chromatin-binding protein HMGN3 stimulates histone acetylation and transcription across the Glyt1 gene. *The Biochemical Journal*, 442(3), 495-505. <https://doi.org/10.1042/BJ20111502>

Birger, Y., Catez, F., Furusawa, T., Lim, J.-H., Prymakowska-Bosak, M., West, K. L., Postnikov, Y. V., Haines, D. C., & Bustin, M. (2005). Increased tumorigenicity and sensitivity to ionizing radiation upon loss of chromosomal protein HMGN1. *Cancer Research*, 65(15), 6711-6718. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-0310>

Chen, F., Luo, N., Hu, Y., Li, X., & Zhang, K. (2018). MiR-137 Suppresses Triple-Negative Breast Cancer Stemness and Tumorigenesis by Perturbing BCL11A-DNMT1 Interaction. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 47(5), 2147-2158. <https://doi.org/10.1159/000491526>

Dias, C., Estruch, S. B., Graham, S. A., McRae, J., Sawiak, S. J., Hurst, J. A., Joss, S. K., Holder, S. E., Morton, J. E. V., Turner, C., Thevenon, J., Mellul, K., Sánchez-Andrade, G., Ibarra-Soria, X., Deriziotis, P., Santos, R. F., Lee, S.-C., Faivre, L., Kleefstra, T., ... Logan, D. W. (2016). BCL11A Haploinsufficiency Causes an Intellectual Disability Syndrome and Dysregulates Transcription. *American Journal of Human Genetics*, 99(2), 253-274. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2016.05.030>

Doench, J. G., Fusi, N., Sullender, M., Hegde, M., Vaimberg, E. W., Donovan, K. F., Smith, I., Tothova, Z., Wilen, C., Orchard, R., Virgin, H. W., Listgarten, J., & Root, D. E. (2016). Optimized sgRNA design to maximize activity and minimize off-target effects of CRISPR-Cas9. *Nature Biotechnology*, 34(2), 184-191. <https://doi.org/10.1038/nbt.3437>

Ernst, J., & Kellis, M. (2012). ChromHMM : Automating chromatin-state discovery and characterization. *Nature Methods*, 9(3), 215-216. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1906>

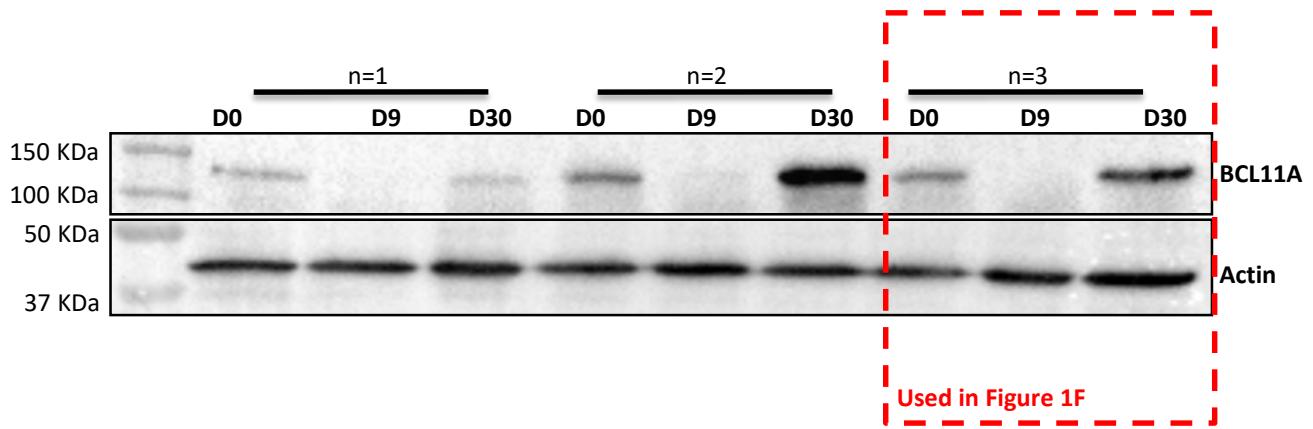
Holohan, C., Van Schaeybroeck, S., Longley, D. B., & Johnston, P. G. (2013). Cancer drug resistance : An evolving paradigm. *Nature Reviews. Cancer*, 13(10), 714-726. <https://doi.org/10.1038/nrc3599>

- Huang, K., Liu, X., Li, Y., Wang, Q., Zhou, J., Wang, Y., Dong, F., Yang, C., Sun, Z., Fang, C., Liu, C., Tan, Y., Wu, X., Jiang, T., & Kang, C. (2019). Genome-Wide CRISPR-Cas9 Screening Identifies NF-κB/E2F6 Responsible for EGFRvIII-Associated Temozolomide Resistance in Glioblastoma. *Advanced Science (Weinheim, Baden-Wurttemberg, Germany)*, 6(17), 1900782. <https://doi.org/10.1002/advs.201900782>
- Kavathia, N., Jain, A., Walston, J., Beamer, B. A., & Fedarko, N. S. (2009). Serum markers of apoptosis decrease with age and cancer stage. *Aging*, 1(7), 652-663.
- Kugler, J., Postnikov, Y. V., Furusawa, T., Kimura, S., & Bustin, M. (2017). Elevated HMGN4 expression potentiates thyroid tumorigenesis. *Carcinogenesis*, 38(4), 391-401. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgx015>
- Lee, S. Y. (2016). Temozolomide resistance in glioblastoma multiforme. *Genes & Diseases*, 3(3), 198-210. <https://doi.org/10.1016/j.gendis.2016.04.007>
- Leelatian, N., Hong, C. S., & Bindra, R. S. (2021). The Role of Mismatch Repair in Glioblastoma Multiforme Treatment Response and Resistance. *Neurosurgery Clinics of North America*, 32(2), 171-180. <https://doi.org/10.1016/j.nec.2020.12.009>
- Liu, S. J., Malatesta, M., Lien, B. V., Saha, P., Thombare, S. S., Hong, S. J., Pedraza, L., Koontz, M., Seo, K., Horlbeck, M. A., He, D., Birk, H. S., Jain, M., Olsen, H. E., Akeson, M., Weissman, J. S., Monje, M., Gupta, N., Raleigh, D. R., ... Lim, D. A. (2020). CRISPRi-based radiation modifier screen identifies long non-coding RNA therapeutic targets in glioma. *Genome Biology*, 21(1), 83. <https://doi.org/10.1186/s13059-020-01995-4>
- Lovén, J., Hoke, H. A., Lin, C. Y., Lau, A., Orlando, D. A., Vakoc, C. R., Bradner, J. E., Lee, T. I., & Young, R. A. (2013). Selective inhibition of tumor oncogenes by disruption of super-enhancers. *Cell*, 153(2), 320-334. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.03.036>
- Nanduri, R., Furusawa, T., & Bustin, M. (2020). Biological Functions of HMGN Chromosomal Proteins. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(2), E449. <https://doi.org/10.3390/ijms21020449>
- Phillips, J. J., Aranda, D., Ellison, D. W., Judkins, A. R., Croul, S. E., Brat, D. J., Ligon, K. L., Horbinski, C., Venneti, S., Zadeh, G., Santi, M., Zhou, S., Appin, C. L., Sioletic, S., Sullivan, L. M., Martinez-Lage, M., Robinson, A. E., Yong, W. H., Cloughesy, T., ... Perry, A. (2013). PDGFRA amplification is common in pediatric and adult high-grade astrocytomas and identifies a poor prognostic group in IDH1 mutant glioblastoma. *Brain Pathology (Zurich, Switzerland)*, 23(5), 565-573. <https://doi.org/10.1111/bpa.12043>
- Schauwecker, S. M., Kim, J. J., Licht, J. D., & Clevenger, C. V. (2017). Histone H1 and Chromosomal Protein HMGN2 Regulate Prolactin-induced STAT5 Transcription Factor Recruitment and Function in Breast Cancer Cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 292(6), 2237-2254. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.764233>
- Stritzelberger, J., Distel, L., Buslei, R., Fietkau, R., & Putz, F. (2018). Acquired temozolomide resistance in human glioblastoma cell line U251 is caused by mismatch repair deficiency and can be overcome by lomustine. *Clinical & Translational Oncology: Official Publication of the Federation of Spanish Oncology Societies and of the National Cancer Institute of Mexico*, 20(4), 508-516. <https://doi.org/10.1007/s12094-017-1743-x>
- Toledo, C. M., Ding, Y., Hoellerbauer, P., Davis, R. J., Basom, R., Girard, E. J., Lee, E., Corrin, P., Hart, T., Bolouri, H., Davison, J., Zhang, Q., Hardcastle, J., Aronow, B. J., Plaisier, C. L., Baliga, N. S., Moffat, J., Lin, Q., Li, X.-N., ... Paddison, P. J. (2015). Genome-wide CRISPR-

Cas9 Screens Reveal Loss of Redundancy between PKMYT1 and WEE1 in Glioblastoma Stem-like Cells. *Cell Reports*, 13(11), 2425-2439. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.11.021>

Whyte, W. A., Orlando, D. A., Hnisz, D., Abraham, B. J., Lin, C. Y., Kagey, M. H., Rahl, P. B., Lee, T. I., & Young, R. A. (2013). Master transcription factors and mediator establish super-enhancers at key cell identity genes. *Cell*, 153(2), 307-319.  
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.03.035>

Yoshimoto, K., Mizoguchi, M., Hata, N., Murata, H., Hatae, R., Amano, T., Nakamizo, A., & Sasaki, T. (2012). Complex DNA repair pathways as possible therapeutic targets to overcome temozolomide resistance in glioblastoma. *Frontiers in Oncology*, 2, 186.  
<https://doi.org/10.3389/fonc.2012.00186>

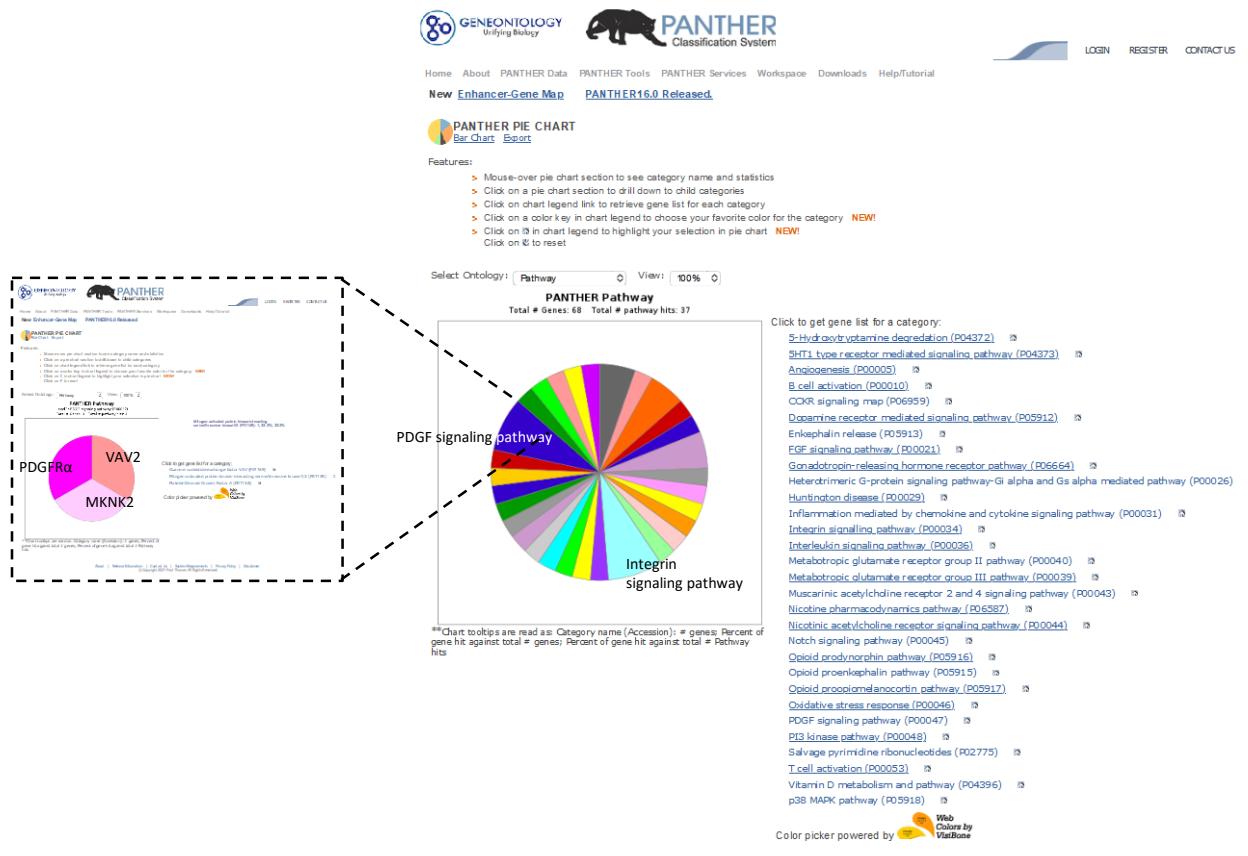


**Figure S1 :** Protein expression of BCL11A in parental (D0), TMZ-tolerant (D9) and TMZ-resistant (D30) U251 cells in three biological replicates.

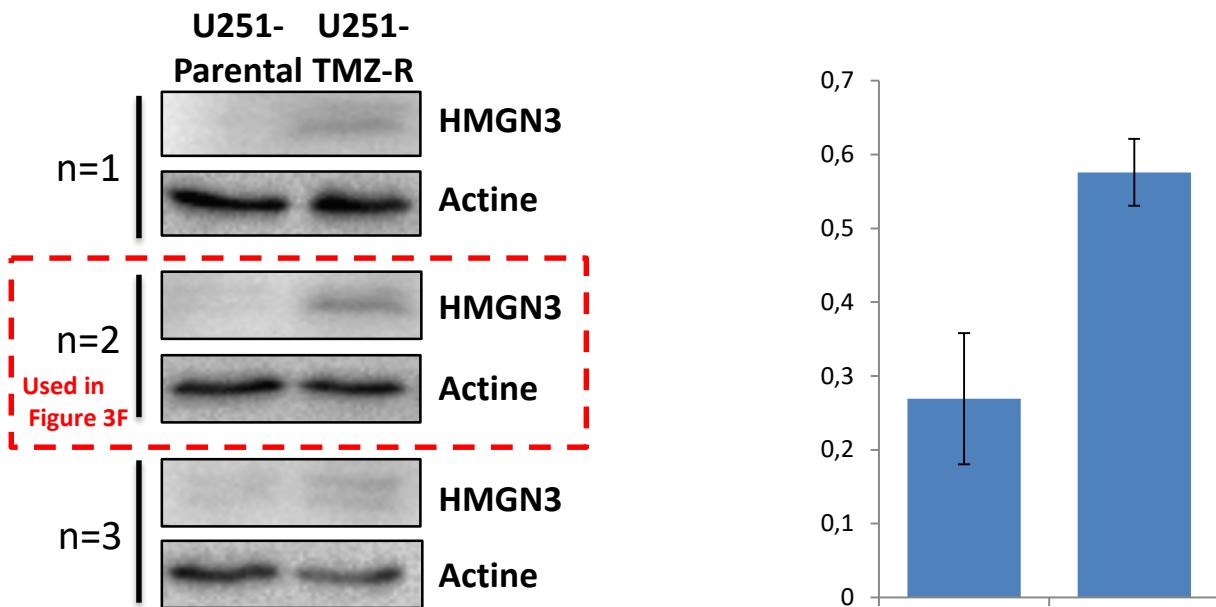
# ROSE: Rank Ordering of Super-Enhancers

(<https://hpc.nih.gov/apps/ROSE.html>)

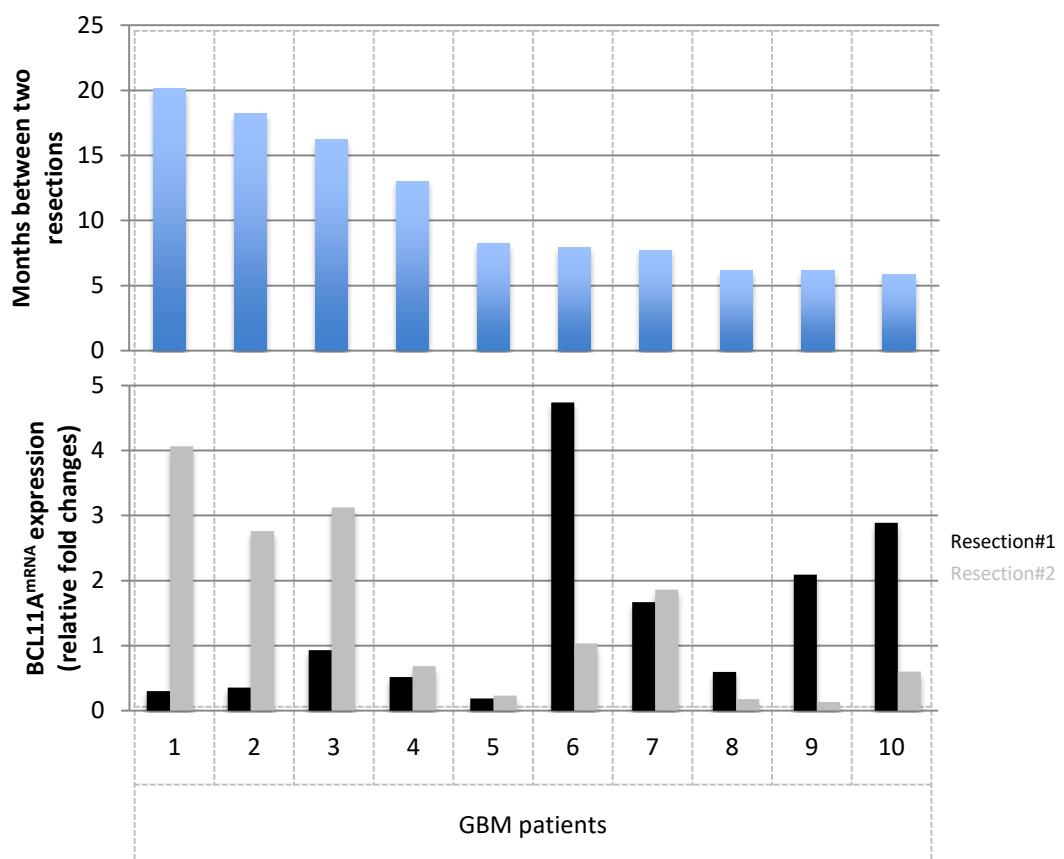
ACOT7	CEBPG	FGFR3	MIR1268B	PLEKHH3	TSPAN32
ACYP1	CHST3	FGFRL1	MIR3074	PPIF	TSPAN9
ADGRG1	CIRBP	GAS6-AS1	MIR365B	PPP1CB	TTYH3
AGPAT2	COL22A1	GNAI2	MIR4316	PPP1R14C	UPF3A
ALDH3A2	COL4A2-AS2	GSE1	MIR4648	PRTG	UPP1
ALDH3B1	COL9A3	KCTD5	MIR5093	RARA	VAC14-AS1
ANKRD26P1	CTD-2201118.1	KLHL29	MIR6730	RARA	VAV2
AQP5	CUEDC1	LAMA5	MIR6880	RBM38	ZBTB7B
ARFGAP3	CXXC5	LAPTM5	MIRLET7BH	SLC9A3R2	ZMIZ1
BCAM	DNAJB12	LINC00273	MKNK2	SNORD1A	ZMIZ1-AS1
BCAR1	EML1	LINC00316	MTSS1L	SNORD83B	
BCL9L	EPHA2	LINC00963	MYEOV	TK2	
BOC	EPHB3	LOC100506688	NCOR2	TMEM189-UBE2V1	
C2CD2	EXOC3L4	LOC101928674	NFIC	TMEM211	
CBX4	FAM129B	LOC101929705	NFIC	TPRSS2	
CBX7	FAM129B	LOC105371703	NUP214	TNFAIP2	
CCDC57	FAM180A	LOC284080	PDGFRA	TNS3	
CDC42EP1	FASN	LOC441178	PLEC	TRERNA1	



**Figure S2 : Ontology Panther analysis of the 123 BCL11A super-enhancers.**



**Figure S3 :** Protein expression of HMGN3 in parental and TMZ-resistant U251 cells in three biological replicates.



**Figure S4 :** BCL11A mRNA expression in 1st and 2nd tumor resections in 10 GBM patients.  
Patients were ranked by decreasing time between the two resections.

### 3. Discussion

Notre travail met en évidence BCL11A comme un nouvel acteur de la résistance acquise au TMZ dans le glioblastome. Très peu d'études avant nous ont mené des investigations sur l'implication de BCL11A dans le glioblastome bien que cette protéine soit hautement exprimée dans le cerveau et semble remplir des fonctions importantes au cours du développement du système nerveux central et dans la neurogenèse adulte (John et al., 2012; Simon et al., 2020). Qui plus est, des travaux conduits sur le récepteur nucléaire orphelin TLX (NR2E1), qui participe à la régulation de l'auto-renouvellement des NSCs de la zone sous-ventriculaire, ont mis en évidence BCL11A comme nouveau ligand régulateur du récepteur (Estruch et al., 2012). Par ailleurs, BCL11A a déjà été montré comme impliqué dans des cancers notamment le cancer du sein, du poumon et des hémopathies malignes, et plusieurs études évoquent son utilisation comme outil clinique (J. Yin et al., 2019). A l'inverse de notre étude, beaucoup de publications évoquent le rôle oncogénique de BCL11A, mais il n'est pas surprenant de rencontrer des agents doubles i.e des protéines ayant à la fois un rôle oncogène et suppresseur de tumeur, et c'est le cas de nombreux facteurs de transcription et acteurs épigénétiques (Datta et al., 2021; L. Shen et al., 2018). En outre, les travaux de Jiang et son équipe sur le cancer du poumon révèlent que l'expression de BCL11A corrèle avec une meilleure survie dans le cancer du poumon, ce qui va dans le sens de nos résultats (Jiang et al., 2013). Il est aussi important de noter que les résultats d'analyse de la corrélation entre le niveau d'expression de l'ARNm et la survie des patients atteints de GBM sous forme de courbes Kaplan-Meier disponibles sur The Human Protein Atlas, bien que ne permettant pas de conclure au caractère pronostic de BCL11A, observent la même tendance que dans le cancer du poumon. Précisons que beaucoup de sources peuvent être utilisées pour générer ces courbes (REMBRANDT, TCGA, KM plotter) mais dans la majorité, voire la totalité de ces banques de données de GBM, les quantifications des ARNm proviennent de premières

résections et ne permettent pas de comparer l'évolution entre deux résections i.e. avant et après traitement au TMZ.

Nos analyses du niveau d'expression de BCL11A au cours de l'acquisition de la résistance montrent sans ambiguïtés la disparition de la protéine dans les cellules tolérantes. Seulement, nous ne connaissons pas les causes de cette diminution d'expression. La littérature fait état de nombreux miRs impliqués dans la régulation de BCL11A (Gasparello et al., 2017; Jiang et al., 2013; J. Yin et al., 2019). Nous pourrions investiguer cette piste mais aussi analyser le niveau de méthylation du gène *BCL11A*. Aussi, nous avons fait le choix de travailler avec une seule lignée cellulaire de GBM (U251) dans le but de rapidement prioriser les expériences sur les échantillons de patients. Il pourrait cependant être intéressant de connaître le niveau d'expression de BCL11A dans d'autres lignées, aux caractéristiques moléculaires distinctes.

Dans leur étude sur le passage de l'hémoglobine fœtale à l'hémoglobine adulte, des chercheurs ont prouvé la répression directe du promoteur de la  $\gamma$ -globine par BCL11A (N. Liu et al., 2018). Dans le cas du glioblastome, grâce à l'atlas génomique de la lignée U251 que nous avons générée, nous avons pu mettre en évidence *in silico*, pour la première fois, la fixation de BCL11A sur des régions enhancers du génome en plus des régions promotrices.

Concernant le lien entre la perte de BCL11A et la diminution de la transcription de PDGFR $\alpha$  nos résultats pourraient être renforcés par la mesure de l'expression protéique du PDGFR $\alpha$  après invalidation de BCL11A. C'est ce qu'on fait des chercheurs dans leur étude portant sur la résistance du cancer du sein au tamoxifen. Dans leur modèle, l'élimination de BCL11A inhibe les voies PI3K/AKT et MAPK dans les cellules résistantes (C.-H. Zhang et al., 2017). Compte tenu de ces informations, nous envisageons que BCL11A agisse comme un activateur transcriptionnel du locus codant pour le récepteur *alpha* au PDGF. Mais une autre étude menée sur les ARNs endogènes compétiteurs (ceARNs), qui agissent

comme des éponges à miRs, vient mettre en perspective cette hypothèse. En effet, dans le glioblastome, le réseau d'interactions médiées par les miRs régulent des milliers de gènes, y compris des oncogènes et des suppresseurs de tumeurs, et ces interactions permettent une coordination entre certaines voies oncogéniques (Sumazin et al., 2011). Dans ce contexte, l'ARNm d'un gène donné qui contient des éléments de réponse (MRE) pour un miR donné peut agir comme une éponge pour séquestrer le miR en question et empêcher son action sur un autre ARNm. Par conséquent, une diminution du niveau d'expression du premier ARNm peut également entraîner indirectement une baisse du niveau du second ARNm (Su et al., 2013). Il se trouve que trois gènes, dont *BCL11A*, sont censés agir en tant que ceARN pour l'ARNm *PDGFRa* dans le glioblastome (Brennan et al., 2013). Cette information fait le lien avec les articles mentionnés plus haut qui mettent en évidence l'inhibition de l'ARNm *BCL11A* par les miRs, qui pourrait s'accompagner d'une diminution de son ARNm compétiteur, *PDGFRa*. Il n'est pas aberrant d'imaginer que l'ARNm *PDGFRa* soit régulé par des miRs dans le glioblastome, c'est d'ailleurs le cas d'un autre récepteur de facteur de croissance, EGFR, impliqué dans la gliomagenèse et la résistance au TMZ. En effet, une étude menée sur des lignées cellulaires résistantes au TMZ et à la radiothérapie, ainsi que sur des tissus de patients, a mis en évidence la surexpression du miR-221 qui conduit à une réduction significative de l'expression d'*EGFR* (Areeb et al., 2020).

En plus des voies de signalisation liées au *PDGFRa*, l'analyse PANTHER d'ontologie des gènes cibles de *BCL11A* met en évidence les voies en lien avec la PI3K. Il se trouve que la PI3K est recrutée et activée après stimulation du récepteur au PDGF, et dont la voie de signalisation en aval régule négativement l'apoptose (H. Zhang et al., 2007). Des expériences préliminaires menées sur des cellules U251 déplétées en *BCL11A* dans lesquelles nous mesurons l'apoptose via l'activation des caspases-3/7, indiquent que l'action de la staurosporine, un pan kinase inhibiteur, entraîne presque 20% d'apoptose en moins par rapport à la population contrôle. Bien que le mode d'action précis de la

staurosporine ne soit pas connu, on peut imaginer que la perte de sensibilité des cellules déplétées en BCL11A soit liée à la perte d'activation de la voie de signalisation impliquant PDGFR $\alpha$  et la PI3K. Nous pourrions vérifier cette hypothèse en mesurant la phosphorylation du récepteur et des cibles en aval de PI3K dans ces cellules.

En lien avec l'autre étude présentée dans ce manuscrit, les résultats obtenus après exposition des cellules à un inhibiteur de PDGFR $\alpha$  ainsi que ceux obtenus sur les prélèvements de patients, appuient encore l'importance d'utiliser les thérapies au bon moment. Nous le voyons, la même lignée cellulaire soumise à une cinétique de TMZ ne répond pas aux mêmes moments aux différents inhibiteurs testés i.e les cellules parentales sont les plus sensibles à l'inhibiteur de PDGFR $\alpha$  tandis que pour les inhibiteurs testés dans la précédente étude, les cellules tolérantes étaient celles qui répondaient le mieux. Le développement de biomarqueurs efficaces et pronostiques de la réponse aux traitements est donc indispensable pour éviter d'administrer aux patients des traitements, parfois lourds, pendant la mauvaise fenêtre de temps. C'est particulièrement vrai pour le PDGFR et l'ensemble des gènes de la famille PDGF qui ont des profils d'expression très hétérogènes au sein d'un glioblastome et entre les patients en fonction de la localisation de la tumeur dans le cerveau (Cantanhede & de Oliveira, 2017).

En s'intéressant aux partenaires protéiques de BCL11A dans le glioblastome, nous avons mis en évidence DNMT1 par spectrométrie de masse après immunoprecipitation. Cette interaction a déjà été démontrée par le passé mais dans le cancer du sein (F. Chen et al., 2018). Nous avons renforcé ce résultat en montrant la proximité spatiale entre ces deux protéines par fluorescence. Cette interaction semble temporairement perdue dans les cellules tolérantes d'après la courbe en U disponible dans l'article. Afin de découvrir les effets de la perte de l'interaction entre BCL11A et DNMT1 il est possible de forcer la perturbation de ce complexe en utilisant un peptide synthétique, comme il a déjà été fait dans le laboratoire pour d'autres interactions DNMT1/protéine-X, ou bien encore, le miR-

137 mis en évidence comme perturbateur naturel dans l'étude de F. Chen et al., (F. Chen et al., 2018; Hervouet, Lalier, et al., 2010). Nous pourrions ainsi, à la fois mesurer la méthylation globale de l'ADN par séquençage au bisulfite et mesurer des pertes locales de méthylation par qMSRE, sur le locus HMGN3 par exemple. La méthode EPIC de mesure de la méthylation différentielle que nous avons choisie pour cette étude nous donne seulement un aperçu (850 000 CpG) de la reprogrammation du méthylome au cours de l'acquisition de la résistance et mérite d'être complétée (Karlow et al., 2021). L'utilisation de la méthode EPIC, et sa restriction à 3% du total des CpGs du génome, est sans doute à l'origine du fait que nos analyses ne mettent en évidence qu'un seul gène à la fois surexprimé dans les cellules résistantes, fixé par BCL11A et hypométhylé dans les cellules résistantes, en l'occurrence HMGN3.

Quant aux effets de l'augmentation de HMGN3 dans notre modèle, ils restent à explorer. Les protéines de la famille HMGN (High mobility group N) participent à l'architecture de la chromatine et sont exprimées de façon ubiquitaire chez les Vertébrés (Nanduri et al., 2020). Elles se lient aux nucléosomes de façon dynamique sans préférence pour une séquence d'ADN (Catez et al., 2003; Postnikov & Bustin, 2010). Les HMGN se localisent notamment dans les régions de régulation de la transcription telles que les enhancers et les promoteurs (Rochman et al., 2009). De ce fait, on peut supposer que des modifications de l'expression de HMGN3 pourraient avoir des conséquences délétères en affectant l'intégrité du paysage épigénétique chromatinien. Néanmoins, les fonctions cellulaires de HMGN3 dans la physio-pathologie cérébrale ne sont pas décrites, et il semble que cette protéine ne soit pas très exprimée naturellement dans le cerveau (West et al., 2001).

## CONCLUSION

---

En explorant les mécanismes et dynamiques chromatiniques qui participent à l'acquisition de la résistance au témozolomide, les travaux menés pendant cette thèse ont permis à la fois de mettre en évidence plusieurs cibles thérapeutiques potentielles pour lever la tolérance des cellules, et de découvrir un nouvel acteur moléculaire de la résistance, à savoir, BCL11A.

L'ensemble de ces travaux montre la nécessité de porter attention aux cellules tolérantes à la chimiothérapie. D'après nos résultats ces cellules sont le siège de nombreuses adaptations moléculaires, parfois transitoires, comme l'activation de régions enhancers et la perte du facteur de transcription BCL11A et de son interaction avec DNMT1. A l'avenir, ces cellules résiduelles survivant au traitement TMZ doivent être mieux caractérisées, et ce, notamment par des approches en cellule-unique, pour envisager de les cibler efficacement.

Nos études illustrent l'utilité des biomarqueurs dans la prise en charge des patients atteints de glioblastomes. En effet, tout en gardant à l'esprit que les résultats que nous avons obtenus sur les prélèvements de patients doivent être renforcés, nos expériences suggèrent que des protéines ou des ARNm, notamment ceux contenus dans les exosomes, peuvent constituer des signatures de la présence de cellules tolérantes indiquant la résistance au TMZ à venir. La capacité des exosomes à passer la BHE en font des biomarqueurs intéressants dès l'instant que des analyses de sang ou d'urine sont des actes peu invasifs. Mais l'utilisation du contenu des exosomes comme biomarqueur est encore une question débattue. Les exosomes sont générés par une variété de types cellulaires différents et, à moins qu'ils ne contiennent des cargaisons extrêmement distinctes, il peut s'avérer difficile de déterminer leur tissu d'origine. Qui plus est, les populations d'exosomes reflétant l'hétérogénéité de la tumeur, on peut s'attendre à ce que les concentrations en protéines qu'ils contiennent se situent dans une fourchette plus ou moins large et qu'il soit difficile de déterminer un seuil fixe au-delà duquel il faut

adapter le traitement. À ce jour, il faut combler un manque général de connaissances sur les exosomes pour envisager de suivre les patients sur leur seule base. Aussi, compte tenu des limitations pratiques de l'analyse des protéines exosomales (temps, débit, contrôle qualité), il convient de développer des technologies plus adaptées à un contexte clinique (X. Li et al., 2019). En ce sens, certains travaux ont donné des résultats prometteurs en utilisant des puces microfluidiques conçues pour mesurer les niveaux d'ARNm de MGMT et d'APNG dans les exosomes circulants (Wong et al., 2021).

Nos travaux sur BCL11A méritent d'être approfondis. Il serait intéressant d'analyser les caractéristiques phénotypiques de cellules dont le gène BCL11A serait invalidé par la méthode CRISPR-Cas9. En outre, nous n'avons pas tirer profit de toutes les informations que nous a fourni l'étude de l'interactome de BCL11A, nous pourrions mettre en évidence d'autres partenaires, épigénétiques ou non, ayant un rôle dans l'acquisition de la résistance.

Le TMZ est pour le moment la meilleure option thérapeutique dans le traitement des GBMs en combinaison avec la radiothérapie et l'exérèse. Surmonter la résistance au TMZ, qu'elle soit intrinsèque ou adaptative, représente un véritable défi clinique. Néanmoins, l'identification de vulnérabilités dans les cellules tolérantes et résistantes ouvrent des perspectives thérapeutiques pour améliorer l'efficacité du TMZ et éviter la rechute. Mais il faut garder à l'esprit que le GBM exploite une pléthore d'armes cellulaires et moléculaires pour échapper au traitement, notamment l'adaptation métabolique, l'autophagie et des mécanismes extracellulaires mettant en jeu son microenvironnement. Par conséquent, il est indispensable de multiplier les axes de recherches, y compris de développer différents modèles *in vitro* reflétant avec plus de précision la complexité du microenvironnement chimiorésistant des GBM (Musah-Eroje, 2021).

## TRAVAUX ANNEXES

---



# Glyphosate Primes Mammary Cells for Tumorigenesis by Reprogramming the Epigenome in a TET3-Dependent Manner

Manon Duforestel<sup>1,2,3,4†</sup>, Arulraj Nadaradjane<sup>1,2,3,4†</sup>, Gwenola Bougras-Cartron<sup>1,2,3,4†</sup>, Joséphine Briand<sup>1,2,3,4†</sup>, Christophe Olivier<sup>1,2,5</sup>, Jean-Sébastien Frenel<sup>1,2,3,4†</sup>, François M. Vallette<sup>1,2,3,4†</sup>, Sophie A. Lelièvre<sup>6,7</sup> and Pierre-François Cartron<sup>1,2,3,4\*\*</sup>

## OPEN ACCESS

### Edited by:

Rui Henrique,  
Portuguese Oncology Institute,  
Portugal

### Reviewed by:

Michael Nicolas Antoniou,  
King's College London,  
United Kingdom  
Abhijit Shukla,  
Memorial Sloan Kettering  
Cancer Center, United States

### \*Correspondence:

Pierre-François Cartron  
pierre-francois.cartron@inserm.fr

<sup>†</sup>Members of EpiSAVMEN  
Consortium

### Specialty section:

This article was submitted to  
Epigenomics and Epigenetics,  
a section of the journal  
*Frontiers in Genetics*

Received: 29 April 2019

Accepted: 22 August 2019

Published: 27 September 2019

### Citation:

Duforestel M, Nadaradjane A, Bougras-Cartron G, Briand J, Olivier C, Frenel J-S, Vallette FM, Lelièvre SA and Cartron P-F (2019) Glyphosate Primes Mammary Cells for Tumorigenesis by Reprogramming the Epigenome in a TET3-Dependent Manner. *Front. Genet.* 10:885.  
doi: 10.3389/fgene.2019.00885

<sup>1</sup> CRCINA, INSERM, Université de Nantes, Nantes, France, <sup>2</sup> Equipe Apoptose et Progression tumorale, LaBCT, Institut de Cancérologie de l'Ouest, Saint Herblain, France, <sup>3</sup> Cancéropôle Grand-Ouest, réseau Epigénétique (RepiCGO), Nantes, France, <sup>4</sup> LabEX IGO, Université de Nantes, Nantes, France, <sup>5</sup> Service de toxicologie, Faculté de pharmacie de Nantes, Nantes, France, <sup>6</sup> Department of Basic Medical Sciences, Purdue University, West Lafayette, IN, United States, <sup>7</sup> Purdue University Center for Cancer Research, West Lafayette, IN, United States

The acknowledgment that pollutants might influence the epigenome raises serious concerns regarding their long-term impact on the development of chronic diseases. The herbicide glyphosate has been scrutinized for an impact on cancer incidence, but reports demonstrate the difficulty of linking estimates of exposure and response analysis. An approach to better apprehend a potential risk impact for cancer is to follow a synergistic approach, as cancer rarely occurs in response to one risk factor. The known influence of glyphosate on estrogen-regulated pathway makes it a logical target of investigation in breast cancer research. We have used nonneoplastic MCF10A cells in a repeated glyphosate exposure pattern over 21 days. Glyphosate triggered a significant reduction in DNA methylation, as shown by the level of 5-methylcytosine DNA; however, in contrast to strong demethylating agent and cancer promoter UP peptide, glyphosate-treated cells did not lead to tumor development. Whereas UP acts through a DNMT1/PCNA/UHRF1 pathway, glyphosate triggered increased activity of ten-eleven translocation (TET)3. Combining glyphosate with enhanced expression of microRNA (miR) 182-5p associated with breast cancer induced tumor development in 50% of mice. Culture of primary cells from resected tumors revealed a luminal B (ER+/PR-/HER2-) phenotype in response to glyphosate-miR182-5p exposure with sensitivity to tamoxifen and invasive and migratory potentials. Tumor development could be prevented either by specifically inhibiting miR 182-5p or by treating glyphosate-miR 182-5p-cells with dimethyloxallyl glycine, an inhibitor of TET pathway. Looking for potential epigenetic marks of TET-mediated gene regulation under glyphosate exposure, we identified *MTRNR2L2* and *DUX4* genes, the hypomethylation of which was sustained even after stopping glyphosate exposure for 6 weeks. Our findings reveal that low pressure but sustained DNA hypomethylation

occurring *via* the TET pathway primes cells for oncogenic response in the presence of another potential risk factor. These results warrant further investigation of glyphosate-mediated breast cancer risk.

**Keywords:** DNA methylation, ten-eleven translocation, breast cancer, hypomethylation, epigenetic mark

## INTRODUCTION

Cancer results from interactions among genetic, epigenetic, environmental and lifestyle factors. Epigenetic modifications govern heritable changes in phenotypes regulated at the chromatin level without requiring DNA sequence alteration. They are strongly modulated by environmental and lifestyle factors. For instance, epigenetic differences between monozygotic twins have been shown to arise over their life-course (Fraga et al., 2005). In honeybees, fertile queens and sterile workers are alternative forms of the adult female that develop from genetically identical larvae following differential feeding with royal jelly. This specific nutrition is responsible for triggering modifications in the epigenome via a DNA MethylTransferase (DNMT) 3A-dependent mechanism (Kucharski et al., 2008) and histone post-translational modifications (Spannhoff et al., 2011). But, it is worrisome that certain exposures, as in farm environment, in early childhood appear to influence DNA methylation in genes related to asthma and allergy (Michel et al., 2013). Indeed, pollutants are powerful modulators of the epigenome. Over the past five years, 26 records related to the keywords “pollutant; epigenetic; cancer risk” can be found in the web of science (**Supplementary Figure S1**).

Especially, herbicides have been increasingly recognized as epigenetic modifiers. Exposure to Diuron was recently reported to affect the methylome of Pacific oysters (Rondon et al., 2017). In 2015, the International Agency for Research on Cancer (IARC) announced that the hazard of the herbicide glyphosate could be ranked as “probably carcinogenic to humans (Group 2A)”. Glyphosate was reported to induce the proliferation of human breast cancer cells via an impact on estrogen receptors (Thongprakaisang et al., 2013). This observation is supported by several other studies demonstrating that glyphosate can affect the activity of estrogen receptor alpha (ER $\alpha$ ) and certain phenotypes of ER $\alpha$  positive cells within breast cancer cell populations (Mesnage et al., 2017; De Almeida et al., 2018; Sritana et al., 2018).

The impact of glyphosate on the distribution of methyl groups (or methylome) in the chromatin is extensive. Glyphosate exposure has been reported to induce 9,205 differentially methylated regions (DMRs) across the genome of *Arabidopsis thaliana* (Kim et al., 2017) and a decrease of DNA methylation in human peripheral blood mononuclear cells (Kwiatkowska et al., 2017).

Here, we present evidence that glyphosate induces global DNA hypomethylation (i.e. overall decrease of 5-methylCytosine (5mC) in the epigenome) in non-neoplastic mammary epithelial MCF10A cells and contributes to tumorigenesis in

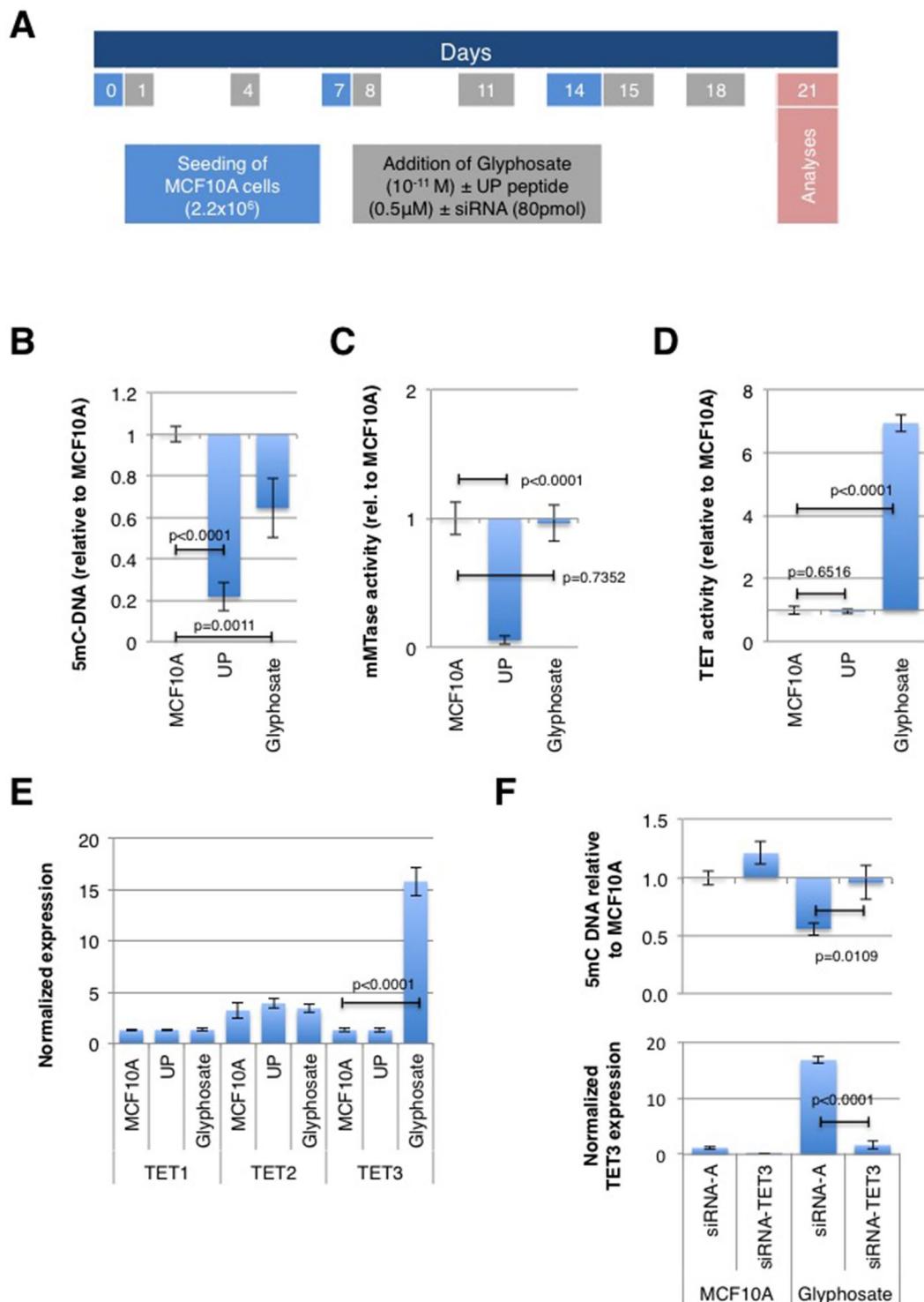
a “two-hit oncogenic model”. Our data also uncover a specific DNA hypomethylation signature of genes (i.e., local DNA hypomethylation) related to the TET3 pathway that might be used as epimark of glyphosate exposure.

## RESULTS

### Exposure to Glyphosate Promotes TET3-Mediated Global DNA Hypomethylation in MCF10A Cells

DNA hypomethylation has been shown to play a determining role in cancer development (Gaudet et al., 2003; Hervouet et al., 2010; Pacaud et al., 2014). To verify the impact of glyphosate exposure on the global level of DNA methylation, non-neoplastic breast epithelial MCF10A cells were treated with a low dose (10-11 M) of this herbicide every three to four days over 21 days, covering three passage numbers; whereas control cultures were treated with vehicle DMSO (**Figure 1A**). Several articles analyzing the effect of glyphosate on human cells have reported using 10-11 M (Thongprakaisang et al., 2013; Mesnage et al., 2017; Sritana et al., 2018). Indeed, 90% of MCF10A cells were viable as measured by XTT (2,3-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide) assay at this concentration (**Supplementary Figure S2**). Importantly, glyphosate 10-11 M is below the concentration detected in biological fluids (milk, serum, urine) (Yoshioka et al., 2011; Acquavella et al., 2004; Steinborn et al., 2016). As a control performed in parallel, MCF10A cells were exposed to carcinogenic UP peptide (0.5  $\mu$ M) previously described to promote global DNA hypomethylation via the disruption of the DNMT1/PCNA/UHRF1 complex (Pacaud et al., 2014). As expected, there was a decrease in the level of 5mC-DNA in MCF10A cells treated with the UP peptide (**Figure 1B**). There was also a reduction in 5mC content in cells treated with glyphosate (**Figure 1B**), hence suggesting that glyphosate promotes a global DNA hypomethylation as per the definition given in the introduction.

The origin of glyphosate-mediated decrease in DNA methylation was assessed by measuring the levels of activity of maintenance methyltransferase (mMTase) and Ten-eleven translocation (TET), since a decrease of mMTase activity and an increase of TET activity are both causes of DNA hypomethylation. The mMTase activity remained unchanged in MCF10A cells treated with glyphosate (**Figure 1C**) while TET activity significantly increased in these cells (**Figure 1D**). Specifically, an ELISA-based assessment of the amount of the three TET family members, TET1, TET2 and TET3, revealed an overexpression of TET3 in MCF10A cells following exposure to glyphosate (**Figure 1E**).



**FIGURE 1 |** Glyphosate exposure promotes a TET3-mediated global DNA hypomethylation. MCF10A cells were treated according to a timetable shown in **(A)** and analyzed on day 21 of culture. (Explanations for color-coded days are located in corresponding color rectangles underneath the timeline. UP peptide promotes DNMT1/PCNA/UHRF1 disruption). **(B)** ELISA was used to measure the level of 5-methylcytosine (5-mC). **(C)** DMB assay was used to measure maintenance methyltransferase (mMTase). **(D)** TET assay. **(E)** In-Cell ELISA was used to quantify TET proteins. **(F)** MCF10A cells were transfected either with siRNA for TET3 or with control siRNA (siRNA-A) and treated with glyphosate (Glyphosate) or vehicle DMSO (MCF10A) according to a timetable shown in **(A)**. ELISA was used to measure the level of 5mC, and TET3 levels were determined by In-Cell ELISA and normalized to Janus Green staining intensity to account for differences in cell seeding density. For all assays, the bar graph displays the average  $\pm$  standard deviation values of three independent experiments.

To confirm that glyphosate promotes TET3-mediated global DNA hypomethylation in MCF10A cells, we analyzed the level of DNA methylation in MCF10A cells with siRNA-mediated TET3 down-regulation. ELISA results show that the presence of siRNA-TET3 abrogates TET3 overexpression and prevents DNA hypomethylation in cells exposed to glyphosate (**Figure 1F**).

### Glyphosate Exposure Is Tumorigenic for MCF10A Cells in a Two-Factor Hit Model

Global DNA hypomethylation is potentially tumorigenic (Gaudet et al., 2003; Hervouet et al., 2010; Pacaud et al., 2014). Therefore, MCF10A cells exposed to glyphosate were injected subcutaneously in Swiss nude mice. No tumors developed, whereas the control experiment with MCF10A cells exposed to the UP peptide led to visible tumor growth within 21 days in 100% of the mice (**Figure 2A**).

The Knudson's hypothesis for cancer initiation suggests that several oncogenic hits cooperate to promote cancer. This hypothesis initially based on mutations can be transposed to risk factors beyond genetic alterations. Indeed, several microRNAs (miR) have been associated with cancer either as oncomiR (one hit) or suspected to promote cancer phenotype in light of their overexpression in cancers. To investigate the possibility of a two-factor hit oncogenic impact with glyphosate, six miRs associated with poor prognosis of breast cancer [miR-182-5p (Yu et al., 2017), miR-27a (Jiang et al., 2018), miR-500a-5p (Degli Esposti et al., 2017), miR-30a (di Gennaro et al., 2018), miR-495 (Cao et al., 2014), and miR-146a (Wang et al., 2016)] were transfected individually in MCF10A cells. For this purpose, miRs mimics were used, and their increased expression was confirmed by RTqPCR (**Supplementary Figure S3**). Tumor nodules were observed in two out of the four mice with subcutaneous injection of glyphosate-exposed MCF10A overexpressing miR-182-5p, whereas none of the other five miRs were associated with tumor formation (**Figure 2B**). Moreover, no tumor nodules were observed with subcutaneous injection of glyphosate/miR-182-5p/siRNA-TET3-exposed MCF10A, confirming that TET3 is implicated in glyphosate-mediated tumorigenic pathway (**Figure 2C**). The use of the Pan-cancer RNA-seq data available from the KM plotter database revealed that although TET3 overexpression is associated with a favorable overall survival in head and neck squamous cell carcinoma, thymoma, and thyroid carcinoma, it is associated with an unfavorable overall survival in breast cancer, as well as cervical squamous cell carcinoma, kidney renal papillary cell carcinoma, liver hepatocellular carcinoma, pheochromocytoma, paraganglioma, and uterine corpus endometrial carcinoma (**Supplementary File F1**).

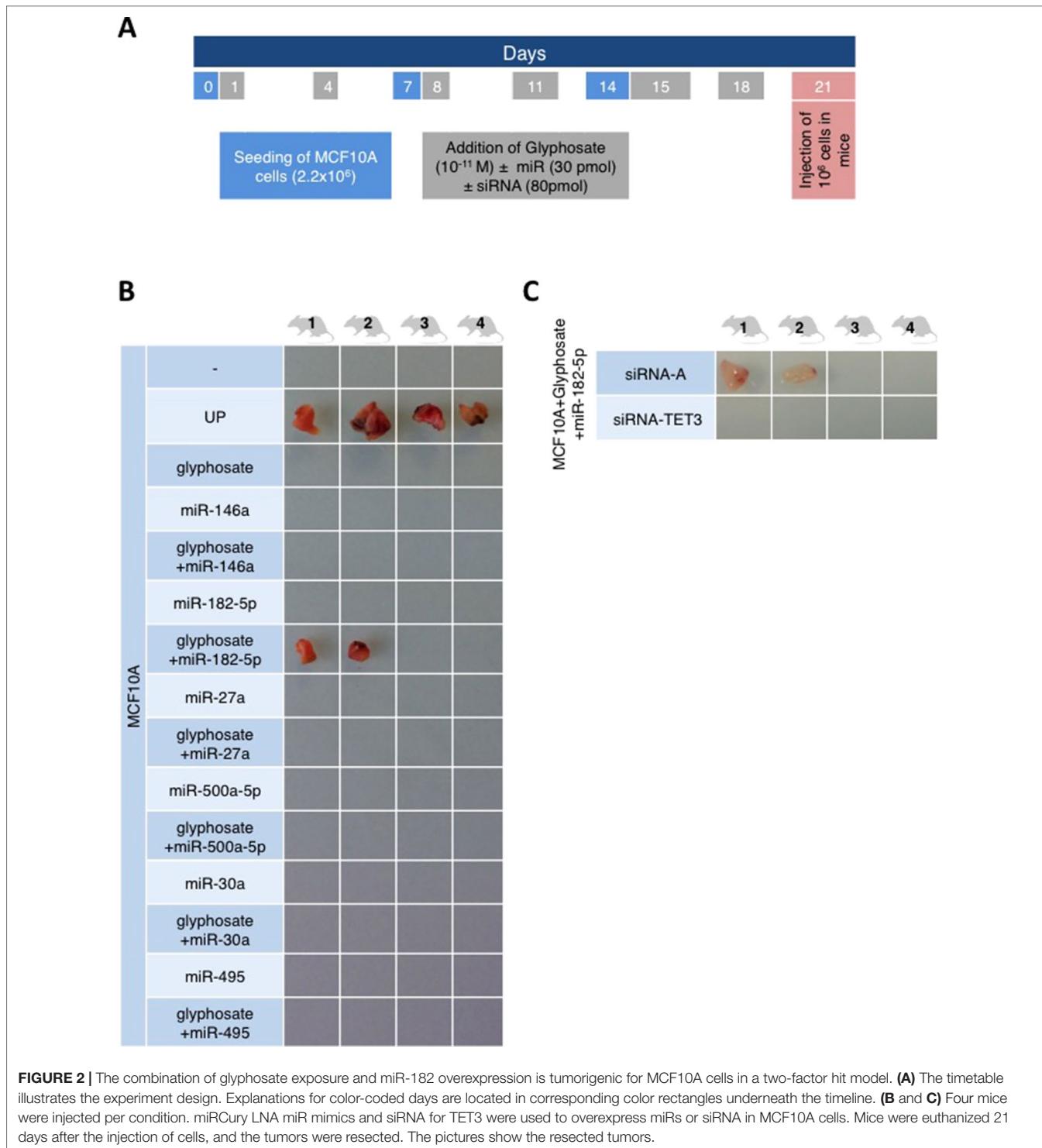
We next compared several molecular signatures and phenotypic traits of primary cultures of tumor cells (PCTC) from glyphosate-induced breast tumors (Glypho-iBPCTC) with the ones of luminal A (MCF-7) and triple negative (MDA-MB-231) breast cancer cells. Only one of the two tumors led to viable Glypho-iBPCTC. In-cell ELISA confirmed that MCF7 and MDA-MB-231 cells were ERα+/PR+/HER2- (luminal A) and ERα-/PR-/HER2- (triple negative),

respectively, and revealed that Glypho-iBPCTC were ERα+/PR-/HER2-, hence corresponding to a luminal B type of breast cancer with poorer outcome compared to ER+/PR+/HER2- subtype (Inic et al., 2014) (**Figure 3A**).

Tamoxifen/IC50 in MCF-7 and Glypho-iBPCTC were similar (**Figure 3B**). The QCM™ 24-Well Collagen-based cell invasion assay revealed that all cell strains had similar invasion capacity (**Figure 3C**), although scratch test indicated that Glypho-iBPCTC had the lowest migration ability compared to MCF-7 ( $p = 0.0137$ ) and MDA-MB-231 cells ( $p = 0.0002$ ) (**Figure 3D**). These results confirm that Glypho-iBPCTC display phenotypic traits associated with breast cancer cells *in vitro*.

### DMOG, a TET Inhibitor, Prevents Tumor Formation in Glyphosate-Challenged Cells

Some of the nutraceuticals/aliments currently available target epigenetic pathways involved in normal homeostasis, notably those controlling DNA methylation. Like established epigenetic drugs, these sources of epigenetic modifiers offer great potentials to help determine the epigenetic path targeted by environmental factors and possibly revert the risk of tumorigenesis. MCF10A cells were transfected with miR-182-5p and exposed to  $10^{-11}$  M of glyphosate (MCF10A<sup>glyphosate</sup>/miR-182-5p) every 3 to 4 days over a 21-day period. They were also simultaneously treated with 40 µg/ml folate, a promoter of DNA methylation (Hervouet et al., 2009; Cartron et al., 2012), or with 250 µM ascorbic acid, an activator of TET (Minor et al., 2013; Yin et al., 2013), 24 h after every glyphosate +/- miR treatment (**Figure 4A**). MCF10A<sup>glyphosate/miR-182-5p</sup> cells were also treated in a similar manner with two therapeutic agents, an anti-miR-182-5p (50 nM) and dimethyloxallyl glycine (DMOG, 1 mM), a compound that blocks TET enzymatic activity (Zhang et al., 2017) (**Figure 4A**). For all of these conditions, we measured the global level of DNA methylation and tumor incidence compared to untreated MCF10A<sup>glyphosate/miR-182-5p</sup> cells (control) at the end of the 21-day treatment sequence. As expected, folate and DMOG prevented glyphosate-induced DNA demethylation, whereas ascorbic acid further reduced DNA methylation in MCF10A<sup>glyphosate/miR-182-5p</sup> cells, as shown by the level of 5mC (**Figure 4B**). Treatment with anti-miR-182-5p did not modify significantly the level of 5mC compared to control. Both folate and DMOG treatments were confirmed to indeed induce hypermethylation in several cell lines (**Supplementary Figure S4**). Of the two hypermethylating agents, DMOG and folate, only DMOG prevented tumor formation; there was no difference between folate and control treatments (50% of the mice displayed tumors). Ascorbic acid and glyphosate acting synergistically on DNA hypomethylation led to a 50% increase in tumor incidence. In contrast, although without an obvious impact on glyphosate-induced DNA hypomethylation, anti-miR-182-5p was able to prevent tumor formation (**Figure 4C**). These results confirm that both DNA demethylation and miR-182-5p are necessary for tumor onset. Importantly, the extent of DNA demethylation appears to set a threshold for tumor



**FIGURE 2 |** The combination of glyphosate exposure and miR-182 overexpression is tumorigenic for MCF10A cells in a two-factor hit model. **(A)** The timetable illustrates the experiment design. Explanations for color-coded days are located in corresponding color rectangles underneath the timeline. **(B and C)** Four mice were injected per condition. miRCury LNA miR mimics and siRNA for TET3 were used to overexpress miRs or siRNA in MCF10A cells. Mice were euthanized 21 days after the injection of cells, and the tumors were resected. The pictures show the resected tumors.

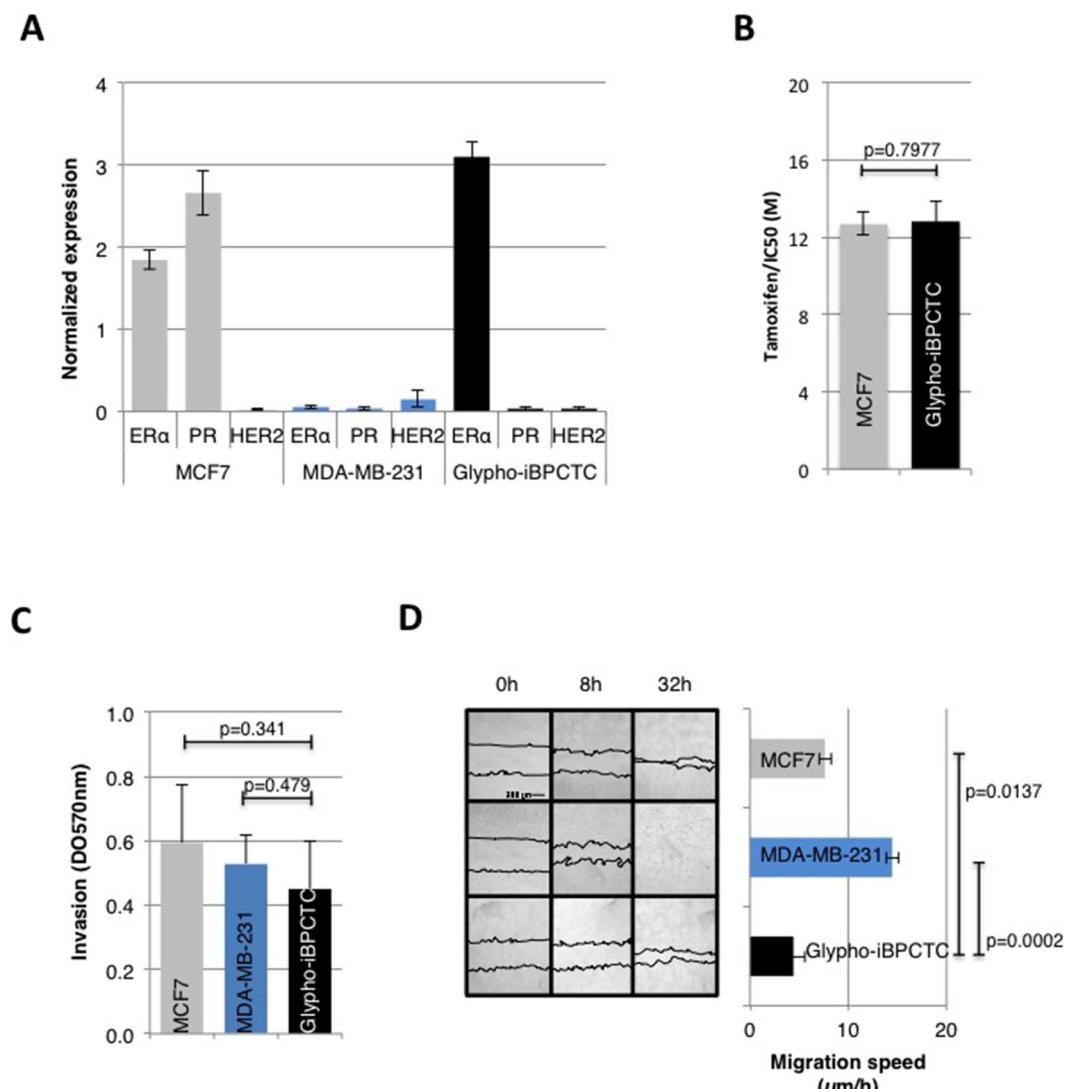
onset (i.e., the more hypomethylated, the higher the risk for tumor development).

### Glyphosate Exposure Induces Sustained TET3-Mediated Gene Demethylation

The hypomethylation induced by glyphosate treatment is sufficient for tumor onset when using a two-factor hit model

with induced overexpression of miR-182-5p. Therefore, we investigated the possibility that an epimark of hypomethylation might be imprinted in the DNA.

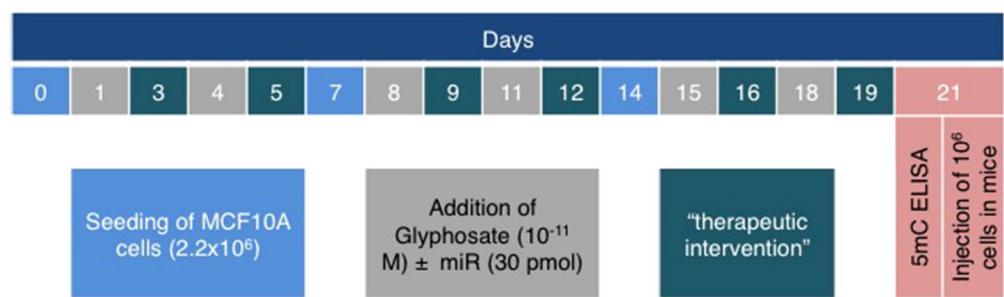
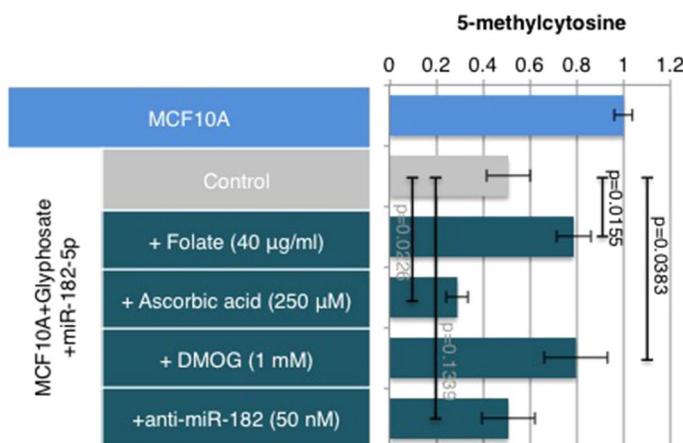
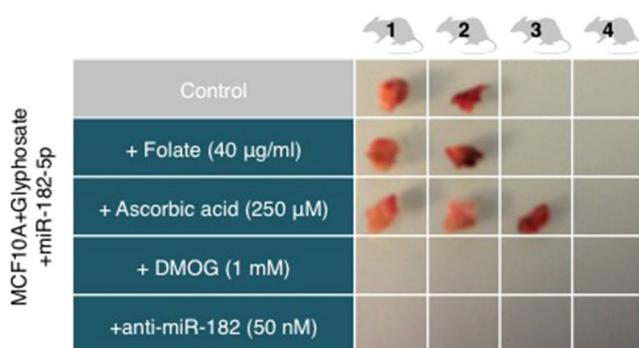
We postulated that the putative epimark induced by glyphosate might be the hypomethylation of TET3-targeted genes because TET3 mediates glyphosate-induced DNA hypomethylation. The chromatin immunoprecipitation (ChIP)



**FIGURE 3 |** Primary cells from glyphosate-induced breast tumor display characteristics of malignant cells. **(A)** The expression levels of ER $\alpha$ , PR, and HER2 were estimated in MCF7 cells, MDA-MB-231 cells, and Glypho-iBPCTC primary cells using In-Cell ELISA. Normalization to Janus Green staining intensity was performed to account for differences in cell seeding density. The bar graph displays the average  $\pm$  standard deviation values of three independent experiments. **(B)** Bar graph of the viability of MCF-7 and Glypho-iBPCTC cells treated with increasing doses of tamoxifen (0, 2, 4, 6, 8, 10, 16, 19, 22  $\mu$ M). Viability was measured by an MTT test, and the results represent the average  $\pm$  standard deviation values of six independent experiments. The IC50 for each cell type was calculated using the IC50 Calculator (ATT Bioquest). **(C)** Bar graph showing the invasion capacity of MCF-7, MDA-MB-231, and Glypho-iBPCTC cells measured by optical density (absorbance at 570 nm). n = 3. **(D)** Confluent cultures of MCF-7, MDA-MB-231, and Glypho-iBPCTC cells were subjected to the wound healing test. The average migration speed was obtained by calculating the ratio distance/time between each acquisition time. Left: Pictures were acquired immediately after seeding (0 h) and after 8 and 32 h of culture. The bar graph represents the average  $\pm$  standard deviation values of three independent experiments.

atlas database identifies *MTRNR2L2*, *COL23A1*, *MSH3*, *DHFR*, and *DUX4* as the most frequently present in TET3-ChIP hits. According to this predictive finding, ChIP experiments using anti-TET3 antibody were performed for chromatin obtained from MCF10A cells treated or not with glyphosate for 21 days, such as described in **Figure 1A**. Interestingly, only *MTRNR2L2* and *DUX4* genes were immunoprecipitated by TET3 in MCF10A cells treated with glyphosate. *COL23A1*, *MSH3*, and *DHFR* genes were not immunoprecipitated in both untreated and treated MCF10A cells. Thus, the prediction

made by the ChIP atlas database was validated for *MTRNR2L2* and *DUX4* genes and not for the *COL23A1*, *MSH3*, and *DHFR* genes, suggesting a context-dependent accessibility for this set of TET3-controlled genes. Accordingly, quantitative methylation-sensitive restriction enzyme (qMSRE) revealed that *MTRNR2L2* and *DUX4* genes were strongly methylated in control cells and became hypomethylated in MCF10A cells exposed to glyphosate (**Figure 5A**). The involvement of TET3 in the glyphosate-induced hypomethylation of *DUX4* and *MTRNR2L2* was confirmed by the abrogation with

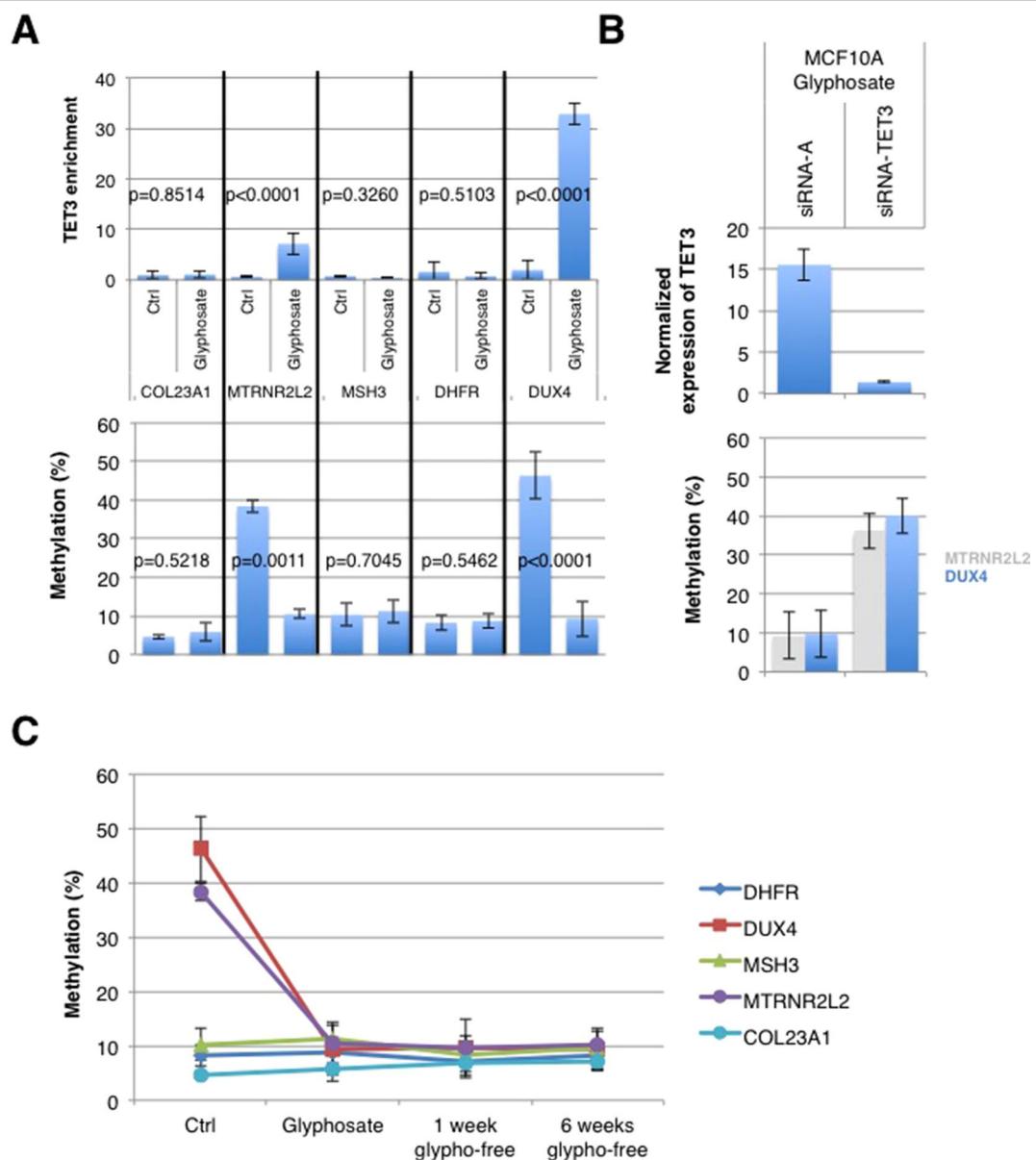
**A****B****C**

**FIGURE 4 |** DMOG and anti-miR-182 prevent tumor onset but differentially impact 5-meC level. **(A)** The timetable illustrating the experiment design. Explanations for color-coded days are located in corresponding color rectangles underneath the timeline. Therapeutic interventions on MCF10A cells treated with glyphosate and miR as indicated were performed on days 3, 5, 9, 12, 16, and 19 with folate (40 µg/ml), ascorbic acid (250 µM), DMOG (1 mM), or anti-miR-182 (50 nM). **(B)** MCF10A cells were treated as shown in schedule A. DNA was extracted at day 21 and used in 5mC ELISA. The bar graph illustrates the levels of 5mC for the different conditions. **(C)** Mice were injected with the cells following the treatment schedule A and euthanized 21 days later. Shown are pictures of the resected tumors.

siRNA-TET3 of the glyphosate-induced hypomethylation of these genes (**Figure 5B**). Preliminary investigation of available breast tissue from breast cancer-free women confirmed the demethylation of *DUX4* and *MTRNR2L2* in a woman showing glyphosate exposure based on urinary test. However, the methylation status of the five genes immunoprecipitated by TET3, *MTRNR2L2*, *DUX4COL23A1*, *MSH3*, and *DHFR*,

should be kept in consideration in the future because a woman with low glyphosate exposure displayed methylation on the five genes, hence suggesting that an epimark should consider the methylation status of all these genes in future investigations (**Supplementary Figure S5**).

The stability of epigenetic changes is an important factor for long-term risk determination. MCF10A cells were exposed



**FIGURE 5 |** Glycophosphate-induced TET3-mediated demethylation affects *MTRNR2L2* and *DUX4* genes. **(A)** MCF10A cells were treated with glycophosphate for 21 days as in the schedule shown in **Figure 2**. The graphs illustrate TET3 enrichment (top) following chromatin immunoprecipitation (ChIP) and the methylation level measured by qMSRE (bottom) of five genes defined by the ChIP atlas as being TET3-targeted genes. **(B)** MCF10A cells were treated with glycophosphate for 21 days (according to the timetable of **Figure 2**), with siRNA added concomitantly to glycophosphate. Bar graph (top) of TET3 expression measured with In-Cell ELISA after treatment with siRNA-TET3 (sc94636) or control siRNA-A (sc94636). Normalization to Janus Green staining intensity was performed to account for differences in cell seeding density. Bar graph (bottom) of methylation levels of *DUX4* and *MTRNR2L2* genes as measured by qMSRE. **(C)** MCF10A cells were treated with glycophosphate for 21 days (glycophosphate) according to the schedule shown in **Figure 1** and then cultured in glycophosphate-free medium for another 1 (1 week glypho-free) or 6 (6 weeks glypho-free) weeks. Shown is the graph of the methylation level of five TET3-dependent genes. “Ctrl” represents MCF10A cells without glycophosphate exposure.

to glycophosphate for 21 days (as previously described; **Figure 1A**) and then cultured without glycophosphate for 1 and 6 weeks. The *DUX4* and *MTRNR2L2* hypomethylations remained stable, as shown by qMSRE, even after exposure to glycophosphate has ceased (**Figure 5C**). bc-GenExMiner and KM plotter indicated that a high expression of *DUX4* is associated with a poor prognosis, suggesting that genes controlled by

TET3 might deserve additional scrutiny in breast cancer pathogenesis (**Supplementary File F2**).

## DISCUSSION

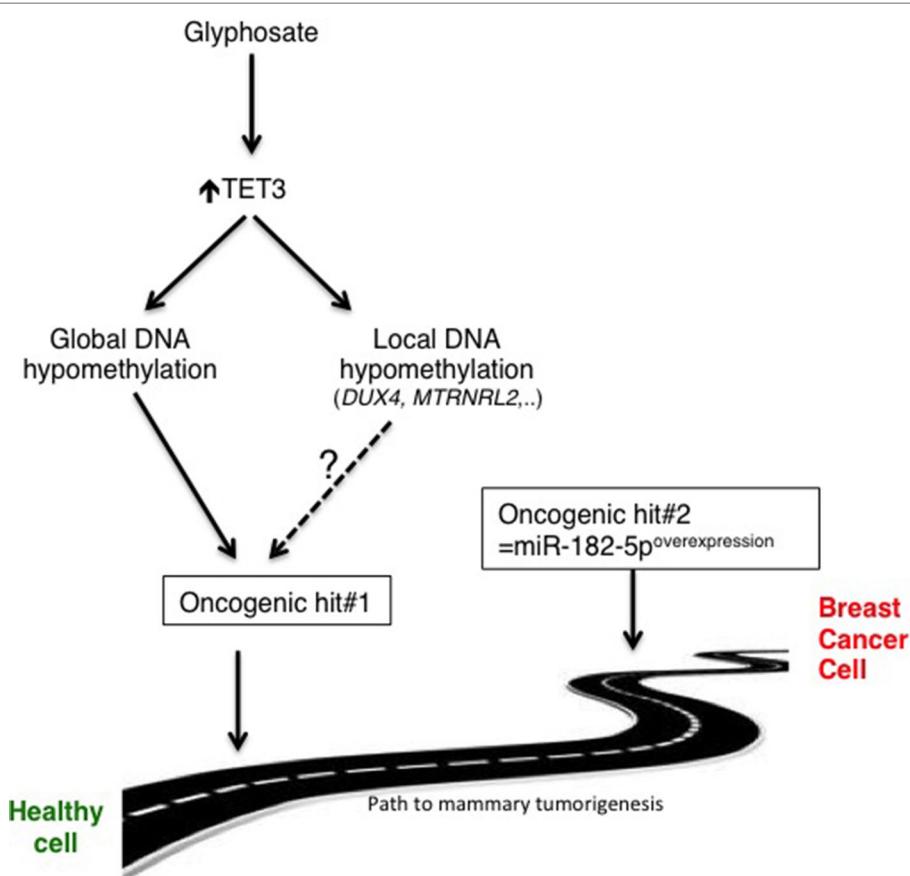
The impact of glycophosphate on human health has been analyzed and discussed for several years now (Gillezeau et al., 2019).

Recently, glyphosate exposure was correlated with shortened gestational lengths (Parvez et al., 2018), and the level of glyphosate excretion was associated with steatohepatitis and advanced liver fibrosis in patients with fatty liver disease (Mills et al., 2019). However, the multiple research studies that investigated the tumorigenic effect of glyphosate as the sole risk factor had not led to convincing evidence of its implication.

It is assumed that only 5–10% of cancers are directly caused by inherited genetic abnormalities. The remaining 90% of cancers are linked to environmental factors that directly or indirectly affect DNA, possibly triggering genetic defects or aberrations in the reading and/or expression of DNA (Perera, 1997; Anand et al., 2008). Environmental and lifestyle factors are pleiotropic and include diet, tobacco, infections, obesity, alcohol, radiation, stress, physical activity, exposure to heavy metals and other pollutants, such as glyphosate. We are reporting that glyphosate exposure is not oncogenic by itself, but it acts as an oncogenic hit factor that, combined with another oncogenic hit, promotes the development of mammary tumors. At the molecular level, our findings demonstrate that glyphosate exposure

can predispose breast cells to tumorigenesis *via* epigenetic reprogramming occurring *via* TET3-mediated global and local DNA hypomethylation (**Figure 6**).

We and others have identified that global DNA hypomethylation promoting tumorigenesis may be caused by a deficiency of the DNMT1/PCNA/UHRF1 complex or of DNMT1 expression as shown in astrocytes, pulmonary fibroblasts, mesothelial cells, and breast cells (Gaudet et al., 2003; Hervouet et al., 2010; Pacaud et al., 2014). We show that glyphosate-mediated DNA hypomethylation is associated with TET3 overexpression instead of the DNMT1 pathway. The lower degree of DNA hypomethylation reached *via* the glyphosate-TET3 path compared to that reached *via* UP peptide-DNMT1 path that is capable of inducing tumor onset suggests that a great intensity of global DNA hypomethylation could act as an oncogenic event, while a moderate intensity of global DNA hypomethylation might be considered a predisposing factor to cancer. The fact that active DNA demethylation orchestrated by TET can occur in resting (nondividing) cells representing the majority of breast cells (in contrast to DNMT activity that requires cell proliferation) confers to TET-mediated mechanism a potentially higher degree of danger for cancer development.



**FIGURE 6 |** Schematic representation of the proposed glyphosate-induced mammary tumorigenesis path. Whether *DUX4* and *MTRNRL2* are involved in oncogenesis remains to be determined.

The implication of TET proteins in breast cancer growth and metastasis has been strongly documented (Sun et al., 2013; Yang et al., 2015), and the level of hypomethylation of triple-negative breast cancer has been associated with TET1 DNA demethylase activity (Good et al., 2018). In the latter article, it is proposed but not shown that TET1 might act as an oncogene by leading to aberrant hypomethylation. Our findings demonstrate that the hypothesis of an involvement of TET-mediated DNA hypomethylation in cancer onset was correct. Notably, siRNA-TET3 abolished the presence of glyphosate-induced global and local *DUX4* and *MTRNR2L2* hypomethylation, as well as tumorigenesis. Our data feed the ongoing debate regarding whether TET3 exerts an oncogenic role or a tumor suppressor role. For the latter role, TET3 might act by inhibiting epithelial-to-mesenchymal transition in ovarian and melanoma cancers (Ye et al., 2016; Gong et al., 2017). But our analysis with KM plotter database revealed a potentially unfavorable outcome for breast cancers when TET3 is overexpressed (**Supplementary File F1**).

Our work shows that two epigenetic events (global DNA hypomethylation and overexpression of a miR) cooperate to promote breast cancer. Other epigenetic events described to be involved in breast cancer development include the reduction of H3K9 acetylation *via* TIP60 downregulation that promotes ER-negative tumors (Bassi et al., 2017; Judes et al., 2018). Histone acetyltransferase p300 activity and BIM1-mediated histone H2A ubiquitination that remodel chromatin are also two epigenetic events described as promoters for the development of aggressive breast tumors. A body of literature reports that miRs also play a crucial role in mammary tumorigenesis. In addition to oncogenic miRs, there are also miRs acting as tumor suppressors. For example, loss of miR-10b delays oncogene-induced mammary tumorigenesis (Kim et al., 2016), and overexpression of miR-489 inhibits HER2/neu-induced mammary tumorigenesis (Patel et al., 2019). Since the expression of miR depends on epigenetic control, it seems that either an extensive global hypomethylation of DNA (like with UP peptide) or a less extensive global hypomethylation associated with local epigenetic alterations affecting a miR might lead to tumor onset. The mechanisms associated with specific targeting of miR expression remain to be understood.

Breast cancer susceptibility has been statistically linked to epigenetic age acceleration and CpG island methylation (Ambatipudi et al., 2017). An important question is whether exposure to pollutants that are detrimental to epigenetic homeostasis might replace or synergize with age-related epigenetic changes and thus lead to the increase in earlier onset of breast cancer that is now documented. This possibility is further supported by our preliminary observation that the luminal B subtype of tumor (ER+/PR-/HER2-) triggered by glyphosate exposure combined with miR-182-5p overexpression is associated with poorer outcomes than the frequent ER+/PR+/HER2-luminal A type of tumor. Indeed, luminal B type of tumors have been found to be most common in young patients (Goksu et al., 2014). This phenotype obtained from one tumor produced in mice will have to be confirmed with additional means; in any case, epigenetic markers of risk would be a prime resource to help curve

the incidence. There exist already DNA methylation markers that add to the prediction of tertiary and secondary outcomes over and beyond standard clinical measures (Terry et al., 2016).

In the MCF10A model, glyphosate-induced DNA hypomethylation can be detected *via* the methylation level of only two of the five genes predicted to be controlled by TET3, *MTRNR2L2* and *DUX4* genes. Even if several other factors than glyphosate-induced TET3-mediated DNA hypomethylation (such as chromatin structure, other epimark, etc.) can govern the methylation status of the five genes, *MTRNR2L2*, *DUX4*, *COL23A1*, *MSH3*, and *DHFR*, our preliminary data with human samples support the idea that the study of the methylation status of these five genes might be important to obtain a marker of risk based on a MethylGlypho score. We are now pursuing this direction of research by detecting and analyzing this 5-gene TET3-dependent epimark in blood samples. Possibly, glyphosate-induced methylome reprogramming might be used for the detection of an increased risk for breast cancer in women living in an environment conducive to this type of pollution.

Due to their concomitant expression during tumorigenesis associated with glyphosate-induced DNA hypomethylation, *DUX4* and *MTRNR2L2* may appear as players in this process instead of only being considered potential biomarkers. Results with KM plotter and bc-GenExMiner indicate that *DUX4* level is negatively associated with breast cancer prognosis. No data seems available on *MTRNR2L2* in these databases. Based on the literature, *DUX4* could act as an oncogene in various sarcomas and hematological malignancies (Dib et al., 2019), while we could not find information in the literature revealing a putative oncogenic role for *MTRNR2L2*. These TET3-controlled genes are worth further investigation to establish their causal effect in mammary tumorigenesis in future work.

Knowing the epigenetic pathway involved in glyphosate-mediated risk increase might lead to prevention strategies to follow detection of the epigenetic risk. Our findings suggest that TET-specific inhibitor DMOG might be a plausible therapeutic intervention since it gave a satisfactory response on both DNA methylation and tumor incidence. It would act by limiting TET3-mediated global DNA hypomethylation. In contrast, global remethylation of DNA by folate that has been considered for possible preventive effect is insufficient to prevent tumor incidence in the case of glyphosate exposure (Hervouet et al., 2009; Cartron et al., 2012). Another interesting direction would be to limit the intake of ascorbic acid since it not only further reduced DNA methylation but also increased tumor incidence in mice. The epigenetic pathway leading to DNA hypomethylation is an important aspect to consider for further translational work on breast cancer risk.

## MATERIALS AND METHODS

### Cell Culture and Transfection

MCF10A cells were cultured in DMEM/F12 supplemented with 5% horse serum (Invitrogen, Cergy Pontoise, France), 500 ng/ml hydrocortisone (Sigma-Aldrich, France), 100 ng/ml cholera

toxin (Sigma-Aldrich, France), 10 µg/ml insulin (ThermoFisher, France) and 20 ng/ml epidermal growth factor (EGF, Sigma-Aldrich, France), penicillin (100 U/ml), and 2 mmol/L L-glutamine. MCF7 and MDA-MB-231 cells were cultured in DMEM medium (Invitrogen) all supplemented with 5% FCS and 2 mM l-glutamine. Glyphosate (CAS 1071-83-6, sc-211568) was purchased from Santa-Cruz (France), and a 10<sup>-8</sup>-M stock solution was prepared in DMSO every week. Glyphosate was diluted directly in fresh cell culture medium and was fed to the cells at the time points indicated in the results section.

For the transfection of RNAs, we used miRCury LNA miR mimics for the has-miR-146a, has-miR-182-5p, has-miR-27a, has-miR-500a-5p, has-miR-30a, and has-miR-495 (Qiagen, France), siRNA for siRNA-T ET3 (sc94636) and control siRNA-A (sc94636) and HiPerfect Transfection Reagent (Qiagen, France). All miRs showed similar transfection efficiency (10- to 15-fold change, as measured by RTqPCR) (Supplementary Figure S3).

## DNA Extraction, 5mC ELISA, and qMSRE

A QIAcube automate and QIAamp DNA Mini QiaCube kit (Qiagen, France) were used to isolate DNA.

The quantification of 5mC was performed using the 5mC DNA ELISA Kit (Zymo Research-Euromodex, France) according to the manufacturer's instructions. The 5mC DNA ELISA Kit estimates the number of 5mC on DNA without distinction of localization; therefore, we used the term of global DNA methylation level when referring to results obtained *via* this mode of quantification.

Next, DNA methylation was quantified by qMSRE. Digestions were performed with adequate restriction enzymes, HpaII and AciI (NEB, France). Typically, 1 ng of genomic DNA was digested with 40 U of enzymes at 37°C for 2 h in 50 µl of reaction. Control samples were treated in the same way but without addition of the enzyme. Five microliters of digestion mixture were used for qPCR. The QuantiFast SYBR Green PCR Kit and Rotor-Gene Q (Qiagen, France) were used to perform the qPCR. Primers were MSH3: TTTCTCCAG GGCTGGGACTTTG and CCCGACTGGATTCCCCTTTCT; DHFR: AACACCTCAGCGCTTCACCAAT and TGATAGG GCTGGAGGAGGAAG; DUX4: CGACACCCTCGGACAGCA and TCAAAGCAGGCTCGCAG; COL23A1: TCTCCAGG CCAGAACACAGTCTT and ATTTAGAGAGGCAGGGTC GAGA; and MTRNR2L2: ACCCCCACCTGTTACCAA and GCTACCTTGACGGTTAGGG.

## Tumor Xenografts in Nude Mice

Cells were harvested by trypsinization, washed and resuspended in saline buffer. Cell suspensions were injected subcutaneously into the flank of 7 to 8-week-old mice (Janvier, France) in 100 µl of sterile PBS. Tumor volume based on caliper measurements was calculated using the modified ellipsoidal formula [Tumor volume = 1/2 (length × width<sup>2</sup>)] according to previously published work (Cartron et al., 2012). At the end of the observation period, the mice with xenograft tumors were euthanized, and the tumor tissues were removed for analysis.

The experimental procedures with animals were in accordance with the guidelines of Institutional Animal Care and the French National Committee of Ethics. In addition, all experiments were conducted according to the Regulations for Animal Experimentation at the *Plateforme Animalerie* in the *Institut de Recherche en Santé de l'Université de Nantes* (IRS-UN) and approved by the French National Committee of Ethics. The number of mice was restricted to four per condition to limit the number of animals to the necessary minimum as in previous studies (Hervouet et al., 2010; Pacaud et al., 2014) based on the fact that we anticipated to detect a highly frequent tumorigenic event (frequency superior to one to four for tumorigenesis).

## Establishment of Tumor Cells From Xenografts (PCTCdX)

PCTCdX (here named Glypto-iBPCTC) were obtained after mechanical dissociation. Briefly, resected tumor tissue from mice was cut into pieces of 1–5 mm<sup>3</sup> and plated in a 60-mm<sup>2</sup> tissue culture dish with DMEM containing 10% FBS and antibiotics. Minced pieces of tumor were incubated with 200 U/ml collagenase I (Sigma) and 500 U/ml DNaseI (Sigma) in PBS for 1 h at 37°C with vigorous constant agitation. The single-cell suspension was filtered through a 70-mm cell strainer (BD Falcon), washed with PBS, and then placed in DMEM-10% FBS. Cell cultures were split 1:5 when confluent.

## Migration Assay

Cells ( $3 \times 10^5$ ) were seeded in six-well plates, cultured until they reached 80–90% confluence, and treated with 10 µg/ml of mitomycin C (Sigma, France) for 2 h (to prevent cell proliferation). The monolayer of cells was scratched using a two-well silicone insert (Ibidi, Germany). Cell migration was monitored by microscopy (Incellis Cell Imager, Bertin, France). The images acquired at different time points (0, 4, 8, 24, 28, 32, and 48 h) for each sample were analyzed quantitatively. For each image, distances between one side of the wound and the other side were measured with ImageJ software; the mean value of 10 measurements all along the wound was recorded. The average migration speed was obtained by calculating the ratio distance/time along the time course.

## Invasion Assay

All of the procedures were performed according to the manufacturer's instructions (QCM 24-Well Collagen-Based Cell Invasion Assay, Millipore, France). In brief, 200 µl of serum-free medium containing  $2 \times 10^5$  cells were added into the invasion chamber, with the bottom well of the 24-well plate containing 500 µl of complete medium. After 72 h of incubation at 37°C, the medium was removed, and the cells were stained by placing the chamber in staining solution for 20 min at room temperature. Cells that did not invade were carefully removed from the top side of the chamber using a cotton swab. The stained chamber was inserted into a clean well containing 200 µl of extraction buffer for 15 min at room temperature. A total of 100 µl of extracted (stained) solution from the chamber was

transferred into a 96-well plate, and the optical density was measured 570 nm using a spectrophotometer.

## Viability Assay: MTT and XTT Tests

A cell suspension containing  $10^5$  cells was prepared, and 100  $\mu$ l was distributed in sixplicates in a 96-well plate. After 24 h of incubation at 37°C and 5% CO<sub>2</sub>, cells were exposed to tamoxifen for 48 h. Tamoxifen was first diluted 10 times in dimethyl sulfoxide (DMSO) and then further diluted in DMEM containing 4.5 g/L glucose, 1% SVF, 1% glutamine, 1% penicillin-streptomycin at the desired concentrations. Following treatment, 10  $\mu$ l of MTT (10  $\mu$ g/ml) (VWR Chemicals, France) was added in each well, and the cells were incubated for 3 h. Finally, the medium containing MTT was removed, and 200  $\mu$ l/well of DMSO was added to measure the optical density at 570 nm using a spectrophotometer.

For the XTT test, we used the XTT Assay Kit (ab232856, Abcam, France) according to the manufacturer's instructions. Briefly, 10<sup>5</sup> cells were seeded in 100  $\mu$ l of culture medium in each well of a 96-well plate. After 24 h of incubation at 37°C and 5% CO<sub>2</sub>, cells were treated with adequate drugs. Then, 10  $\mu$ l/well of XTT mixture was added for an incubation of 2 h at 37°C and 5% CO<sub>2</sub>. Finally, absorbance was measured at 450 nm.

## Breast Tissue and Urine Samples

Human samples were collected from the Réseau des tumorothèques du Cancéropôle Grand-Ouest and Institut de Cancérologie de l'Ouest (ICO, <http://www.ico-cancer.fr>).

In accordance with regulations, all subjects signed a specific informed consent form for this biocollection approved by an Ethics Committee (CPP OUEST IV, n°18/16), the French State Department for National Education, Higher Education and Research (Ministère de l'Education Nationale, de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche, N° DC-2015-2457) and the Commission Nationale de l'Informatique et des Libertés (CNIL) (compliance commitment to MR 001). The glyphosate concentration in urine samples was obtained using Glyphosate kit (Novakits, France).

## mMTase and TET Activities

TET activity was determined using the Epigenase 5mC-Hydroxylase TET Activity/Inhibition Assay Kit (Colorimetric; Epigentek/Euromedex, France) according to the manufacturer's instructions. Dnmts-magnetic beads (DMB) assays were performed to estimate mMTase, such as initially described (Yokochi and Robertson, 2002). Briefly, a typical methylation reaction required 50  $\mu$ g of nuclear extract (Nuclear extract kit, Active Motif, France), 125 nM DNA oligonucleotides (probes), and 900 nM tritium-labeled AdoMet (1 mCi/ml; #NET155V001MC; PerkinElmer, France) in reaction buffer (50 mM Tris, pH 8.0, 5 mM EDTA, 10% glycerol, 0.5 mM phenylmethylsulfonyl fluoride). After incubation at 37°C for 1 h, reactions were quenched with an equal volume of magnetic beads suspension and incubated for 15 min at room temperature. Next, the beads were magnetically

isolated from the reaction mix, and tritium incorporation was measured by scintillation counting.

## In-Cell ELISA

In-cell ELISA was performed using the In-Cell ELISA Kit (Abcam, France) according to the manufacturer's instructions and after a fixation step performed with 4% of paraformaldehyde solution (10 min at room temperature). Primary antibodies were incubated overnight at 4°C. Adequate HRP-conjugated secondary antibodies were incubated for 1 h at room temperature. Detection was performed at 450 nm.

After the washes, cells in each well were incubated with 1X Janus Green Stain for 5 min at room temperature, according to the manufacturer's instructions. Data were expressed in normalized unit, according to the following calculation: (HRPsignal 'minus' HRPsignal in absence of primary antibody)/(Janus Green signal 'minus' Janus Green signal in absence of cells).

Antibodies used were anti-TET1 (sc163446, Santa Cruz, France), anti-TET2 (sc398535, Santa Cruz), anti-TET3 (sc139186, Santa Cruz), anti-ER $\alpha$  (sc8002, Santa Cruz), anti-PR (sc130071, Santa Cruz), and anti-HER2 (sc-393712, Santa Cruz).

## ChIP Analyses

ChIP was performed using the ChIP-IT Express kit (Active Motif, France) according to the manufacturer's instructions. The cross-linking step was performed by treating the cells with 37% formaldehyde solution for 15 min at room temperature. Sonication was performed with the Bioruptor Plus (eight cycles 30 s on/90 s off) (Diagenode, France). The QuantiFast SYBR Green PCR Kit and Rotor-Gene Q (Qiagen, France) were used to perform the qPCR. Antibodies used were Anti-IgG (Abcam, AB2410) and anti-TET3 (sc139186, Santa Cruz).

## Statistical Analysis

All experiments were done at least in biological triplicates. Differences in means were assessed using Student t test, and the degree of correlation between two parameters was calculated using Pearson's test.  $P < 0.05$  was considered significant.

## DATA AVAILABILITY

All datasets generated for this study are included in the manuscript and the **Supplementary Files**.

## ETHICS STATEMENT

The experimental procedures with animals were in accordance with the guidelines of Institutional Animal Care and the French National Committee of Ethics. In addition, all experiments were conducted according to the Regulations for Animal Experimentation at the "Plateforme Animale" in the "Institut de Recherche en Santé de l'Université de Nantes (IRS-UN)" and approved by the French National Committee of Ethics.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

PFC designed experiments and coordinated the project. MD, JB, AN, and PFC performed all experiments. GBC, FMV, JSF, SL and PFC interpreted and discussed the data. PFC wrote the manuscript. SL edited several versions of the manuscript. All authors have reviewed and approved the manuscript.

## FUNDING

This work was supported by funding from the LIGUE NATIONALE CONTRE LE CANCER, Comité InterRégional Grand Ouest, département de Loire Atlantique, d'Ille et Vilaine, Vendée et Côte d'Armor. PFC.

## REFERENCES

- Acquavella, J. F., Alexander, B. H., Mandel, J. S., Gustin, C., Baker, B., Chapman, P., et al. (2004). Glyphosate biomonitoring for farmers and their families: results from the farm family exposure study. *Environ. Health Perspect.* 112, 321–326. doi: 10.1289/ehp.6667
- Ambatipudi, S., Horvath, S., Perrier, F., Cuenin, C., Hernandez-Vargas, H., Le Calvez-Kelm, F., et al. (2017). DNA methylome analysis identifies accelerated epigenetic ageing associated with postmenopausal breast cancer susceptibility. *Eur. J. Cancer* 75, 299–307. doi: 10.1016/j.ejca.2017.01.014
- Anand, P., Kunnumakkara, A. B., Kunnumakkara, A. B., Sundaram, C., Harikumar, K. B., Tharakan, S. T., et al. (2008). Cancer is a preventable disease that requires major lifestyle changes. *Pharm. Res.* 25, 2097–2116. doi: 10.1007/s11095-008-9661-9
- Bassi, S., Tripathi, T., Monzani, A., Di Leva, F., and Biagioli, M. (2017). Epigenetics of Huntington's disease. *Adv. Exp. Med. Biol.* 978, 277–299. doi: 10.1007/978-3-319-53889-1\_15
- Cao, M., Nie, W., Li, J., Zhang, Y., Yan, X., Guan, X., et al. (2014). MicroRNA-495 induces breast cancer cell migration by targeting JAM-A. *Protein Cell* 5, 862–872. doi: 10.1007/s13238-014-0088-2
- Cartron, P.-F., Hervouet, E., Debien, E., Olivier, C., Pouliquen, D., Menanteau, J., et al. (2012). Folate supplementation limits the tumorigenesis in rodent models of gliomagenesis. *Eur. J. Cancer* 48, 2431–2441. doi: 10.1016/j.ejca.2012.01.002
- De Almeida, L. K. S., Pletschke, B. I., and Frost, C. L. (2018). Moderate levels of glyphosate and its formulations vary in their cytotoxicity and genotoxicity in a whole blood model and in human cell lines with different estrogen receptor status. *3 Biotech.* 8, 438. doi: 10.1007/s13205-018-1464-z
- Degli Esposti, D., Aushev, V. N., Lee, E., Cros, M.-P., Zhu, J., Herceg, Z., et al. (2017). miR-500a-5p regulates oxidative stress response genes in breast cancer and predicts cancer survival. *Sci Rep* 7, 15966. doi: 10.1038/s41598-017-16226-3
- di Gennaro, A., Damiano, V., Brisotto, G., Armellin, M., Perin, T., Zucchetto, A., et al. (2018). A p53/miR-30a/ZEB2 axis controls triple negative breast cancer aggressiveness. *Cell Death Differ.* 25, 2165–2180. doi: 10.1038/s41418-018-0103-x
- Dib, C., Zakharov, V., Popova, E., Kiseleva, E., Chernyak, B., Lipinski, M., et al. (2019). DUX4 pathological expression: causes and consequences in cancer. *Trends Cancer* 5, 268–271. doi: 10.1016/j.trecan.2019.03.001
- Fraga, M. F., Ballestar, E., Paz, M. F., Ropero, S., Setien, F., Ballestar, M. L., et al. (2005). Epigenetic differences arise during the lifetime of monozygotic twins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 10604–10609. doi: 10.1073/pnas.0500398102
- Gaudet, F., Hodgson, J. G., Eden, A., Jackson-Grusby, L., Dausman, J., Gray, J. W., et al. (2003). Induction of tumors in mice by genomic hypomethylation. *Science* 300, 489–492. doi: 10.1126/science.1083558
- Gillezeau, C., van Gerwen, M., Shaffer, R. M., Rana, I., Zhang, L., Sheppard, L., et al. (2019). The evidence of human exposure to glyphosate: a review. *Environ. Health* 18, 2. doi: 10.1186/s12940-018-0435-5
- Goksu, S. S., Tastekin, D., Arslan, D., Gunduz, S., Tatli, A. M., Unal, D., et al. (2014). Clinicopathologic features and molecular subtypes of breast cancer in young women (age ≤ 35). *Asian Pac. J. Cancer Prev.* 15, 6665–6668. doi: 10.7314/APJCP.2014.15.16.6665
- Gong, F., Guo, Y., Niu, Y., Jin, J., Zhang, X., Shi, X., et al. (2017). Epigenetic silencing of TET2 and TET3 induces an EMT-like process in melanoma. *Oncotarget* 8, 315–328. doi: 10.18632/oncotarget.13324
- Good, C. R., Panjarian, S., Kelly, A. D., Madzo, J., Patel, B., Jelinek, J., et al. (2018). TET1-Mediated Hypomethylation Activates Oncogenic Signaling in Triple-Negative Breast Cancer. *Cancer Res.* 78, 4126–4137. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-17-2082
- Hervouet, E., Debien, E., Campion, L., Charbord, J., Menanteau, J., Vallette, F. M., et al. (2009). Folate supplementation limits the aggressiveness of glioma via the remethylation of DNA repeats element and genes governing apoptosis and proliferation. *Clin. Cancer Res.* 15, 3519–3529. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-08-2062
- Hervouet, E., Lalier, L., Debien, E., Cheray, M., Geairon, A., Rogniaux, H., et al. (2010). Disruption of Dnmt1/PCNA/UHRF1 interactions promotes tumorigenesis from human and mice glial cells. *PLoS ONE* 5, e11333. doi: 10.1371/journal.pone.0011333
- Inic, Z., Zegarac, M., Inic, M., Markovic, I., Kozomara, Z., Djurisic, I., et al. (2014). Difference between Luminal A and Luminal B subtypes according to Ki-67, tumor size, and progesterone receptor negativity providing prognostic information. *Clin. Med. Insights Oncol.* 8, 107–111. doi: 10.4137/CMO.S18006
- Jiang, G., Shi, W., Fang, H., and Zhang, X. (2018). miR-27a promotes human breast cancer cell migration by inducing EMT in a FBXW7-dependent manner. *Mol. Med. Rep.* 18, 5417–5426. doi: 10.3892/mmr.2018.9587
- Judes, G., Dubois, L., Rifai, K., Idrissou, M., Mishellany, F., Pajon, A., et al. (2018). TIP60: an actor in acetylation of H3K4 and tumor development in breast cancer. *Epigenomics* 10, 1415–1430. doi: 10.2217/epi-2018-0004
- Kim, G., Clarke, C. R., Larose, H., Tran, H. T., Haak, D. C., Zhang, L., et al. (2017). Herbicide injury induces DNA methylome alterations in *Arabidopsis*. *PeerJ* 5, e3560. doi: 10.7717/peerj.3560
- Kim, J., Siverly, A. N., Chen, D., Wang, M., Yuan, Y., Wang, Y., et al. (2016). Ablation of miR-10b suppresses oncogene-induced mammary tumorigenesis and metastasis and reactivates tumor-suppressive pathways. *Cancer Res.* 76, 6424–6435. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-16-1571
- Kucharski, R., Maleszka, J., Foret, S., and Maleszka, R. (2008). Nutritional control of reproductive status in honeybees via DNA methylation. *Science* 319, 1827–1830. doi: 10.1126/science.1153069
- Kwiatkowska, M., Reszka, E., Woźniak, K., Jabłońska, E., Michałowicz, J., and Bukiowska, B. (2017). DNA damage and methylation induced by glyphosate in human peripheral blood mononuclear cells (*in vitro* study). *Food Chem. Toxicol.* 105, 93–98. doi: 10.1016/j.fct.2017.03.051
- Mesnage, R., Phednos, A., Biserni, M., Arno, M., Balu, S., Corton, J. C., et al. (2017). Evaluation of estrogen receptor alpha activation by glyphosate-based herbicide constituents. *Food Chem. Toxicol.* 108, 30–42. doi: 10.1016/j.fct.2017.07.025
- Michel, S., Busato, F., Genuneit, J., Pekkanen, J., Dalphin, J.-C., Riedler, J., et al. (2013). Farm exposure and time trends in early childhood may influence

## ACKNOWLEDGMENTS

MD and JB were supported by fellowships from “EpiSAVMEN/REGION PAYS DE LA LOIRE” research program and SAL’s work was supported in part by a Congressionally-Directed Medical Research Program/Breast Cancer Research Breakthrough Award # W81XWH-17-1-0250. SL and PFC are members of international breast cancer & nutrition (IBCN).

## SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fgene.2019.00885/full#supplementary-material>

- DNA methylation in genes related to asthma and allergy. *Allergy* 68, 355–364. doi: 10.1111/all.12097
- Mills, P. J., Caussy, C., and Loomba, R. (2019). Glyphosate excretion is associated with steatohepatitis and advanced liver fibrosis in patients with fatty liver disease. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* S1542-3565, 30361–1. doi: 10.1016/j.cgh.2019.03.045
- Minor, E. A., Court, B. L., Young, J. I., and Wang, G. (2013). Ascorbate induces ten-eleven translocation (Tet) methylcytosine dioxygenase-mediated generation of 5-hydroxymethylcytosine. *J. Biol. Chem.* 288, 13669–13674. doi: 10.1074/jbc.C113.464800
- Pacaud, R., Brocard, E., Lalier, L., Hervouet, E., Vallette, F. M., and Cartron, P.-F. (2014). The DNMT1/PCNA/UHRF1 disruption induces tumorigenesis characterized by similar genetic and epigenetic signatures. *Sci Rep* 4, 4230. doi: 10.1038/srep04230
- Parvez, S., Gerona, R. R., Proctor, C., Friesen, M., Ashby, J. L., Reiter, J. L., et al. (2018). Glyphosate exposure in pregnancy and shortened gestational length: a prospective Indiana birth cohort study. *Environ. Health* 17, 23. doi: 10.1186/s12940-018-0367-0
- Patel, Y., Soni, M., Awgulewitsch, A., Kern, M. J., Liu, S., Shah, N., et al. (2019). Overexpression of miR-489 derails mammary hierarchy structure and inhibits HER2/neu-induced tumorigenesis. *Oncogene* 38, 445–453. doi: 10.1038/s41388-018-0439-1
- Perera, F. P. (1997). Environment and cancer: who are susceptible? *Science* 278, 1068–1073. doi: 10.1126/science.278.5340.1068
- Rondon, R., Grunau, C., Fallot, M., Charlemagne, N., Sussarellu, R., Chaparro, C., et al. (2017). Effects of a parental exposure to diuron on Pacific oyster spat methylome. *Environ. Epigenet.* 3, dvx004. doi: 10.1093/eep/dvx004
- Spannhoff, A., Kim, Y. K., Raynal, N. J.-M., Gharibyan, V., Su, M.-B., Zhou, Y.-Y., et al. (2011). Histone deacetylase inhibitor activity in royal jelly might facilitate caste switching in bees. *EMBO Rep.* 12, 238–243. doi: 10.1038/embor.2011.9
- Sritana, N., Suriyo, T., Kanitwithayanun, J., Songvasin, B. H., Thiantanawat, A., and Satayavivad, J. (2018). Glyphosate induces growth of estrogen receptor alpha positive cholangiocarcinoma cells via non-genomic estrogen receptor/ERK1/2 signaling pathway. *Food Chem. Toxicol.* 118, 595–607. doi: 10.1016/j.fct.2018.06.014
- Steinborn, A., Alder, L., Michalski, B., Zomer, P., Bendig, P., Martinez, S. A., et al. (2016). Determination of glyphosate levels in breast milk samples from Germany by LC-MS/MS and GC-MS/MS. *J. Agric. Food Chem.* 64, 1414–1421. doi: 10.1021/acs.jafc.5b05852
- Sun, M., Song, C.-X., Huang, H., Frankenberger, C. A., Sankarsharma, D., Gomes, S., et al. (2013). HMGA2/TET1/HOXA9 signaling pathway regulates breast cancer growth and metastasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 9920–9925. doi: 10.1073/pnas.1305172110
- Terry, M. B., McDonald, J. A., Wu, H. C., Eng, S., and Santella, R. M. (2016). Epigenetic biomarkers of breast cancer risk: across the breast cancer prevention continuum. *Adv. Exp. Med. Biol.* 882, 33–68. doi: 10.1007/978-3-319-22909-6\_2
- Thongprakaisang, S., Thiantanawat, A., Rangkadilok, N., Suriyo, T., and Satayavivad, J. (2013). Glyphosate induces human breast cancer cells growth via estrogen receptors. *Food Chem. Toxicol.* 59, 129–136. doi: 10.1016/j.fct.2013.05.057
- Wang, Q., Wang, C., Guo, J., and Zhnag, Z. (2016). Expression of miR-146a in triple negative breast cancer and its clinical significance. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 9, 11832–11837. doi: 10.1111/j.0105-2896.2009.00867.x
- Yang, L., Yu, S.-J., Hong, Q., Yang, Y., and Shao, Z.-M. (2015). Reduced expression of TET1, TET2, TET3 and TDG mRNAs are associated with poor prognosis of patients with early breast cancer. *PLoS One* 10, e0133896. doi: 10.1371/journal.pone.0133896
- Ye, Z., Li, J., Han, X., Hou, H., Chen, H., Zheng, X., et al. (2016). TET3 inhibits TGF- $\beta$ 1-induced epithelial-mesenchymal transition by demethylating miR-30d precursor gene in ovarian cancer cells. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 35, 72. doi: 10.1186/s13046-016-0350-y
- Yin, R., Mao, S.-Q., Zhao, B., Chong, Z., Yang, Y., Zhao, C., et al. (2013). Ascorbic acid enhances Tet-mediated 5-methylcytosine oxidation and promotes DNA demethylation in mammals. *J. Am. Chem. Soc.* 135, 10396–10403. doi: 10.1021/ja4028346
- Yokochi, T., and Robertson, K. D. (2002). Preferential methylation of unmethylated DNA by Mammalian *de novo* DNA methyltransferase Dnmt3a. *J. Biol. Chem.* 277, 11735–11745. doi: 10.1074/jbc.M106590200
- Yoshioka, N., Asano, M., Kuse, A., Mitsuhashi, T., Nagasaki, Y., and Ueno, Y. (2011). Rapid determination of glyphosate, glufosinate, bialaphos, and their major metabolites in serum by liquid chromatography-tandem mass spectrometry using hydrophilic interaction chromatography. *J. Chromatogr. A* 1218, 3675–3680. doi: 10.1016/j.chroma.2011.04.021
- Yu, J., Shen, W., Gao, B., Zhao, H., Xu, J., and Gong, B. (2017). MicroRNA-182 targets FOXF2 to promote the development of triple-negative breast cancer. *Neoplasma* 64, 209–215. doi: 10.4149/neo\_2017\_206
- Zhang, J., Zhang, S., Wang, Y., Cheng, H., Hao, L., Zhai, Y., et al. (2017). Effect of TET inhibitor on bovine parthenogenetic embryo development. *PLoS One* 12, e0189542. doi: 10.1371/journal.pone.0189542

**Conflict of Interest Statement:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2019 Duforestel, Nadaradjane, Bougras-Cartron, Briand, Olivier, Frenel, Vallette, Lelièvre and Cartron. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.



# Cell-free circulating epimarks in cancer monitoring

Manon Duforestel<sup>‡,1,2,3,4</sup>, Joséphine Briand<sup>‡,1,2,3,4</sup>, Gwenola Bougras-Cartron<sup>1,2,3,4</sup>, Dominique Heymann<sup>1,2</sup>, Jean-Sébastien Frenel<sup>1,2,3,4,6</sup>, François M Vallette<sup>1,2,3,4,5</sup> & Pierre-François Cartron<sup>\*1,2,3,4,5</sup>

<sup>1</sup>CRCINA, INSERM, Université de Nantes, Nantes, France

<sup>2</sup>Equipe Apoptose et Progression tumorale, LaBCT, Institut de Cancérologie de l'Ouest, Saint Herblain, France

<sup>3</sup>Niches & Epigenetics of Tumors Network from Cancéropôle Grand Ouest

<sup>4</sup>EpiSAVMEN Network (Région Pays de la Loire)

<sup>5</sup>LabEX IGO, Université de Nantes, France

<sup>6</sup>Department of Medical Oncology, Institut de Cancérologie de l'Ouest Site René Gauducheau, Saint Herblain, France

\*Author for correspondence: pierre-francois.cartron@inserm.fr

‡ Authors contributed equally

Cancer numbers increasing, cases heterogeneity and the drug resistance emergence have pushed scientists to search for innovative solutions for patients and epimutations can be one. Methylated DNA, modified nucleosomes and noncoding RNAs are found in all cells, including tumor cells. They are intracellular actors but also have intercellular communication roles, being released in extracellular environment and in different body fluids. Here, we reviewed current literature on the use of these blood circulating epimarks in cancer monitoring. What stands out is that epimarkers must be considered as 'real time' images of the tumor, and can be isolated without invasive methods. In the future, the real challenge lies in the development of specific, sensitive, fast and clinically applicable detection and analysis methods of epimarkers.

First draft submitted: 17 June 2019; Accepted for publication: 11 November 2019; Published online: 9 January 2020

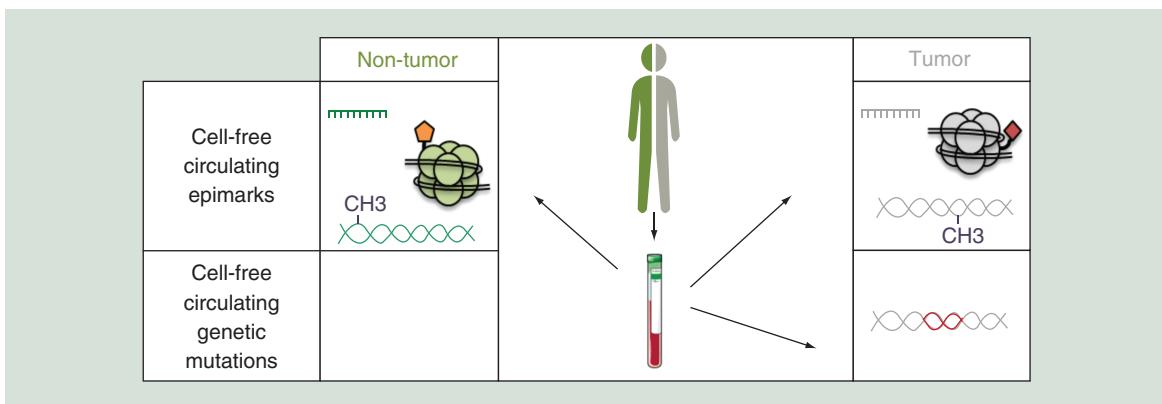
**Keywords:** biomarkers • cancer • cfc-DNA • cfc-ncRNA • cfc-nucleosomes • epigenetics

According to the WHO, cancer was responsible for an estimated 9.6 million deaths in 2018. It means that about one in six deaths is due to cancer despite progress in detection and treatment. Cancer is a complex disease, and most of the time, multifactorial. Complexity and heterogeneity of tumors are not the results of genetic mutations alone, it results from the accumulation of genetic and epigenetic disorders causing neoplasia. Even more, epigenetic alterations tend to be more frequent events than genetic mutations. Epigenetic mechanisms are heritable and reversible, and the sum of the alterations to the chromatin template collectively establish and propagate different patterns of gene expression and silencing [1]. Interest in cancer epigenetics is growing and recent findings in the underlying mechanisms of carcinogenesis are promising. Currently, three types of epigenetic mechanisms are known to be involved in cancer: DNA methylation, histone marks modification and noncoding RNAs (ncRNAs) expression [2]. For the last few years, these three modifications have been widely studied for their potential as a biomarker. Biomarkers were defined in 2001 by Biomarkers Definitions Working Group as a molecule 'that is objectively measured and evaluated as an indicator of normal biological processes, pathogenic processes or pharmacologic responses to a therapeutic intervention'. In this context, the identification of circulating epimarkers in prediction, early diagnosis, prognosis and management of cancer therapy response is a real challenge.

Here, we reviewed the current literature on the use, interest and efficiency of three types of cell-free circulating epimarks in cancer monitoring: cytosine-methylated circulating tumor DNA (ct-DNA-5mC), circulating tumor nucleosome modification (ct-nucleosomes) and cell-free circulating ncRNA (ct-ncRNA; Figure 1).

## Cytosine-methylated ct-DNA

Ct-DNA-5mC is here defined as a subgroup of cell-free circulating DNA and characterized as being a cytosine-methylated DNA fragment that comes from cancerous cells.



**Figure 1. Cell-free circulating epimarks and genetic mutations in a physiological and tumoral context.**  
Cell-free circulating epimarks correspond to cfc-DNA, cfc-nucleosomes and cfc-ncRNA. In cancer context, these epimarks are modified and called 'circulating tumoral', and ct-DNA can carry mutations.

### Cell-free circulating DNA: the basics

The first demonstration of cell-free circulating nucleic acid in human plasma dates back to 1948 by Mandel and Metais [3]. In 1968, Barnett demonstrated the presence of DNA in sera and synovial fluids in normal and pathologic humans [4] and a few years later in 1973, Davis and Davis detected and quantified this cell-free DNA in the plasma of 418 individuals by counterimmunoelectrophoresis [5]. After this highlight and occasional articles, it was only in the 1990s that scientists realized the potential clinical implication of cell-free circulating DNA. Since, researchers' interest in cfc-DNA is growing and nowadays many papers are in favor of its use as a diagnostic and prognostic tool in several diseases [6].

In humans, cfc-DNA is found in several circulating fluids such as blood or lymphatic fluid and other body fluids like synovial fluids, pleural fluid, saliva, urine, milk, etc. [7]. In healthy people, cfc-DNA can be originated from all living cells by spontaneous release and by cell death process associated to the cellular homeostasis. Thus, hematopoietic cells are the largest contributors to cfc-DNA during their cell death [8], lymphocytes also seem to be responsible for regulated excretion of DNA [9,10]. Han *et al.* report that cfc-DNA is mainly characterized by a size of 70–200 base pairs (bp) with a blood concentration of 0–100 ng/ml [11].

Many articles report that both physiological and pathological conditions can influence the amount of cfc-DNA such as pregnancy [12], traumatic brain injury [13] or systemic inflammation [14]. Very recently, Hummel *et al.* showed that psychosocial stress exposure leads to increased cfc-DNA fragments as well as their size and their methylation pattern [15]. In cancer context, the pool of 'physiological' cfc-DNA is enriched by cfc-DNA that originates from tumor cells, and which we here call circulating tumor DNA (ct-DNA).

### Characteristics of ct-DNA

Ct-DNA can represent 0.01–90% of total cfc-DNA [11,16]. Of course, several parameters influence these percentages such as size, localization, therapy sensitivity, metastasis and vascularity of the tumors [17]. Currently, it is believed that the ct-DNA originates from cancer cells eliminated by cell death processes such as apoptosis and necrosis. However, the hypothesis that living cancer cells actively release DNA is not to be excluded. Abolhassani *et al.* [18], Stroun *et al.* [19] and Bronkhorst *et al.* [20] report the existence of a spontaneously extracellular release of DNA from two human cancer cell lines (leukemia and osteosarcoma). Despite the need of clear evidences, circulating tumor cells could also increase the pool of ct-DNA.

Even if the release mechanism is still unclear and remains to be investigated, it is admitted that dsDNA fragments in circulation are mainly small, generally 180 bp [21] or sized in multiples of the nucleosomal DNA [22]. The size distribution is not completely homogeneous because necrosis is responsible for fragments of several kbp [20]. DNA released from cells is not 'naked', but can circulate as nucleosome or chromatosome [23]. Some studies even suggest that a non-negligible portion of ct-DNA is bound to the cell surface rather than circulating freely in the blood [24].

For about 20 years now, studies about ct-DNA have multiplied and it appears that in a tumoral context the quantity of ct-DNA is higher than in physiological conditions, 180 ng/ml on average [9,21,25]. Of course, the amount of ct-DNA in blood varies from one individual to another, and can be up to 1000 ng/ml. The half-life of

ct-DNA is low, ranged between 16 min and 2.5 h between biogenesis and clearance/degradation [26]. Therefore, its turnover is constant. In their study on patients with colorectal tumors, Diehl *et al.* estimated that for a patient with a tumor of  $3 \times 10^{10}$  neoplastic cells (i.e., 100 g), 3.3% of the tumor DNA is daily fed into the circulation [27].

### Tumor circulating DNA as biomarker

With a rapid, constant turnover and an origin from all cancer cell clones, ct-DNA appears as a perfect ‘real-time biomarker’ informing on the heterogeneity, state [28] and size [29] of the tumor within an individual patient. However, distinguish ct-DNA derived from tumor cells and cfc-DNA derived from healthy cells is proven challenging. Differences in size of ct-DNA and nontumoral cfc-DNA have been highlighted [30]. Though, the size difference can be weak: 165 bp for ct-DNA derived from *BRAF* V600E mutant allele in melanoma patients versus 132–145 bp for cfc-DNA derived from this wild-type allele in healthy persons [31]. However, fragmentation profiles have already been used to identify the tissue of origin of the cancers by Cristiano *et al.* [32]. They also improved their approach by combining with mutation-based cell-free DNA analyses. Indeed the main differentiating element between ct-DNA and cfc-DNA is the presence in ct-DNA of a large number of cancer hallmarks including genetic mutations (such as single-base substitutions, insertions, deletions or translocations) [28] and epigenetic modifications (such as cytosine DNA methylation).

In 2016, the first liquid biopsy test (based on the monitoring of *EGFR* mutation in ct-DNA) was approved by the US FDA, allowing to identify patients with non-small-cell lung cancer (NSCLC) suitable for EGFR tyrosine kinase inhibitors therapy by analysis of ct-DNA [33]. Liquid biopsy represents a real alternative to the traditional biopsy, which is invasive, with long lead time and not always feasible, depending on the location of the tumor and the patient state. Since this marketing authorization, the emergence of studies [34–38] open concerns on management of all cancers and the use of ct-DNA detection as a prognostic, predictive and postoperative tool [39].

### Ct-DNA-5mC: the new insight for cancer management

In addition to genetic alterations, ct-DNA can harbor tumoral epigenetic modifications such as aberrant cytosine methylation. Cytosine DNA methylation corresponds mainly to an addition of a methyl group ( $\text{CH}_3$ ) on CpG dinucleotide, which becomes a 5-methylcytosine (5mC). Main actors of DNA methylation are DNA methyltransferases. Global hypomethylation, hypomethylation of DNA repeat elements (such as *LINE-1*), oncogene hypomethylation and hypermethylation of CpG islands in gene promoter are signatures characterizing the DNA of almost all types of cancer and that can be observed in ct-DNA [40]. One subtype of ct-DNA is called ct-DNA-5mC. Due to its rapid writing or erasing in response to environmental condition changes, ct-DNA-5mC appears as a real-time reflect of cytosine DNA methylation changes occurring in tumors cells.

In January 2019, Gai and Sun have reported 15 studies less than 6 years old using DNA methylation-based cancer liquid biopsy [41]. The interest in circulating methylome is growing, indeed, the major benefit of large-scale epigenetic modifications is their tissue specificity and therefore their potential to inform about cancer specificities. Several teams have succeeded in identifying the origin of ct-DNA by analyzing methylation patterns [42–44]. Among them, Kang *et al.* developed CancerLocator, a probabilistic approach, based on CpG cluster features and Moss *et al.* [45] worked out a comprehensive human cell-type methylation atlas to decipher the cellular identity of ct-DNA.

A good example of the usefulness of circulating methylome as diagnostic tool is *SEPT9* gene in colorectal cancer (CRC). The 5'-end regulatory regions of *SEPT9* gene contains a CpG island, which when is methylated can silence *SEPT9* expression and may enhance cell proliferation, cell migration, angiogenesis and so, neoplastic progression [46]. *SEPT9* seems to be methylated in over 90% of CRC tissues [47]. After the validation by many papers [48], in 2016 the only FDA-approved molecular blood test for CRC [49] was commercialized under the name Epi ProColon. This test is based on a real-time PCR assay to detect the hypermethylated promoter region of *SEPT9* DNA in plasma [50]. More recently, studies have favorably evaluated *SEPT9* as a prognostic factor and significant postoperative indicator for CRC recurrences [51,52]. Over the last years, many studies have been conducted on the CRC to identify the regions in which analysis of the changes in methylation provides the highest clinical value. These studies of ct-DNA-5mC to evaluate the tumor occurrence, progression and recurrence have spread to other types of cancers, such as hepatocellular carcinoma (HCC) [53], ovarian cancer [54], breast cancer [55], prostate cancer [56], etc. But research work remains to be done to develop new molecular blood tests.

## Circulating nucleosomes & their post-translational modifications

### Histones & nucleosomes: the basics

The nucleosome was first described in 1974 by Kornberg [57]. It represents a repetitive unit of chromatin structure and is essential for facilitating the very tight compaction of DNA into a chromosome. Concretely, DNA is complexed with histones to form nucleosomes, the first level of DNA compression [58]. The core of the nucleosome is an octamer of eight histone proteins, with 145 bp of DNA wrapped around [59]. This octamer is composed of two copies of each histone: H2A, H2B, H3 and H4 to which is added the histone linker H1 to strongly maintain the two full turns of DNA around the octamer, this structure is called chromatosome [60]. Histones are small basic proteins containing a globular domain and a N-terminal tail rich in basic amino acid residues. These core histone tails can protrude from their own nucleosome and interact with adjacent nucleosomes and other proteins. Thanks to these interactions, the architecture in 'string-of-beads' will undergo another shortening and assembling into higher-order 3D structure to finally fit into the nucleus. The amino acids residing in histone tails may be subject to post-translational modifications (PTMs). PTMs refer to chemical events including acetylation (Ac), methylation (Me), phosphorylation (P), ubiquitylation (Ub) and sumoylation (Sumo), the most common [61]. It turns out that PTMs can occur at different residues (e.g., arginine, serine, threonine, tyrosine) but mainly on lysines and, to several degrees (e.g., mono-, di-, tri-) at a single residue.

The combination of all marks in a nucleosome determines outcomes. Till today, more than one hundred distinct modifications have been described [62] and are related to gene activation or silencing. As example, acetylation may have direct effects on nucleosomal architecture and influence chromatin accessibility to transcriptional machinery [63] by affecting histone-histone and histone-DNA interactions [64]. Histone methylation regulates gene expression through recruiting histone-tail-binding proteins [65]. Those chromatin PTMs are established from effector, also named writer proteins. The underlying DNA methylation template functions as platforms for the recruitments of readers of histone code able to entail downstream effects such as recruiting other chromatin remodeling complexes [66]. Eraser proteins have the role to remove those modifications. Histone modifications are essential for physiological process such as cellular differentiation, DNA repair [67] and probably other cellular mechanisms remaining further exploration as maintenance of telomeric and subtelomeric chromatin [68].

### Histone modifications in cancer

The global function of histones PTMs is to regulate access to DNA and consequently genes expression. Thereby, deregulation of histones modification mechanisms are often involved in carcinogenesis. Upregulation, downregulation or mutation of writers proteins including histone acetyltransferases, methyltransferases (HMTs) or erasers (e.g., deacetylases, demethylases) can lead to an overall alteration of the histone patterns [69]. For example, in 2005, Fraga *et al.* showed that a loss of acetylation at Lys16 and trimethylation at Lys20 of histone H4 are hallmarks often associated with cancer occurrence [70]. Sometimes, hypoacetylated and hypermethylated histones are associated with hypermethylated CpGs islands, an another characteristic of transformed cells [71]. Kondo *et al.* have reported that G9a, a well-described PTMs writer, is higher expressed in HCC than in noncancerous liver tissues. G9a is HMTs mainly responsible for H3K9me1 and H3K9me2, and more rarely for H3K27me1 and H3K27me2. It seems that the histone H3K9 methylation combined with promoter methylation on CpG is related with the silencing of P16, a tumor suppressor [72]. Gene repression mediated by G9a overexpression has also been reported in breast cancer [73], immune escape and chemoresistance of colon carcinoma [74], etc. Phosphorylation is also a crucial, but less studied, PTM. Histone phosphorylation appears to play a role in DNA repair [75], transcription and chromosome segregation during mitosis [76]. Obviously, a change in the histone phosphorylation pattern may promotes tumorigenesis [77–79]. Example are numerous, and quite logically, cancer therapy is turning more and more to the use of epigenetic drugs and the PTM players are excellent targets. Among the privileged targets of the epidrugs are the writers and the erasers, but it can be counterproductive to inhibit a whole class of major transcription regulator proteins.

For instance, studies of HDAC inhibitors have exploded this last years and many are already approved and used clinically in various pathologies [80]. HDAC inhibitors are relatively new anticancer drugs but are the most used epidrugs-targeting PTM players. Restoration or inhibition of HMT activity also is of great importance for tumor therapy. Different HMT inhibitors are the subject of clinical trials at different stages such as Tazemetostat, an EZH2 inhibitor [81].

Now that the relationship between histone modifications and cancer is establish and the lack of effective therapies is therefore not a hindrance, the use of nucleosomes and their specific PTMs as cancer biomarkers shows a real

potential. As for ct-DNA-5mC, to take advantage of PTMs as biomarkers and avoid the inconveniences associated with invasive solid biopsy, the alternative of liquid biopsy is strongly considered [82].

### Circulating nucleosomes as cancer biomarkers

As cfc-DNA and ct-DNA, circulating nucleosomes are released into biologic fluid following cell death such as necrosis and apoptosis, and many circulating nucleosomes can be captured and digested by macrophages. In plasma, nucleosomes have an initial half life of 4 min before being degraded by circulating endonucleases [83]. Like ct-DNA-5mC, these circulating nucleosomes can be isolated with specific antibodies [84]. Nucleosomes can also be secreted in blood by active mechanisms [85]. Either they joined bloodstream by both damaged and activated cells, the role of nucleosomes is not yet completely clear but it seems that they exhibit an inflammatory state and mediate cell death [86,87]. As with cfc-DNA, multiple biological conditions, both physiological and pathological including cancer [88], cause an increase in the amount of cell-free nucleosomes [89,90].

The utility of cfc-nucleosomes as biomarkers has already been explored in two studies in 2017 and 2018. The two papers discussed the interest of cfc-nucleosomes in early diagnosis of CRC [91,92]. Both performed ELISA tests on a cocktail of circulating nucleosome epitopes, some of which epimodified as H4K20me3, H3K9Me3 and H3K9Ac. Cfc-nucleosomes carrying epigenetic modifications are presented from tumor initiation to advanced stages. In spite of that, neither of the two studies is really conclusive. They highlighted some cfc-nucleosomes combinations promising for early detection but the link between cfc-nucleosomes levels and CRC diagnosis or prognosis is still unknown. Finally, these articles suggest to deepen the research, with larger numbers of patients, for example, or considering the association of biomarkers of different types, such as enzymes. Circulating nucleosomes also appear to be interesting biomarkers for early predicting the efficacy of a treatment as it has been demonstrated in lung [93], colon [94] and breast cancers [95].

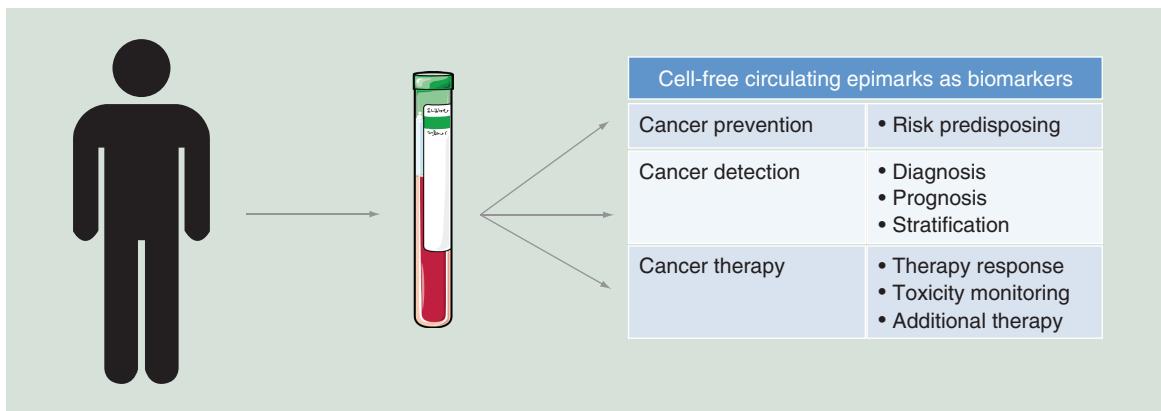
In many cases, histone PTMs in the initial tumor, such as those described in the previous section, are used in prognosis. But studies of these biomarkers in the blood are scarce while the therapeutic arsenal is full of possibilities. A concrete example is glioblastoma, an aggressive brain tumor that becomes rapidly resistant to standard temozolomide and irradiation treatment [96]. Therapeutic failures with glioblastoma drive scientists to wonder if it is not an epigenetic disease [97]. In 2015, Pacaud *et al.* demonstrated that three different phosphorylated signatures of histone H3 are associated with a poor prognosis in patient with the reference treatment [98]. They highlight that the use of kinase inhibitors abrogated the high level of phosphorylated histones residues. Nowadays, plethora of kinase inhibitors are available, but the limiting step is still in sample collection, extremely invasive and not always feasible in the case of glioblastoma. Finally, to benefit from kinase inhibitors in antiglioblastoma therapy, the alternative of using cfc-nucleosomes as blood biomarkers could once again raises barriers.

### Cell-free circulating ncRNA

#### ncRNA: the basics

For a long time, researchers were only interested by coding DNA, they were focused on RNA transcription and proteins translation. Noncoding DNA, which represents 98% of total DNA, was called ‘junk DNA.’ Even if DNA is coding for an RNA, it does not always end with the production of a protein: it is what we call ncRNA. Since a few years, researchers started to focus on ncRNAs. In humans, only 2% of the genome code for proteins [99], whereas 80% are transcribed [17], which means that most of the transcribed sequences are ncRNAs. There are two main families of ncRNAs: long ncRNA (lncRNA; >200nt) and short ncRNA (19nt<size<200nt).

The lncRNA family is very heterogeneous and not well classified. Among the lncRNA family, we here distinguish the large intergenic ncRNAs (lincRNAs) and circular RNA (cirRNA). LincRNAs represent the half of lncRNA and are defined as autonomously transcribed ncRNAs longer than 200 nucleotides, which do not overlap annotated coding genes [100]. They exercise functions such as remodeling chromatin and genome architecture, RNA stabilization and transcription regulation, including enhancer-associated activity. CircRNA are defined as endogenous RNAs that can form between the fusion of a downstream 3' splice site and an upstream 5' splice site in a linear precursor mRNA and act as miRNA sponges, competitor of RNA, sequestor of proteins and splicing modulator [101]. The short ncRNA family can be divided in several subtypes: miRNA that target mRNA and induce their degradation, piwiRNA (piRNA) implicated in transposons silencing, small nuclear RNA (snRNA) with a role in splicing, small nucleolar RNA (snoRNA) that participate to ribosomal RNA maturation [102] but also ribosomal RNA (rRNA), transfer RNA (tRNA) and its derived fragments.



**Figure 2. Cell-free circulating epimarks as biomarkers, for cancer detection, prevention and therapy.** These epimarks can be very useful to monitor cancer evolution during its development.

### Characteristics of cfc-ncRNA

Multiple mechanisms participate to the release of ncRNA in body fluids from cells, including necrosis and apoptosis [103]. Certain ncRNA can also be released and transported in body fluids in association with proteins such as miRNA-AGO1/2 [104]. In theory, all ncRNAs can be detected in body fluids and particularly in blood. A study performed from 477 cancer patients illustrates this point by reporting that the core of cfc-ncRNA includes 258 miRNA, 441 piRNA, 411 tRNA, 125 snRNA and 24 snoRNA [105].

The half-life of cfc-ncRNA in blood is distinct between the different ncRNA subtypes. In theory, the half-life of all ncRNAs in the plasma is affected by circulating RNases. An interesting study reports that half-life of miRNA in blood could be of 14 days because the expression level of those tumor-associated miRNA decreased to their basal levels 2 weeks after the tumor resection [106]. Butova *et al.* report that 6% of lncRNAs shows a half-life over 12 h, and only 29% of lncRNAs may be considered unstable with a 2-h half-life [107]. The average half-life of circRNAs in plasma exceed 48 h [108].

### cfc-ncRNA as cancer biomarkers

Being easy to isolate and study by RT-qPCR, ncRNA could be very good biomarkers in cancer diagnosis and therapy. This is why they are pretty much studied in several cancer types. In this part, we will focus only on cell-free-circulating ncRNA, they do not give same informations about tumors than ncRNA in extracellular vesicles, which can be the proof of intercellular communication.

Many cfc-ncRNAs have been described as deregulated in several cancer types and used as biomarkers as cfc-lncRNA in NSCLC [109], cfc-miRNA in CRC [110], cfc-cirRNA in breast cancer [111], to cite only a few.

More than focusing on unique biomarker, some papers tried to identify a panel of cfc-ncRNA as biomarker to increase the diagnosis precision, the prediction of response to anticancer therapy and or to anticipate toxicity. For example, Peng *et al.* [112] found four miRNA and lncRNA to be used in early diagnosis of NSCLC. A cfc-ncRNA panel has also been identified in HCC [113]. A panel of serum ncRNAs, including let-7a, miR-155, miR-574-5p and MALAT1, was shown to be present in patients with breast cancer [114]. Even if some ncRNA are not pertinent in diagnosis, they can be used in therapy, like the miR-370-3p in glioblastoma, for example, which is not prognostic but able to reduce tumor volume in mice [115].

### Conclusion, challenges & future directions

Cancer monitoring is a topic at the heart of scientific research. In parallel with the studies for innovative treatments or to get around the phenomena of resistance, the early detection of the malignancy is the Holy Grail of cancer research. Accumulating evidence indicates that epigenetic modifications happen prematurely in oncogenesis [116,117], so are they an asset in early detection? We covered each cancers' epimarks rather superficially, and we recommend those recent high-quality review to go in-depth [118–120]. Withal, our review is sufficient to understand that circulating epimarks, whatever their nature, are allies in cancer diagnosis (Figure 2). But detection of circulating epimarks can also be useful to stratify the tumors and to emit a prognosis. In cancer therapy, epimarkers may have a role in

treatment efficiency and toxicity monitoring. Thus, cell-free circulating epimarks are real Swiss army knives, giving us a real-time image of the tumor and its adaptation to its microenvironment.

Despite the use of plasma methylome, nucleosome and noncoding transcriptome as biomarkers is a promising insight for the development of precision medicine [121] and personalized therapy, the identification of biomarkers with adequate clinical accuracy stays a challenge. The relevance of plasma methylome studies is no longer to prove considering the specificity of the markers, but the test sensitivity is discussed, not always satisfactory probably due to the noises from the background DNA. Even if false positives should be rarer with cfc-DNA than with protein biomarkers (e.g., antigen dosage), the screening will be no less tedious for a given cancer, the methylation changes would not be systematically known a priori, and a panel of genes would have to be tested. Another need is to find a way to discriminate between ct-DNA-5mC and methylated nontumor DNA, the size criterion evidenced by certain papers is not technically applicable. However, as sequencing technologies quickly develop, the eventual use of ct-DNA in clinical seems to be promised. The other challenge that remains is the discovery of appropriate epidrugs, in order to really valorize these discoveries [122]. The existence of drug is not a limiting factor in the case of modified nucleosomes in cancer. However, studies on the use of cfc-nucleosomes in cancer management require further exploration. The few existing studies are inconclusive. However, the isolation of nucleosomes circulating in the blood could facilitate the monitoring of the hard-to-access tumors known to display histones profile changes, as glioblastoma. Now that many papers studied circulating epimarks, it seems important to go further and design clinical trials to validate epimarks use in clinic. Indeed, our priority research must remain patients.

#### Author contributions

All the authors were responsible for the draft of the work or critical revision for important intellectual content. All the authors read and approved the final manuscript.

#### Acknowledgments

The authors thank Cancéropôle Grand Ouest for supporting the 'Niches and Epigenetics of Tumors' network, <http://www.canceropole-grandouest.com>.

#### Financial & competing interests disclosure

M Duforestel was supported by a fellowship from EpiSAVMEN/REGION PAYS DE LA LOIRE. J Briand was supported by a fellowship from EpiSAVMEN/REGION PAYS DE LA LOIRE and 'EN AVANT LA VIE', a French association that fights against glioma. The authors have no other relevant affiliations or financial involvement with any organization or entity with a financial interest in or financial conflict with the subject matter or materials discussed in the manuscript apart from those disclosed.

No writing assistance was utilized in the production of this manuscript.

#### References

- Allis CD, Caparros M-L, Jenuwein T, Reinberg D, Lachlan M. *Epigenetics, 2nd Edition*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. (2015).
- Kanwal R, Gupta S. Epigenetic modifications in cancer. *Clin. Genet.* 81(4), 303–311 (2012).
- Mandel P, Metais P. Les acides nucléiques du plasma sanguin chez l'homme. *C. R. Séances Soc. Biol. Fil.* 142(3–4), 241–243 (1948).
- Barnett EV. Detection of nuclear antigens (DNA) in normal and pathologic human fluids by quantitative complement fixation. *Arthritis Rheum.* 11(3), 407–417 (1968).
- Davis GL, Davis JS. Detection of circulating DNA by counterimmunoelectrophoresis (CIE). *Arthritis Rheum.* 16(1), 52–58 (1973).
- Chan AKC, Chiu RWK, Lo YMD. Cell-free nucleic acids in plasma, serum and urine: a new tool in molecular diagnosis. *Ann. Clin. Biochem.* 40(2), 122–130 (2003).
- Fleischhacker M, Schmidt B. Circulating nucleic acids (CNAs) and cancer – a survey. *Biochim. Biophys. Acta BBA Rev. Cancer* 1775(1), 181–232 (2007).
- Moss J, Magenheim J, Neiman D et al. Comprehensive human cell-type methylation atlas reveals origins of circulating cell-free DNA in health and disease. *Nat. Commun.* 9(1), 5068 (2018).
- Anker P, Stroun M, Maurice PA. Spontaneous release of DNA by human blood lymphocytes as shown in an *in vitro* system. *Cancer Res.* 35(9), 2375–2382 (1975).
- Rogers JC, Boldt D, Kornfeld S, Skinner A, Valeri CR. Excretion of deoxyribonucleic acid by lymphocytes stimulated with phytohemagglutinin or antigen. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 69(7), 1685–1689 (1972).
- Han X, Wang J, Sun Y. Circulating tumor DNA as biomarkers for cancer detection. *Genomics Proteomics Bioinformatics* 15(2), 59–72 (2017).

12. Lo YM, Corbetta N, Chamberlain PF et al. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet* 350(9076), 485–487 (1997).
13. Rodrigues Filho EM, Simon D, Ikuta N et al. Elevated cell-free plasma DNA level as an independent predictor of mortality in patients with severe traumatic brain injury. *J. Neurotrauma* 31(19), 1639–1646 (2014).
14. Borisoff JI, Joosen IA, Versteylen MO et al. Elevated levels of circulating DNA and chromatin are independently associated with severe coronary atherosclerosis and a prothrombotic state. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 33(8), 2032–2040 (2013).
15. Hummel EM, Hessas E, Müller S et al. Cell-free DNA release under psychosocial and physical stress conditions. *Transl. Psychiatry* 8(1), 236 (2018).
16. Lanman RB, Mortimer SA, Zill OA et al. Analytical and clinical validation of a digital sequencing panel for quantitative, highly accurate evaluation of cell-free circulating tumor DNA. *PLoS ONE* 10(10), e0140712 (2015).
17. Elshimali YI, Khaddour H, Sarkissyan M, Wu Y, Vadgama JV. The clinical utilization of circulating cell free DNA (CCFDNA) in blood of cancer patients. *Int. J. Mol. Sci.* 14(9), 18925–18958 (2013).
18. Abolhassani M, Tillotson J, Chiao J. Characterization of the release of DNA by a human leukemia-cell line hl-60. *Int. J. Oncol.* 4(2), 417–421 (1994).
19. Stroun M, Lyautey J, Lederrey C, Olson-Sand A, Anker P. About the possible origin and mechanism of circulating DNA apoptosis and active DNA release. *Clin. Chim. Acta Int. J. Clin. Chem.* 313(1–2), 139–142 (2001).
20. Bronkhorst AJ, Wentzel JF, Aucamp J, van Dyk E, du Plessis L, Pretorius PJ. Characterization of the cell-free DNA released by cultured cancer cells. *Biochim. Biophys. Acta BBA Mol. Cell Res.* 1863(1), 157–165 (2016).
21. Jahr S, Hentze H, Englisch S et al. DNA fragments in the blood plasma of cancer patients: quantitations and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells. *Cancer Res.* 61(4), 1659–1665 (2001).
22. Holdenrieder S. Cell-free DNA in serum and plasma: comparison of ELISA and quantitative PCR. *Clin. Chem.* 51(8), 1544–1546 (2005).
23. Snyder MW, Kircher M, Hill AJ, Daza RM, Shendure J. Cell-free DNA comprises an *in vivo* nucleosome footprint that informs its tissues-of-origin. *Cell* 164(1–2), 57–68 (2016).
24. Tamkovich SN. Circulating nucleic acids in blood of healthy male and female donors. *Clin. Chem.* 51(7), 1317–1319 (2005).
25. Kaiser J. Keeping tabs on tumor DNA. *Science* 327(5969), 1074–1074 (2010).
26. Wan JCM, Massie C, Garcia-Corbacho J et al. Liquid biopsies come of age: towards implementation of circulating tumour DNA. *Nat. Rev. Cancer* 17, 223 (2017).
27. Diehl F, Li M, Dressman D et al. Detection and quantification of mutations in the plasma of patients with colorectal tumors. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 102(45), 16368–16373 (2005).
28. Bettegowda C, Sausen M, Leary RJ et al. Detection of circulating tumor DNA in early- and late-stage human malignancies. *Sci. Transl. Med.* 6(224), 224ra24–224ra24 (2014).
29. Kamat AA, Bischoff FZ, Dang D et al. Circulating cell-free DNA: a novel biomarker for response to therapy in ovarian carcinoma. *Cancer Biol. Ther.* 5(10), 1369–1374 (2006).
30. Jiang P, Lo YMD. The long and short of circulating cell-free DNA and the ins and outs of molecular diagnostics. *Trends Genet.* 32(6), 360–371 (2016).
31. Underhill HR, Kitzman JO, Hellwig S et al. Fragment length of circulating tumor DNA. *PLoS Genet.* 12(7), e1006162 (2016).
32. Cristiano S, Leal A, Phallen J et al. Genome-wide cell-free DNA fragmentation in patients with cancer. *Nature* 570(7761), 385–389 (2019).
33. Kwapisz D. The first liquid biopsy test approved. Is it a new era of mutation testing for non-small cell lung cancer? *Ann. Transl. Med.* 5(3), 46 (2017).
34. Choudhury AD, Werner L, Francini E et al. Tumor fraction in cell-free DNA as a biomarker in prostate cancer. *JCI Insight*(2018). <https://insight.jci.org/articles/view/122109>
35. Li H, Jing C, Wu J et al. Circulating tumor DNA detection: a potential tool for colorectal cancer management (Review). *Oncol. Lett.* (2018). <http://www.spandidos-publications.com/10.3892/ol.2018.9794>
36. Lin L-H, Chang K-W, Kao S-Y, Cheng H-W, Liu C-J. Increased plasma circulating cell-free DNA could be a potential marker for oral cancer. *Int. J. Mol. Sci.* 19(11), 3303 (2018).
37. Montagut C, Vidal J, Visa L. KRAS mutations in ctDNA: a promising new biomarker in advanced pancreatic cancer. *Ann. Oncol.* 29(12), 2280–2282 (2018).
38. Panagopoulou M, Karaglani M, Balgkouranidou I et al. Circulating cell-free DNA in breast cancer: size profiling, levels, and methylation patterns lead to prognostic and predictive classifiers. *Oncogene* (2019). <http://www.nature.com/articles/s41388-018-0660-y>
39. Corcoran RB, Chabner BA. Application of cell-free DNA analysis to cancer treatment. *N. Engl. J. Med.* 379(18), 1754–1765 (2018).
40. Jones PA, Baylin SB. The epigenomics of cancer. *Cell* 128(4), 683–692 (2007).
41. Gai W, Sun K. Epigenetic biomarkers in cell-free DNA and applications in liquid biopsy. *Genes* 10(1), 32 (2019).

42. Lehmann-Werman R, Neiman D, Zemmour H *et al.* Identification of tissue-specific cell death using methylation patterns of circulating DNA. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 113(13), E1826–E1834 (2016).
43. Shen SY, Singhania R, Fehringer G *et al.* Sensitive tumour detection and classification using plasma cell-free DNA methylomes. *Nature* 563(7732), 579–583 (2018).
44. Sun K, Jiang P, Chan KCA *et al.* Plasma DNA tissue mapping by genome-wide methylation sequencing for noninvasive prenatal, cancer, and transplantation assessments. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 112(40), E5503–E5512 (2015).
45. Moss J, Magenheim J, Neiman D *et al.* Comprehensive human cell-type methylation atlas reveals origins of circulating cell-free DNA in health and disease. *Nat. Commun.* 9(1), 5068 (2018).
46. Tóth K, Galamb O, Spisák S *et al.* The influence of methylated septin 9 gene on RNA and protein level in colorectal cancer. *Pathol. Oncol. Res.* 17(3), 503–509 (2011).
47. Payne SR. From discovery to the clinic: the novel DNA methylation biomarker <sup>m</sup> SEPT9 for the detection of colorectal cancer in blood. *Epigenomics* 2(4), 575–585 (2010).
48. Wang Y, Chen P-M, Liu R-B. Advance in plasma SEPT9 gene methylation assay for colorectal cancer early detection. *World J. Gastrointest. Oncol.* 10(1), 15–22 (2018).
49. Cai L, Hood S, Kallam E *et al.* Epi proColon®: use of a non-invasive SEPT9 gene methylation blood test for colorectal cancer screening: a national laboratory experience. *J. Clin. Epigenetics*(2018). <http://clinical-epigenetics.imedpub.com/epi-procolon-use-of-a-noninvasive-sept9-gene-methylation-blood-test-for-colorectal-cancer-screening-a-national-laboratory-experien.php?aid=22115>
50. Potter NT, Hurban P, White MN *et al.* Validation of a real-time PCR-based qualitative assay for the detection of methylated SEPT9 DNA in human plasma. *Clin. Chem.* 60(9), 1183–1191 (2014).
51. Fu B, Yan P, Zhang S *et al.* Cell-free circulating methylated SEPT9 for noninvasive diagnosis and monitoring of colorectal cancer. *Dis. Markers* 2018, 1–11 (2018).
52. Song L, Guo S, Wang J *et al.* The blood mSEPT9 is capable of assessing the surgical therapeutic effect and the prognosis of colorectal cancer. *Biomark. Med.* 12(9), 961–973 (2018).
53. Xu R, Wei W, Krawczyk M *et al.* Circulating tumour DNA methylation markers for diagnosis and prognosis of hepatocellular carcinoma. *Nat. Mater.* 16, 1155 (2017).
54. Widschwendter M, Zikan M, Wahl B *et al.* The potential of circulating tumor DNA methylation analysis for the early detection and management of ovarian cancer. *Genome Med.* 9(1), (2017). <https://genomemedicine.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13073-017-0500-7>
55. Rohanizadegan M. Analysis of circulating tumor DNA in breast cancer as a diagnostic and prognostic biomarker. *Cancer Gener.* 228–229, 159–168 (2018).
56. Mundbjerg K, Chopra S, Alemozaffar M *et al.* Identifying aggressive prostate cancer foci using a DNA methylation classifier. *Genome Biol.* (2017). <http://genomebiology.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13059-016-1129-3>
57. Kornberg RD. Chromatin structure: a repeating unit of histones and DNA. *Science* 184(4139), 868–871 (1974).
58. Bednar J, Horowitz RA, Grigoryev SA *et al.* Nucleosomes, linker DNA, and linker histone form a unique structural motif that directs the higher-order folding and compaction of chromatin. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 95(24), 14173–14178 (1998).
59. Luger K, Mäder AW, Richmond RK, Sargent DF, Richmond TJ. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* 389(6648), 251–260 (1997).
60. Simpson RT. Structure of the chromatosome, a chromatin particle containing 160 base pairs of DNA and all the histones. *Biochemistry* 17(25), 5524–5531 (1978).
61. Bannister AJ, Kouzarides T. Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Res.* 21(3), 381–395 (2011).
62. Zentner GE, Henikoff S. Regulation of nucleosome dynamics by histone modifications. *Nat. Struct. Amp Mol. Biol.* 20, 259 (2013).
63. Sims RJ, Belotserkovskaya R, Reinberg D. Elongation by RNA polymerase II: the short and long of it. *Genes Dev.* 18(20), 2437–2468 (2004).
64. Tessarz P, Kouzarides T. Histone core modifications regulating nucleosome structure and dynamics. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 15(11), 703–708 (2014).
65. Strahl BD, Allis CD. The language of covalent histone modifications. *Nature* 403(6765), 41–45 (2000).
66. Zhang Z, Wippo CJ, Wal M, Ward E, Korber P, Pugh BF. A packing mechanism for nucleosome organization reconstituted across a eukaryotic genome. *Science* 332(6032), 977–980 (2011).
67. Huertas D, Sendra R, Muñoz P. Chromatin dynamics coupled to DNA repair. *Epigenetics* 4(1), 31–42 (2009).
68. Jezek M, Green EM. Histone modifications and the maintenance of telomere integrity. *Cells* 8(2), 199 (2019).
69. Portela A, Esteller M. Epigenetic modifications and human disease. *Nat. Biotechnol.* 28(10), 1057–1068 (2010).
70. Fraga MF, Ballestar E, Villar-Garea A *et al.* Loss of acetylation at Lys16 and trimethylation at Lys20 of histone H4 is a common hallmark of human cancer. *Nat. Genet.* 37(4), 391 (2005).

71. Fahrner JA, Eguchi S, Herman JG, Baylin SB. Dependence of histone modifications and gene expression on DNA hypermethylation in cancer. *Cancer Res.* 62(24), 7213–7218 (2002).
72. Kondo Y, Shen L, Suzuki S et al. Alterations of DNA methylation and histone modifications contribute to gene silencing in hepatocellular carcinomas. *Hepatol. Res.* 37(11), 974–983 (2007).
73. Wozniak RJ, Klimecki WT, Lau SS, Feinstein Y, Futscher BW. 5-Aza-2'-deoxycytidine-mediated reductions in G9A histone methyltransferase and histone H3 K9 di-methylation levels are linked to tumor suppressor gene reactivation. *Oncogene* 26(1), 77–90 (2007).
74. Paschall AV, Yang D, Lu C et al. H3K9 trimethylation silences Fas expression to confer colon carcinoma immune escape and 5-fluorouracil chemoresistance. *J. Immunol.* 195(4), 1868–1882 (2015).
75. Millan-Zambrano G, Santos-Rosa H, Puddu F, Robson SC, Jackson SP, Kouzarides T. Phosphorylation of histone H4T80 triggers DNA damage checkpoint recovery. *Mol. Cell.* 72(4), 625–635.e4 (2018).
76. Seibert M, Krüger M, Watson NA et al. CDK1-mediated phosphorylation at H2B serine 6 is required for mitotic chromosome segregation. *J. Cell Biol.* 218(4), 1164–1181 (2019).
77. Liu Y, Long Y-H, Wang S-Q et al. JMJD6 regulates histone H2A. X phosphorylation and promotes autophagy in triple-negative breast cancer cells via a novel tyrosine kinase activity. *Oncogene* 38(7), 980–997 (2019).
78. Mahajan K, Malla P, Lawrence HR et al. ACK1/TNK2 regulates histone H4 Tyr88-phosphorylation and AR gene expression in castration-resistant prostate cancer. *Cancer Cell.* 31(6), 790–803.e8 (2017).
79. Yang W, Xia Y, Hawke D et al. PKM2 phosphorylates histone H3 and promotes gene transcription and tumorigenesis. *Cell* 150(4), 685–696 (2012).
80. Yoon S, Eom GH. HDAC and HDAC inhibitor: from cancer to cardiovascular diseases. *Chonnam Med. J.* 52(1), 1–11 (2016).
81. Sun W, Lv S, Li H, Cui W, Wang L. Enhancing the anticancer efficacy of immunotherapy through combination with histone modification inhibitors. *Genes*(2018). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6315613/>
82. Karachaliou N, Mayo-de-las-Casas C, Molina-Vila MA, Rosell R. Real-time liquid biopsies become a reality in cancer treatment. *Ann. Transl. Med.*(2015). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4356857/>
83. Enari M, Sakahira H, Yokoyama H, Okawa K, Iwamatsu A, Nagata S. A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* 391(6662), 43–50 (1998).
84. Holdenrieder S, Dharuman Y, Standop J et al. Novel serum nucleosomics biomarkers for the detection of colorectal cancer. *Anticancer Res.* 34(5), 2357–2362 (2014).
85. Xu J, Zhang X, Pelayo R et al. Extracellular histones are major mediators of death in sepsis. *Nat. Med.* 15(11), 1318–1321 (2009).
86. Allam R, Kumar SVR, Darisipudi MN, Anders H-J. Extracellular histones in tissue injury and inflammation. *J. Mol. Med. Berl. Ger.* 92(5), 465–472 (2014).
87. Chen R, Kang R, Fan X-G, Tang D. Release and activity of histone in diseases. *Cell Death Dis.* 5(8), e1370 (2014).
88. Kuroi K, Tanaka C, Toi M. Plasma nucleosome levels in node-negative breast cancer patients. *Breast Cancer* 6(4), 361–364 (1999).
89. Holdenrieder S, Stieber P, Bodenmüller H et al. Circulating nucleosomes in serum. *Ann. NY Acad. Sci.* 945(1), 93–102 (2006).
90. Kutcher ME, Xu J, Vilardi RF, Ho C, Esmon CT, Cohen MJ. Extracellular histone release in response to traumatic injury: implications for a compensatory role of activated protein C. *J. Trauma Acute Care Surg.* 73(6), 1389–1394 (2012).
91. Rahier J-F, Druez A, Faugeras L et al. Circulating nucleosomes as new blood-based biomarkers for detection of colorectal cancer. *Clin. Epigenetics* 9(53), (2017).
92. Rasmussen L, Christensen IJ, Herzog M, Micallef J, Nielsen HJ. For the Danish Collaborative Group on EA. Circulating cell-free nucleosomes as biomarkers for early detection of colorectal cancer. Circulating cell-free nucleosomes as biomarkers for early detection of colorectal cancer. *Oncotarget* 9(12), 10247–10258 (2017).
93. Holdenrieder S, Stieber P, von Pawel J et al. Circulating nucleosomes predict the response to chemotherapy in patients with advanced non-small cell lung cancer. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 10(18 Pt 1), 5981–5987 (2004).
94. Fahmueller YN, Nagel D, Hoffmann R-T et al. Predictive and prognostic value of circulating nucleosomes and serum biomarkers in patients with metastasized colorectal cancer undergoing selective internal radiation therapy. *BMC Cancer* 12, 5 (2012).
95. Stoetzer OJ, Fersching DMI, Salat C et al. Prediction of response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer patients by circulating apoptotic biomarkers nucleosomes, DNase, cytokeratin-18 fragments and survivin. *Cancer Lett.* 336(1), 140–148 (2013).
96. Messaoudi K, Clavreul A, Lagarce F. Toward an effective strategy in glioblastoma treatment. Part I: resistance mechanisms and strategies to overcome resistance of glioblastoma to temozolamide. *Drug Discov. Today* 20(7), 899–905 (2015).
97. Maleszewska M, Kaminska B. Is glioblastoma an epigenetic malignancy? *Cancers* 5(4), 1120–1139 (2013).
98. Pacaud R, Cheray M, Nadaradjane A, Vallette FM, Cartron P-F. Histone H3 phosphorylation in GBM: a new rational to guide the use of kinase inhibitors in anti-GBM therapy. *Theranostics*. 5(1), 12–22 (2015).

99. ENCODE Project Consortium, Birney E, Stamatoyannopoulos JA *et al.* Identification and analysis of functional elements in 1% of the human genome by the ENCODE pilot project. *Nature* 447(7146), 799–816 (2007).
100. Ransohoff JD, Wei Y, Khavari PA. The functions and unique features of long intergenic non-coding RNA. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 19(3), 143–157 (2018).
101. Bach D-H, Lee SK, Sood AK. Circular RNAs in cancer. *Mol. Ther. Nucleic Acids*. 16, 118–129 (2019).
102. Esteller M. Non-coding RNAs in human disease. *Nat. Rev. Genet.* 12(12), 861–874 (2011).
103. Enache LS, Enache EL, Ramière C *et al.* Circulating RNA molecules as biomarkers in liver disease. *Int. J. Mol. Sci.* 15(10), 17644–17666 (2014).
104. Turchinovich A, Burwinkel B. Distinct AGO1 and AGO2 associated miRNA profiles in human cells and blood plasma. *RNA Biol.* 9(8), 1066–1075 (2012).
105. Umu SU, Langseth H, Bucher-Johannessen C *et al.* A comprehensive profile of circulating RNAs in human serum. *RNA Biol.* 15(2), 242–250 (2018).
106. Heneghan HM, Miller N, Kerin MJ. Circulating microRNAs: promising breast cancer Biomarkers. *Breast Cancer Res. BCR.* 13(1), 402; author reply 403 (2011).
107. Butova R, Vychytilova-Faltejskova P, Souckova A, Sevcikova S, Hajek R. Long non-coding RNAs in multiple myeloma. *Non-Coding RNA.* 5(1), (2019).
108. Jeck WR, Sharpless NE. Detecting and characterizing circular RNAs. *Nat. Biotechnol.* 32(5), 453–461 (2014).
109. Hu X, Bao J, Wang Z *et al.* The plasma lncRNA acting as fingerprint in non-small-cell lung cancer. *Tumour Biol. J. Int. Soc. Oncodevelopmental Biol. Med.* 37(3), 3497–3504 (2016).
110. Masuda T, Hayashi N, Kuroda Y, Ito S, Eguchi H, Mimori K. MicroRNAs as biomarkers in colorectal cancer. *Cancers* 9(9), 124 (2017).
111. Wang X, Fang L. Advances in circular RNAs and their roles in breast cancer. *J. Exp. Clin. Cancer Res. CR* 37(1), 206 (2018).
112. Peng H, Wang J, Li J *et al.* A circulating non-coding RNA panel as an early detection predictor of non-small cell lung cancer. *Life Sci.* 151, 235–242 (2016).
113. El-Tawdi AHF, Marboli M, Shehata HH *et al.* Evaluation of circulatory RNA-based biomarker panel in hepatocellular carcinoma. *Mol. Diagn. Ther.* 20(3), 265–277 (2016).
114. Huang S-K, Luo Q, Peng H *et al.* A panel of serum noncoding RNAs for the diagnosis and monitoring of response to therapy in patients with breast cancer. *Med. Sci. Monit. Int. Med. J. Exp. Clin. Res.* 24, 2476–2488 (2018).
115. Nadaradjane A, Briand J, Bougras-Cartron G *et al.* miR-370-3p is a therapeutic tool in anti-glioblastoma therapy but is not an intratumoral or cell-free circulating biomarker. *Mol. Ther. - Nucleic Acids*. 13, 642–650 (2018).
116. Baylin SB, Ohm JE. Epigenetic gene silencing in cancer – a mechanism for early oncogenic pathway addiction? *Nat. Rev. Cancer.* 6(2), 107–116 (2006).
117. Füllgrabe J, Kavanagh E, Joseph B. Histone onco-modifications. *Oncogene* 30(31), 3391–3403 (2011).
118. Fiala C, Diamandis EP. Utility of circulating tumor DNA in cancer diagnostics with emphasis on early detection. *BMC Med.*(2018). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6167864/>
119. Pardini B, Sabo AA, Birolo G, Calin GA. Noncoding RNAs in extracellular fluids as cancer biomarkers: The new frontier of liquid biopsies. *Cancers* 11(8), 1170 (2019). doi:10.3390/cancers11081170
120. McAnena P, Brown JAL, Kerin MJ. Circulating nucleosomes and nucleosome modifications as biomarkers in cancer. *Cancers* 9(1), 5 (2017).
121. Dumitrescu RG (Ed.). Early epigenetic markers for precision medicine. In: *Cancer Epigenetics for Precision Medicine*. Verma M (Ed.). Springer, NY, USA, 3–17 (2018). [http://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-8751-1\\_1](http://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-8751-1_1)
122. Yong E. Cancer biomarkers: written in blood. *Nature* 511(7511), 524–526 (2014).

1      **Epigenetic consequences of herbicide exposure: a global approach** (submitted for publication)  
2      Pierre Autin<sup>\* 1-4-5-6</sup>, Orlane Bosson<sup>\* 1-2-4-7</sup>, Joséphine Briand<sup>\* 1-2-3-4</sup>, Manon Duforestel<sup>\* 1-2-3-4</sup>, Gwenola  
3      Bougras-Cartron<sup>1-2-3-4</sup>, François M. Vallette<sup>1-2-3-4-5</sup>, Jean-Luc Mouget<sup>4-7</sup>, Aurore Caruso<sup>7</sup>, Myriam  
4      Badawi<sup>7</sup>, Delphine Fradin<sup>1-4-5-6</sup>, Christophe Blanquart<sup>1-4-5-6</sup> and Pierre-François Cartron<sup>§ 1-2-3-4-5</sup>

5

6

7      <sup>1</sup> CRCINA, INSERM, Université d'Angers, Université de Nantes, 8 quai Moncousu - BP 70721 - 44007  
8      Nantes cedex 1, France.

9      <sup>2</sup> Equipe Apoptose et Progression tumorale, LaBCT, Institut de Cancérologie de l'Ouest, Boulevard du  
10     Pr Jacques Monod, Saint Herblain, 44805, France.

11     <sup>3</sup> Cancéropole Grand-Ouest, réseau Epigénétique (RepICGO).

12     <sup>4</sup> EpiSAVMEN Consortium (Région Pays de la Loire).

13     <sup>5</sup> LabEX IGO, Université de Nantes, France.

14     <sup>6</sup> Equipe Mort cellulaire immunogénique appliquée aux traitements du mésothéliome, CRCINA, 8 quai  
15     Moncousu - BP 70721 - 44007 Nantes cedex 1, France.

16     <sup>7</sup> Laboratoire Mer, Molécules, Santé, EA 2160 Le Mans Université, Avenue Olivier Messiaen 72085, Le  
17     Mans cedex 9, France.

18     \*These authors contributed equally to this work

19

20     <sup>§</sup>Correspondance: pierre-francois.cartron@inserm.fr, CRCINA, INSERM U1232, Equipe Apoptose et  
21     Progression tumorale, LaBCT, Institut de Cancérologie de l'Ouest, Saint Herblain, France.

22

23

24    **Abstract**

25    Epigenetics is a trending domain in science. It refers to changes in gene function that are mitotically  
26    and/or meiotically heritable and that do not entail a modification in the DNA sequence. These changes  
27    in gene function can be caused by environmental factors, including exposure to pollutants. Among  
28    these pollutants, herbicides are molecules used in crops, railways, roadsides, or boat hulls to kill  
29    unwanted weeds. Aside from their target efficient weed-killing properties, these chemicals are carried  
30    by the wind, water, or other organisms away from their initial spreading areas, leading to exposure of  
31    non-targeted species. Despite the growing use of herbicides and the increasing importance given to  
32    epigenetics in pathological mechanisms, the link between these chemicals and epigenetic alterations  
33    has not been thoroughly studied yet. Thus, some literature shows that exposure to herbicides induces  
34    aberrant methylation patterns in different cell types; can be the source of changes in microRNA  
35    (miRNA) expression in mammals and cause transgenerational effects in rodents. Mammals are not the  
36    only organisms subjected to herbicide-induced epigenetic changes in gene function. Indeed, studies  
37    evidenced altered methylation levels linked to the over or under-expression of epigenetic players in  
38    several species of fish or plants. Concerning algae, herbicide exposure leads to proliferation and/or  
39    photosynthesis alteration, but the role of the epigenetic deregulations in these changes needs to be  
40    clarified. Therefore, it is clear that in-depth studies are still lacking to give a precise and updated picture  
41    of the epigenetic modifications induced by exposure to herbicides, whatever the model used. This  
42    subject is even more important because epigenetics can play a key role in the development of various  
43    diseases in many organisms.

44

45    Keywords

46    Herbicides, epigenetics, environment, pollutants, organisms

47        **1. Introduction**

48        Between 1950 and 2018, the global human population expanded from 2.54 to 7.63 billion, which  
49        represents a 300% increase. Human activity (industry, agriculture, infrastructure, domestic use...) has  
50        increased accordingly, but also the use of pesticides. If the present trend continues, by 2050, the world  
51        production and trade in pesticides would be 2.7 times its current amount, which means that humans  
52        and all other living organisms will be exposed to increasing levels of these products. Nowadays, this  
53        worldwide and massive use of pesticides becomes more and more controversial, especially due to the  
54        emerging and increasing number of studies describing impacts on human health. Pesticides are  
55        chemical substances commercialized for pest control, including phytosanitary products and biocides,  
56        and there are hundreds of active molecules on the market. They can be divided into several categories,  
57        targeting different unwanted organisms: insecticides, rodenticides, bactericides, fungicides, larvicides,  
58        and finally herbicides, employed to destroy weeds. These molecules are widely used over crops, roads,  
59        railways, or boat hulls all around the world. Some of them are selective and able to control the growth  
60        of specific weed species, others are total weed killers, especially used to clear farmland, roadsides, or  
61        railways. More than 85 900 tons were sold in 2018 in France, ranking it to the top of the European  
62        market for phytosanitary.

63        More alarming, all herbicides can be leached below the root zone after spreading. This means that the  
64        control of herbicide dispersion areas, concentration in the environment, and organisms exposed is  
65        completely lost. Different factors affect leaching such as the soil structure and moisture, the presence  
66        of microorganisms able to degrade the herbicide and its degradation forms, the type of irrigation  
67        system, the amount of rainfall, and physical properties such as slope and depth (Flury, 1996).  
68        Obviously, the amount of herbicide found in groundwater also depends on the herbicide  
69        physicochemical properties such as solubility, persistence and adsorption coefficient. Consequently,  
70        herbicides and their metabolites may be found generally in ponds or lakes near fields (Hartzler, n.d.).  
71        They have also been detected in the effluents of urban and rural wastewater treatment plants,  
72        accumulate in groundwater and thus end up in rivers and oceans (Münze et al., 2017). Molecules found  
73        in water originate from herbicides commonly used but also those banned several years ago (e.g. diuron  
74        and atrazine in France) (Chaudhry and Malik, 2017).

75        During the herbicide life cycle, different organisms may either be directly exposed (Figure 1), subject  
76        to bioaccumulation and/or biomagnification. Bioaccumulation phenomenon describes mechanisms by  
77        which the integration of the substance (e.g. through ingestion of contaminated food) by the organism  
78        is faster than the excretion and/or degradation. Therefore, molecule concentration increases in the  
79        tissues. Biomagnification phenomenon amplifies the effects of the bioaccumulation as the substance  
80        transfers from preys to predators, causing an increasing concentration of the chemical while going up  
81        in the food chain (Langenbach, 2013).

82 These organisms develop then physiological alterations, most of them concern immunity,  
83 development disorders, photosynthetic abilities, herbicide resistance, growth, cancer risk, progeny  
84 (Bassil et al., 2007; Damalas and Eleftherohorinos, 2011; Dich et al., 1997). Rationally, this review  
85 focuses on plants, the main targets of herbicides, and mammalian models, in order to better assess  
86 the impact on human health. However, to keep a link and an interesting balance between health and  
87 ecosystem, the impacts on the aquatic ecosystem will be also evoked, including algae which are both  
88 primary targets and off-targets and the fauna. Moreover, all these organisms constitute different links  
89 of food chains, allowing us to have a global view all the way to non-specific effects of herbicides on  
90 non-targeted organisms.

91

92 Increasingly, it has been demonstrated that physiological alterations through environmental pressures  
93 may result from epigenetic mechanisms (V Bollati and Baccarelli, 2010; Syed et al., 2013a). Epigenetic  
94 phenomena would not only allow a rapid response to the environment of the order of acclimatization  
95 but also a longer-term adaptation. Epigenetics has been defined as the study of alterations in gene  
96 function that are mitotically and/or meiotically heritable and that do not entail a modification in DNA  
97 sequence (Wu and Morris, 2001). According to another definition, epigenetics is the sum of the  
98 alterations to the chromatin template that collectively establish and propagate different patterns of  
99 gene expression and silencing from the same genome (Allis et al., 2015). Currently, two epigenetic  
100 mechanisms are commonly recognized by the scientific community: DNA methylation and histone  
101 mark modifications. A third one is still controversial because it acts also at a post transcriptional level  
102 instead of at transcription only: non-coding RNA. However, because all these operations contribute to  
103 the same end effect, genotype regulation to obtain different phenotypes, the three of them will be  
104 considered (Figure 2).

105 The more striking example of epigenetic regulation through environmental exposure is probably in  
106 bees: the honeybee queen shares the same genome than other workers in the hive, but she alone has  
107 been fed with royal jelly her whole life. This specific diet induces epigenetic modifications like DNA  
108 methylation modifications leading to a very different phenotype (Chittka and Chittka, 2010). In  
109 humans, it has also been shown that environment can modify epigenetics. The ideal setup for these  
110 kind of epigenetic studies are monozygotic (*i.e.*, “identical”) twins as they share an identical genome,  
111 thus allowing researchers to focus only on the epigenome (Tan et al., 2015). For instance, Fraga *et al.*  
112 demonstrated that monozygotic twins showed greater differences in both DNA methylation and  
113 histone acetylation levels of peripheral lymphocytes as they grew older (Fraga *et al.*, 2005). They  
114 explained this finding by the fact that twins spent less time together, or had more dissimilar  
115 environment, health or medical histories. From the literature, most epigenetic studies have been  
116 conducted on human and other mammal organisms, and more than on animal than on plant models.

117 Although it has been shown several times that the environment has an impact on epigenetic, but also  
118 that impacts of herbicides on physiology happen in many types of organisms, surprisingly, only few  
119 studies illustrate the connection between widespread herbicides and epigenetics. This link appears to  
120 be crucial to enlighten the underlying mechanisms and to predict the consequences of a growing  
121 accumulation of these chemicals in all ecosystems but also for human health. The field of epigenetics  
122 is not a barrier in itself, because the use of various study models, representing all kingdoms of life, is  
123 already a common practice. However, protocol harmonization could be beneficiary to the whole  
124 scientific community and would permit an increase in published papers dealing with these thematic.  
125 Thus, it is important to give a clear and updated picture of the highlighted epigenetic modifications  
126 following herbicide exposures in an ecosystem, *i.e.* a system composed of many genetically different  
127 organisms interconnected but also strongly linked with their environment. Even if there is always a  
128 genetic gap between different study models, collecting information reflecting the entire ecosystem  
129 appears to be a necessity.

130 In this context, the epigenetic modifications highlighted in humans will be distinguished and treated  
131 apart from those in other animals and plants. Indeed, if all shared the three main epigenetic  
132 mechanisms (DNA methylation, histone modifications, non-coding RNA), each species has his own  
133 specificities. The first part of the review will describe three widely used and well representative  
134 herbicides, often used as models for their chemical families: glyphosate, atrazine and diuron. Indeed,  
135 without being exhaustive about each herbicide available on the market, this review is motivated by  
136 the urgency to consider a wide number of organisms, whether terrestrial or aquatic, animal or plant.  
137 We will collect the available information about each pollutant on epigenetics, leading or not to  
138 phenotypic changes and disease development. For each group of organism, mammals, aquatic fauna  
139 and plants/algae, the subject will be approached as follows: a rapid overview of epigenetic  
140 mechanisms and peculiarities, then the review of epigenetic consequences of herbicide exposure.

141

## 142      **2. Characteristics of three representative herbicides**

143 Glyphosate (N-(phosphonomethyl) glycine) is an organophosphate compound and it is the most  
144 common herbicide, with over 9 million tons spread since the 1970s in the world (Benbrook, 2016). It  
145 is a non-selective and post-emergent herbicide, which inhibits the 5-enolpyruvylshikimate-3-  
146 phosphate synthase (EPSPS) activity, responsible for the synthesis of aromatic amino acids. This  
147 inhibition degrades chloroplasts and therefore, reduces photosynthesis (Wang et al., 2016). The best  
148 known formulation containing glyphosate is the Roundup®, in which it is present under isopropylamine  
149 salt (IPA) form, in addition to polyoxyethylene amine (POEA), a surfactant added to amplify the  
150 herbicide activity, with a typical half-life of 47 days (Mercurio et al., 2014). Recently, investigations  
151 have started to highlight glyphosate dangerousness on human health. In March 2015, the International

152 Agency for Research on Cancer (IARC) Monographs Programme, whose role is to identify and evaluate  
153 environmental causes of cancer in humans, has classified glyphosate as probably carcinogenic to  
154 humans. Despite this alarming conclusion, no global interdiction of this substance has yet been applied.  
155 Atrazine (2-chloro-4-ethylamino-6-isopropylamino-s-triazine) is another well-known herbicide, still  
156 widely used, especially in the United States, but banned in the European Union since 2003 mainly to  
157 avoid "an unacceptable impact on groundwater". Atrazine belongs to the simazine family and is mostly  
158 spread over corn, sorghum, sugarcane, and wheat crops to control broadleaf weeds as well as fatty  
159 leaf plants. This herbicide acts on different plant molecular mechanisms, such as hormonal regulation,  
160 cell cycle, pigment synthesis or photosynthesis. Marketed under the name Primextra®, its half-life in  
161 soils is 40 days (Filimonova et al., 2016), however, high levels have been found in rivers of North  
162 America (108µg/L), but also in drinking water in some areas of China (2µg/L) (Jiang et al., 2019) and,  
163 even in France (0.375-1µg/L) (Caquet et al., 2013).

164 The third herbicide considered in the present review, diuron, is a phenylurea compound used for weed  
165 control in soy, fruit, cotton and sugarcane cultures, particularly in developing countries. Previously  
166 used for agricultural purposes, it has been banned in France (but not in European Union) since 2003  
167 for its toxicity on organisms (Moisset et al., 2015). However, in France, it is still found in trace amounts  
168 in 38% of surface waters (Pesce et al., 2006), at concentrations ranging from a few ng/L to 4 µg/L  
169 (Legrand et al., 2006), due to its use as anti-algae on boat hulls (Khanam et al., 2017; Silkina et al.,  
170 2009) despite a typical half-life of 81 days (Rouchaud et al., 2000). Even though these concentrations  
171 do not affect all organisms the same way, diuron remains sometimes over the limit in drinking water,  
172 which is 0.1µg/mL in France.

173

### 174       **3. Epigenetic disruptions by herbicides**

#### 175       **1.1. In Mammals**

##### 176       **1.1.1. Epigenetic mechanisms in Mammals**

177 Thanks to epigenetics, more than 200 different cellular phenotypes naturally occur in one person from  
178 the fertilized egg, starting with a single genome that becomes multitude of distinct epigenomes. In this  
179 context, DNA and nucleosomes are subject to several variations, which together constitute the  
180 epigenetic language.

181

182 DNA methylation corresponds to the addition of a methyl group ( $\text{CH}_3$ ) on CpG dinucleotide cytosine,  
183 modifying it into a 5-methylcytosine (5mC). Main actors of DNA methylation are a protein family  
184 composed of several DNA methyltransferases (DNMTs). DNMT1 is implicated mainly in maintaining  
185 methylation during cell division, whereas DNMT3A and 3B are responsible for *de novo* methylation.  
186 The opposite phenomenon, DNA demethylation, can occur from two different mechanisms. The first

187 one is passive DNA demethylation: after cell division, if DNMT1 does not remethylate DNA, CH<sub>3</sub> groups  
188 will be lost after a few cell cycles. The other mechanism is active DNA demethylation, processed by  
189 TET (Ten-Eleven-Translocation) enzymes, which convert 5mC to 5-hydroxymethylcytosine (5hmC),  
190 then to 5-formylcytosine (5fC) and finally to 5-carboxylcytosine (5CaC). These modified cytosines are  
191 then replaced by a non-modified cytosine by Thymine-DNA glycosylase (TDG) and Base Excision Repair  
192 (BER).

193 DNA methylation is implicated in transcription regulation: when a gene promoter is methylated, the  
194 gene is generally repressed. Indeed, methylation will cause a steric hindrance preventing transcription  
195 factor binding, directly or after Methylated DNA Binding (MDB) protein recruitment (Moore et al.,  
196 2013).

197

198 In eukaryotic cells, DNA is compacted into chromatin, which consists in several histone octamers called  
199 nucleosomes. The nucleosome is a 146 bp of DNA wrapped around 2 sets of histones H2A, H2B, H3  
200 and H4. Histone post-translational modifications (PTMs) refer to chemical events including acetylation,  
201 methylation, phosphorylation, and ubiquitination on amino acids at the N-terminal tails of core  
202 histones. It turns out that some histone PTMs are related to gene activation or silencing through  
203 alteration of chromosomal relaxation or compaction, respectively. The two most common histone  
204 marks are acetylation (Ac) and methylation (Me).

205 Acetylation of histones may have direct effect on nucleosomal architecture and influence chromatin  
206 structure by affecting histone–histone and histone–DNA interactions. This is a very dynamic process  
207 during which histone acetyltransferases (HATs) and histone deacetylases (HDACs) act in concert to add  
208 and remove acetylation marks, often on histone-tail-lysines. When acetylated, DNA is less condensed  
209 and then, gene expression is increased. These marks are very transient and are described as being vital  
210 for precise transcriptional timing control (Peterson and Laniel, 2004). Hyperacetylation of oncogenes  
211 or proto-oncogenes have been described in various cancers such as hepatocellular carcinoma (Bai et  
212 al., 2008), and acetylation of a specific lysine on histone H3 (H3K18) was correlated with prostate  
213 cancer recurrence (Bianco-Miotto et al., 2010).

214 Histone methylation regulates gene expression through recruiting histone-tail binding proteins.  
215 Depending on the location and the number of methylations, the effects on gene transcription are  
216 various. On the one hand, methylation of H3 histone on Lysine 4 (H3K4), H3K36, and H3K79 generally  
217 results in transcription of genes, on the other hand, methylation of H3K9, H3K27, and H4K20 often  
218 leads to the silencing of transcription. The number of methyl groups added (mono, di or tri-methylated)  
219 can also impact the output of the modification, for example, in most cases H3K9 mono-methylated  
220 leads to the activation of the transcription whereas its tri-methylated form causes transcriptional  
221 inhibition (Fardi et al., 2018).

222

223 In humans, a very large majority of DNA does not code for proteins, whereas 80% are transcribed into  
224 RNAs. This means that most of transcribed DNA sequences are non-coding RNAs (ncRNAs). These non-  
225 coding RNAs have been split in two main families, using a size criterion: long non-coding RNAs (>200nt)  
226 and short non-coding RNAs (19nt<size<200nt). The long non-coding RNA family is very miscellaneous  
227 and different subtypes have been described as well as in the family of the short ncRNAs. For example,  
228 small nuclear RNAs (snRNAs) are implicated in splicing, piwiRNAs (piRNAs) have a role in transposon  
229 silencing, microRNAs (miRNAs) target mRNAs in order to induce their degradation and inhibit their  
230 transcription, and small nucleolar RNAs (snoRNAs) participate in ribosomal RNA maturation (Esteller,  
231 2011). Hence, ncRNAs play a crucial role in all cell types and constitute a large part of epigenetic  
232 players.

233

#### 234 **1.1.1. Epigenetic consequences of herbicide exposure in mammals**

235 Epidemiological studies on the impacts of herbicides in humans are rare and difficult to implement.  
236 Not only they should consider the duration and the frequency of exposure but also the formulation  
237 and degradation products of the herbicide. The few articles available focus on immune system and  
238 cancer, and most of them do not provide convincing evidence of the link between herbicide exposure  
239 and cancer in humans (Mink et al., 2012; Sathiakumar et al., 2011; Thongprakaisang et al., 2013).  
240 Moreover, it appears that not only herbicide company specialists, but also independent scientists, IARC  
241 and European Union assessment can sometimes disagree about product toxicity and carcinogenicity,  
242 as in the case of glyphosate (Tarazona et al., 2017).

243 Surprisingly, almost no article evokes epigenetic alterations while they sometimes constitute a  
244 significant keystone of several diseases. There are nevertheless some exceptions illustrating the ability  
245 of herbicides to hyper or hypomethylate the DNA template. This is the case of a study published in  
246 2017, which describes a decrease of global DNA methylation in human peripheral blood mononuclear  
247 cells exposed to 0.25mM of glyphosate (Kwiatkowska et al., 2017). Still regarding the immune system,  
248 diuron has been shown to reduce plasmacytoid dendritic cell (pDC) activity by ILT7 (immunoglobulin-  
249 like transcript 7) and TRAIL (TNF-related apoptosis inducing ligand) promoter demethylation after TET2  
250 overexpression (Briand et al., 2019a).

251 In cancer, high concentrations of glyphosate are also responsible for hypermethylation of the tumor  
252 suppressor p53 promoter. Interestingly, these two patterns are often associated in human tumor cells,  
253 driving specific cancer phenotypes, although the authors emphasized that it would be necessary to  
254 confirm these results in other cell types and *in vivo*. Another study evaluated the link between “high  
255 pesticide exposure events” and DNA methylation in a cohort of pesticide (including herbicide) users  
256 (Rusiecki et al., 2017). After DNA extraction from whole blood, they used pyrosequencing to quantify

257 methylated DNA. They showed that pesticides may contribute to decrease DNA methylation in  
258 repetitive element LINE-1, an emerging biomarker for neoplasia (Ardeljan et al., 2017). Among older  
259 men, pesticide users carried some CpG sites in MGMT (O-6-methylguanine-DNA methyltransferase)  
260 promoter less methylated than in controls. MGMT is a protein involved in DNA repair and has a major  
261 role in tumor development and chemoresistance (Sharma et al., 2009). Very recently, a study  
262 highlighted that glyphosate can trigger TET3-dependent DNA global hypomethylation, and participate  
263 in mammary cell carcinogenesis (Duforestel et al., 2019). Moreover, it has been demonstrated that  
264 diuron exposure, when associated with an oncogene overexpression, participated in the development  
265 of gliomas by inducing DNA hypomethylation (Briand et al., 2019b). Regarding short-term persistency,  
266 exposure of HEK293T cells to atrazine has been shown to induce changes in DNA methylation and  
267 H3K9me3, even 48 hours after the removal of atrazine source (Sánchez et al., 2020).

268

269 In different rodent models, herbicides seemed to alter the reproductive system. Indeed, in male mice  
270 exposed to atrazine, an impact on epigenetic processes of meiosis has been identified (Gely-Pernot et  
271 al., 2015), whereas in rats exposed to glyphosate, it is an epigenetic disruption of ER $\alpha$  (Lorenz et al.,  
272 2019). Interestingly, these modifications are transmitted to rat progeny, independently of their  
273 exposition (Kubsad et al., 2019). Consistently, McBirney *et al.* have highlighted that atrazine exposure  
274 promotes sperm differential DNA methylation regions (DMRs) in rats and epigenetic transgenerational  
275 inheritance of various diseases such as testis dysfunctions and mammary tumors (McBirney et al.,  
276 2017). These DMRs could provide potential epimarkers for those diseases. Atrazine also has a  
277 transgenerational effect in mice, inducing a decrease of trimethylation of histones at least in the third  
278 generation (Hao et al., 2016). Some effects of glyphosate-based herbicides (GBH) on rats have been  
279 observed. GBH exposure during the developmental period alters mammary gland development and  
280 steroid hormone receptor expression involving methylation modifications (Gomez et al., 2019).  
281 Moreover, it has been shown that GBH formulation induces epigenetic modifications, especially  
282 histone H3 modifications in adult female rats following *in utero* and lactational exposure (Lorenz et al.,  
283 2019). However, these last studies must be interpreted cautiously. Indeed, the preparations tested  
284 were glyphosate-based and not pure, the mixture could have an influence on health, which cannot be  
285 allocated to glyphosate alone (Vandenberg et al., 2017). Finally, a study conducted by King *et al.* on rat  
286 adipocytes showed a differential DNA methylation between groups exposed or not to atrazine (King et  
287 al., 2019).

288

289 All these examples give a primary but good insight on the variety of effects herbicides can have on  
290 rodents and humans at the epigenetic level. Nevertheless, it seems clear that research in this area  
291 needs to go further and experiments to be conducted on the longer term, to confirm these

292 observations. Additionally, this would allow evidencing emerging epigenetic phenomenon in mammals  
293 and their offspring that could lead to new diseases.

294

295 **1.2. In Aquatic fauna**

296 **1.2.1. Epigenetic particularities of the aquatic fauna**

297 Most of what we know about epigenetics in animals comes from mammals, and even if there are  
298 similarities we must not neglect taxa specific patterns. Among fish and shellfish, zebrafish (*Danio rerio*)  
299 is considered as an excellent model to study pollutant-induced epigenetic changes as described by  
300 Cavalieri and Spinelli (Cavalieri and Spinelli, 2017). Indeed, in both fish and shellfish, the basic  
301 methylation machinery is comparable to the one in humans. As example, zebrafish possess the two  
302 families of DNMT (maintenance and *de novo*) identified in mammals. However, in contrast to  
303 mammals, which have three active DNMTs as mentioned above, zebrafish genome contains multiple  
304 paralogs (for instance, they express 6 DNMT3-like classified from DNMT3 to DNMT8) (Cavalieri and  
305 Spinelli, 2017) (Figure 3). In fish, it appears that the overall level of DNA methylation is of the same  
306 order of magnitude as in mammals (Feng et al., 2010), and some regions methylated by the  
307 environment may escape reprogramming at the beginning of the embryonic phase (Goll and Halpern,  
308 2011). Conversely, there is a major difference in the rate of methylation between vertebrates (> 80%)  
309 and invertebrates (~50%) (Metzger and Schulte, 2016). In Pacific oyster, as in vertebrates, the  
310 methylome dynamics plays a role in transcription regulation during the development (Riviere et al.,  
311 2017). However, as in invertebrates in general, the methylation profile is similar to a mosaic composed  
312 of methylated regions punctuated by unmethylated tracts of the same length (Riviere, 2014; Suzuki et  
313 al., 2007). The percentage of methylated CpGs in Pacific oyster somatic tissues reached 15% versus 60  
314 to 70% in mammals (Gavery and Roberts, 2013).

315

316 Concerning histones, variants and post-translational modifications are well conserved between taxa.  
317 Histones H3, H4, H2B present in humans have been found in oysters, even in the cytoplasm as  
318 fragments with antimicrobial properties (Dorrington et al., 2011). Valero et al. have characterized  
319 histone H1 and H2B in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and gilthead sea bream (*Sparus*  
320 *aurata*) (Valero et al., 2016). Studies conducted on zebrafish have highlighted histone modifications  
321 induced by methyltransferases such as Polycomb/Thritorax group proteins, and histone demethylation  
322 seems necessary for regeneration (Stewart et al., 2009). Among the known specificities in other  
323 vertebrate models, is the existence of unique histone variants in fish oocytes (Wu et al., 2009), but this  
324 part of epigenetics needs further investigation to evidence the particularities of each species.

325

326 Although studies on non-coding RNAs in aquatic fauna are quite rare (Wirbisky et al., 2016), sequencing  
327 data available show that there is a large number and variety of non-coding RNAs in fish and shellfish  
328 (long intergenic noncoding RNAs, miRNAs, piRNAs...) which exact properties are not always known. As  
329 in humans, these RNAs seem to be involved in different physiological processes, depending on the  
330 species: larval development, immune response, shell color diversity, salinity tolerance, transcription  
331 regulation (Andreassen et al., 2017; Houwing et al., 2007; Wang et al., 2018; Yu et al., 2016; Zhao et  
332 al., 2016).

333

334

335 **1.2.2. Epigenetic consequences of herbicide exposure in aquatic fauna**

336 In the Pacific oysters (*Crassostrea gigas*), diuron exposure in parents leads to higher methylation levels  
337 in sperm and higher global DNA methylation in offspring from different genitor groups (Bachère et al.,  
338 2017), but also to a modification of DNA methylation pattern (Rondon et al., 2017). In the common  
339 carp (*Cyprinus carpio L.*), two similar studies demonstrated that DNA methylation levels and most  
340 DNMT mRNA decreased in liver, kidneys and gills (Wang et al., 2014) as well as in brain and gonads  
341 (Xing et al., 2015) when exposed to atrazine. Exposure to environmentally relevant concentrations of  
342 glyphosate and Roundup in another fish, the medaka (*Oryzias latipes*), leads to the same decrease in  
343 DNMT1 mRNA and to an increase in TET1 and TET3 mRNA (Smith et al., 2019). As observed in  
344 mammals, atrazine has also a transgenerational effect on DNA methylation in the medaka (Cleary et  
345 al., 2019). Concerning the zebrafish (*D. rerio*), atrazine again affects DNMTs activity and expression  
346 level, leading to the diminution of global DNA methylation level (Wirbisky-Hershberger et al., 2017). If  
347 applied during the embryonic phase, atrazine also alters 17 miRNAs expression, especially miR-10  
348 family, which is critical for several pathways such as embryonic development and angiogenesis  
349 signaling (Wirbisky et al., 2016).

350 It is worth to note that our current knowledge of the epigenetic effects of herbicides on aquatic fauna  
351 reflects the limited information available about epigenetics in these animals, due to very few articles  
352 published yet. But overall, it is known that organisms require the correct pattern of methylation to  
353 avoid changes in gene expression and/or genomic rearrangements. Because little changes in the  
354 environment such as water temperature (Varriale, 2014; Whitaker et al., 2018), or captive rearing  
355 (Rodriguez Barreto et al., 2019) are able to induce variations in DNA methylation, it is reasonable to  
356 hypothesize that herbicides can cause similar epigenetic changes, resulting in serious metabolic  
357 damages in aquatic fauna. The same is true for histones and non-coding RNAs. Their broad involvement  
358 in various pathways, and their overall sensitivity to environmental pollutants will possibly make them  
359 key actors in the responses of aquatic organisms to herbicide exposure.

360

361   **1.3. In Plants and algae**

362   **1.3.1. Epigenetic particularities in plants and algae**

363   Studies in plants were precursory for epigenetic discoveries in eukaryotes, including humans, but they  
364   have their own specificities (Pikaard and Mittelsten Scheid, 2014). DNA methylation in plants and algae  
365   includes not only the CG methylation, but also CHG (where H = A, C or T) and CHH methylation  
366   (Henderson and Jacobsen, 2007; Zhang et al., 2018) (Figure 4). There are also three DNA  
367   methyltransferase families, with different roles in plants or algae: (i) DNMT1 that will allow  
368   methylation on the CG, (ii) DRMs (domain rearranged methyltransferase) that are homologous to  
369   DNMT3 and will allow methylation to be maintained on CHH, and (iii) CMTs (chromomethylases) which  
370   intervene in the methylation of CHG (Greco et al., 2012). Another difference is that plant epigenome,  
371   in a perspective of adaptation and genome stability, remains mostly unchanged from one generation  
372   to the other in contrast to mammals, in which methyl marks are cleared during reproduction. This  
373   leads to the so called “epialleles” encoded mainly because of the methylation status and responsible  
374   for various phenotypes depending on the timing of flowering, disease resistance, biomass production  
375   or fruit ripening (Bartels et al., 2018). Numerous small non-coding RNAs are produced in plants or  
376   algae. They are involved in development, reproduction and adaptation to the environment. Their  
377   biogenesis is well understood, engage DICER proteins as in mammals, but unlike them they can play a  
378   role either in the cytoplasm as transcriptional gene silencer, or in the nucleus by directing DNA  
379   methylation proteins on specific loci (Borges and Martienssen, 2015). Investigated later in comparison  
380   with human studies, long non-coding RNAs in plants and algae begin to be deciphered and seem to  
381   have an important role in stress response (Liu et al., 2015).

382

383   **1.3.2. Epigenetic consequences of herbicide exposure in plants and algae**

384   Global methylation in plants appears to be altered by herbicide exposure as in humans. Both  
385   glyphosate and atrazine are responsible for DNA methylation alterations in rice and wheat (Lu et al.,  
386   2016; Nardemir et al., 2015). Using bisulfite sequencing, differentially methylated regions and their  
387   locations were evidenced in *Arabidopsis thaliana* after glyphosate exposure (Kim et al., 2017). In  
388   Canadian horseweed (*Conyza Canadensis*), a phenomenon of resistance to glyphosate was related to  
389   hypermethylation of EPSP-synthase 1 gene (Margaritopoulou et al., 2018). Just a few studies described  
390   the implication of non-coding RNA in herbicide responses in plants, however a glyphosate treatment  
391   of tall fescue (*Festuca arundinacea*) resulted in a downregulation of transcription factors, induced by  
392   miRNAs (Unver et al., 2010).

393   As for animals, terrestrial plants can be exposed and affected, whether they are directly targeted by  
394   the chemical, or they just grow in the surrounding areas of an herbicide spreading. The situation is a  
395   little bit different for aquatic plants and algae, as to some extent, these organisms might also

encounter herbicides through leaching and water pollution. Indeed, herbicide impacts are not limited to terrestrial organisms and their study must be extended to seaweeds, seagrasses, and phytoplankton, which play a major role in all aquatic ecosystems and food webs. Given similarities in the oxygenic photosynthetic metabolism, several algal studies described effects already known in plants due to their homology, such as photosynthesis breakdown induced by diuron in *Dunaliella tertiolecta* (DeLorenzo et al., 2001). Indeed in aquatic photosynthetic organisms, whether they are unicellular like diatoms (*Skeletonema costatum*, *Phaeodactylum tricornutum*, *Thalassiosira pseudonana*, *Chaetoceros calcitrans*) or multicellular like seagrasses (*Halophila ovalis*, *Halophila universis* or *Zostera muelleri*), effects are variable depending on the species but they often lead to growth and/or photosynthesis alterations, main physiological functions targeted by herbicides (Wang et al., 2016; Dupraz et al., 2019; Flores et al., 2013; Negri et al., 2015; Wilkinson et al., 2017). Although some studies have evaluated the impacts of these molecules on algae, none of them mentioned epigenetic dysregulations, a field of future research worth to be investigated further. It is important to note that a similar conclusion could be drawn for other organisms such as insects or bacteria for which the few information available only mention effects on growth without investigating epigenetic consequences. This represents a crucial lack of information for ecological and ecotoxicological studies conducted to determine if chemicals like herbicides could be used safely, or to assess how they do impact the components and functioning of the whole ecosystem.

414

#### 415      **4. Conclusion**

416 The present work aimed at gathering all available information about the epigenetic impacts of  
417 herbicides on genetically different organisms including plants, algae, aquatic vertebrates and  
418 invertebrates, humans and other mammals. This review completes and extends a previous work by  
419 Collotta et al. on the epigenetic impacts of various pesticides (including herbicides, fungicides, and  
420 insecticides) on mammals and humans (Collotta et al., 2013). Nowadays, it appears obvious that  
421 atrazine, diuron, glyphosate and possibly many other herbicides are found in every environment,  
422 sometimes years after their spreading. The impacts of these compounds and their residues on all living  
423 organisms are not limited in space and time, and the global consequences for the environment still  
424 need to be assessed. Despite a growing attention paid towards herbicides used worldwide in the last  
425 decades, it seems surprising to have so few recent publications dealing with their effects, especially on  
426 the long-term. To date, these few studies are usually not fully conclusive and the conclusions for  
427 human health hazards are still divergent. It is therefore important to stress the need to multiply  
428 epigenetic studies, particularly in humans. Indeed, it is now known that cellular epigenetic processes  
429 are diverse and very frequent, crucial for gene expression and cell functions, and involved in many  
430 pathological phenomena such as cancers, neurodegenerative and psychological disorders or

431 autoimmune diseases. In this context, it also seems important to point out that most human diseases  
432 are multifactorial. For example, cancer development involves several oncogenic hits, which suggests  
433 that genetic and epigenetic modifications induced by herbicides that would be phenotypically invisible  
434 alone, could be at the origin of the carcinogenesis process associated with another spontaneous or  
435 induced oncogenic hit.

436 It is therefore obvious that there is a need for strong evidences on the long-term toxicity of herbicides,  
437 especially regarding epigenetics, whatever the model used. Some species at the base of the food  
438 chains, or essential to maintain the good functioning of an ecosystem, such as algae and bees, are  
439 mostly absent from these studies, which is an ecological and ecotoxicological nonsense. Despite this  
440 lack of in-depth studies, it appears that data already available generally agree on the epigenetic  
441 consequences of herbicides exposure. Epigenetic mechanisms are modified by environmental  
442 perturbations and most studies suggest that methylation or non-coding RNAs might, at least partially,  
443 be modified in various species. However, these results are most of the time obtained *in vitro*, after  
444 acute exposures, at specific concentrations and using herbicides isolated from their chemical  
445 compounds, metabolites and residues. Consequently, harmonization of protocols and doses would be  
446 profitable to facilitate comparison between data sets and allow highlighting common mechanisms.

447

448 **5. Acknowledgements**

449 This work benefited from funding from the Dynamique Scientifique Région Pays de la Loire EpiSAVMEN  
450 (Epigénétique-Santé-Agro-Alimentaire-Végétal-Mer-Environnement-Nutrition) (P.-F.C.).

451

- 452        **6. References**
- 453 Allis, C.D., Caparros, M.-L., Jenuwein, T., Reinberg, D., 2015. Epigenetics, Second edition. ed. CSH Press,  
454            Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- 455 Andreassen, R., Woldemariam, N.T., Egeland, I.Ø., Agafonov, O., Sindre, H., Høyheim, B., 2017.  
456            Identification of differentially expressed Atlantic salmon miRNAs responding to salmonid  
457            alphavirus (SAV) infection. *BMC Genomics* 18, 349. <https://doi.org/10.1186/s12864-017-3741-3>
- 458 Ardeljan, D., Taylor, M.S., Ting, D.T., Burns, K.H., 2017. The Human Long Interspersed Element-1  
459            Retrotransposon: An Emerging Biomarker of Neoplasia. *Clin. Chem.* 63, 816–822.  
460            <https://doi.org/10.1373/clinchem.2016.257444>
- 461 Bachère, E., Barranger, A., Bruno, R., Rouxel, J., Menard, D., Piquemal, D., Akcha, F., 2017. Parental  
462            diuron-exposure alters offspring transcriptome and fitness in Pacific oyster *Crassostrea gigas*.  
463            *Ecotoxicology and Environmental Safety* 142, 51–58.  
464            <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.03.030>
- 465 Bai, Z.G., Dent, D.L., Olsson, L., Schaeppman, M.E., 2008. Proxy global assessment of land degradation.  
466            *Soil Use and Management* 24, 223–234. <https://doi.org/10.1111/j.1475-2743.2008.00169.x>
- 467 Bartels, A., Han, Q., Nair, P., Stacey, L., Gaynier, H., Mosley, M., Huang, Q., Pearson, J., Hsieh, T.-F., An,  
468            Y.-Q., Xiao, W., 2018. Dynamic DNA Methylation in Plant Growth and Development.  
469            *International Journal of Molecular Sciences* 19, 2144. <https://doi.org/10.3390/ijms19072144>
- 470 Bassil, K.L., Vakil, C., Sanborn, M., Cole, D.C., Kaur, J.S., Kerr, K.J., 2007. Cancer health effects of  
471            pesticides: systematic review. *Can Fam Physician* 53, 1704–1711.
- 472 Benbrook, C.M., 2016. Trends in glyphosate herbicide use in the United States and globally. *Environ Sci  
473            Eur* 28. <https://doi.org/10.1186/s12302-016-0070-0>
- 474 Bianco-Miotto, T., Chiam, K., Buchanan, G., Jindal, S., Day, T.K., Thomas, M., Pickering, M.A.,  
475            O'Loughlin, M.A., Ryan, N.K., Raymond, W.A., Horvath, L.G., Kench, J.G., Stricker, P.D.,  
476            Marshall, V.R., Sutherland, R.L., Henshall, S.M., Gerald, W.L., Scher, H.I., Risbridger, G.P.,  
477            Clements, J.A., Butler, L.M., Tilley, W.D., Horsfall, D.J., Ricciardelli, C., for the Australian  
478            Prostate Cancer BioResource, 2010. Global Levels of Specific Histone Modifications and an  
479            Epigenetic Gene Signature Predict Prostate Cancer Progression and Development. *Cancer  
480            Epidemiology Biomarkers & Prevention* 19, 2611–2622. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-10-0555>
- 481 Bollati, V., Baccarelli, A., 2010. Environmental epigenetics. *Heredity* 105, 105–112.  
482            <https://doi.org/10.1038/hdy.2010.2>
- 483 Bollati, V., Baccarelli, A., 2010. Environmental epigenetics. *Heredity (Edinb)* 105, 105–112.  
484            <https://doi.org/10.1038/hdy.2010.2>
- 485 Borges, F., Martienssen, R.A., 2015. The expanding world of small RNAs in plants. *Nat Rev Mol Cell Biol*  
486            16, 727–741. <https://doi.org/10.1038/nrm4085>
- 487 Briand, J., Joalland, M.-P., Nadaradjane, A., Bougras-Cartron, G., Olivier, C., Vallette, F.M., Perruche, S.,  
488            Cartron, P.-F., 2019a. Diuron modulates the DNA methylation status of the ILT7 and  
489            TRAIL/TNFSF10 genes and decreases the killing activity of plasmacytoid dendritic cells.  
490            *Environmental Sciences Europe* 31, 35. <https://doi.org/10.1186/s12302-019-0219-8>
- 491 Briand, J., Nadaradjane, A., Bougras-Cartron, G., Olivier, C., Vallette, F.M., Cartron, P.-F., 2019b. Diuron  
492            exposure and Akt overexpression promote glioma formation through DNA hypomethylation.  
493            *Clin Epigenetics* 11, 159. <https://doi.org/10.1186/s13148-019-0759-1>
- 494 Caquet, Th., Roucaute, M., Mazzella, N., Delmas, F., Madigou, C., Farcy, E., Burgeot, Th., Allenou, J.-P.,  
495            Gabellec, R., 2013. Risk assessment of herbicides and booster biocides along estuarine  
496            continuums in the Bay of Vilaine area (Brittany, France). *Environ Sci Pollut Res* 20, 651–666.  
497            <https://doi.org/10.1007/s11356-012-1171-y>
- 498 Cavalieri, V., Spinelli, G., 2017. Environmental epigenetics in zebrafish. *Epigenetics Chromatin* 10, 46.  
499            <https://doi.org/10.1186/s13072-017-0154-0>
- 500
- 501

- 502 Chaudhry, F., Malik, M., 2017. Factors Affecting Water Pollution: A Review. *J Ecosyst Ecogr* 07.  
503 <https://doi.org/10.4172/2157-7625.1000225>
- 504 Chittka, A., Chittka, L., 2010. Epigenetics of Royalty. *PLOS Biology* 8, e1000532.  
505 <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000532>
- 506 Cleary, J.A., Tillitt, D.E., vom Saal, F.S., Nicks, D.K., Claunch, R.A., Bhandari, R.K., 2019. Atrazine induced  
507 transgenerational reproductive effects in medaka (*Oryzias latipes*). *Environmental Pollution*  
508 251, 639–650. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.05.013>
- 509 Collotta, M., Bertazzi, P.A., Bollati, V., 2013. Epigenetics and pesticides. *Toxicology* 307, 35–41.  
510 <https://doi.org/10.1016/j.tox.2013.01.017>
- 511 Damalas, C.A., Eleftherohorinos, I.G., 2011. Pesticide Exposure, Safety Issues, and Risk Assessment  
512 Indicators. *IJERPH* 8, 1402–1419. <https://doi.org/10.3390/ijerph8051402>
- 513 DeLorenzo, M.E., Scott, G.I., Ross, P.E., 2001. Toxicity of pesticides to aquatic microorganisms: a  
514 review. *Environ. Toxicol. Chem.* 20, 84–98.
- 515 Dich, J., Zahm, S.H., Hanberg, A., Adami, H.-O., Adami, H.-O., 1997. Pesticides and cancer. *Cancer  
516 Causes and Control* 8, 420–443. <https://doi.org/10.1023/A:1018413522959>
- 517 Dorrington, T., Villamil, L., Gómez-chiarri, M., 2011. Upregulation in response to infection and  
518 antibacterial activity of oyster histone H4. *Fish & Shellfish Immunology* 30, 94–101.  
519 <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2010.09.006>
- 520 Duforestel, M., Nadaradjane, A., Bougras-Cartron, G., Briand, J., Olivier, C., Frenel, J.-S., Vallette, F.M.,  
521 Lelièvre, S.A., Cartron, P.-F., 2019. Glyphosate Primes Mammary Cells for Tumorigenesis by  
522 Reprogramming the Epigenome in a TET3-Dependent Manner. *Front Genet* 10, 885.  
523 <https://doi.org/10.3389/fgene.2019.00885>
- 524 Dupraz, V., Stachowski-Haberkorn, S., Wicquart, J., Tapie, N., Budzinski, H., Akcha, F., 2019.  
525 Demonstrating the need for chemical exposure characterisation in a microplate test system:  
526 toxicity screening of sixteen pesticides on two marine microalgae. *Chemosphere* 221, 278–  
527 291. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.01.035>
- 528 Esteller, M., 2011. Non-coding RNAs in human disease. *Nat. Rev. Genet.* 12, 861–874.  
529 <https://doi.org/10.1038/nrg3074>
- 530 Fardi, M., Solali, S., Farshdousti Hagh, M., 2018. Epigenetic mechanisms as a new approach in cancer  
531 treatment: An updated review. *Genes Dis* 5, 304–311.  
532 <https://doi.org/10.1016/j.gendis.2018.06.003>
- 533 Feng, S., Cokus, S.J., Zhang, X., Chen, P.-Y., Bostick, M., Goll, M.G., Hetzel, J., Jain, J., Strauss, S.H.,  
534 Halpern, M.E., Ukomadu, C., Sadler, K.C., Pradhan, S., Pellegrini, M., Jacobsen, S.E., 2010. Conservation and divergence of methylation patterning in plants and animals. *Proceedings of  
535 the National Academy of Sciences* 107, 8689–8694. <https://doi.org/10.1073/pnas.1002720107>
- 536 Filimonova, V., Gonçalves, F., Marques, J., De Troch, M., Gonçalves, A., 2016. Biochemical and  
537 toxicological effects of organic (herbicide Primextra® Gold TZ) and inorganic (copper)  
538 compounds on zooplankton and phytoplankton species. *Aquatic Toxicology* 177.  
539 <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2016.05.008>
- 540 Flores, F., Collier, C.J., Mercurio, P., Negri, A.P., 2013. Phytotoxicity of four photosystem II herbicides  
541 to tropical seagrasses. *PLoS ONE* 8, e75798. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0075798>
- 542 Flury, M., 1996. Experimental evidence of transport of pesticides through field soils - a review. *Journal  
543 of Environmental Quality* 25. <https://doi.org/10.2134/jeq1996.00472425002500010005x>
- 544 Fraga, M.F., Ballestar, E., Paz, M.F., Ropero, S., Setien, F., Ballestar, M.L., Heine-Suner, D., Cigudosa,  
545 J.C., Urioste, M., Benitez, J., Boix-Chornet, M., Sanchez-Aguilera, A., Ling, C., Carlsson, E.,  
546 Poulsen, P., Vaag, A., Stephan, Z., Spector, T.D., Wu, Y.-Z., Plass, C., Esteller, M., 2005. From  
547 The Cover: Epigenetic differences arise during the lifetime of monozygotic twins. *Proceedings  
548 of the National Academy of Sciences* 102, 10604–10609.  
549 <https://doi.org/10.1073/pnas.0500398102>
- 550 Gavery, M.R., Roberts, S.B., 2013. Predominant intragenic methylation is associated with gene  
551 expression characteristics in a bivalve mollusc. *PeerJ* 1, e215.  
552 <https://doi.org/10.7717/peerj.215>

- 554 Gely-Pernot, A., Hao, C., Becker, E., Stuparevic, I., Kervarrec, C., Chalmel, F., Primig, M., Jégou, B.,  
555 Smagulova, F., 2015. The epigenetic processes of meiosis in male mice are broadly affected by  
556 the widely used herbicide atrazine. *BMC Genomics* 16, 885. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-2095-y>
- 557 Goll, M.G., Halpern, M.E., 2011. DNA Methylation in Zebrafish, in: *Progress in Molecular Biology and*  
558 *Translational Science*. Elsevier, pp. 193–218. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-387685-0.00005-6>
- 561 Gomez, A.L., Altamirano, G.A., Leturia, J., Bosquiazzo, V.L., Muñoz-de-Toro, M., Kass, L., 2019. Male  
562 mammary gland development and methylation status of estrogen receptor alpha in Wistar rats  
563 are modified by the developmental exposure to a glyphosate-based herbicide. *Mol. Cell. Endocrinol.* 481, 14–25. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2018.11.005>
- 565 Greco, M., Chiappetta, A., Bruno, L., Bitonti, M.B., 2012. In *Posidonia oceanica* cadmium induces  
566 changes in DNA methylation and chromatin patterning. *J. Exp. Bot.* 63, 695–709.  
567 <https://doi.org/10.1093/jxb/err313>
- 568 Hao, C., Gely-Pernot, A., Kervarrec, C., Boudjema, M., Becker, E., Khil, P., Tevosian, S., Jégou, B.,  
569 Smagulova, F., 2016. Exposure to the widely used herbicide atrazine results in deregulation of  
570 global tissue-specific RNA transcription in the third generation and is associated with a global  
571 decrease of histone trimethylation in mice. *Nucleic Acids Res.* 44, 9784–9802.  
572 <https://doi.org/10.1093/nar/gkw840>
- 573 Hartzler, B., n.d. Absorption of Soil-Applied Herbicides [WWW Document]. URL  
574 <https://crops.extension.iastate.edu/encyclopedia/absorption-soil-applied-herbicides>  
575 (accessed 10.19.20).
- 576 Henderson, I.R., Jacobsen, S.E., 2007. Epigenetic inheritance in plants. *Nature* 447, 418–424.  
577 <https://doi.org/10.1038/nature05917>
- 578 Houwing, S., Kamminga, L.M., Berezikov, E., Cronembold, D., Girard, A., van den Elst, H., Filippov, D.V.,  
579 Blaser, H., Raz, E., Moens, C.B., Plasterk, R.H.A., Hannon, G.J., Draper, B.W., Ketting, R.F., 2007.  
580 A Role for Piwi and piRNAs in Germ Cell Maintenance and Transposon Silencing in Zebrafish.  
581 *Cell* 129, 69–82. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.03.026>
- 582 Jiang, Z., Zhang, X., Wang, Z., Cao, B., Deng, S., Bi, M., Zhang, Y., 2019. Enhanced biodegradation of  
583 atrazine by Arthrobacter sp. DNS10 during co-culture with a phosphorus solubilizing bacteria:  
584 Enterobacter sp. P1. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 172, 159–166.  
585 <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.01.070>
- 586 Khanam, M.R.M., Shimasaki, Y., Hosain, M.Z., Mukai, K., Tsuyama, M., Qiu, X., Tasmin, R., Goto, H.,  
587 Oshima, Y., 2017. Diuron causes sinking retardation and physiochemical alteration in marine  
588 diatoms *Thalassiosira pseudonana* and *Skeletonema marinoi-dohrnii* complex. *CHEMOSPHERE*  
589 175, 200–209. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.02.054>
- 590 Kim, G., Clarke, C.R., Larose, H., Tran, H.T., Haak, D.C., Zhang, L., Askew, S., Barney, J., Westwood, J.H.,  
591 2017. Herbicide injury induces DNA methylome alterations in *Arabidopsis*. *PeerJ* 5, e3560.  
592 <https://doi.org/10.7717/peerj.3560>
- 593 King, S.E., Nilsson, E., Beck, D., Skinner, M.K., 2019. Adipocyte epigenetic alterations and potential  
594 therapeutic targets in transgenerationally inherited lean and obese phenotypes following  
595 ancestral exposures. *Adipocyte* 8, 362–378. <https://doi.org/10.1080/21623945.2019.1693747>
- 596 Kubsad, D., Nilsson, E.E., King, S.E., Sadler-Riggleman, I., Beck, D., Skinner, M.K., 2019. Assessment of  
597 Glyphosate Induced Epigenetic Transgenerational Inheritance of Pathologies and Sperm  
598 Epimutations: Generational Toxicology. *Sci Rep* 9, 1–17. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-42860-0>
- 600 Kwiatkowska, M., Reszka, E., Woźniak, K., Jabłońska, E., Michałowicz, J., Bukowska, B., 2017. DNA  
601 damage and methylation induced by glyphosate in human peripheral blood mononuclear cells  
602 (in vitro study). *Food Chem. Toxicol.* 105, 93–98. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.03.051>
- 603 Langenbach, T., 2013. Persistence and Bioaccumulation of Persistent Organic Pollutants (POPs), in:  
604 Patil, Y. (Ed.), *Applied Bioremediation - Active and Passive Approaches*. InTech.  
605 <https://doi.org/10.5772/56418>

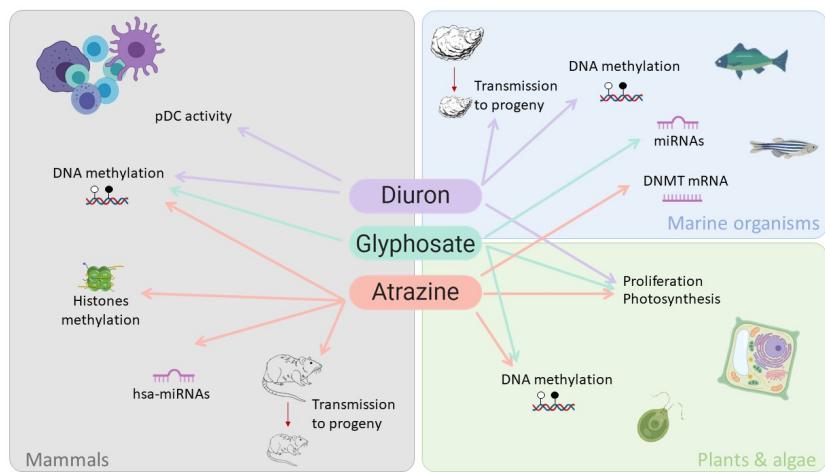
- 606 Legrand, H., Herlory, O., Guarini, J.-M., Blanchard, G., Richard, P., 2006. Inhibition of  
607 microphytobenthic photosynthesis by the herbicides atrazine and diuron. Cahiers de Biologie  
608 Marine 47, 39–45.
- 609 Liu, X., Hao, L., Li, D., Zhu, L., Hu, S., 2015. Long Non-coding RNAs and Their Biological Roles in Plants.  
610 Genomics, Proteomics & Bioinformatics 13, 137–147.  
611 <https://doi.org/10.1016/j.gpb.2015.02.003>
- 612 Lorenz, V., Milesi, M.M., Schimpf, M.G., Luque, E.H., Varayoud, J., 2019. Epigenetic disruption of  
613 estrogen receptor alpha is induced by a glyphosate-based herbicide in the preimplantation  
614 uterus of rats. Mol. Cell. Endocrinol. 480, 133–141.  
615 <https://doi.org/10.1016/j.mce.2018.10.022>
- 616 Lu, Y.C., Feng, S.J., Zhang, J.J., Luo, F., Zhang, S., Yang, H., 2016. Genome-wide identification of DNA  
617 methylation provides insights into the association of gene expression in rice exposed to  
618 pesticide atrazine. Sci Rep 6, 18985. <https://doi.org/10.1038/srep18985>
- 619 Margaritopoulou, T., Tani, E., Chachalis, D., Travlos, I., 2018. Involvement of Epigenetic Mechanisms in  
620 Herbicide Resistance: The Case of Conyza canadensis. Agriculture 8, 17.  
621 <https://doi.org/10.3390/agriculture8010017>
- 622 Mc Birney, M., King, S.E., Pappalardo, M., Houser, E., Unkefer, M., Nilsson, E., Sadler-Riggleman, I.,  
623 Beck, D., Winchester, P., Skinner, M.K., 2017. Atrazine induced epigenetic transgenerational  
624 inheritance of disease, lean phenotype and sperm epimutation pathology biomarkers. PLoS  
625 ONE 12, e0184306. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184306>
- 626 Mercurio, P., Flores, F., Mueller, J.F., Carter, S., Negri, A.P., 2014. Glyphosate persistence in seawater.  
627 Marine Pollution Bulletin, 7th International Conference on Marine Pollution and Ecotoxicology  
628 85, 385–390. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2014.01.021>
- 629 Metzger, D.C.H., Schulte, P.M., 2016. Epigenomics in marine fishes. Marine Genomics 30, 43–54.  
630 <https://doi.org/10.1016/j.margen.2016.01.004>
- 631 Mink, P.J., Mandel, J.S., Sceurman, B.K., Lundin, J.I., 2012. Epidemiologic studies of glyphosate and  
632 cancer: a review. Regul. Toxicol. Pharmacol. 63, 440–452.  
633 <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2012.05.012>
- 634 Moisset, S., Kim Tiam, S., Feurtet-Mazel, A., Morin, S., Delmas, F., Mazzella, N., Gonzalez, P., 2015.  
635 Genetic and physiological responses of three freshwater diatoms to realistic diuron exposures.  
636 Environ Sci Pollut Res Int 22, 4046–4055. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3523-2>
- 637 Moore, L.D., Le, T., Fan, G., 2013. DNA Methylation and Its Basic Function. Neuropsychopharmacology  
638 38, 23–38. <https://doi.org/10.1038/npp.2012.112>
- 639 Münze, R., Hannemann, C., Orlinskiy, P., Gunold, R., Paschke, A., Foit, K., Becker, J., Kaske, O., Paulsson,  
640 E., Peterson, M., Jernstedt, H., Kreuger, J., Schüürmann, G., Liess, M., 2017. Pesticides from  
641 wastewater treatment plant effluents affect invertebrate communities. Sci. Total Environ.  
642 599–600, 387–399. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.03.008>
- 643 Nardemir, G., Yanmis, D., Alpsoy, L., Gulluce, M., Agar, G., Aslan, A., 2015. Genotoxic, antigenotoxic  
644 and antioxidant properties of methanol extracts obtained from *Peltigera horizontalis* and  
645 *Peltigera praetextata*. Toxicol Ind Health 31, 602–613.  
646 <https://doi.org/10.1177/0748233713480207>
- 647 Negri, A.P., Flores, F., Mercurio, P., Mueller, J.F., Collier, C.J., 2015. Lethal and sub-lethal chronic effects  
648 of the herbicide diuron on seagrass. Aquat. Toxicol. 165, 73–83.  
649 <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.05.007>
- 650 Pesce, S., Fajon, C., Bardot, C., Bonnemoy, F., Portelli, C., Bohatier, J., 2006. Effects of the phenylurea  
651 herbicide diuron on natural riverine microbial communities in an experimental study. Aquat  
652 Toxicol 78, 303–314. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2006.03.006>
- 653 Peterson, C.L., Laniel, M.-A., 2004. Histones and histone modifications. Current Biology 14, R546–R551.  
654 <https://doi.org/10.1016/j.cub.2004.07.007>
- 655 Pikaard, C.S., Mittelsten Scheid, O., 2014. Epigenetic Regulation in Plants. Cold Spring Harb Perspect  
656 Biol 6. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a019315>

- 657 Riviere, G., 2014. Epigenetic features in the oyster *Crassostrea gigas* suggestive of functionally relevant  
658 promoter DNA methylation in invertebrates. *Front. Physiol.* 5.  
659 <https://doi.org/10.3389/fphys.2014.00129>
- 660 Riviere, G., He, Y., Tecchio, S., Crowell, E., Gras, M., Sourdaine, P., Guo, X., Favrel, P., 2017. Dynamics  
661 of DNA methylomes underlie oyster development. *PLoS Genet* 13, e1006807.  
662 <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006807>
- 663 Rodriguez Barreto, D., Garcia de Leaniz, C., Verspoor, E., Sobolewska, H., Coulson, M., Consuegra, S.,  
664 2019. DNA Methylation Changes in the Sperm of Captive-Reared Fish: A Route to Epigenetic  
665 Introgression in Wild Populations. *Molecular Biology and Evolution* 36, 2205–2211.  
666 <https://doi.org/10.1093/molbev/msz135>
- 667 Rondon, R., Grunau, C., Fallet, M., Charlemagne, N., Sussarellu, R., Chaparro, C., Montagnani, C., Mitta,  
668 G., Bachère, E., Akcha, F., Cosseau, C., 2017. Effects of a parental exposure to diuron on Pacific  
669 oyster spat methylome. *Environ Epigenet* 3. <https://doi.org/10.1093/eep/dvx004>
- 670 Rouchaud, J., Neus, O., Bulcke, R., Cools, K., Eelen, H., Dekkers, T., 2000. Soil Dissipation of Diuron,  
671 Chlorotoluron, Simazine, Propyzamide, and Diflufenican Herbicides After Repeated  
672 Applications in Fruit Tree Orchards. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 39, 60–65.  
673 <https://doi.org/10.1007/s002440010080>
- 674 Rusiecki, J.A., Beane Freeman, L.E., Bonner, M.R., Alexander, M., Chen, L., Andreotti, G., Barry, K.H.,  
675 Moore, L.E., Byun, H.-M., Kamel, F., Alavanja, M., Hoppin, J.A., Baccarelli, A., 2017. High  
676 pesticide exposure events and DNA methylation among pesticide applicators in the agricultural  
677 health study: High Pesticide Exposure Events and DNA Methylation. *Environmental and  
678 Molecular Mutagenesis* 58, 19–29. <https://doi.org/10.1002/em.22067>
- 679 Sánchez, O.F., Lin, L., Bryan, C.J., Xie, J., Freeman, J.L., Yuan, C., 2020. Profiling epigenetic changes in  
680 human cell line induced by atrazine exposure. *Environmental Pollution* 258, 113712.  
681 <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.113712>
- 682 Sathiakumar, N., MacLennan, P.A., Mandel, J., Delzell, E., 2011. A review of epidemiologic studies of  
683 triazine herbicides and cancer. *Critical Reviews in Toxicology* 41, 1–34.  
684 <https://doi.org/10.3109/10408444.2011.554793>
- 685 Sharma, S., Salehi, F., Scheithauer, B.W., Rotondo, F., Syro, L.V., Kovacs, K., 2009. Role of MGMT in  
686 tumor development, progression, diagnosis, treatment and prognosis. *Anticancer Res.* 29,  
687 3759–3768.
- 688 Silkina, A., Bazes, A., Vouvé, F., Le, V.T., Douzenel, P., Mouget, J.L., Bourgougnon, N., 2009. Antifouling  
689 activity of macroalgal extracts on *Fragilaria pinnata* (Bacillariophyceae): a comparison with  
690 Diuron. *Aquat Toxicol* 94, 245–254. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2009.07.004>
- 691 Smith, C.M., Vera, M.K.M., Bhandari, R.K., 2019. Developmental and epigenetic effects of Roundup and  
692 glyphosate exposure on Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Aquatic Toxicology* 210, 215–226.  
693 <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2019.03.005>
- 694 Stewart, S., Tsun, Z.-Y., Belmonte, J.C.I., 2009. A histone demethylase is necessary for regeneration in  
695 zebrafish. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106, 19889–19894.  
696 <https://doi.org/10.1073/pnas.0904132106>
- 697 Suzuki, M.M., Kerr, A.R.W., De Sousa, D., Bird, A., 2007. CpG methylation is targeted to transcription  
698 units in an invertebrate genome. *Genome Research* 17, 625–631.  
699 <https://doi.org/10.1101/gr.6163007>
- 700 Syed, A., Hew, K., Kohli, A., Knowlton, G., Nadeau, K.C., 2013a. Air Pollution and Epigenetics. *JEP* 04,  
701 114–122. <https://doi.org/10.4236/jep.2013.48A1014>
- 702 Syed, A., Hew, K.M., Kohli, A., Knowlton, G., Nadeau, K.C., 2013b. Air Pollution and Epigenetics.  
703 <https://doi.org/10.4236/jep.2013.48A1014>
- 704 Tan, Q., Christiansen, L., von Bornemann Hjelmborg, J., Christensen, K., 2015. Twin methodology in  
705 epigenetic studies. *Journal of Experimental Biology* 218, 134–139.  
706 <https://doi.org/10.1242/jeb.107151>
- 707 Tarazona, J.V., Court-Marques, D., Tiramani, M., Reich, H., Pfeil, R., Istace, F., Crivellente, F., 2017.  
708 Glyphosate toxicity and carcinogenicity: a review of the scientific basis of the European Union

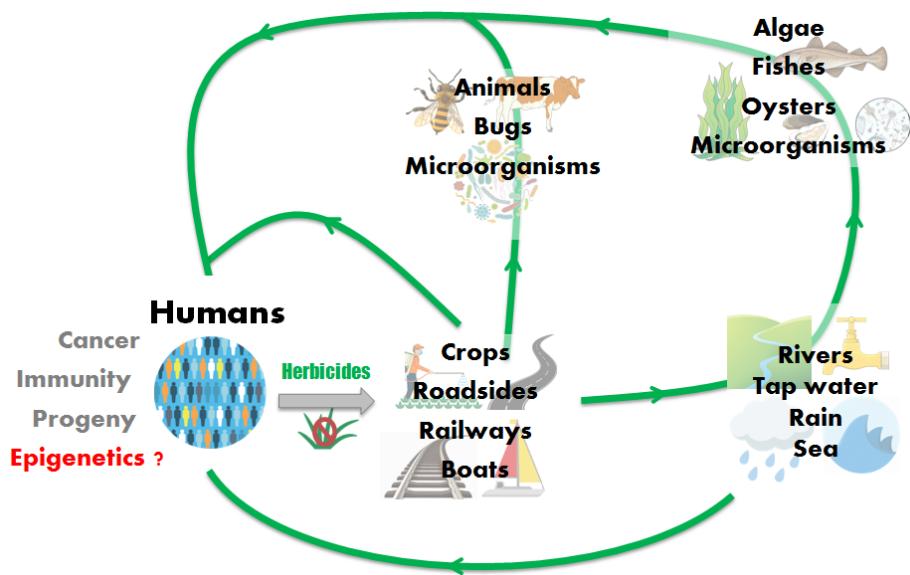
- 709 assessment and its differences with IARC. Arch. Toxicol. 91, 2723–2743.  
710 <https://doi.org/10.1007/s00204-017-1962-5>
- 711 Thongprakaisang, S., Thiantanawat, A., Rangkadilok, N., Suriyo, T., Satayavivad, J., 2013. Glyphosate  
712 induces human breast cancer cells growth via estrogen receptors. Food Chem. Toxicol. 59,  
713 129–136. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2013.05.057>
- 714 Unver, T., Bakar, M., Shearman, R.C., Budak, H., 2010. Genome-wide profiling and analysis of *Festuca*  
715 *arundinacea* miRNAs and transcriptomes in response to foliar glyphosate application. Mol.  
716 Genet. Genomics 283, 397–413. <https://doi.org/10.1007/s00438-010-0526-7>
- 717 Valero, Y., Arizcun, M., Esteban, M.Á., Cuesta, A., Chaves-Pozo, E., 2016. Transcription of histones H1  
718 and H2B is regulated by several immune stimuli in gilthead seabream and European sea bass.  
719 Fish & Shellfish Immunology 57, 107–115. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2016.08.019>
- 720 Vandenberg, L.N., Blumberg, B., Antoniou, M.N., Benbrook, C.M., Carroll, L., Colborn, T., Everett, L.G.,  
721 Hansen, M., Landrigan, P.J., Lanphear, B.P., Mesnage, R., vom Saal, F.S., Welshons, W.V.,  
722 Myers, J.P., 2017. Is it time to reassess current safety standards for glyphosate-based  
723 herbicides? J Epidemiol Community Health 71, 613–618. <https://doi.org/10.1136/jech-2016-208463>
- 724 Varriale, A., 2014. DNA Methylation, Epigenetics, and Evolution in Vertebrates: Facts and Challenges.  
725 International Journal of Evolutionary Biology 2014, 1–7.  
726 <https://doi.org/10.1155/2014/475981>
- 727 Wang, C., Lin, X., Li, L., Lin, S., 2016. Differential Growth Responses of Marine Phytoplankton to  
728 Herbicide Glyphosate. PLoS ONE 11, e0151633.  
729 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0151633>
- 730 Wang, C., Zhang, Z., Yao, H., Zhao, F., Wang, L., Wang, X., Xing, H., Xu, S., 2014. Effects of atrazine and  
731 chlorpyrifos on DNA methylation in the liver, kidney and gill of the common carp (*Cyprinus*  
732 *carpio* L.). Ecotoxicology and Environmental Safety 108, 142–151.  
733 <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.06.011>
- 734 Wang, M., Jiang, S., Wu, W., Yu, F., Chang, W., Li, P., Wang, K., 2018. Non-coding RNAs Function as  
735 Immune Regulators in Teleost Fish. Front. Immunol. 9, 2801.  
736 <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02801>
- 737 Whitaker, J.M., Welsh, A.B., Hondorp, D.W., Boase, J.C., Merovich, G.T., Welsh, S., Krueger, C., 2018.  
738 Variation in DNA methylation is associated with migratory phenotypes of lake sturgeon  
739 *Acipenser fulvescens* in the St. Clair River, MI, USA. J Fish Biol 93, 942–951.  
740 <https://doi.org/10.1111/jfb.13804>
- 741 Wilkinson, A.D., Collier, C.J., Flores, F., Langlois, L., Ralph, P.J., Negri, A.P., 2017. Combined effects of  
742 temperature and the herbicide diuron on Photosystem II activity of the tropical seagrass  
743 *Halophila ovalis*. Scientific Reports 7, 45404. <https://doi.org/10.1038/srep45404>
- 744 Wirbisky, S.E., Weber, G.J., Schlotman, K.E., Sepúlveda, M.S., Freeman, J.L., 2016. Embryonic atrazine  
745 exposure alters zebrafish and human miRNAs associated with angiogenesis, cancer, and  
746 neurodevelopment. Food and Chemical Toxicology 98, 25–33.  
747 <https://doi.org/10.1016/j.fct.2016.03.027>
- 748 Wirbisky-Hershberger, S.E., Sanchez, O.F., Horzmann, K.A., Thanki, D., Yuan, C., Freeman, J.L., 2017.  
749 Atrazine exposure decreases the activity of DNMTs, global DNA methylation levels, and dnmt  
750 expression. Food and Chemical Toxicology 109, 727–734.  
751 <https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.08.041>
- 752 Wu, C. -t, Morris, J.R., 2001. Genes, Genetics, and Epigenetics: A Correspondence. Science 293, 1103–  
753 1105. <https://doi.org/10.1126/science.293.5532.1103>
- 754 Wu, N., Yue, H.-M., Chen, B., Gui, J.-F., 2009. Histone H2A Has a Novel Variant in Fish Oocytes1. Biology  
755 of Reproduction 81, 275–283. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.108.074955>
- 756 Xing, H., Wang, C., Wu, H., Chen, D., Li, S., Xu, S., 2015. Effects of atrazine and chlorpyrifos on DNA  
757 methylation in the brain and gonad of the common carp. Comparative Biochemistry and  
758 Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology 168, 11–19.  
759 <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2014.11.002>
- 760

- 761 Yu, H., Zhao, X., Li, Q., 2016. Genome-wide identification and characterization of long intergenic  
762 noncoding RNAs and their potential association with larval development in the Pacific oyster.  
763 *Sci Rep* 6, 20796. <https://doi.org/10.1038/srep20796>
- 764 Zhang, H., Lang, Z., Zhu, J.-K., 2018. Dynamics and function of DNA methylation in plants. *Nat. Rev.*  
765 *Mol. Cell Biol.* 19, 489–506. <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0016-z>
- 766 Zhao, X., Yu, H., Kong, L., Liu, S., Li, Q., 2016. High throughput sequencing of small RNAs transcriptomes  
767 in two *Crassostrea* oysters identifies microRNAs involved in osmotic stress response. *Sci Rep*  
768 6, 22687. <https://doi.org/10.1038/srep22687>
- 769
- 770
- 771

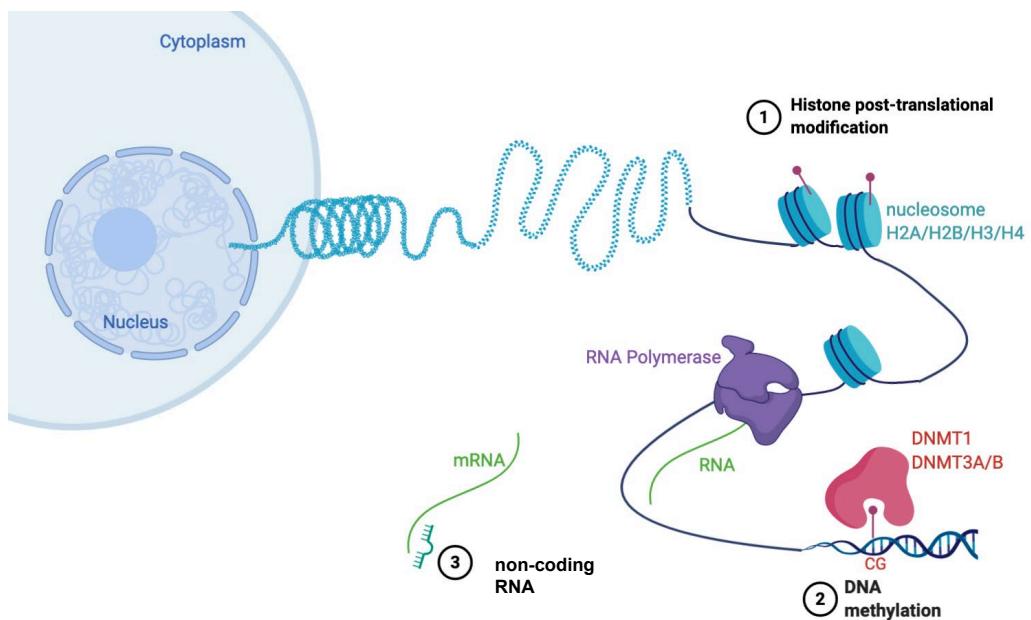
### Graphical abstract



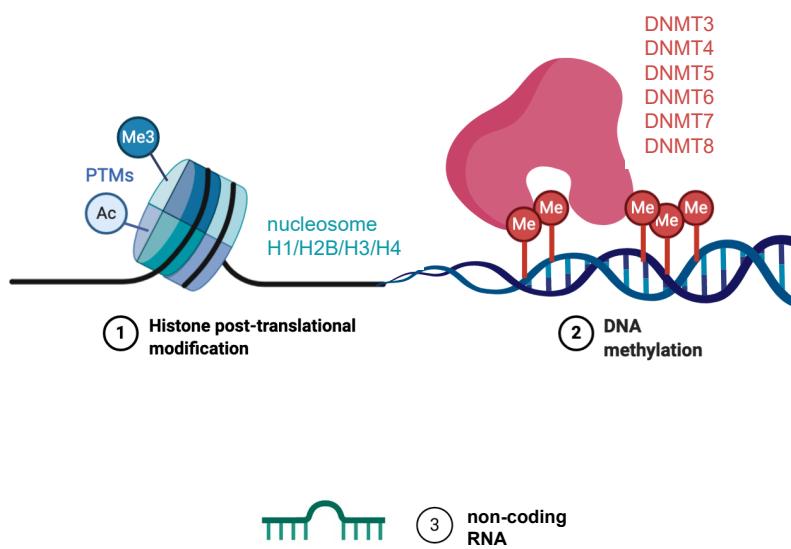
**Figure 1. Herbicides life cycle and their potential off-target effects.** Excessive use of herbicides can lead to contamination of different media including air, land and water. Consequently, numerous organisms living in its ecosystems can be affected.



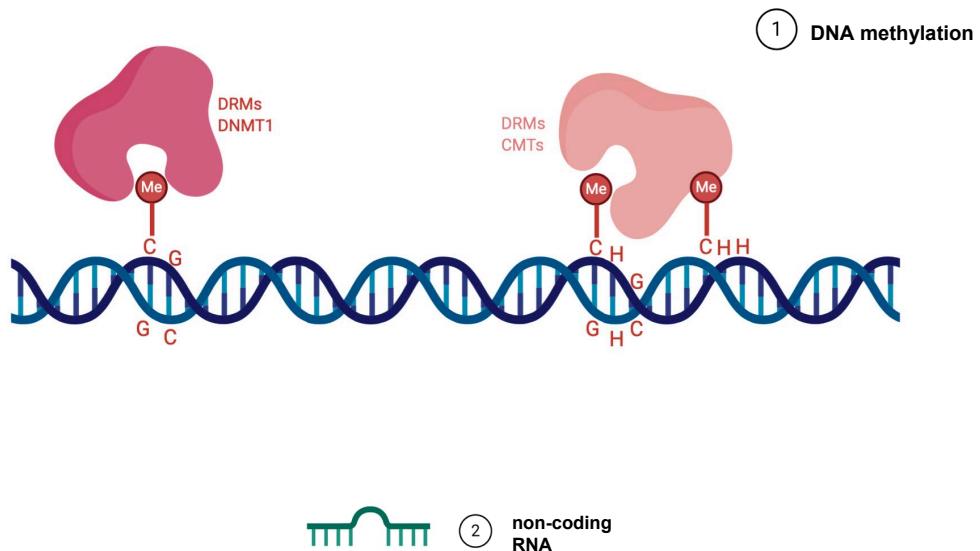
**Figure 2. Three fundamental mechanism of epigenetics in mammals.** Mammalian gene expression is tightly controlled by epigenetic mechanisms : 1) The nucleosomes are composed of dimers of H2A, H2B, H3 and H4 histones. Post-translational modifications of the histones' tails can affect the chromatin structure. 2) The addition of a methyl group to cytidine residues in the dinucleotide CG modify the way in which DNA interacts with histones and others proteins, leading to chromatin compaction or gene transcription. 3) Non-coding RNA, such as microRNA (miRNA), have also an impact on gene expression through the degradation of messenger RNA (mRNA) or an inhibition of their translation.



**Figure 3. Epigenetic particularities in aquatic fauna.** Epigenetic regulation mainly comprises DNA methylation and histone post-translational modifications (PTMs). Global DNA methylation levels is higher in aquatic fauna than in mammals and occurs mainly in gene bodies. Non-coding RNA are for now little described but exist.



**Figure 4. DNA methylation in plants.** DNA methylation occurs in distinct contexts, including CG, CHG and CHH. Domains rearranged methyltransferase (DRM) catalyzes de novo DNA methylation in all sequence contexts. Methylation is then maintained after DNA replication by DNA methyltransferase 1 (DNMT1) and chromomethylase (CMT), in CG and in CHG/CHH contexts respectively. Few studies are about non-coding RNA but they seem to play a role in stress response.



## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- Aapola, U., Kawasaki, K., Scott, H. S., Ollila, J., Vihinen, M., Heino, M., Shintani, A., Kawasaki, K., Minoshima, S., Krohn, K., Antonarakis, S. E., Shimizu, N., Kudoh, J., & Peterson, P. (2000). Isolation and initial characterization of a novel zinc finger gene, DNMT3L, on 21q22.3, related to the cytosine-5-methyltransferase 3 gene family. *Genomics*, 65(3), 293-298. <https://doi.org/10.1006/geno.2000.6168>
- Abbas, A., He, X., Niu, J., Zhou, B., Zhu, G., Ma, T., Song, J., Gao, J., Zhang, M. Q., & Zeng, J. (2019). Integrating Hi-C and FISH data for modeling of the 3D organization of chromosomes. *Nature Communications*, 10(1), 2049. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-10005-6>
- Agnihotri, S., Burrell, K., Buczkowicz, P., Remke, M., Golbourn, B., Chornenkyy, Y., Gajadhar, A., Fernandez, N. A., Clarke, I. D., Barszczky, M. S., Pajovic, S., Ternamian, C., Head, R., Sabha, N., Sobol, R. W., Taylor, M. D., Rutka, J. T., Jones, C., Dirks, P. B., ... Hawkins, C. (2014). ATM Regulates 3-Methylpurine-DNA Glycosylase and Promotes Therapeutic Resistance to Alkylating Agents. *Cancer Discovery*, 4(10), 1198-1213. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-14-0157>
- Alcantara Llaguno, S. R., Wang, Z., Sun, D., Chen, J., Xu, J., Kim, E., Hatanpaa, K. J., Raisanen, J. M., Burns, D. K., Johnson, J. E., & Parada, L. F. (2015). Adult Lineage-Restricted CNS Progenitors Specify Distinct Glioblastoma Subtypes. *Cancer Cell*, 28(4), 429-440. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2015.09.007>
- Ali Syeda, Z., Langden, S. S. S., Munkhzul, C., Lee, M., & Song, S. J. (2020). Regulatory Mechanism of MicroRNA Expression in Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(5), 1723. <https://doi.org/10.3390/ijms21051723>
- Allis, C. D., Caparros, M.-L., Jenuwein, T., & Reinberg, D. (Éds.). (2015). *Epigenetics* (Second edition). CSH Press, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- An Introduction to Modern Genetics. (s. d.). Routledge & CRC Press. Consulté 26 juin 2021, à l'adresse <https://www.routledge.com/An-Introduction-to-Modern-Genetics/Waddington/p/book/9781138956964>
- Andersson, R., Gebhard, C., Miguel-Escalada, I., Hoof, I., Bornholdt, J., Boyd, M., Chen, Y., Zhao, X., Schmidl, C., Suzuki, T., Ntini, E., Arner, E., Valen, E., Li, K., Schwarzbacher, L., Glatz, D., Raithel, J., Lilje, B., Rapin, N., ... Sandelin, A. (2014). An atlas of active enhancers across human cell types and tissues. *Nature*, 507(7493), 455-461. <https://doi.org/10.1038/nature12787>
- Andersson, R., & Sandelin, A. (2020). Determinants of enhancer and promoter activities of regulatory elements. *Nature Reviews Genetics*, 21(2), 71-87. <https://doi.org/10.1038/s41576-019-0173-8>
- Antequera, F., & Bird, A. (1993). Number of CpG islands and genes in human and mouse. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(24), 11995-11999. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.24.11995>
- Areeb, Z., Stuart, S. F., West, A. J., Gomez, J., Nguyen, H. P. T., Paradiso, L., Zulkifli, A., Jones, J., Kaye, A. H., Morokoff, A. P., & Luwor, R. B. (2020). Reduced EGFR and increased miR-221 is associated with increased resistance to temozolomide and radiotherapy in glioblastoma. *Scientific Reports*, 10(1), 17768. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-74746-x>
- Arnaudo, A. M., & Garcia, B. A. (2013). Proteomic characterization of novel histone post-translational modifications. *Epigenetics & Chromatin*, 6(1), 24. <https://doi.org/10.1186/1756-8935-6-24>

- Aroui, S., Najlaoui, F., Chtourou, Y., Meunier, A.-C., Laajimi, A., Kenani, A., & Fetoui, H. (2016). Naringin inhibits the invasion and migration of human glioblastoma cell via downregulation of MMP-2 and MMP-9 expression and inactivation of p38 signaling pathway. *Tumour Biology: The Journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, 37(3), 3831-3839. <https://doi.org/10.1007/s13277-015-4230-4>
- Atlasi, Y., & Stunnenberg, H. G. (2017). The interplay of epigenetic marks during stem cell differentiation and development. *Nature Reviews Genetics*, 18(11), 643-658. <https://doi.org/10.1038/nrg.2017.57>
- Audia, J. E., & Campbell, R. M. (2016). Histone Modifications and Cancer. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 8(4), a019521. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a019521>
- Auzmendi-Iriarte, J., Saenz-Antoñanzas, A., Mikelez-Alonso, I., Carrasco-Garcia, E., Tellaetxe-Abete, M., Lawrie, C. H., Sampron, N., Cortajarena, A. L., & Matheu, A. (2020). Characterization of a new small-molecule inhibitor of HDAC6 in glioblastoma. *Cell Death & Disease*, 11(6), 417. <https://doi.org/10.1038/s41419-020-2586-x>
- Ayob, A. Z., & Ramasamy, T. S. (2018). Cancer stem cells as key drivers of tumour progression. *Journal of Biomedical Science*, 25(1), 20. <https://doi.org/10.1186/s12929-018-0426-4>
- Azuaje, F., Tiemann, K., & Niclou, S. P. (2015). Therapeutic control and resistance of the EGFR-driven signaling network in glioblastoma. *Cell Communication and Signaling*, 13(1), 23. <https://doi.org/10.1186/s12964-015-0098-6>
- Babenko, V. N., Chadaeva, I. V., & Orlov, Y. L. (2017). Genomic landscape of CpG rich elements in human. *BMC Evolutionary Biology*, 17(Suppl 1), 19. <https://doi.org/10.1186/s12862-016-0864-0>
- Bachman, M., Uribe-Lewis, S., Yang, X., Williams, M., Murrell, A., & Balasubramanian, S. (2014). 5-Hydroxymethylcytosine is a predominantly stable DNA modification. *Nature Chemistry*, 6(12), 1049-1055. <https://doi.org/10.1038/nchem.2064>
- Baek, D., Villén, J., Shin, C., Camargo, F. D., Gygi, S. P., & Bartel, D. P. (2008). The impact of microRNAs on protein output. *Nature*, 455(7209), 64-71. <https://doi.org/10.1038/nature07242>
- Baghban, R., Roshangar, L., Jahanban-Esfahlan, R., Seidi, K., Ebrahimi-Kalan, A., Jaymand, M., Kolahian, S., Javaheri, T., & Zare, P. (2020). Tumor microenvironment complexity and therapeutic implications at a glance. *Cell Communication and Signaling*, 18(1), 59. <https://doi.org/10.1186/s12964-020-0530-4>
- Bagnardi, V., Rota, M., Botteri, E., Tramacere, I., Islami, F., Fedirko, V., Scotti, L., Jenab, M., Turati, F., Pasquali, E., Pelucchi, C., Galeone, C., Bellocchio, R., Negri, E., Corrao, G., Boffetta, P., & La Vecchia, C. (2015). Alcohol consumption and site-specific cancer risk : A comprehensive dose-response meta-analysis. *British Journal of Cancer*, 112(3), 580-593. <https://doi.org/10.1038/bjc.2014.579>
- Bai, L., & Morozov, A. V. (2010). Gene regulation by nucleosome positioning. *Trends in Genetics*, 26(11), 476-483. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2010.08.003>
- Banelli, B., Carra, E., Barbieri, F., Würth, R., Parodi, F., Pattarozzi, A., Carosio, R., Forlani, A., Allemanni, G., Marubbi, D., Florio, T., Daga, A., & Romani, M. (2015). The histone demethylase KDM5A is a key factor for the resistance to temozolomide in glioblastoma. *Cell Cycle*, 14(21), 3418-3429. <https://doi.org/10.1080/15384101.2015.1090063>

- Banelli, B., Daga, A., Forlani, A., Allemanni, G., Marubbi, D., Pistillo, M. P., Profumo, A., & Romani, M. (2017). Small molecules targeting histone demethylase genes (KDMs) inhibit growth of temozolomide-resistant glioblastoma cells. *Oncotarget*, 8(21), 34896-34910. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.16820>
- Bannister, A. J., & Kouzarides, T. (2011). Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Research*, 21(3), 381-395. <https://doi.org/10.1038/cr.2011.22>
- Bao, S., Wu, Q., McLendon, R. E., Hao, Y., Shi, Q., Hjelmeland, A. B., Dewhirst, M. W., Bigner, D. D., & Rich, J. N. (2006). Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature*, 444(7120), 756-760. <https://doi.org/10.1038/nature05236>
- Barneda-Zahonero, B., & Parra, M. (2012). Histone deacetylases and cancer. *Molecular Oncology*, 6(6), 579-589. <https://doi.org/10.1016/j.molonc.2012.07.003>
- Barreto, G., Schäfer, A., Marhold, J., Stach, D., Swaminathan, S. K., Handa, V., Döderlein, G., Maltby, N., Wu, W., Lyko, F., & Niehrs, C. (2007). Gadd45a promotes epigenetic gene activation by repair-mediated DNA demethylation. *Nature*, 445(7128), 671-675. <https://doi.org/10.1038/nature05515>
- Bartel, D. P. (2009). MicroRNAs : Target Recognition and Regulatory Functions. *Cell*, 136(2), 215-233. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.01.002>
- Becker, P. B., & Workman, J. L. (2013). Nucleosome remodeling and epigenetics. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 5(9). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a017905>
- Bednar, J., Horowitz, R. A., Grigoryev, S. A., Carruthers, L. M., Hansen, J. C., Koster, A. J., & Woodcock, C. L. (1998). Nucleosomes, linker DNA, and linker histone form a unique structural motif that directs the higher-order folding and compaction of chromatin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(24), 14173-14178. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.24.14173>
- Bell, R. E., Golan, T., Sheinboim, D., Malcov, H., Amar, D., Salomon, A., Liron, T., Gelfman, S., Gabet, Y., Shamir, R., & Levy, C. (2016). Enhancer methylation dynamics contribute to cancer plasticity and patient mortality. *Genome Research*, 26(5), 601-611. <https://doi.org/10.1101/gr.197194.115>
- Berndsen, C. E., Albaugh, B. N., Tan, S., & Denu, J. M. (2007). Catalytic Mechanism of a MYST Family Histone Acetyltransferase †. *Biochemistry*, 46(3), 623-629. <https://doi.org/10.1021/bi602513x>
- Bernstein, E., Caudy, A. A., Hammond, S. M., & Hannon, G. J. (2001). Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature*, 409(6818), 363-366. <https://doi.org/10.1038/35053110>
- Black, J. C., Van Rechem, C., & Whetstone, J. R. (2012). Histone Lysine Methylation Dynamics : Establishment, Regulation, and Biological Impact. *Molecular Cell*, 48(4), 491-507. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.11.006>
- Blandin, A.-F., Cruz Da Silva, E., Mercier, M.-C., Glushonkov, O., Didier, P., Dedieu, S., Schneider, C., Devy, J., Etienne-Selloum, N., Dontenwill, M., Choulier, L., & Lehmann, M. (2021). Gefitinib induces EGFR and α5β1 integrin co-endocytosis in glioblastoma cells. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 78(6), 2949-2962. <https://doi.org/10.1007/s00018-020-03686-6>

- Boldogh, I., Ramana, C. V., Chen, Z., Biswas, T., Hazra, T. K., Grösch, S., Grombacher, T., Mitra, S., & Kaina, B. (1998). Regulation of expression of the DNA repair gene O6-methylguanine-DNA methyltransferase via protein kinase C-mediated signaling. *Cancer Research*, 58(17), 3950-3956.
- Bonev, B., Mendelson Cohen, N., Szabo, Q., Fritsch, L., Papadopoulos, G. L., Lubling, Y., Xu, X., Lv, X., Hugnot, J.-P., Tanay, A., & Cavalli, G. (2017). Multiscale 3D Genome Rewiring during Mouse Neural Development. *Cell*, 171(3), 557-572.e24. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.09.043>
- Bostick, M., Kim, J. K., Esteve, P.-O., Clark, A., Pradhan, S., & Jacobsen, S. E. (2007). UHRF1 Plays a Role in Maintaining DNA Methylation in Mammalian Cells. *Science*, 317(5845), 1760-1764. <https://doi.org/10.1126/science.1147939>
- Bozic, I., Antal, T., Ohtsuki, H., Carter, H., Kim, D., Chen, S., Karchin, R., Kinzler, K. W., Vogelstein, B., & Nowak, M. A. (2010). Accumulation of driver and passenger mutations during tumor progression. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(43), 18545-18550. <https://doi.org/10.1073/pnas.1010978107>
- Bregy, A., Shah, A. H., Diaz, M. V., Pierce, H. E., Ames, P. L., Diaz, D., & Komotar, R. J. (2013). The role of Gliadel wafers in the treatment of high-grade gliomas. *Expert Review of Anticancer Therapy*, 13(12), 1453-1461. <https://doi.org/10.1586/14737140.2013.840090>
- Brennan, C. W., Verhaak, R. G. W., McKenna, A., Campos, B., Noushmehr, H., Salama, S. R., Zheng, S., Chakravarty, D., Sanborn, J. Z., Berman, S. H., Beroukhim, R., Bernard, B., Wu, C.-J., Genovese, G., Shmulevich, I., Barnholtz-Sloan, J., Zou, L., Vegesna, R., Shukla, S. A., ... Chin, L. (2013). The Somatic Genomic Landscape of Glioblastoma. *Cell*, 155(2), 462-477. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.09.034>
- Brenner, C., Deplus, R., Didelot, C., Loriot, A., Viré, E., De Smet, C., Gutierrez, A., Danovi, D., Bernard, D., Boon, T., Giuseppe Pelicci, P., Amati, B., Kouzarides, T., de Launoit, Y., Di Croce, L., & Fuks, F. (2005). Myc represses transcription through recruitment of DNA methyltransferase corepressor. *The EMBO Journal*, 24(2), 336-346. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600509>
- Briand, J., Nadaradjane, A., Bougras-Cartron, G., Olivier, C., Vallette, F. M., & Cartron, P.-F. (2019). Diuron exposure and Akt overexpression promote glioma formation through DNA hypomethylation. *Clinical Epigenetics*, 11(1), 159. <https://doi.org/10.1186/s13148-019-0759-1>
- Briand, J., Sérandour, A. A., Nadaradjane, A., Bougras-Cartron, G., Heymann, D., Ory, B., Vallette, F. M., & Cartron, P.-F. (2020). N6-Adenosine Methylation of miRNA-200b-3p Influences Its Functionality and Is a Therapeutic Tool. *Molecular Therapy. Nucleic Acids*, 22, 72-83. <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2020.08.010>
- Briand, N., & Collas, P. (2020). Lamina-associated domains : Peripheral matters and internal affairs. *Genome Biology*, 21(1), 85. <https://doi.org/10.1186/s13059-020-02003-5>
- Brown, R., Curry, E., Magnani, L., Wilhelm-Benartzi, C. S., & Borley, J. (2014). Poised epigenetic states and acquired drug resistance in cancer. *Nature Reviews Cancer*, 14(11), 747-753. <https://doi.org/10.1038/nrc3819>
- Brownell, J. E., Zhou, J., Ranalli, T., Kobayashi, R., Edmondson, D. G., Roth, S. Y., & Allis, C. D. (1996). Tetrahymena histone acetyltransferase A : A homolog to yeast Gcn5p linking histone acetylation to gene activation. *Cell*, 84(6), 843-851. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81063-6](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81063-6)

- Buchan, J. R., & Parker, R. (2007). MOLECULAR BIOLOGY : The Two Faces of miRNA. *Science*, 318(5858), 1877-1878. <https://doi.org/10.1126/science.1152623>
- Cai, Y., Zhang, Y., Loh, Y. P., Tng, J. Q., Lim, M. C., Cao, Z., Raju, A., Lieberman Aiden, E., Li, S., Manikandan, L., Tergaonkar, V., Tucker-Kellogg, G., & Fullwood, M. J. (2021). H3K27me3-rich genomic regions can function as silencers to repress gene expression via chromatin interactions. *Nature Communications*, 12(1), 719. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-20940-y>
- Calin, G. A., Dumitru, C. D., Shimizu, M., Bichi, R., Zupo, S., Noch, E., Aldler, H., Rattan, S., Keating, M., Rai, K., Rassenti, L., Kipps, T., Negrini, M., Bullrich, F., & Croce, C. M. (2002). Nonlinear partial differential equations and applications : 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*, 99(24), 15524-15529. <https://doi.org/10.1073/pnas.242606799>
- Calo, E., & Wysocka, J. (2013). Modification of enhancer chromatin : What, how, and why? *Molecular Cell*, 49(5), 825-837. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.01.038>
- Canovas, S., & Ross, P. J. (2016). Epigenetics in preimplantation mammalian development. *Theriogenology*, 86(1), 69-79. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.04.020>
- Cantanhede, I. G., & de Oliveira, J. R. M. (2017). PDGF Family Expression in Glioblastoma Multiforme : Data Compilation from Ivy Glioblastoma Atlas Project Database. *Scientific Reports*, 7(1), 15271. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-15045-w>
- Carreón, T., Butler, M. A., Ruder, A. M., Waters, M. A., Davis-King, K. E., Calvert, G. M., Schulte, P. A., Connally, B., Ward, E. M., Sanderson, W. T., Heineman, E. F., Mandel, J. S., Morton, R. F., Reding, D. J., Rosenman, K. D., Talaska, G., & the Brain Cancer Collaborative Study Group. (2005). Gliomas and Farm Pesticide Exposure in Women : The Upper Midwest Health Study. *Environmental Health Perspectives*, 113(5), 546-551. <https://doi.org/10.1289/ehp.7456>
- Carthew, R. W., & Sontheimer, E. J. (2009). Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell*, 136(4), 642-655. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.01.035>
- Cartron, P.-F., Nadaradjane, A., Lepape, F., Lalier, L., Gardie, B., & Vallette, F. M. (2013). Identification of TET1 Partners That Control Its DNA-Demethylating Function. *Genes & Cancer*, 4(5-6), 235-241. <https://doi.org/10.1177/1947601913489020>
- Catez, F., Lim, J.-H., Hock, R., Postnikov, Y. V., & Bustin, M. (2003). HMGN dynamics and chromatin function. *Biochemistry and Cell Biology = Biochimie Et Biologie Cellulaire*, 81(3), 113-122. <https://doi.org/10.1139/o03-040>
- Cech, T. R., & Steitz, J. A. (2014). The Noncoding RNA Revolution—Trashing Old Rules to Forge New Ones. *Cell*, 157(1), 77-94. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.03.008>
- Chai, X., Guo, J., Dong, R., Yang, X., Deng, C., Wei, C., Xu, J., Han, W., Lu, J., Gao, C., Gao, D., Huang, C., Ke, A., Li, S., Li, H., Tian, Y., Gu, Z., Liu, S., Liu, H., ... Cai, J. (2021). Quantitative acetylome analysis reveals histone modifications that may predict prognosis in hepatitis B-related hepatocellular carcinoma. *Clinical and Translational Medicine*, 11(3). <https://doi.org/10.1002/ctm2.313>
- Challen, G. A., Sun, D., Mayle, A., Jeong, M., Luo, M., Rodriguez, B., Mallaney, C., Celik, H., Yang, L., Xia, Z., Cullen, S., Berg, J., Zheng, Y., Darlington, G. J., Li, W., & Goodell, M. A. (2014). Dnmt3a and Dnmt3b Have Overlapping and Distinct Functions in

Hematopoietic Stem Cells. *Cell Stem Cell*, 15(3), 350-364.  
<https://doi.org/10.1016/j.stem.2014.06.018>

Chapuy, B., McKeown, M. R., Lin, C. Y., Monti, S., Roemer, M. G. M., Qi, J., Rahl, P. B., Sun, H. H., Yeda, K. T., Doench, J. G., Reichert, E., Kung, A. L., Rodig, S. J., Young, R. A., Shipp, M. A., & Bradner, J. E. (2013). Discovery and characterization of super-enhancer-associated dependencies in diffuse large B cell lymphoma. *Cancer Cell*, 24(6), 777-790. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2013.11.003>

Charpentier, E., Corne, M., Dumont, S., Meistermann, D., Bordron, P., David, L., Redon, R., Bonnaud, S., & Bihouée, A. (2021). 3' RNA sequencing for robust and low-cost gene expression profiling [Preprint]. Protocol Exchange. <https://doi.org/10.21203/rs.3.pex-1336/v1>

Chedin, F., Lieber, M. R., & Hsieh, C.-L. (2002). The DNA methyltransferase-like protein DNMT3L stimulates de novo methylation by Dnmt3a. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(26), 16916-16921. <https://doi.org/10.1073/pnas.262443999>

Chen, C.-C., Wang, K.-Y., & Shen, C.-K. J. (2013). DNA 5-Methylcytosine Demethylation Activities of the Mammalian DNA Methyltransferases\*. *Journal of Biological Chemistry*, 288(13), 9084-9091. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.445585>

Chen, F., Luo, N., Hu, Y., Li, X., & Zhang, K. (2018). MiR-137 Suppresses Triple-Negative Breast Cancer Stemness and Tumorigenesis by Perturbing BCL11A-DNMT1 Interaction. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 47(5), 2147-2158.  
<https://doi.org/10.1159/000491526>

Chen, H.-Y., Lang, Y.-D., Lin, H.-N., Liu, Y.-R., Liao, C.-C., Nana, A. W., Yen, Y., & Chen, R.-H. (2019). MiR-103/107 prolong Wnt/β-catenin signaling and colorectal cancer stemness by targeting Axin2. *Scientific Reports*, 9(1), 9687. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-41053-z>

Chen, J., Li, Y., Yu, T.-S., McKay, R. M., Burns, D. K., Kernie, S. G., & Parada, L. F. (2012). A restricted cell population propagates glioblastoma growth after chemotherapy. *Nature*, 488(7412), 522-526. <https://doi.org/10.1038/nature11287>

Chen, R., Zhang, M., Zhou, Y., Guo, W., Yi, M., Zhang, Z., Ding, Y., & Wang, Y. (2020). The application of histone deacetylases inhibitors in glioblastoma. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 39(1), 138. <https://doi.org/10.1186/s13046-020-01643-6>

Chen, S., Yang, J., Wei, Y., & Wei, X. (2020). Epigenetic regulation of macrophages : From homeostasis maintenance to host defense. *Cellular & Molecular Immunology*, 17(1), 36-49. <https://doi.org/10.1038/s41423-019-0315-0>

Chen, T., Ueda, Y., Dodge, J. E., Wang, Z., & Li, E. (2003). Establishment and Maintenance of Genomic Methylation Patterns in Mouse Embryonic Stem Cells by Dnmt3a and Dnmt3b. *Molecular and Cellular Biology*, 23(16), 5594-5605.  
<https://doi.org/10.1128/MCB.23.16.5594-5605.2003>

Chen, X., Yang, F., Zhang, T., Wang, W., Xi, W., Li, Y., Zhang, D., Huo, Y., Zhang, J., Yang, A., & Wang, T. (2019). MiR-9 promotes tumorigenesis and angiogenesis and is activated by MYC and OCT4 in human glioma. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 38(1), 99. <https://doi.org/10.1186/s13046-019-1078-2>

Chen, X., Zhang, M., Gan, H., Wang, H., Lee, J.-H., Fang, D., Kitange, G. J., He, L., Hu, Z., Parney, I. F., Meyer, F. B., Giannini, C., Sarkaria, J. N., & Zhang, Z. (2018). A novel enhancer regulates MGMT expression and promotes temozolomide resistance in

glioblastoma. *Nature Communications*, 9(1), 2949. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05373-4>

Chen, Z., Zang, J., Whetstine, J., Hong, X., Davrazou, F., Kutateladze, T. G., Simpson, M., Mao, Q., Pan, C.-H., Dai, S., Hagman, J., Hansen, K., Shi, Y., & Zhang, G. (2006). Structural Insights into Histone Demethylation by JMJD2 Family Members. *Cell*, 125(4), 691-702. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.04.024>

Cheng, J., Xu, L., Deng, L., Xue, L., Meng, Q., Wei, F., & Wang, J. (2020). RNA N 6 -methyladenosine modification is required for miR-98/MYCN axis-mediated inhibition of neuroblastoma progression. *Scientific Reports*, 10(1), 13624. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-64682-1>

Cheng, L., Huang, Z., Zhou, W., Wu, Q., Donnola, S., Liu, J. K., Fang, X., Sloan, A. E., Mao, Y., Lathia, J. D., Min, W., McLendon, R. E., Rich, J. N., & Bao, S. (2013). Glioblastoma Stem Cells Generate Vascular Pericytes to Support Vessel Function and Tumor Growth. *Cell*, 153(1), 139-152. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.02.021>

Cheng, L., Wu, Q., Guryanova, O. A., Huang, Z., Huang, Q., Rich, J. N., & Bao, S. (2011). Elevated invasive potential of glioblastoma stem cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 406(4), 643-648. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.02.123>

Cheray, M., Etcheverry, A., Jacques, C., Pacaud, R., Bougras-Cartron, G., Aubry, M., Denoual, F., Peterlongo, P., Nadaradjane, A., Briand, J., Akcha, F., Heymann, D., Vallette, F. M., Mosser, J., Ory, B., & Cartron, P.-F. (2020). Cytosine methylation of mature microRNAs inhibits their functions and is associated with poor prognosis in glioblastoma multiforme. *Molecular Cancer*, 19(1), 36. <https://doi.org/10.1186/s12943-020-01155-z>

Cheung, N., & So, C. W. E. (2011). Transcriptional and epigenetic networks in haematological malignancy. *FEBS Letters*, 585(13), 2100-2111. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2011.03.068>

Chinot, O. L., Wick, W., Mason, W., Henriksson, R., Saran, F., Nishikawa, R., Carpentier, A. F., Hoang-Xuan, K., Kavan, P., Cernea, D., Brandes, A. A., Hilton, M., Abrey, L., & Cloughesy, T. (2014). Bevacizumab plus Radiotherapy-Temozolomide for Newly Diagnosed Glioblastoma. *New England Journal of Medicine*, 370(8), 709-722. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1308345>

Cho, J.-W., Hong, M. H., Ha, S.-J., Kim, Y.-J., Cho, B. C., Lee, I., & Kim, H. R. (2020). Genome-wide identification of differentially methylated promoters and enhancers associated with response to anti-PD-1 therapy in non-small cell lung cancer. *Experimental & Molecular Medicine*, 52(9), 1550-1563. <https://doi.org/10.1038/s12276-020-00493-8>

Christman, J. K. (2002). 5-Azacytidine and 5-aza-2'-deoxycytidine as inhibitors of DNA methylation : Mechanistic studies and their implications for cancer therapy. *Oncogene*, 21(35), 5483-5495. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1205699>

Ciechomska, I. A., Marciniak, M. P., Jackl, J., & Kaminska, B. (2018). Pre-treatment or Post-treatment of Human Glioma Cells With BIX01294, the Inhibitor of Histone Methyltransferase G9a, Sensitizes Cells to Temozolomide. *Frontiers in Pharmacology*, 9, 1271. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.01271>

Clements, E. G., Mohammad, H. P., Leadem, B. R., Easwaran, H., Cai, Y., Van Neste, L., & Baylin, S. B. (2012). DNMT1 modulates gene expression without its catalytic activity partially through its interactions with histone-modifying enzymes. *Nucleic Acids Research*, 40(10), 4334-4346. <https://doi.org/10.1093/nar/gks031>

- Costa, Y., Ding, J., Theunissen, T. W., Faiola, F., Hore, T. A., Shliaha, P. V., Fidalgo, M., Saunders, A., Lawrence, M., Dietmann, S., Das, S., Levasseur, D. N., Li, Z., Xu, M., Reik, W., Silva, J. C. R., & Wang, J. (2013). NANOG-dependent function of TET1 and TET2 in establishment of pluripotency. *Nature*, 495(7441), 370-374. <https://doi.org/10.1038/nature11925>
- Court, F., Le Boiteux, E., Fogli, A., Müller-Barthélémy, M., Vaurs-Barrière, C., Chautard, E., Pereira, B., Biau, J., Kemeny, J.-L., Khalil, T., Karayan-Tapon, L., Verrelle, P., & Arnaud, P. (2019). Transcriptional alterations in glioma result primarily from DNA methylation-independent mechanisms. *Genome Research*, 29(10), 1605-1621. <https://doi.org/10.1101/gr.249219.119>
- Crick, F. H. (1958). On protein synthesis. *Symposia of the Society for Experimental Biology*, 12, 138-163.
- Crump, N. T., Ballabio, E., Godfrey, L., Thorne, R., Repapi, E., Kerry, J., Tapia, M., Hua, P., Lagerholm, C., Filippakopoulos, P., Davies, J. O. J., & Milne, T. A. (2021). BET inhibition disrupts transcription but retains enhancer-promoter contact. *Nature Communications*, 12(1), 223. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-20400-z>
- Cruz Da Silva, E., Mercier, M.-C., Etienne-Selloum, N., Dontenwill, M., & Choulier, L. (2021). A Systematic Review of Glioblastoma-Targeted Therapies in Phases II, III, IV Clinical Trials. *Cancers*, 13(8), 1795. <https://doi.org/10.3390/cancers13081795>
- Cui, X.-L., Nie, J., Ku, J., Dougherty, U., West-Szymanski, D. C., Collin, F., Ellison, C. K., Sieh, L., Ning, Y., Deng, Z., Zhao, C. W. T., Bergamaschi, A., Pekow, J., Wei, J., Beadell, A. V., Zhang, Z., Sharma, G., Talwar, R., Arendorf, P., ... He, C. (2020). A human tissue map of 5-hydroxymethylcytosines exhibits tissue specificity through gene and enhancer modulation. *Nature Communications*, 11(1), 6161. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-20001-w>
- Dagogo-Jack, I., & Shaw, A. T. (2018). Tumour heterogeneity and resistance to cancer therapies. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 15(2), 81-94. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2017.166>
- Danson, S. J., & Middleton, M. R. (2001). Temozolomide : A novel oral alkylating agent. *Expert Review of Anticancer Therapy*, 1(1), 13-19. <https://doi.org/10.1586/14737140.1.1.13>
- Darlix, A., Zouaoui, S., Rigau, V., Bessaoud, F., Figarella-Branger, D., Mathieu-Daudé, H., Trétarre, B., Bauchet, F., Duffau, H., Taillandier, L., & Bauchet, L. (2017). Epidemiology for primary brain tumors : A nationwide population-based study. *Journal of Neuro-Oncology*, 131(3), 525-546. <https://doi.org/10.1007/s11060-016-2318-3>
- D'Asti, E., Chennakrishnaiah, S., Lee, T. H., & Rak, J. (2016). Extracellular Vesicles in Brain Tumor Progression. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 36(3), 383-407. <https://doi.org/10.1007/s10571-015-0296-1>
- Datta, N., Chakraborty, S., Basu, M., & Ghosh, M. K. (2021). Tumor Suppressors Having Oncogenic Functions : The Double Agents. *Cells*, 10(1), 46. <https://doi.org/10.3390/cells10010046>
- De Angelis, M. L., Francescangeli, F., La Torre, F., & Zeuner, A. (2019). Stem Cell Plasticity and Dormancy in the Development of Cancer Therapy Resistance. *Frontiers in Oncology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00626>

- De Paolis, V., Lorefice, E., Orecchini, E., Carissimi, C., Laudadio, I., & Fulci, V. (2021). Epitranscriptomics : A New Layer of microRNA Regulation in Cancer. *Cancers*, 13(13), 3372. <https://doi.org/10.3390/cancers13133372>
- De Pergola, G., & Silvestris, F. (2013). Obesity as a Major Risk Factor for Cancer. *Journal of Obesity*, 2013, 291546. <https://doi.org/10.1155/2013/291546>
- Deaton, A. M., & Bird, A. (2011). CpG islands and the regulation of transcription. *Genes & Development*, 25(10), 1010-1022. <https://doi.org/10.1101/gad.2037511>
- Debruyne, D. N., Dries, R., Sengupta, S., Seruggia, D., Gao, Y., Sharma, B., Huang, H., Moreau, L., McLane, M., Day, D. S., Marco, E., Chen, T., Gray, N. S., Wong, K.-K., Orkin, S. H., Yuan, G.-C., Young, R. A., & George, R. E. (2019). BORIS promotes chromatin regulatory interactions in treatment-resistant cancer cells. *Nature*, 572(7771), 676-680. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1472-0>
- DeCordova, S., Shastri, A., Tsolaki, A. G., Yasmin, H., Klein, L., Singh, S. K., & Kishore, U. (2020). Molecular Heterogeneity and Immunosuppressive Microenvironment in Glioblastoma. *Frontiers in Immunology*, 11, 1402. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01402>
- de Oliveria Andrade, L. J., D'Oliveira, A., Melo, R. C., De Souza, E. C., Costa Silva, C. A., & Paraná, R. (2009). Association Between Hepatitis C and Hepatocellular Carcinoma. *Journal of Global Infectious Diseases*, 1(1), 33-37. <https://doi.org/10.4103/0974-777X.52979>
- Department of Medical Oncology, Centro Hospitalar de São João, Porto, Portugal, Fernandes, C., Costa, A., Department of Medical Oncology, Centro Hospitalar de São João, Porto, Portugal, Osório, L., Department of Radiotherapy, Centro Hospitalar de São João, Porto, Portugal, Lago, R. C., Department of Radiotherapy, Centro Hospitalar de São João, Porto, Portugal, Linhares, P., Department of Neurosurgery, Centro Hospitalar de São João, Porto, Portugal, Faculty of Medicine of the University of Porto, Portugal, Carvalho, B., Department of Neurosurgery, Centro Hospitalar de São João, Porto, Portugal, Faculty of Medicine of the University of Porto, Portugal, Caeiro, C., & Department of Medical Oncology, Centro Hospitalar de São João, Porto, Portugal. (2017). Current Standards of Care in Glioblastoma Therapy. In Department of Neurosurgery, University Hospitals Leuven, Leuven, Belgium & S. De Vleeschouwer (Eds.), *Glioblastoma* (p. 197-241). Codon Publications. <https://doi.org/10.15586/codon.glioblastoma.2017.ch11>
- DeRoetth, A. (1969). Cryosurgery for glaucoma. *Transactions - American Academy of Ophthalmology and Otolaryngology*. American Academy of Ophthalmology and Otolaryngology, 73(6), 1041-1043.
- de Souza, C. F., Sabedot, T. S., Malta, T. M., Stetson, L., Morozova, O., Sokolov, A., Laird, P. W., Wiznerowicz, M., Iavarone, A., Snyder, J., deCarvalho, A., Sanborn, Z., McDonald, K. L., Friedman, W. A., Tirapelli, D., Poisson, L., Mikkelsen, T., Carlotti, C. G., Kalkanis, S., ... Noushmehr, H. (2018). A Distinct DNA Methylation Shift in a Subset of Glioma CpG Island Methylator Phenotypes during Tumor Recurrence. *Cell Reports*, 23(2), 637-651. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.03.107>
- Di Cerbo, V., & Schneider, R. (2013). Cancers with wrong HATs : The impact of acetylation. *Briefings in Functional Genomics*, 12(3), 231-243. <https://doi.org/10.1093/bfgp/els065>
- Di Croce, L. (2002). Methyltransferase Recruitment and DNA Hypermethylation of Target Promoters by an Oncogenic Transcription Factor. *Science*, 295(5557), 1079-1082. <https://doi.org/10.1126/science.1065173>

- Dillon, S. C., Zhang, X., Trievel, R. C., & Cheng, X. (2005). [No title found]. *Genome Biology*, 6(8), 227. <https://doi.org/10.1186/gb-2005-6-8-227>
- Dirkse, A., Golebiewska, A., Buder, T., Nazarov, P. V., Muller, A., Poovathingal, S., Brons, N. H. C., Leite, S., Sauvageot, N., Sarkisjan, D., Seyfrid, M., Fritah, S., Stieber, D., Michelucci, A., Hertel, F., Herold-Mende, C., Azuaje, F., Skupin, A., Bjerkvig, R., ... Niclou, S. P. (2019). Stem cell-associated heterogeneity in Glioblastoma results from intrinsic tumor plasticity shaped by the microenvironment. *Nature Communications*, 10(1), 1787. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-09853-z>
- Dixon, J. R., Selvaraj, S., Yue, F., Kim, A., Li, Y., Shen, Y., Hu, M., Liu, J. S., & Ren, B. (2012). Topological domains in mammalian genomes identified by analysis of chromatin interactions. *Nature*, 485(7398), 376-380. <https://doi.org/10.1038/nature11082>
- Doench, J. G., Fusi, N., Sullender, M., Hegde, M., Vaimberg, E. W., Donovan, K. F., Smith, I., Tothova, Z., Wilen, C., Orchard, R., Virgin, H. W., Listgarten, J., & Root, D. E. (2016). Optimized sgRNA design to maximize activity and minimize off-target effects of CRISPR-Cas9. *Nature Biotechnology*, 34(2), 184-191. <https://doi.org/10.1038/nbt.3437>
- Doi, A., Park, I.-H., Wen, B., Murakami, P., Aryee, M. J., Irizarry, R., Herb, B., Ladd-Acosta, C., Rho, J., Loewer, S., Miller, J., Schlaeger, T., Daley, G. Q., & Feinberg, A. P. (2009). Differential methylation of tissue- and cancer-specific CpG island shores distinguishes human induced pluripotent stem cells, embryonic stem cells and fibroblasts. *Nature Genetics*, 41(12), 1350-1353. <https://doi.org/10.1038/ng.471>
- Dong, S. M., Kim, H. S., Rha, S. H., & Sidransky, D. (2001). Promoter hypermethylation of multiple genes in carcinoma of the uterine cervix. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 7(7), 1982-1986.
- Doroshow, D. B., Eder, J. P., & LoRusso, P. M. (2017). BET inhibitors : A novel epigenetic approach. *Annals of Oncology*, 28(8), 1776-1787. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdx157>
- Du, R., Petritsch, C., Lu, K., Liu, P., Haller, A., Ganss, R., Song, H., Vandenberg, S., & Bergers, G. (2008). Matrix metalloproteinase-2 regulates vascular patterning and growth affecting tumor cell survival and invasion in GBM. *Neuro-Oncology*, 10(3), 254-264. <https://doi.org/10.1215/15228517-2008-001>
- Duforestel, M., Briand, J., Bougras-Cartron, G., Heymann, D., Frenel, J.-S., Vallette, F. M., & Cartron, P.-F. (2020). Cell-free circulating epimarks in cancer monitoring. *Epigenomics*, 12(2), 145-155. <https://doi.org/10.2217/epi-2019-0170>
- Duforestel, M., Nadaradjane, A., Bougras-Cartron, G., Briand, J., Olivier, C., Frenel, J.-S., Vallette, F. M., Lelièvre, S. A., & Cartron, P.-F. (2019). Glyphosate Primes Mammary Cells for Tumorigenesis by Reprogramming the Epigenome in a TET3-Dependent Manner. *Frontiers in Genetics*, 10, 885. <https://doi.org/10.3389/fgene.2019.00885>
- Dunn, J., Baborie, A., Alam, F., Joyce, K., Moxham, M., Sibson, R., Crooks, D., Husband, D., Shenoy, A., Brodbelt, A., Wong, H., Liloglou, T., Haylock, B., & Walker, C. (2009). Extent of MGMT promoter methylation correlates with outcome in glioblastomas given temozolamide and radiotherapy. *British Journal of Cancer*, 101(1), 124-131. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6605127>
- Duymich, C. E., Charlet, J., Yang, X., Jones, P. A., & Liang, G. (2016). DNMT3B isoforms without catalytic activity stimulate gene body methylation as accessory proteins in somatic cells. *Nature Communications*, 7(1), 11453. <https://doi.org/10.1038/ncomms11453>

- Easwaran, H., Tsai, H.-C., & Baylin, S. B. (2014). Cancer epigenetics : Tumor heterogeneity, plasticity of stem-like states, and drug resistance. *Molecular Cell*, 54(5), 716-727. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.05.015>
- Eckhardt, F., Lewin, J., Cortese, R., Rakyan, V. K., Attwood, J., Burger, M., Burton, J., Cox, T. V., Davies, R., Down, T. A., Haefliger, C., Horton, R., Howe, K., Jackson, D. K., Kunde, J., Koenig, C., Liddle, J., Niblett, D., Otto, T., ... Beck, S. (2006). DNA methylation profiling of human chromosomes 6, 20 and 22. *Nature Genetics*, 38(12), 1378-1385. <https://doi.org/10.1038/ng1909>
- Eden, A. (2003). Chromosomal Instability and Tumors Promoted by DNA Hypomethylation. *Science*, 300(5618), 455-455. <https://doi.org/10.1126/science.1083557>
- Edwards, J. R., Yarychkivska, O., Boulard, M., & Bestor, T. H. (2017). DNA methylation and DNA methyltransferases. *Epigenetics & Chromatin*, 10(1), 23. <https://doi.org/10.1186/s13072-017-0130-8>
- Ehrlich, M. (2009). DNA hypomethylation in cancer cells. *Epigenomics*, 1(2), 239-259. <https://doi.org/10.2217/epi.09.33>
- Ellinger, J., Schneider, A.-C., Bachmann, A., Kristiansen, G., Müller, S. C., & Rogenhofer, S. (2016). Evaluation of Global Histone Acetylation Levels in Bladder Cancer Patients. *Anticancer Research*, 36(8), 3961-3964.
- Elliott, E. N., Sheaffer, K. L., & Kaestner, K. H. (s. d.). The 'de novo' DNA methyltransferase Dnmt3b compensates the Dnmt1-deficient intestinal epithelium. *eLife*, 5, e12975. <https://doi.org/10.7554/eLife.12975>
- EPITRANSCRIPTOMICS. (2021). SPRINGER NATURE.
- Estève, P.-O., Chang, Y., Samaranayake, M., Upadhyay, A. K., Horton, J. R., Feehery, G. R., Cheng, X., & Pradhan, S. (2011). A methylation and phosphorylation switch between an adjacent lysine and serine determines human DNMT1 stability. *Nature Structural & Molecular Biology*, 18(1), 42-48. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1939>
- Esteve, P.-O., Chin, H. G., Smallwood, A., Feehery, G. R., Gangisetty, O., Karpf, A. R., Carey, M. F., & Pradhan, S. (2006). Direct interaction between DNMT1 and G9a coordinates DNA and histone methylation during replication. *Genes & Development*, 20(22), 3089-3103. <https://doi.org/10.1101/gad.1463706>
- Estruch, S. B., Buzón, V., Carbó, L. R., Schorova, L., Lüders, J., & Estébanez-Perpiñá, E. (2012). The oncoprotein BCL11A binds to orphan nuclear receptor TLX and potentiates its transrepressive function. *PloS One*, 7(6), e37963. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0037963>
- Fabbri, M., Paone, A., Calore, F., Galli, R., Gaudio, E., Santhanam, R., Lovat, F., Fadda, P., Mao, C., Nuovo, G. J., Zanesi, N., Crawford, M., Ozer, G. H., Wernicke, D., Alder, H., Caligiuri, M. A., Nana-Sinkam, P., Perrotti, D., & Croce, C. M. (2012). MicroRNAs bind to Toll-like receptors to induce prometastatic inflammatory response. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(31), E2110-E2116. <https://doi.org/10.1073/pnas.1209414109>
- Fahmueller, Y. N., Nagel, D., Hoffmann, R.-T., Tatsch, K., Jakobs, T., Stieber, P., & Holdenrieder, S. (2012). Predictive and prognostic value of circulating nucleosomes and serum biomarkers in patients with metastasized colorectal cancer undergoing Selective Internal Radiation Therapy. *BMC Cancer*, 12(1), 5. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-12-5>

- Fahrner, J. A., Eguchi, S., Herman, J. G., & Baylin, S. B. (2002). Dependence of histone modifications and gene expression on DNA hypermethylation in cancer. *Cancer Research*, 62(24), 7213-7218.
- Fane, M., & Weeraratna, A. T. (2020). How the ageing microenvironment influences tumour progression. *Nature Reviews Cancer*, 20(2), 89-106. <https://doi.org/10.1038/s41568-019-0222-9>
- Farc, O., & Cristea, V. (2020). An overview of the tumor microenvironment, from cells to complex networks (Review). *Experimental and Therapeutic Medicine*, 21(1), 96. <https://doi.org/10.3892/etm.2020.9528>
- Feinberg, A. P., & Irizarry, R. A. (2010). Stochastic epigenetic variation as a driving force of development, evolutionary adaptation, and disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(suppl\_1), 1757-1764. <https://doi.org/10.1073/pnas.0906183107>
- Feinberg, A. P., Ohlsson, R., & Henikoff, S. (2006). The epigenetic progenitor origin of human cancer. *Nature Reviews Genetics*, 7(1), 21-33. <https://doi.org/10.1038/nrg1748>
- Feinberg, A. P., & Vogelstein, B. (1983). Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts. *Nature*, 301(5895), 89-92. <https://doi.org/10.1038/301089a0>
- Feldheim, J., Kessler, A. F., Monoranu, C. M., Ernestus, R.-I., Löhr, M., & Hagemann, C. (2019). Changes of O6-Methylguanine DNA Methyltransferase (MGMT) Promoter Methylation in Glioblastoma Relapse—A Meta-Analysis Type Literature Review. *Cancers*, 11(12), 1837. <https://doi.org/10.3390/cancers11121837>
- Feng, Q., Wang, H., Ng, H. H., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Struhl, K., & Zhang, Y. (2002). Methylation of H3-Lysine 79 Is Mediated by a New Family of HMTases without a SET Domain. *Current Biology*, 12(12), 1052-1058. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(02\)00901-6](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(02)00901-6)
- Feng, Y., Xie, N.-B., Tao, W.-B., Ding, J.-H., You, X.-J., Ma, C.-J., Zhang, X., Yi, C., Zhou, X., Yuan, B.-F., & Feng, Y.-Q. (2021). Transformation of 5-Carboxylcytosine to Cytosine Through C–C Bond Cleavage in Human Cells Constitutes a Novel Pathway for DNA Demethylation. *CCS Chemistry*, 3(4), 994-1008. <https://doi.org/10.31635/ccschem.020.202000286>
- Ferlay, J., Ervik, M., Lam, F., Colombet, M., Mery, L., Piñeros, M., Znaor, A., Soerjomataram, I., & Bray, F. (2018). *Cancer Today (powered by GLOBOCAN 2018)*. IARC CancerBase No. 15.
- Fernandez, A. F., Assenov, Y., Martin-Subero, J. I., Balint, B., Siebert, R., Taniguchi, H., Yamamoto, H., Hidalgo, M., Tan, A.-C., Galm, O., Ferrer, I., Sanchez-Cespedes, M., Villanueva, A., Carmona, J., Sanchez-Mut, J. V., Berdasco, M., Moreno, V., Capella, G., Monk, D., ... Esteller, M. (2012). A DNA methylation fingerprint of 1628 human samples. *Genome Research*, 22(2), 407-419. <https://doi.org/10.1101/gr.119867.110>
- Fiorentino, F., Mai, A., & Rotili, D. (2020). Chapter 3—HAT inhibitors in cancer therapy. In P. Castelo-Branco & C. Jeronimo (Éds.), *Histone Modifications in Therapy* (Vol. 20, p. 51-80). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816422-8.00003-9>
- Fisher, J. L., Schwartzbaum, J. A., Wrensch, M., & Wiemels, J. L. (2007). Epidemiology of Brain Tumors. *Neurologic Clinics*, 25(4), 867-890. <https://doi.org/10.1016/j.ncl.2007.07.002>

Fraga, M. F., Ballestar, E., Villar-Garea, A., Boix-Chornet, M., Espada, J., Schotta, G., Bonaldi, T., Haydon, C., Ropero, S., Petrie, K., Iyer, N. G., Pérez-Rosado, A., Calvo, E., Lopez, J. A., Cano, A., Calasanz, M. J., Colomer, D., Piris, M. A., Ahn, N., ... Esteller, M. (2005). Loss of acetylation at Lys16 and trimethylation at Lys20 of histone H4 is a common hallmark of human cancer. *Nature Genetics*, 37(4), 391-400.  
<https://doi.org/10.1038/ng1531>

Frenel, J.-S., Cartron, P.-F., Gourmelon, C., Campion, L., Aumont, M., Augereau, P., Ducray, F., Loussouarn, D., Lallier, L., Robert, M., & Campone, M. (2020). 370MO FOLAGLI : A phase I study of folinic acid combined with temozolamide and radiotherapy to modulate MGMT gene promoter methylation in newly diagnosed MGMT non-methylated glioblastoma. *Annals of Oncology*, 31, S400.  
<https://doi.org/10.1016/j.annonc.2020.08.479>

Friedman, H. S., Prados, M. D., Wen, P. Y., Mikkelsen, T., Schiff, D., Abrey, L. E., Yung, W. K. A., Paleologos, N., Nicholas, M. K., Jensen, R., Vredenburgh, J., Huang, J., Zheng, M., & Cloughesy, T. (2009). Bevacizumab Alone and in Combination With Irinotecan in Recurrent Glioblastoma. *Journal of Clinical Oncology*, 27(28), 4733-4740.  
<https://doi.org/10.1200/JCO.2008.19.8721>

Fuks, F. (2003). The DNA methyltransferases associate with HP1 and the SUV39H1 histone methyltransferase. *Nucleic Acids Research*, 31(9), 2305-2312.  
<https://doi.org/10.1093/nar/gkg332>

Fuks, F., Burgers, W. A., Brehm, A., Hughes-Davies, L., & Kouzarides, T. (2000). DNA methyltransferase Dnmt1 associates with histone deacetylase activity. *Nature Genetics*, 24(1), 88-91. <https://doi.org/10.1038/71750>

Füller, M., Klein, M., Schmidt, E., Rohde, C., Göllner, S., Schulze, I., Qianli, J., Berdel, W. E., Edemir, B., Müller-Tidow, C., & Tschanter, P. (2015). 5-Azacytidine enhances efficacy of multiple chemotherapy drugs in AML and lung cancer with modulation of CpG methylation. *International Journal of Oncology*, 46(3), 1192-1204.  
<https://doi.org/10.3892/ijo.2014.2792>

Gade, I. S., Richard, T. S., Chadeneau, C., Seite, P., Vannier, B., Atchade, A. de T., Seke Etet, P. F., Talla, E., Nwabo Kamdje, A. H., & Muller, J.-M. (2021). Anticancer Activity of Combretum fragrans F. Hoffm on Glioblastoma and Prostate Cancer Cell Lines. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 22(4), 1087-1093.  
<https://doi.org/10.31557/APJCP.2021.22.4.1087>

Gallego, O. (2015). Nonsurgical Treatment of Recurrent Glioblastoma. *Current Oncology*, 22(4), 273-281. <https://doi.org/10.3747/co.22.2436>

Galli, R., Binda, E., Orfanelli, U., Cipelletti, B., Gritti, A., De Vitis, S., Fiocco, R., Foroni, C., Dimeco, F., & Vescovi, A. (2004). Isolation and characterization of tumorigenic, stem-like neural precursors from human glioblastoma. *Cancer Research*, 64(19), 7011-7021.  
<https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-1364>

Gao, L., Emperle, M., Guo, Y., Grimm, S. A., Ren, W., Adam, S., Uryu, H., Zhang, Z.-M., Chen, D., Yin, J., Dukatz, M., Anteneh, H., Jurkowska, R. Z., Lu, J., Wang, Y., Bashtrykov, P., Wade, P. A., Wang, G. G., Jeltsch, A., & Song, J. (2020). Comprehensive structure-function characterization of DNMT3B and DNMT3A reveals distinctive de novo DNA methylation mechanisms. *Nature Communications*, 11(1), 3355.  
<https://doi.org/10.1038/s41467-020-17109-4>

Gasparello, J., Fabbri, E., Bianchi, N., Breveglieri, G., Zuccato, C., Borgatti, M., Gambari, R., & Finotti, A. (2017). BCL11A mRNA Targeting by miR-210 : A Possible Network Regulating

$\gamma$ -Globin Gene Expression. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(12), E2530. <https://doi.org/10.3390/ijms18122530>

Gaudet, F., Hodgson, J. G., Eden, A., Jackson-Grusby, L., Dausman, J., Gray, J. W., Leonhardt, H., & Jaenisch, R. (2003). Induction of tumors in mice by genomic hypomethylation. *Science (New York, N.Y.)*, 300(5618), 489-492. <https://doi.org/10.1126/science.1083558>

Ghazi, S. O., Stark, M., Zhao, Z., Mobley, B. C., Munden, A., Hover, L., & Abel, T. W. (2012). Cell of Origin Determines Tumor Phenotype in an Oncogenic Ras/p53 Knockout Transgenic Model of High-Grade Glioma. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 71(8), 729-740. <https://doi.org/10.1097/NEN.0b013e3182625c02>

Gheidari, F., Arefian, E., Adegani, F. J., Kalhori, M. R., Seyedjafari, E., Kabiri, M., Teimoori-Toolabi, L., & Soleimani, M. (2021). MiR-424 induces apoptosis in glioblastoma cells and targets AKT1 and RAF1 oncogenes from the ERBB signaling pathway. *European Journal of Pharmacology*, 906, 174273. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2021.174273>

Glaich, O., Parikh, S., Bell, R. E., Mekahel, K., Donyo, M., Leader, Y., Shayevitch, R., Sheinboim, D., Yannai, S., Hollander, D., Melamed, Z., Lev-Maor, G., Ast, G., & Levy, C. (2019). DNA methylation directs microRNA biogenesis in mammalian cells. *Nature Communications*, 10(1), 5657. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13527-1>

Goljanek-Whysall, K., Pais, H., Rathjen, T., Sweetman, D., Dalmary, T., & Münsterberg, A. (2012). Regulation of multiple target genes by miR-1 and miR-206 is pivotal for C2C12 myoblast differentiation. *Journal of Cell Science*, 125(15), 3590-3600. <https://doi.org/10.1242/jcs.101758>

Goll, M. G., Kirpekar, F., Maggert, K. A., Yoder, J. A., Hsieh, C.-L., Zhang, X., Golic, K. G., Jacobsen, S. E., & Bestor, T. H. (2006). Methylation of tRNA<sup>Asp</sup> by the DNA Methyltransferase Homolog Dnmt2. *Science*, 311(5759), 395-398. <https://doi.org/10.1126/science.1120976>

Gourlay, J., Morokoff, A. P., Luwor, R. B., Zhu, H.-J., Kaye, A. H., & Stylli, S. S. (2017). The emergent role of exosomes in glioma. *Journal of Clinical Neuroscience*, 35, 13-23. <https://doi.org/10.1016/j.jocn.2016.09.021>

Gowher, H., Liebert, K., Hermann, A., Xu, G., & Jeltsch, A. (2005). Mechanism of Stimulation of Catalytic Activity of Dnmt3A and Dnmt3B DNA-(cytosine-C5)-methyltransferases by Dnmt3L. *Journal of Biological Chemistry*, 280(14), 13341-13348. <https://doi.org/10.1074/jbc.M413412200>

Gräff, J., & Tsai, L.-H. (2013). Histone acetylation : Molecular mnemonics on the chromatin. *Nature Reviews Neuroscience*, 14(2), 97-111. <https://doi.org/10.1038/nrn3427>

Greten, F. R. (2017). Tumour stem-cell surprises. *Nature*, 543(7647), 626-627. <https://doi.org/10.1038/543626a>

Greville, G., Llop, E., Howard, J., Madden, S. F., Perry, A. S., Peracaula, R., Rudd, P. M., McCann, A., & Saldova, R. (2021). 5-AZA-dC induces epigenetic changes associated with modified glycosylation of secreted glycoproteins and increased EMT and migration in chemo-sensitive cancer cells. *Clinical Epigenetics*, 13(1), 34. <https://doi.org/10.1186/s13148-021-01015-7>

Guenther, M. G., Levine, S. S., Boyer, L. A., Jaenisch, R., & Young, R. A. (2007). A Chromatin Landmark and Transcription Initiation at Most Promoters in Human Cells. *Cell*, 130(1), 77-88. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.05.042>

- Guillemette, B., Drogaris, P., Lin, H.-H. S., Armstrong, H., Hiragami-Hamada, K., Imhof, A., Bonneil, É., Thibault, P., Verreault, A., & Festenstein, R. J. (2011). H3 Lysine 4 Is Acetylated at Active Gene Promoters and Is Regulated by H3 Lysine 4 Methylation. *PLoS Genetics*, 7(3), e1001354. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1001354>
- Gujar, H., Weisenberger, D. J., & Liang, G. (2019). The Roles of Human DNA Methyltransferases and Their Isoforms in Shaping the Epigenome. *Genes*, 10(2), 172. <https://doi.org/10.3390/genes10020172>
- Guo, G., Sun, Y., Hong, R., Xiong, J., Lu, Y., Liu, Y., Lu, J., Zhang, Z., Guo, C., Nan, Y., & Huang, Q. (2020). IKBKE enhances TMZ-chemoresistance through upregulation of MGMT expression in glioblastoma. *Clinical and Translational Oncology*, 22(8), 1252-1262. <https://doi.org/10.1007/s12094-019-02251-3>
- Hajkova, P., Erhardt, S., Lane, N., Haaf, T., El-Maarri, O., Reik, W., Walter, J., & Surani, M. A. (2002). Epigenetic reprogramming in mouse primordial germ cells. *Mechanisms of Development*, 117(1-2), 15-23. [https://doi.org/10.1016/S0925-4773\(02\)00181-8](https://doi.org/10.1016/S0925-4773(02)00181-8)
- Han, J., Zhang, Z., & Wang, K. (2018). 3C and 3C-based techniques : The powerful tools for spatial genome organization deciphering. *Molecular Cytogenetics*, 11. <https://doi.org/10.1186/s13039-018-0368-2>
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of Cancer : The Next Generation. *Cell*, 144(5), 646-674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- Hanif, F., Muzaffar, K., Perveen, kahkashan, Malhi, S., & Simjee, S. (2017). Glioblastoma Multiforme : A Review of its Epidemiology and Pathogenesis through Clinical Presentation and Treatment. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 18(1). <https://doi.org/10.22034/APJCP.2017.18.1.3>
- Harden, S. V., Tokumaru, Y., Westra, W. H., Goodman, S., Ahrendt, S. A., Yang, S. C., & Sidransky, D. (2003). Gene promoter hypermethylation in tumors and lymph nodes of stage I lung cancer patients. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 9(4), 1370-1375.
- Harder, B. G., Peng, S., Sereduk, C. P., Sodoma, A. M., Kitange, G. J., Loftus, J. C., Sarkaria, J. N., & Tran, N. L. (2019). Inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase by PX-866 suppresses temozolomide-induced autophagy and promotes apoptosis in glioblastoma cells. *Molecular Medicine*, 25(1), 49. <https://doi.org/10.1186/s10020-019-0116-z>
- Harmouch, E., Seitlinger, J., Chaddad, H., Ubeaud-Sequier, G., Barths, J., Saidu, S., Désaubry, L., Grandemange, S., Massfelder, T., Fuhrmann, G., Fioretti, F., Dontenwill, M., Benkirane-Jessel, N., & Idoux-Gillet, Y. (2020). Flavagline synthetic derivative induces senescence in glioblastoma cancer cells without being toxic to healthy astrocytes. *Scientific Reports*, 10(1), 13750. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-70820-6>
- Head, J. A. (2014). Patterns of DNA Methylation in Animals : An Ecotoxicological Perspective. *Integrative and Comparative Biology*, 54(1), 77-86. <https://doi.org/10.1093/icb/icu025>
- Hegi, M. E., Diserens, A.-C., Gorlia, T., Hamou, M.-F., de Tribolet, N., Weller, M., Kros, J. M., Hainfellner, J. A., Mason, W., Mariani, L., Bromberg, J. E. C., Hau, P., Mirimanoff, R. O., Cairncross, J. G., Janzer, R. C., & Stupp, R. (2005). MGMT Gene Silencing and Benefit from Temozolomide in Glioblastoma. *New England Journal of Medicine*, 352(10), 997-1003. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa043331>
- Heintzman, N. D., Stuart, R. K., Hon, G., Fu, Y., Ching, C. W., Hawkins, R. D., Barrera, L. O., Van Calcar, S., Qu, C., Ching, K. A., Wang, W., Weng, Z., Green, R. D., Crawford, G. E., &

- Ren, B. (2007). Distinct and predictive chromatin signatures of transcriptional promoters and enhancers in the human genome. *Nature Genetics*, 39(3), 311-318. <https://doi.org/10.1038/ng1966>
- Hellman, A., & Chess, A. (2007). Gene Body-Specific Methylation on the Active X Chromosome. *Science*, 315(5815), 1141-1143. <https://doi.org/10.1126/science.1136352>
- Helwak, A., Kudla, G., Dudnakova, T., & Tolliver, D. (2013). Mapping the Human miRNA Interactome by CLASH Reveals Frequent Noncanonical Binding. *Cell*, 153(3), 654-665. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.03.043>
- Herman, J. G., & Baylin, S. B. (2003). Gene Silencing in Cancer in Association with Promoter Hypermethylation. *New England Journal of Medicine*, 349(21), 2042-2054. <https://doi.org/10.1056/NEJMra023075>
- Hervouet, E., Lalier, L., Debien, E., Cheray, M., Geairon, A., Rogniaux, H., Loussouarn, D., Martin, S. A., Vallette, F. M., & Cartron, P.-F. (2010). Disruption of Dnmt1/PCNA/UHRF1 Interactions Promotes Tumorigenesis from Human and Mice Glial Cells. *PLOS ONE*, 5(6), e11333. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011333>
- Hervouet, E., Nadaradjane, A., Gueguen, M., Vallette, F. M., & Cartron, P.-F. (2012). Kinetics of DNA methylation inheritance by the Dnmt1-including complexes during the cell cycle. *Cell Division*, 7, 5. <https://doi.org/10.1186/1747-1028-7-5>
- Hervouet, E., Peixoto, P., Delage-Mourroux, R., Boyer-Guittaut, M., & Cartron, P.-F. (2018). Specific or not specific recruitment of DNMTs for DNA methylation, an epigenetic dilemma. *Clinical Epigenetics*, 10(1), 17. <https://doi.org/10.1186/s13148-018-0450-y>
- Hervouet, E., Vallette, F. M., & Cartron, P.-F. (2009). Dnmt3/transcription factor interactions as crucial players in targeted DNA methylation. *Epigenetics*, 4(7), 487-499. <https://doi.org/10.4161/epi.4.7.9883>
- Hervouet, E., Vallette, F. M., & Cartron, P.-F. (2010). Dnmt1/Transcription Factor Interactions : An Alternative Mechanism of DNA Methylation Inheritance. *Genes & Cancer*, 1(5), 434-443. <https://doi.org/10.1177/1947601910373794>
- Hoagland, M. B., Stephenson, M. L., Scott, J. F., Hecht, L. I., & Zamecnik, P. C. (1958). A soluble ribonucleic acid intermediate in protein synthesis. *The Journal of Biological Chemistry*, 231(1), 241-257.
- Holdenrieder, S., Stieber, P., von Pawel, J., Raith, H., Nagel, D., Feldmann, K., & Seidel, D. (2004). Circulating nucleosomes predict the response to chemotherapy in patients with advanced non-small cell lung cancer. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 10(18 Pt 1), 5981-5987. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-04-0625>
- Holland, E. C. (2001). Gliomagenesis : Genetic alterations and mouse models. *Nature Reviews Genetics*, 2(2), 120-129. <https://doi.org/10.1038/35052535>
- Holley, R. W., Apgar, J., Everett, G. A., Madison, J. T., Marquisee, M., Merrill, S. H., Penswick, J. R., & Zamir, A. (1965). STRUCTURE OF A RIBONUCLEIC ACID. *Science (New York, N.Y.)*, 147(3664), 1462-1465. <https://doi.org/10.1126/science.147.3664.1462>
- Holliday, R. (1987). The inheritance of epigenetic defects. *Science*, 238(4824), 163-170. <https://doi.org/10.1126/science.3310230>

- Holliday, R. (1994). Epigenetics : An overview. *Developmental Genetics*, 15(6), 453-457.  
<https://doi.org/10.1002/dvg.1020150602>
- Hombach, S., & Kretz, M. (2016). Non-coding RNAs : Classification, Biology and Functioning. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 937, 3-17.  
[https://doi.org/10.1007/978-3-319-42059-2\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-319-42059-2_1)
- Howell, C. Y., Bestor, T. H., Ding, F., Latham, K. E., Mertineit, C., Trasler, J. M., & Chaillet, J. R. (2001). Genomic Imprinting Disrupted by a Maternal Effect Mutation in the Dnmt1 Gene. *Cell*, 104(6), 829-838. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)00280-X](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00280-X)
- Huang, M., Zhang, D., Wu, J. Y., Xing, K., Yeo, E., Li, C., Zhang, L., Holland, E., Yao, L., Qin, L., Binder, Z. A., O'Rourke, D. M., Brem, S., Koumenis, C., Gong, Y., & Fan, Y. (2020). Wnt-mediated endothelial transformation into mesenchymal stem cell-like cells induces chemoresistance in glioblastoma. *Science Translational Medicine*, 12(532), eaay7522.  
<https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aay7522>
- Huang, Y., & Rao, A. (2014). Connections between TET proteins and aberrant DNA modification in cancer. *Trends in Genetics: TIG*, 30(10), 464-474.  
<https://doi.org/10.1016/j.tig.2014.07.005>
- Huertas, D., Sendra, R., & Muñoz, P. (2009). Chromatin dynamics coupled to DNA repair. *Epigenetics*, 4(1), 31-42. <https://doi.org/10.4161/epi.4.1.7733>
- Huisenga, K. L., Brower-Toland, B., & Elgin, S. C. R. (2006). The contradictory definitions of heterochromatin : Transcription and silencing. *Chromosoma*, 115(2), 110-122.  
<https://doi.org/10.1007/s00412-006-0052-x>
- Huttner, A. J., Kieran, M. W., Yao, X., Cruz, L., Ladner, J., Quayle, K., Goumnerova, L. C., Irons, M. B., & Ullrich, N. J. (2010). Clinicopathologic study of glioblastoma in children with neurofibromatosis type 1. *Pediatric Blood & Cancer*, 54(7), 890-896.  
<https://doi.org/10.1002/pbc.22462>
- Hyun, K., Jeon, J., Park, K., & Kim, J. (2017). Writing, erasing and reading histone lysine methylations. *Experimental & Molecular Medicine*, 49(4), e324-e324.  
<https://doi.org/10.1038/emm.2017.11>
- Idrissou, M., Sanchez, A., Penault-Llorca, F., Bignon, Y.-J., & Bernard-Gallon, D. (2020). Epi-drugs as triple-negative breast cancer treatment. *Epigenomics*, 12(8), 725-742.  
<https://doi.org/10.2217/epi-2019-0312>
- Iida, T., Suetake, I., Tajima, S., Morioka, H., Ohta, S., Obuse, C., & Tsurimoto, T. (2002). PCNA clamp facilitates action of DNA cytosine methyltransferase 1 on hemimethylated DNA : Interactions between Dnmt1 and PCNA. *Genes to Cells*, 7(10), 997-1007.  
<https://doi.org/10.1046/j.1365-2443.2002.00584.x>
- Inoue, A., Shen, L., Dai, Q., He, C., & Zhang, Y. (2011). Generation and replication-dependent dilution of 5fC and 5caC during mouse preimplantation development. *Cell Research*, 21(12), 1670-1676. <https://doi.org/10.1038/cr.2011.189>
- Inskip, P. D., Tarone, R. E., Hatch, E. E., Wilcosky, T. C., Shapiro, W. R., Selker, R. G., Fine, H. A., Black, P. M., Loeffler, J. S., & Linet, M. S. (2001). Cellular-Telephone Use and Brain Tumors. *New England Journal of Medicine*, 344(2), 79-86.  
<https://doi.org/10.1056/NEJM200101113440201>
- Irizarry, R. A., Ladd-Acosta, C., Wen, B., Wu, Z., Montano, C., Onyango, P., Cui, H., Gabo, K., Rongione, M., Webster, M., Ji, H., Potash, J. B., Sabunciyan, S., & Feinberg, A. P. (2009).

The human colon cancer methylome shows similar hypo- and hypermethylation at conserved tissue-specific CpG island shores. *Nature Genetics*, 41(2), 178-186. <https://doi.org/10.1038/ng.298>

Ito, S., D'Alessio, A. C., Taranova, O. V., Hong, K., Sowers, L. C., & Zhang, Y. (2010). Role of Tet proteins in 5mC to 5hmC conversion, ES-cell self-renewal and inner cell mass specification. *Nature*, 466(7310), 1129-1133. <https://doi.org/10.1038/nature09303>

Ito, S., Shen, L., Dai, Q., Wu, S. C., Collins, L. B., Swenberg, J. A., He, C., & Zhang, Y. (2011). Tet Proteins Can Convert 5-Methylcytosine to 5-Formylcytosine and 5-Carboxylcytosine. *Science*, 333(6047), 1300-1303. <https://doi.org/10.1126/science.1210597>

Iurlaro, M., Ficz, G., Oxley, D., Raiber, E.-A., Bachman, M., Booth, M. J., Andrews, S., Balasubramanian, S., & Reik, W. (2013). A screen for hydroxymethylcytosine and formylcytosine binding proteins suggests functions in transcription and chromatin regulation. *Genome Biology*, 14(10), R119. <https://doi.org/10.1186/gb-2013-14-10-r119>

Iwan, K., Rahimoff, R., Kirchner, A., Spada, F., Schröder, A. S., Kossmatchev, O., Ferizaj, S., Steinbacher, J., Parsa, E., Müller, M., & Carell, T. (2018). 5-Formylcytosine to cytosine conversion by C-C bond cleavage in vivo. *Nature Chemical Biology*, 14(1), 72-78. <https://doi.org/10.1038/nchembio.2531>

Jackson, K., Yu, M. C., Arakawa, K., Fiala, E., Youn, B., Fiegl, H., Müller-Holzner, E., Widschwendter, M., & Ehrlich, M. (2004). DNA hypomethylation is prevalent even in low-grade breast cancers. *Cancer Biology & Therapy*, 3(12), 1225-1231. <https://doi.org/10.4161/cbt.3.12.1222>

Jacob, L., Freyn, M., Kalder, M., Dinas, K., & Kostev, K. (2018). Impact of tobacco smoking on the risk of developing 25 different cancers in the UK : A retrospective study of 422,010 patients followed for up to 30 years. *Oncotarget*, 9(25), 17420-17429. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.24724>

Jeltsch, A. (2006). Molecular Enzymology of Mammalian DNA Methyltransferases. In W. Doerfler & P. Böhm (Eds.), *DNA Methylation : Basic Mechanisms* (Vol. 301, p. 203-225). Springer-Verlag. [https://doi.org/10.1007/3-540-31390-7\\_7](https://doi.org/10.1007/3-540-31390-7_7)

Jeltsch, A., Ehrenhofer-Murray, A., Jurkowski, T. P., Lyko, F., Reuter, G., Ankri, S., Nellen, W., Schaefer, M., & Helm, M. (2016). Mechanism and biological role of Dnmt2 in Nucleic Acid Methylation. *RNA Biology*, 14(9), 1108-1123. <https://doi.org/10.1080/15476286.2016.1191737>

Jeltsch, A., & Jurkowska, R. Z. (2016). Allosteric control of mammalian DNA methyltransferases—A new regulatory paradigm. *Nucleic Acids Research*, 44(18), 8556-8575. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw723>

Jeppesen, P., & Turner, B. M. (1993). The inactive X chromosome in female mammals is distinguished by a lack of histone H4 acetylation, a cytogenetic marker for gene expression. *Cell*, 74(2), 281-289. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90419-Q](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90419-Q)

Jezek, M., & Green, E. M. (2019). Histone Modifications and the Maintenance of Telomere Integrity. *Cells*, 8(2). <https://doi.org/10.3390/cells8020199>

Jia, D., Jurkowska, R. Z., Zhang, X., Jeltsch, A., & Cheng, X. (2007). Structure of Dnmt3a bound to Dnmt3L suggests a model for de novo DNA methylation. *Nature*, 449(7159), 248-251. <https://doi.org/10.1038/nature06146>

Jia, Y., Chng, W.-J., & Zhou, J. (2019). Super-enhancers : Critical roles and therapeutic targets in hematologic malignancies. *Journal of Hematology & Oncology*, 12(1), 77. <https://doi.org/10.1186/s13045-019-0757-y>

Jiang, B., Zhang, X., Su, J., Meng, W., Yang, X., Yang, J., Zhou, Q., Chen, Z., Chen, Z., Xie, Z., Chen, S., & Wu, Y. (2013). BCL11A overexpression predicts survival and relapse in non-small cell lung cancer and is modulated by microRNA-30a and gene amplification. *Molecular Cancer*, 12(1), 61. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-12-61>

Jin, S.-G., Jiang, Y., Qiu, R., Rauch, T. A., Wang, Y., Schackert, G., Krex, D., Lu, Q., & Pfeifer, G. P. (2011). 5-Hydroxymethylcytosine Is Strongly Depleted in Human Cancers but Its Levels Do Not Correlate with IDH1 Mutations. *Cancer Research*, 71(24), 7360-7365. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-2023>

Jin, S.-G., Zhang, Z.-M., Dunwell, T. L., Harter, M. R., Wu, X., Johnson, J., Li, Z., Liu, J., Szabó, P. E., Lu, Q., Xu, G., Song, J., & Pfeifer, G. P. (2016). Tet3 Reads 5-Carboxylcytosine through Its CXXC Domain and Is a Potential Guardian against Neurodegeneration. *Cell Reports*, 14(3), 493-505. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.12.044>

John, A., Brylka, H., Wiegreffe, C., Simon, R., Liu, P., Jüttner, R., Crenshaw, E. B., III, Luyten, F. P., Jenkins, N. A., Copeland, N. G., Birchmeier, C., & Britsch, S. (2012). Bcl11a is required for neuronal morphogenesis and sensory circuit formation in dorsal spinal cord development. *Development*, 139(10), 1831-1841. <https://doi.org/10.1242/dev.072850>

Johnson, K. C., Houseman, E. A., King, J. E., von Herrmann, K. M., Fadul, C. E., & Christensen, B. C. (2016). 5-Hydroxymethylcytosine localizes to enhancer elements and is associated with survival in glioblastoma patients. *Nature Communications*, 7(1), 13177. <https://doi.org/10.1038/ncomms13177>

Johnston, M. J., Nikolic, A., Ninkovic, N., Guilhamon, P., Cavalli, F. M. G., Seaman, S., Zemp, F. J., Lee, J., Abdelkareem, A., Ellestad, K., Murison, A., Kushida, M. M., Coutinho, F. J., Ma, Y., Mungall, A. J., Moore, R., Marra, M. A., Taylor, M. D., Dirks, P. B., ... Gallo, M. (2019). High-resolution structural genomics reveals new therapeutic vulnerabilities in glioblastoma. *Genome Research*, 29(8), 1211-1222. <https://doi.org/10.1101/gr.246520.118>

Jones, P. A., & Baylin, S. B. (2007). The Epigenomics of Cancer. *Cell*, 128(4), 683-692. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.01.029>

Juan, L.-J., Shia, W.-J., Chen, M.-H., Yang, W.-M., Seto, E., Lin, Y.-S., & Wu, C.-W. (2000). Histone Deacetylases Specifically Down-regulate p53-dependent Gene Activation. *Journal of Biological Chemistry*, 275(27), 20436-20443. <https://doi.org/10.1074/jbc.M000202200>

Jukam, D., Shariati, S. A. M., & Skotheim, J. M. (2017). Zygotic Genome Activation in Vertebrates. *Developmental Cell*, 42(4), 316-332. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2017.07.026>

Jurkowski, T. P., Meusburger, M., Phalke, S., Helm, M., Nellen, W., Reuter, G., & Jeltsch, A. (2008). Human DNMT2 methylates tRNAA<sup>Asp</sup> molecules using a DNA methyltransferase-like catalytic mechanism. *RNA*, 14(8), 1663-1670. <https://doi.org/10.1261/rna.970408>

Juven-Gershon, T., & Kadonaga, J. T. (2010). Regulation of gene expression via the core promoter and the basal transcriptional machinery. *Developmental Biology*, 339(2), 225-229. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2009.08.009>

- Kafer, G. R., Li, X., Horii, T., Suetake, I., Tajima, S., Hatada, I., & Carlton, P. M. (2016). 5-Hydroxymethylcytosine Marks Sites of DNA Damage and Promotes Genome Stability. *Cell Reports*, 14(6), 1283-1292. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.01.035>
- Kagey, M. H., Newman, J. J., Bilodeau, S., Zhan, Y., Orlando, D. A., van Berkum, N. L., Ebmeier, C. C., Goossens, J., Rahl, P. B., Levine, S. S., Taatjes, D. J., Dekker, J., & Young, R. A. (2010). Mediator and cohesin connect gene expression and chromatin architecture. *Nature*, 467(7314), 430-435. <https://doi.org/10.1038/nature09380>
- Kaminskas, E., Farrell, A. T., Wang, Y.-C., Sridhara, R., & Pazdur, R. (2005). FDA drug approval summary : Azacitidine (5-azacytidine, Vidaza) for injectable suspension. *The Oncologist*, 10(3), 176-182. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.10-3-176>
- Kaneda, M., Okano, M., Hata, K., Sado, T., Tsujimoto, N., Li, E., & Sasaki, H. (2004). Essential role for de novo DNA methyltransferase Dnmt3a in paternal and maternal imprinting. *Nature*, 429(6994), 900-903. <https://doi.org/10.1038/nature02633>
- Kanherkar, R. R., Bhatia-Dey, N., & Csoka, A. B. (2014). Epigenetics across the human lifespan. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 2. <https://doi.org/10.3389/fcell.2014.00049>
- Karczmarski, J., Rubel, T., Paziewska, A., Mikula, M., Bujko, M., Kober, P., Dadlez, M., & Ostrowski, J. (2014). Histone H3 lysine 27 acetylation is altered in colon cancer. *Clinical Proteomics*, 11(1), 24. <https://doi.org/10.1186/1559-0275-11-24>
- Karlow, J. A., Miao, B., Xing, X., Wang, T., & Zhang, B. (2021). Common DNA methylation dynamics in endometrioid adenocarcinoma and glioblastoma suggest universal epigenomic alterations in tumorigenesis. *Communications Biology*, 4(1), 1-16. <https://doi.org/10.1038/s42003-021-02094-1>
- Karmodiya, K., Krebs, A. R., Oulad-Abdelghani, M., Kimura, H., & Tora, L. (2012). H3K9 and H3K14 acetylation co-occur at many gene regulatory elements, while H3K14ac marks a subset of inactive inducible promoters in mouse embryonic stem cells. *BMC Genomics*, 13(1), 424. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-424>
- Kato, Y., Kaneda, M., Hata, K., Kumaki, K., Hisano, M., Kohara, Y., Okano, M., Li, E., Nozaki, M., & Sasaki, H. (2007). Role of the Dnmt3 family in de novo methylation of imprinted and repetitive sequences during male germ cell development in the mouse. *Human Molecular Genetics*, 16(19), 2272-2280. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddm179>
- Kelly, J. J. P., Blough, M. D., Stechishin, O. D. M., Chan, J. A. W., Beauchamp, D., Perizzolo, M., Demetrick, D. J., Steele, L., Auer, R. N., Hader, W. J., Westgate, M., Parney, I. F., Jenkins, R., Cairncross, J. G., & Weiss, S. (2010). Oligodendrogloma cell lines containing t(1;19)(q10;p10). *Neuro-Oncology*, 12(7), 745-755. <https://doi.org/10.1093/neuonc/noq031>
- Kelly, T. K., De Carvalho, D. D., & Jones, P. A. (2010). Epigenetic modifications as therapeutic targets. *Nature Biotechnology*, 28(10), 1069-1078. <https://doi.org/10.1038/nbt.1678>
- Kidder, B. L., Hu, G., Cui, K., & Zhao, K. (2017). SMYD5 regulates H4K20me3-marked heterochromatin to safeguard ES cell self-renewal and prevent spurious differentiation. *Epigenetics & Chromatin*, 10(1), 8. <https://doi.org/10.1186/s13072-017-0115-7>
- Kim, E., Kim, M., Woo, D.-H., Shin, Y., Shin, J., Chang, N., Oh, Y. T., Kim, H., Rheey, J., Nakano, I., Lee, C., Joo, K. M., Rich, J. N., Nam, D.-H., & Lee, J. (2013). Phosphorylation of EZH2 Activates STAT3 Signaling via STAT3 Methylation and Promotes Tumorigenicity of

Glioblastoma Stem-like Cells. *Cancer Cell*, 23(6), 839-852.  
<https://doi.org/10.1016/j.ccr.2013.04.008>

Kim, G. W., Lee, D. H., Yeon, S.-K., Jeon, Y. H., Yoo, J., Lee, S. W., & Kwon, S. H. (2019). Temozolomide-resistant Glioblastoma Depends on HDAC6 Activity Through Regulation of DNA Mismatch Repair. *Anticancer Research*, 39(12), 6731-6741.  
<https://doi.org/10.21873/anticanres.13888>

Kim, J. K., Estève, P.-O., Jacobsen, S. E., & Pradhan, S. (2009). UHRF1 binds G9a and participates in p21 transcriptional regulation in mammalian cells. *Nucleic Acids Research*, 37(2), 493-505. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn961>

Kim, M.-J., White-Cross, J. A., Shen, L., Issa, J.-P. J., & Rashid, A. (2009). Hypomethylation of long interspersed nuclear element-1 in hepatocellular carcinomas. *Modern Pathology*, 22(3), 442-449. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2008.203>

Kim, Y., Kim, K. H., Lee, J., Lee, Y.-A., Kim, M., Lee, S. J., Park, K., Yang, H., Jin, J., Joo, K. M., Lee, J., & Nam, D.-H. (2012). Wnt activation is implicated in glioblastoma radioresistance. *Laboratory Investigation*, 92(3), 466-473.  
<https://doi.org/10.1038/labinvest.2011.161>

Kim, Y.-I., Giuliano, A., Hatch, K. D., Schneider, A., Nour, M. A., Dallal, G. E., Selhub, J., & Mason, J. B. (1994). Global DNA hypomethylation increases progressively in cervical dysplasia and carcinoma. *Cancer*, 74(3), 893-899. [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(19940801\)74:3<893::AID-CNCR2820740316>3.0.CO;2-B](https://doi.org/10.1002/1097-0142(19940801)74:3<893::AID-CNCR2820740316>3.0.CO;2-B)

Kirstein, A., Schmid, T. E., & Combs, S. E. (2020). The Role of miRNA for the Treatment of MGMT Unmethylated Glioblastoma Multiforme. *Cancers*, 12(5), 1099.  
<https://doi.org/10.3390/cancers12051099>

Kizilbash, S. H., Gupta, S. K., Chang, K., Kawashima, R., Parrish, K. E., Carlson, B. L., Bakken, K. K., Mladek, A. C., Schroeder, M. A., Decker, P. A., Kitange, G. J., Shen, Y., Feng, Y., Protter, A. A., Elmquist, W. F., & Sarkaria, J. N. (2017). Restricted Delivery of Talazoparib Across the Blood–Brain Barrier Limits the Sensitizing Effects of PARP Inhibition on Temozolomide Therapy in Glioblastoma. *Molecular Cancer Therapeutics*, 16(12), 2735-2746. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-17-0365>

Kleff, S., Andrulis, E. D., Anderson, C. W., & Sternglanz, R. (1995). Identification of a gene encoding a yeast histone H4 acetyltransferase. *The Journal of Biological Chemistry*, 270(42), 24674-24677. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.42.24674>

Klein, B. J., Simithy, J., Wang, X., Ahn, J., Andrews, F. H., Zhang, Y., Côté, J., Shi, X., Garcia, B. A., & Kutateladze, T. G. (2017). Recognition of Histone H3K14 Acylation by MORF. *Structure*, 25(4), 650-654.e2. <https://doi.org/10.1016/j.str.2017.02.003>

Ko, M., An, J., Bandukwala, H. S., Chavez, L., Äijö, T., Pastor, W. A., Segal, M. F., Li, H., Koh, K. P., Lähdesmäki, H., Hogan, P. G., Aravind, L., & Rao, A. (2013). Modulation of TET2 expression and 5-methylcytosine oxidation by the CXXC domain protein IDAX. *Nature*, 497(7447), 122-126. <https://doi.org/10.1038/nature12052>

Kohsaka, S., Wang, L., Yachi, K., Mahabir, R., Narita, T., Itoh, T., Tanino, M., Kimura, T., Nishihara, H., & Tanaka, S. (2012). STAT3 Inhibition Overcomes Temozolomide Resistance in Glioblastoma by Downregulating MGMT Expression. *Molecular Cancer Therapeutics*, 11(6), 1289-1299. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-11-0801>

Kondo, Y., Shen, L., Suzuki, S., Kurokawa, T., Masuko, K., Tanaka, Y., Kato, H., Mizuno, Y., Yokoe, M., Sugauchi, F., Hirashima, N., Orito, E., Osada, H., Ueda, R., Guo, Y., Chen, X., Issa, J.-

P. J., & Sekido, Y. (2007). Alterations of DNA methylation and histone modifications contribute to gene silencing in hepatocellular carcinomas. *Hepatology Research: The Official Journal of the Japan Society of Hepatology*, 37(11), 974-983.  
<https://doi.org/10.1111/j.1872-034X.2007.00141.x>

Konno, M., Koseki, J., Asai, A., Yamagata, A., Shimamura, T., Motooka, D., Okuzaki, D., Kawamoto, K., Mizushima, T., Eguchi, H., Takiguchi, S., Satoh, T., Mimori, K., Ochiya, T., Doki, Y., Ofusa, K., Mori, M., & Ishii, H. (2019). Distinct methylation levels of mature microRNAs in gastrointestinal cancers. *Nature Communications*, 10(1), 3888.  
<https://doi.org/10.1038/s41467-019-11826-1>

Kornberg, R. D. (1974). Chromatin Structure : A Repeating Unit of Histones and DNA. *Science*, 184(4139), 868-871. <https://doi.org/10.1126/science.184.4139.868>

Korpal, M., & Kang, Y. (2008). The emerging role of miR-200 family of MicroRNAs in epithelial-mesenchymal transition and cancer metastasis. *RNA Biology*, 5(3), 115-119.  
<https://doi.org/10.4161/rna.5.3.6558>

Koshy, M., Villano, J. L., Dolecek, T. A., Howard, A., Mahmood, U., Chmura, S. J., Weichselbaum, R. R., & McCarthy, B. J. (2012). Improved survival time trends for glioblastoma using the SEER 17 population-based registries. *Journal of Neuro-Oncology*, 107(1), 207-212. <https://doi.org/10.1007/s11060-011-0738-7>

Kouzarides, T. (2007). Chromatin Modifications and Their Function. *Cell*, 128(4), 693-705.  
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.02.005>

Kraus, T. F. J., Globisch, D., Wagner, M., Eigenbrod, S., Widmann, D., Münzel, M., Müller, M., Pfaffeneder, T., Hackner, B., Feiden, W., Schüller, U., Carell, T., & Kretzschmar, H. A. (2012). Low values of 5-hydroxymethylcytosine (5hmC), the "sixth base," are associated with anaplasia in human brain tumors. *International Journal of Cancer*, 131(7), 1577-1590. <https://doi.org/10.1002/ijc.27429>

Kraus, T. F. J., Kolck, G., Greiner, A., Schierl, K., Guibourt, V., & Kretzschmar, H. A. (2015). Loss of 5-hydroxymethylcytosine and intratumoral heterogeneity as an epigenomic hallmark of glioblastoma. *Tumor Biology*, 36(11), 8439-8446. <https://doi.org/10.1007/s13277-015-3606-9>

Kriaucionis, S., & Heintz, N. (2009). The Nuclear DNA Base 5-Hydroxymethylcytosine Is Present in Purkinje Neurons and the Brain. *Science*, 324(5929), 929-930.  
<https://doi.org/10.1126/science.1169786>

Krol, J., Loedige, I., & Filipowicz, W. (2010). The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. *Nature Reviews Genetics*, 11(9), 597-610.  
<https://doi.org/10.1038/nrg2843>

Kuehner, J. N., Chen, J., Bruggeman, E. C., Wang, F., Li, Y., Xu, C., McEachin, Z. T., Li, Z., Chen, L., Hales, C. M., Wen, Z., Yang, J., & Yao, B. (2021). 5-hydroxymethylcytosine is dynamically regulated during forebrain organoid development and aberrantly altered in Alzheimer's disease. *Cell Reports*, 35(4), 109042.  
<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.109042>

Kwon, D. Y., Zhao, Y.-T., Lamonica, J. M., & Zhou, Z. (2017). Locus-specific histone deacetylation using a synthetic CRISPR-Cas9-based HDAC. *Nature Communications*, 8(1), 15315. <https://doi.org/10.1038/ncomms15315>

Laird, P. W. (1997). Oncogenic mechanisms mediated by DNA methylation. *Molecular Medicine Today*, 3(5), 223-229. [https://doi.org/10.1016/S1357-4310\(97\)01019-8](https://doi.org/10.1016/S1357-4310(97)01019-8)

- Lan, F., Pan, Q., Yu, H., & Yue, X. (2015). Sulforaphane enhances temozolomide-induced apoptosis because of down-regulation of miR-21 via Wnt/β-catenin signaling in glioblastoma. *Journal of Neurochemistry*, 134(5), 811-818. <https://doi.org/10.1111/jnc.13174>
- Lander, E. S., Linton, L. M., Birren, B., Nusbaum, C., Zody, M. C., Baldwin, J., Devon, K., Dewar, K., Doyle, M., FitzHugh, W., Funke, R., Gage, D., Harris, K., Heaford, A., Howland, J., Kann, L., Lehoczky, J., LeVine, R., McEwan, P., ... International Human Genome Sequencing Consortium. (2001). Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*, 409(6822), 860-921. <https://doi.org/10.1038/35057062>
- Langhans, J., Schneele, L., Trenkler, N., von Bandemer, H., Nonnenmacher, L., Karpel-Massler, G., Siegelin, M. D., Zhou, S., Halatsch, M.-E., Debatin, K.-M., & Westhoff, M.-A. (2017). The effects of PI3K-mediated signalling on glioblastoma cell behaviour. *Oncogenesis*, 6(11), 398. <https://doi.org/10.1038/s41389-017-0004-8>
- Langmead, B., & Salzberg, S. L. (2012). Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nature Methods*, 9(4), 357-359. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1923>
- Lara-Velazquez, M., Al-Kharboosh, R., Jeanneret, S., Vazquez-Ramos, C., Mahato, D., Tavanaiepour, D., Rahmathulla, G., & Quinones-Hinojosa, A. (2017). Advances in Brain Tumor Surgery for Glioblastoma in Adults. *Brain Sciences*, 7(12). <https://doi.org/10.3390/brainsci7120166>
- Lavoie, G., Estève, P.-O., Laulan, N., Pradhan, S., & St-Pierre, Y. (2011). PKC isoforms interact with and phosphorylate DNMT1. *BMC Biology*, 9(1), 31. <https://doi.org/10.1186/1741-7007-9-31>
- Lawlor, K., Marques-Torrejon, M. A., Dharmalingham, G., El-Azhar, Y., Schneider, M. D., Pollard, S. M., & Rodríguez, T. A. (2020). Glioblastoma stem cells induce quiescence in surrounding neural stem cells via Notch signaling. *Genes & Development*, 34(23-24), 1599-1604. <https://doi.org/10.1101/gad.336917.120>
- Le cancer en chiffres | Fondation ARC pour la recherche sur le cancer. (s. d.). Consulté 29 juin 2021, à l'adresse <https://www.fondation-arc.org/le-cancer-en-chiffres>
- Lee, D. H., Ryu, H.-W., Won, H.-R., & Kwon, S. H. (2017). Advances in epigenetic glioblastoma therapy. *Oncotarget*, 8(11), 18577-18589. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.14612>
- Lee, I., Ajay, S. S., Yook, J. I., Kim, H. S., Hong, S. H., Kim, N. H., Dhanasekaran, S. M., Chinnaiyan, A. M., & Athey, B. D. (2009). New class of microRNA targets containing simultaneous 5'-UTR and 3'-UTR interaction sites. *Genome Research*, 19(7), 1175-1183. <https://doi.org/10.1101/gr.089367.108>
- Lee, J. H., Lee, J. E., Kahng, J. Y., Kim, S. H., Park, J. S., Yoon, S. J., Um, J.-Y., Kim, W. K., Lee, J.-K., Park, J., Kim, E. H., Lee, J.-H., Lee, J.-H., Chung, W.-S., Ju, Y. S., Park, S.-H., Chang, J. H., Kang, S.-G., & Lee, J. H. (2018). Human glioblastoma arises from subventricular zone cells with low-level driver mutations. *Nature*, 560(7717), 243-247. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0389-3>
- Lee, J., Hong, H. K., Peng, S.-B., Kim, T. W., Lee, W. Y., Yun, S. H., Kim, H. C., Liu, J., Ebert, P. J., Aggarwal, A., Jung, S., & Cho, Y. B. (2020). Identifying metastasis-initiating miRNA-target regulations of colorectal cancer from expressional changes in primary tumors. *Scientific Reports*, 10(1), 14919. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-71868-0>

- Lee, R. C., Feinbaum, R. L., & Ambros, V. (1993). The *C. elegans* heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14. *Cell*, 75(5), 843-854. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90529-y](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90529-y)
- Lee, S. Y. (2016). Temozolomide resistance in glioblastoma multiforme. *Genes & Diseases*, 3(3), 198-210. <https://doi.org/10.1016/j.gendis.2016.04.007>
- Lee, Y., Koh, J., Kim, S.-I., Won, J. K., Park, C.-K., Choi, S. H., & Park, S.-H. (2017). The frequency and prognostic effect of TERT promoter mutation in diffuse gliomas. *Acta Neuropathologica Communications*, 5(1), 62. <https://doi.org/10.1186/s40478-017-0465-1>
- Lehnertz, B., Ueda, Y., Derijck, A. A. H. A., Braunschweig, U., Perez-Burgos, L., Kubicek, S., Chen, T., Li, E., Jenuwein, T., & Peters, A. H. F. M. (2003). Suv39h-Mediated Histone H3 Lysine 9 Methylation Directs DNA Methylation to Major Satellite Repeats at Pericentric Heterochromatin. *Current Biology*, 13(14), 1192-1200. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(03\)00432-9](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(03)00432-9)
- Leonhardt, H., Page, A. W., Weier, H.-U., & Bestor, T. H. (1992). A targeting sequence directs DNA methyltransferase to sites of DNA replication in mammalian nuclei. *Cell*, 71(5), 865-873. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(92\)90561-P](https://doi.org/10.1016/0092-8674(92)90561-P)
- Lettice, L. A., Heaney, S. J. H., Purdie, L. A., Li, L., de Beer, P., Oostra, B. A., Goode, D., Elgar, G., Hill, R. E., & de Graaff, E. (2003). A long-range Shh enhancer regulates expression in the developing limb and fin and is associated with preaxial polydactyly. *Human Molecular Genetics*, 12(14), 1725-1735. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddg180>
- Li, B., Carey, M., & Workman, J. L. (2007). The Role of Chromatin during Transcription. *Cell*, 128(4), 707-719. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.01.015>
- Li, E. (2002). Chromatin modification and epigenetic reprogramming in mammalian development. *Nature Reviews Genetics*, 3(9), 662-673. <https://doi.org/10.1038/nrg887>
- Li, E., Bestor, T. H., & Jaenisch, R. (1992). Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. *Cell*, 69(6), 915-926. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(92\)90611-F](https://doi.org/10.1016/0092-8674(92)90611-F)
- Li, G., Tian, Y., & Zhu, W.-G. (2020). The Roles of Histone Deacetylases and Their Inhibitors in Cancer Therapy. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 8, 576946. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.576946>
- Li, G.-H., Qu, Q., Qi, T.-T., Teng, X.-Q., Zhu, H.-H., Wang, J.-J., Lu, Q., & Qu, J. (2021). Super-enhancers : A new frontier for epigenetic modifiers in cancer chemoresistance. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 40(1), 174. <https://doi.org/10.1186/s13046-021-01974-y>
- Li, S., Chen, X., Mao, L., Zahid, K. R., Wen, J., Zhang, L., Zhang, M., Duan, J., Duan, J., Yin, X., Wang, Y., Zhao, L., Tang, X., Wang, X., & Xu, G. (2018). Histone deacetylase 1 promotes glioblastoma cell proliferation and invasion via activation of PI3K/AKT and MEK/ERK signaling pathways. *Brain Research*, 1692, 154-162. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2018.05.023>
- Li, X., Corbett, A. L., Taatizadeh, E., Tasnim, N., Little, J. P., Garnis, C., Daugaard, M., Guns, E., Hoorfar, M., & Li, I. T. S. (2019). Challenges and opportunities in exosome research—Perspectives from biology, engineering, and cancer therapy. *APL Bioengineering*, 3(1), 011503. <https://doi.org/10.1063/1.5087122>

- Li, Y., & Sasaki, H. (2011). Genomic imprinting in mammals : Its life cycle, molecular mechanisms and reprogramming. *Cell Research*, 21(3), 466-473. <https://doi.org/10.1038/cr.2011.15>
- Li, Y.-Q., Zhou, P.-Z., Zheng, X.-D., Walsh, C. P., & Xu, G.-L. (2007). Association of Dnmt3a and thymine DNA glycosylase links DNA methylation with base-excision repair. *Nucleic Acids Research*, 35(2), 390-400. <https://doi.org/10.1093/nar/gkl1052>
- Li, Z., Li, Q., Chen, L., Chen, B., Wang, B., Zhang, X., & Li, W. (2016). Histone Deacetylase Inhibitor RGFP109 Overcomes Temozolomide Resistance by Blocking NF- $\kappa$ B-Dependent Transcription in Glioblastoma Cell Lines. *Neurochemical Research*, 41(12), 3192-3205. <https://doi.org/10.1007/s11064-016-2043-5>
- Liau, B. B., Sievers, C., Donohue, L. K., Gillespie, S. M., Flavahan, W. A., Miller, T. E., Venteicher, A. S., Hebert, C. H., Carey, C. D., Rodig, S. J., Shareef, S. J., Najm, F. J., Galen, P. van, Wakimoto, H., Cahill, D. P., Rich, J. N., Aster, J. C., Suvà, M. L., Patel, A. P., & Bernstein, B. E. (2017). Adaptive Chromatin Remodeling Drives Glioblastoma Stem Cell Plasticity and Drug Tolerance. *Cell Stem Cell*, 20(2), 233-246.e7. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2016.11.003>
- Lin, C. H., Hsieh, S. Y., Sheen, I. S., Lee, W. C., Chen, T. C., Shyu, W. C., & Liaw, Y. F. (2001). Genome-wide hypomethylation in hepatocellular carcinogenesis. *Cancer Research*, 61(10), 4238-4243.
- Lin, C.-J., Lee, C.-C., Shih, Y.-L., Lin, C.-H., Wang, S.-H., Chen, T.-H., & Shih, C.-M. (2012). Inhibition of Mitochondria- and Endoplasmic Reticulum Stress-Mediated Autophagy Augments Temozolomide-Induced Apoptosis in Glioma Cells. *PLoS ONE*, 7(6), e38706. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038706>
- Lin, C.-J., Lee, C.-C., Shih, Y.-L., Lin, T.-Y., Wang, S.-H., Lin, Y.-F., & Shih, C.-M. (2012). Resveratrol enhances the therapeutic effect of temozolomide against malignant glioma in vitro and in vivo by inhibiting autophagy. *Free Radical Biology and Medicine*, 52(2), 377-391. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2011.10.487>
- Lin, X., Qiu, W., Xiao, Y., Ma, J., Xu, F., Zhang, K., Gao, Y., Chen, Q., Li, Y., Li, H., & Qian, A. (2020). MiR-199b-5p Suppresses Tumor Angiogenesis Mediated by Vascular Endothelial Cells in Breast Cancer by Targeting ALK1. *Frontiers in Genetics*, 10, 1397. <https://doi.org/10.3389/fgene.2019.01397>
- Linos, E., Raine, T., Alonso, A., & Michaud, D. (2007). Atopy and Risk of Brain Tumors : A Meta-analysis. *JNCI Journal of the National Cancer Institute*, 99(20), 1544-1550. <https://doi.org/10.1093/jnci/djm170>
- Lister, R., Pelizzola, M., Dowen, R. H., Hawkins, R. D., Hon, G., Tonti-Filippini, J., Nery, J. R., Lee, L., Ye, Z., Ngo, Q.-M., Edsall, L., Antosiewicz-Bourget, J., Stewart, R., Ruotti, V., Millar, A. H., Thomson, J. A., Ren, B., & Ecker, J. R. (2009). Human DNA methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences. *Nature*, 462(7271), 315-322. <https://doi.org/10.1038/nature08514>
- Liu, N., Hargreaves, V. V., Zhu, Q., Kurland, J. V., Hong, J., Kim, W., Sher, F., Macias-Trevino, C., Rogers, J. M., Kurita, R., Nakamura, Y., Yuan, G.-C., Bauer, D. E., Xu, J., Bulyk, M. L., & Orkin, S. H. (2018). Direct Promoter Repression by BCL11A Controls the Fetal to Adult Hemoglobin Switch. *Cell*, 173(2), 430-442.e17. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.03.016>
- Liu, X., Wu, G., Shan, Y., Hartmann, C., von Deimling, A., & Xing, M. (2013). Highly prevalent *TERT* promoter mutations in bladder cancer and glioblastoma. *Cell Cycle*, 12(10), 1637-1638. <https://doi.org/10.4161/cc.24662>

- Liu, Y., Long, Y.-H., Wang, S.-Q., Zhang, Y.-Y., Li, Y.-F., Mi, J.-S., Yu, C.-H., Li, D.-Y., Zhang, J.-H., & Zhang, X.-J. (2019). JMJD6 regulates histone H2A.X phosphorylation and promotes autophagy in triple-negative breast cancer cells via a novel tyrosine kinase activity. *Oncogene*, 38(7), 980-997. <https://doi.org/10.1038/s41388-018-0466-y>
- Liu, Z., Liu, Y., Li, L., Xu, Z., Bi, B., Wang, Y., & Li, J. Y. (2014). MiR-7-5p is frequently downregulated in glioblastoma microvasculature and inhibits vascular endothelial cell proliferation by targeting RAF1. *Tumour Biology: The Journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, 35(10), 10177-10184. <https://doi.org/10.1007/s13277-014-2318-x>
- Liutkevičiūtė, Z., Kriukienė, E., Ličytė, J., Rudytė, M., Urbanavičiūtė, G., & Klimašauskas, S. (2014). Direct Decarboxylation of 5-Carboxylcytosine by DNA C5- Methyltransferases. *Journal of the American Chemical Society*, 136(16), 5884-5887. <https://doi.org/10.1021/ja5019223>
- Liutkevičiūtė, Z., Lukinavičius, G., Masevičius, V., Daujotytė, D., & Klimašauskas, S. (2009). Cytosine-5-methyltransferases add aldehydes to DNA. *Nature Chemical Biology*, 5(6), 400-402. <https://doi.org/10.1038/nchembio.172>
- Lo, H.-W., Cao, X., Zhu, H., & Ali-Osman, F. (2008). Constitutively Activated STAT3 Frequently Coexpresses with Epidermal Growth Factor Receptor in High-Grade Gliomas and Targeting STAT3 Sensitizes Them to Iressa and Alkylators. *Clinical Cancer Research*, 14(19), 6042-6054. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-4923>
- Local, A., Huang, H., Albuquerque, C. P., Singh, N., Lee, A. Y., Wang, W., Wang, C., Hsia, J. E., Shiao, A. K., Ge, K., Corbett, K. D., Wang, D., Zhou, H., & Ren, B. (2018). Identification of H3K4me1-associated proteins at mammalian enhancers. *Nature Genetics*, 50(1), 73-82. <https://doi.org/10.1038/s41588-017-0015-6>
- Loeb, K. R., & Loeb, L. A. (2000). Significance of multiple mutations in cancer. *Carcinogenesis*, 21(3), 379-385. <https://doi.org/10.1093/carcin/21.3.379>
- Lois, C., & Alvarez-Buylla, A. (1994). Long-distance neuronal migration in the adult mammalian brain. *Science*, 264(5162), 1145-1148. <https://doi.org/10.1126/science.8178174>
- Louis, D. N., Perry, A., Reifenberger, G., von Deimling, A., Figarella-Branger, D., Cavenee, W. K., Ohgaki, H., Wiestler, O. D., Kleihues, P., & Ellison, D. W. (2016). The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System : A summary. *Acta Neuropathologica*, 131(6), 803-820. <https://doi.org/10.1007/s00401-016-1545-1>
- Love, M. I., Huber, W., & Anders, S. (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology*, 15(12), 550. <https://doi.org/10.1186/s13059-014-0550-8>
- Lu, C., Cui, C., Liu, B., Zou, S., Song, H., Tian, H., Zhao, J., & Li, Y. (2017). FERMT3 contributes to glioblastoma cell proliferation and chemoresistance to temozolomide through integrin mediated Wnt signaling. *Neuroscience Letters*, 657, 77-83. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2017.07.057>
- Lu, C., Wei, Y., Wang, X., Zhang, Z., Yin, J., Li, W., Chen, L., Lyu, X., Shi, Z., Yan, W., & You, Y. (2020). DNA-methylation-mediated activating of lncRNA SNHG12 promotes temozolomide resistance in glioblastoma. *Molecular Cancer*, 19(1), 28. <https://doi.org/10.1186/s12943-020-1137-5>

- Lu, J., Getz, G., Miska, E. A., Alvarez-Saavedra, E., Lamb, J., Peck, D., Sweet-Cordero, A., Ebert, B. L., Mak, R. H., Ferrando, A. A., Downing, J. R., Jacks, T., Horvitz, H. R., & Golub, T. R. (2005). MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature*, 435(7043), 834-838. <https://doi.org/10.1038/nature03702>
- Luger, K., Mäder, A. W., Richmond, R. K., Sargent, D. F., & Richmond, T. J. (1997). Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature*, 389(6648), 251-260. <https://doi.org/10.1038/38444>
- Luo, Z., & Lin, C. (2016). Enhancer, epigenetics, and human disease. *Current Opinion in Genetics & Development*, 36, 27-33. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2016.03.012>
- Ma, D. K., Bonaguidi, M. A., Ming, G.-L., & Song, H. (2009). Adult neural stem cells in the mammalian central nervous system. *Cell Research*, 19(6), 672-682. <https://doi.org/10.1038/cr.2009.56>
- Ma, D. K., Guo, J. U., Ming, G., & Song, H. (2009). DNA excision repair proteins and Gadd45 as molecular players for active DNA demethylation. *Cell Cycle*, 8(10), 1526-1531. <https://doi.org/10.4161/cc.8.10.8500>
- Mack, S. C., Singh, I., Wang, X., Hirsch, R., Wu, Q., Villagomez, R., Bernatchez, J. A., Zhu, Z., Gimple, R. C., Kim, L. J. Y., Morton, A., Lai, S., Qiu, Z., Prager, B. C., Bertrand, K. C., Mah, C., Zhou, W., Lee, C., Barnett, G. H., ... Rich, J. N. (2019). Chromatin landscapes reveal developmentally encoded transcriptional states that define human glioblastoma. *Journal of Experimental Medicine*, 216(5), 1071-1090. <https://doi.org/10.1084/jem.20190196>
- Mahajan, K., Malla, P., Lawrence, H. R., Chen, Z., Kumar-Sinha, C., Malik, R., Shukla, S., Kim, J., Coppola, D., Lawrence, N. J., & Mahajan, N. P. (2017). ACK1/TNK2 Regulates Histone H4 Tyr88-phosphorylation and AR Gene Expression in Castration-Resistant Prostate Cancer. *Cancer Cell*, 31(6), 790-803.e8. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2017.05.003>
- Majello, B., Gorini, F., Saccà, C., & Amenta, S. (2019). Expanding the Role of the Histone Lysine-Specific Demethylase LSD1 in Cancer. *Cancers*, 11(3), 324. <https://doi.org/10.3390/cancers11030324>
- Malta, T. M., de Souza, C. F., Sabedot, T. S., Silva, T. C., Mosella, M. S., Kalkanis, S. N., Snyder, J., Castro, A. V. B., & Noushmehr, H. (2018). Glioma CpG island methylator phenotype (G-CIMP) : Biological and clinical implications. *Neuro-Oncology*, 20(5), 608-620. <https://doi.org/10.1093/neuonc/nox183>
- Mansouri, A., Hachem, L. D., Mansouri, S., Nassiri, F., Laperriere, N. J., Xia, D., Lindeman, N. I., Wen, P. Y., Chakravarti, A., Mehta, M. P., Hegi, M. E., Stupp, R., Aldape, K. D., & Zadeh, G. (2019). MGMT promoter methylation status testing to guide therapy for glioblastoma : Refining the approach based on emerging evidence and current challenges. *Neuro-Oncology*, 21(2), 167-178. <https://doi.org/10.1093/neuonc/noy132>
- Marchal, C., & Miotto, B. (2015). Emerging Concept in DNA Methylation : Role of Transcription Factors in Shaping DNA Methylation Patterns: TRANSCRIPTION FACTORS IN DNA METHYLATION. *Journal of Cellular Physiology*, 230(4), 743-751. <https://doi.org/10.1002/jcp.24836>
- Mason, W. P. (2015). Blood-brain barrier-associated efflux transporters : A significant but underappreciated obstacle to drug development in glioblastoma. *Neuro-Oncology*, nov122. <https://doi.org/10.1093/neuonc/nov122>

- Matos, B., Bostjancic, E., Matjasic, A., Popovic, M., & Glavac, D. (2018). Dynamic expression of 11 miRNAs in 83 consecutive primary and corresponding recurrent glioblastoma : Correlation to treatment, time to recurrence, overall survival and MGMT methylation status. *Radiology and Oncology*, 52(4), 422-432. <https://doi.org/10.2478/raon-2018-0043>
- Mau, T., & Yung, R. (2014). Potential of epigenetic therapies in non-cancerous conditions. *Frontiers in Genetics*, 5. <https://doi.org/10.3389/fgene.2014.00438>
- Mayer, W., Niveleau, A., Walter, J., Fundele, R., & Haaf, T. (2000). Demethylation of the zygotic paternal genome. *Nature*, 403(6769), 501-502. <https://doi.org/10.1038/35000656>
- McMahon, K. W., Karunasena, E., & Ahuja, N. (2017). The Roles of DNA Methylation in the Stages of Cancer. *The Cancer Journal*, 23(5), 257-261. <https://doi.org/10.1097/PPO.0000000000000279>
- Meeks, J. J., & Shilatifard, A. (2017). Multiple Roles for the MLL/COMPASS Family in the Epigenetic Regulation of Gene Expression and in Cancer. *Annual Review of Cancer Biology*, 1(1), 425-446. <https://doi.org/10.1146/annurev-cancerbio-050216-034333>
- Meilinger, D., Fellinger, K., Bultmann, S., Rothbauer, U., Bonapace, I. M., Klinkert, W. E. F., Spada, F., & Leonhardt, H. (2009). Np95 interacts with de novo DNA methyltransferases, Dnmt3a and Dnmt3b, and mediates epigenetic silencing of the viral CMV promoter in embryonic stem cells. *EMBO Reports*, 10(11), 1259-1264. <https://doi.org/10.1038/embor.2009.201>
- Meissner, A., Mikkelsen, T. S., Gu, H., Wernig, M., Hanna, J., Sivachenko, A., Zhang, X., Bernstein, B. E., Nusbaum, C., Jaffe, D. B., Gnirke, A., Jaenisch, R., & Lander, E. S. (2008). Genome-scale DNA methylation maps of pluripotent and differentiated cells. *Nature*, 454(7205), 766-770. <https://doi.org/10.1038/nature07107>
- Melamed, P., Yosefzon, Y., David, C., Tsukerman, A., & Pnueli, L. (2018). Tet Enzymes, Variants, and Differential Effects on Function. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 6, 22. <https://doi.org/10.3389/fcell.2018.00022>
- Mellén, M., Ayata, P., Dewell, S., Kriaucionis, S., & Heintz, N. (2012). MeCP2 binds to 5hmC enriched within active genes and accessible chromatin in the nervous system. *Cell*, 151(7), 1417-1430. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.11.022>
- Meshorer, E., & Misteli, T. (2006). Chromatin in pluripotent embryonic stem cells and differentiation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 7(7), 540-546. <https://doi.org/10.1038/nrm1938>
- Métivier, R., Gallais, R., Tiffache, C., Le Péron, C., Jurkowska, R. Z., Carmouche, R. P., Ibberson, D., Barath, P., Demay, F., Reid, G., Benes, V., Jeltsch, A., Gannon, F., & Salbert, G. (2008). Cyclical DNA methylation of a transcriptionally active promoter. *Nature*, 452(7183), 45-50. <https://doi.org/10.1038/nature06544>
- Millan-Zambrano, G., Santos-Rosa, H., Puddu, F., Robson, S. C., Jackson, S. P., & Kouzarides, T. (2018). Phosphorylation of Histone H4T80 Triggers DNA Damage Checkpoint Recovery. *Molecular Cell*, 72(4), 625-635.e4. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.09.023>
- Miranda Furtado, C. L., Dos Santos Luciano, M. C., Silva Santos, R. D., Furtado, G. P., Moraes, M. O., & Pessoa, C. (2019). Epidrugs : Targeting epigenetic marks in cancer treatment. *Epigenetics*, 14(12), 1164-1176. <https://doi.org/10.1080/15592294.2019.1640546>

- Mizoguchi, M., Guan, Y., Yoshimoto, K., Hata, N., Amano, T., Nakamizo, A., & Sasaki, T. (2013). Clinical implications of microRNAs in human glioblastoma. *Frontiers in Oncology*, 3. <https://doi.org/10.3389/fonc.2013.00019>
- Mohammad, F., Mondal, T., Guseva, N., Pandey, G. K., & Kanduri, C. (2010). *Kcnq1ot1* noncoding RNA mediates transcriptional gene silencing by interacting with Dnmt1. *Development*, 137(15), 2493-2499. <https://doi.org/10.1242/dev.048181>
- Mohammed, H., Taylor, C., Brown, G. D., Papachristou, E. K., Carroll, J. S., & D'Santos, C. S. (2016). Rapid immunoprecipitation mass spectrometry of endogenous proteins (RIME) for analysis of chromatin complexes. *Nature Protocols*, 11(2), 316-326. <https://doi.org/10.1038/nprot.2016.020>
- Moody, R. R., Lo, M.-C., Meagher, J. L., Lin, C.-C., Stevers, N. O., Tinsley, S. L., Jung, I., Matvekas, A., Stuckey, J. A., & Sun, D. (2018). Probing the interaction between the histone methyltransferase/deacetylase subunit RBBP4/7 and the transcription factor BCL11A in epigenetic complexes. *The Journal of Biological Chemistry*, 293(6), 2125-2136. <https://doi.org/10.1074/jbc.M117.811463>
- Morgan, H. D., Dean, W., Coker, H. A., Reik, W., & Petersen-Mahrt, S. K. (2004). Activation-induced Cytidine Deaminase Deaminates 5-Methylcytosine in DNA and Is Expressed in Pluripotent Tissues. *Journal of Biological Chemistry*, 279(50), 52353-52360. <https://doi.org/10.1074/jbc.M407695200>
- Morison, I. M., Ramsay, J. P., & Spencer, H. G. (2005). A census of mammalian imprinting. *Trends in Genetics*, 21(8), 457-465. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2005.06.008>
- Mullard, A. (2020). Stemming the tide of drug resistance in cancer. *Nature Reviews Drug Discovery*, 19(4), 221-223. <https://doi.org/10.1038/d41573-020-00050-y>
- Musah-Eroje, A. (2021). Chapter 19—Three-dimensional in vitro models to study potentiation of glioblastoma resistance by hypoxia. In R. Paulmurugan & T. F. Massoud (Eds.), *Glioblastoma Resistance to Chemotherapy : Molecular Mechanisms and Innovative Reversal Strategies* (Vol. 15, p. 491-496). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-821567-8.00021-X>
- Nadaradjane, A., Briand, J., Bougras-Cartron, G., Disdero, V., Vallette, F. M., Frenel, J.-S., & Cartron, P.-F. (2018). MiR-370-3p Is a Therapeutic Tool in Anti-glioblastoma Therapy but Is Not an Intratumoral or Cell-free Circulating Biomarker. *Molecular Therapy. Nucleic Acids*, 13, 642-650. <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2018.09.007>
- Namee, N. M., & O'Driscoll, L. (2018). Extracellular vesicles and anti-cancer drug resistance. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*, 1870(2), 123-136. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2018.07.003>
- Nanduri, R., Furusawa, T., & Bustin, M. (2020). Biological Functions of HMGN Chromosomal Proteins. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(2), 449. <https://doi.org/10.3390/ijms21020449>
- Nelson, J. S., Burchfiel, C. M., Fekedulegn, D., & Andrew, M. E. (2012). Potential risk factors for incident glioblastoma multiforme : The Honolulu Heart Program and Honolulu-Asia Aging Study. *Journal of Neuro-Oncology*, 109(2), 315-321. <https://doi.org/10.1007/s11060-012-0895-3>
- Nicetto, D., & Zaret, K. S. (2019). Role of H3K9me3 heterochromatin in cell identity establishment and maintenance. *Current Opinion in Genetics & Development*, 55, 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2019.04.013>

- Niederriter, A. R., Varshney, A., Parker, S. C. J., & Martin, D. M. (2015). Super Enhancers in Cancers, Complex Disease, and Developmental Disorders. *Genes*, 6(4), 1183-1200. <https://doi.org/10.3390/genes6041183>
- Nishihara, T., Zekri, L., Braun, J. E., & Izaurralde, E. (2013). MiRISC recruits decapping factors to miRNA targets to enhance their degradation. *Nucleic Acids Research*, 41(18), 8692-8705. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt619>
- Nishiyama, A., Mulholland, C. B., Bultmann, S., Kori, S., Endo, A., Saeki, Y., Qin, W., Trummer, C., Chiba, Y., Yokoyama, H., Kumamoto, S., Kawakami, T., Hojo, H., Nagae, G., Aburatani, H., Tanaka, K., Arita, K., Leonhardt, H., & Nakanishi, M. (2020). Two distinct modes of DNMT1 recruitment ensure stable maintenance DNA methylation. *Nature Communications*, 11(1), 1222. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-15006-4>
- Nooshmehr, H., Weisenberger, D. J., Diefes, K., Phillips, H. S., Pujara, K., Berman, B. P., Pan, F., Pelloski, C. E., Sulman, E. P., Bhat, K. P., Verhaak, R. G. W., Hoadley, K. A., Hayes, D. N., Perou, C. M., Schmidt, H. K., Ding, L., Wilson, R. K., Van Den Berg, D., Shen, H., ... Aldape, K. (2010). Identification of a CpG Island Methylator Phenotype that Defines a Distinct Subgroup of Glioma. *Cancer Cell*, 17(5), 510-522. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2010.03.017>
- Ohgaki, H., & Kleihues, P. (2013). The Definition of Primary and Secondary Glioblastoma. *Clinical Cancer Research*, 19(4), 764-772. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-12-3002>
- Okada, Y., Yamagata, K., Hong, K., Wakayama, T., & Zhang, Y. (2010). A role for the elongator complex in zygotic paternal genome demethylation. *Nature*, 463(7280), 554-558. <https://doi.org/10.1038/nature08732>
- Okano, M., Bell, D. W., Haber, D. A., & Li, E. (1999). DNA Methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b Are Essential for De Novo Methylation and Mammalian Development. *Cell*, 99(3), 247-257. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81656-6](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81656-6)
- Oldrini, B., Vaquero-Siguero, N., Mu, Q., Kroon, P., Zhang, Y., Galán-Ganga, M., Bao, Z., Wang, Z., Liu, H., Sa, J. K., Zhao, J., Kim, H., Rodriguez-Perales, S., Nam, D.-H., Verhaak, R. G. W., Rabadan, R., Jiang, T., Wang, J., & Squatrito, M. (2020). MGMT genomic rearrangements contribute to chemotherapy resistance in gliomas. *Nature Communications*, 11(1), 3883. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-17717-0>
- Oliver, L., Lalier, L., Salaud, C., Heymann, D., Cartron, P. F., & Vallette, F. M. (2020). Drug resistance in glioblastoma : Are persisters the key to therapy? *Cancer Drug Resistance*, 3(3), 287-301. <https://doi.org/10.20517/cdr.2020.29>
- Orlova, N. N., Bogatova, O. V., & Orlov, A. V. (2020). High-performance method for identification of super enhancers from ChIP-Seq data with configurable cloud virtual machines. *MethodsX*, 7, 101165. <https://doi.org/10.1016/j.mex.2020.101165>
- Oruba, A., Saccani, S., & van Essen, D. (2020). Role of cell-type specific nucleosome positioning in inducible activation of mammalian promoters. *Nature Communications*, 11(1), 1075. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-14950-5>
- Ostrom, Q. T., Gittleman, H., Farah, P., Ondracek, A., Chen, Y., Wolinsky, Y., Stroup, N. E., Kruchko, C., & Barnholtz-Sloan, J. S. (2013). CBTRUS statistical report : Primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2006-2010. *Neuro-Oncology*, 15 Suppl 2, ii1-56. <https://doi.org/10.1093/neuonc/not151>

- Oswald, J., Engemann, S., Lane, N., Mayer, W., Olek, A., Fundele, R., Dean, W., Reik, W., & Walter, J. (2000). Active demethylation of the paternal genome in the mouse zygote. *Current Biology*, 10(8), 475-478. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(00\)00448-6](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(00)00448-6)
- Ou, A., Yung, W. K. A., & Majd, N. (2020). Molecular Mechanisms of Treatment Resistance in Glioblastoma. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(1), 351. <https://doi.org/10.3390/ijms22010351>
- Pacaud, R., Brocard, E., Lalier, L., Hervouet, E., Vallette, F. M., & Cartron, P.-F. (2014). The DNMT1/PCNA/UHRF1 disruption induces tumorigenesis characterized by similar genetic and epigenetic signatures. *Scientific Reports*, 4, 4230. <https://doi.org/10.1038/srep04230>
- Padda, J., Khalid, K., Cooper, A. C., & Jean-Charles, G. (2021). Association Between Helicobacter pylori and Gastric Carcinoma. *Cureus*, 13(5), e15165. <https://doi.org/10.7759/cureus.15165>
- Pandolfini, L., Barbieri, I., Bannister, A. J., Hendrick, A., Andrews, B., Webster, N., Murat, P., Mach, P., Brandi, R., Robson, S. C., Migliori, V., Alendar, A., d'Onofrio, M., Balasubramanian, S., & Kouzarides, T. (2019). METTL1 Promotes let-7 MicroRNA Processing via m7G Methylation. *Molecular Cell*, 74(6), 1278-1290.e9. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.03.040>
- Paraskevopoulou, C., Fairhurst, S. A., Lowe, D. J., Brick, P., & Onesti, S. (2006). The Elongator subunit Elp3 contains a Fe4S4 cluster and binds S-adenosylmethionine. *Molecular Microbiology*, 59(3), 795-806. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04989.x>
- Park, C.-K., Kim, J. E., Kim, J. Y., Song, S. W., Kim, J. W., Choi, S. H., Kim, T. M., Lee, S.-H., Kim, I. H., & Park, S.-H. (2012). The Changes in MGMT Promoter Methylation Status in Initial and Recurrent Glioblastomas. *Translational Oncology*, 5(5), 393-IN19. <https://doi.org/10.1593/tlo.12253>
- Paschall, A. V., Yang, D., Lu, C., Choi, J.-H., Li, X., Liu, F., Figueroa, M., Oberlies, N. H., Pearce, C., Bollag, W. B., Nayak-Kapoor, A., & Liu, K. (2015). H3K9 Trimethylation Silences Fas Expression To Confer Colon Carcinoma Immune Escape and 5-Fluorouracil Chemoresistance. *The Journal of Immunology*, 195(4), 1868-1882. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1402243>
- Patel, A. P., Tiros, I., Trombetta, J. J., Shalek, A. K., Gillespie, S. M., Wakimoto, H., Cahill, D. P., Nahed, B. V., Curry, W. T., Martuza, R. L., Louis, D. N., Rozenblatt-Rosen, O., Suva, M. L., Regev, A., & Bernstein, B. E. (2014). Single-cell RNA-seq highlights intratumoral heterogeneity in primary glioblastoma. *Science*, 344(6190), 1396-1401. <https://doi.org/10.1126/science.1254257>
- Patel, V. N., Gokulrangan, G., Chowdhury, S. A., Chen, Y., Sloan, A. E., Koyutürk, M., Barnholtz-Sloan, J., & Chance, M. R. (2013). Network Signatures of Survival in Glioblastoma Multiforme. *PLOS Computational Biology*, 9(9), e1003237. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1003237>
- Penn, N. W., Suwalski, R., O'Riley, C., Bojanowski, K., & Yura, R. (1972). The presence of 5-hydroxymethylcytosine in animal deoxyribonucleic acid. *Biochemical Journal*, 126(4), 781-790. <https://doi.org/10.1042/bj1260781>
- Petryk, N., Bultmann, S., Bartke, T., & Defossez, P.-A. (2021). Staying true to yourself : Mechanisms of DNA methylation maintenance in mammals. *Nucleic Acids Research*, 49(6), 3020-3032. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa1154>

- Pham, P., Bransteitter, R., Petruska, J., & Goodman, M. F. (2003). Processive AID-catalysed cytosine deamination on single-stranded DNA simulates somatic hypermutation. *Nature*, 424(6944), 103-107. <https://doi.org/10.1038/nature01760>
- Pietrocola, F., Galluzzi, L., Bravo-San Pedro, J. M., Madeo, F., & Kroemer, G. (2015). Acetyl Coenzyme A : A Central Metabolite and Second Messenger. *Cell Metabolism*, 21(6), 805-821. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2015.05.014>
- Platten, M., Bunse, L., Wick, A., Bunse, T., Le Cornet, L., Harting, I., Sahm, F., Sanghvi, K., Tan, C. L., Poschke, I., Green, E., Justesen, S., Behrens, G. A., Breckwoldt, M. O., Freitag, A., Rother, L.-M., Schmitt, A., Schnell, O., Hense, J., ... Wick, W. (2021). A vaccine targeting mutant IDH1 in newly diagnosed glioma. *Nature*, 592(7854), 463-468. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03363-z>
- Pogribny, I. P., & Beland, F. A. (2009). DNA hypomethylation in the origin and pathogenesis of human diseases. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 66(14), 2249-2261. <https://doi.org/10.1007/s00018-009-0015-5>
- Poon, M. T. C., Sudlow, C. L. M., Figueroa, J. D., & Brennan, P. M. (2020). Longer-term ( $\geq 2$  years) survival in patients with glioblastoma in population-based studies pre- and post-2005 : A systematic review and meta-analysis. *Scientific Reports*, 10(1), 11622. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-68011-4>
- Popp, C., Dean, W., Feng, S., Cokus, S. J., Andrews, S., Pellegrini, M., Jacobsen, S. E., & Reik, W. (2010). Genome-wide erasure of DNA methylation in mouse primordial germ cells is affected by AID deficiency. *Nature*, 463(7284), 1101-1105. <https://doi.org/10.1038/nature08829>
- Portela, A., & Esteller, M. (2010). Epigenetic modifications and human disease. *Nature Biotechnology*, 28(10), 1057-1068. <https://doi.org/10.1038/nbt.1685>
- Postnikov, Y., & Bustin, M. (2010). Regulation of chromatin structure and function By HMGN proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*, 1799(1), 62-68. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2009.11.016>
- Pott, S., & Lieb, J. D. (2015). What are super-enhancers? *Nature Genetics*, 47(1), 8-12. <https://doi.org/10.1038/ng.3167>
- Prager, B. C., Bhargava, S., Mahadev, V., Hubert, C. G., & Rich, J. N. (2020). Glioblastoma Stem Cells : Driving Resilience through Chaos. *Trends in Cancer*, 6(3), 223-235. <https://doi.org/10.1016/j.trecan.2020.01.009>
- Qiu, C., Sawada, K., Zhang, X., & Cheng, X. (2002). The PWWP domain of mammalian DNA methyltransferase Dnmt3b defines a new family of DNA-binding folds. *Nature Structural Biology*. <https://doi.org/10.1038/nsb759>
- Quinlan, A. R., & Hall, I. M. (2010). BEDTools : A flexible suite of utilities for comparing genomic features. *Bioinformatics*, 26(6), 841-842. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq033>
- Rabal, O., San José-Enériz, E., Agirre, X., Sánchez-Arias, J. A., de Miguel, I., Ordoñez, R., Garate, L., Miranda, E., Sáez, E., Vilas-Zornoza, A., Pineda-Lucena, A., Estella, A., Zhang, F., Wu, W., Xu, M., Prosper, F., & Oyarzabal, J. (2021). Design and Synthesis of Novel Epigenetic Inhibitors Targeting Histone Deacetylases, DNA Methyltransferase 1, and Lysine Methyltransferase G9a with *In Vivo* Efficacy in Multiple Myeloma. *Journal of Medicinal Chemistry*, 64(6), 3392-3426. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.0c02255>

- Rabé, M., Dumont, S., Álvarez-Arenas, A., Janati, H., Belmonte-Beitia, J., Calvo, G. F., Thibault-Carpentier, C., Séry, Q., Chauvin, C., Joalland, N., Briand, F., Blandin, S., Scotet, E., Pecqueur, C., Clairambault, J., Oliver, L., Pérez-García, V., Nadaradjane, A. M., Cartron, P.-F., ... Vallette, F. (2020). Identification of a transient state during the acquisition of temozolomide resistance in glioblastoma. *Cell Death and Disease*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/s41419-019-2200-2>
- Rahme, G. J., & Israel, M. A. (2015). Id4 suppresses MMP2-mediated invasion of glioblastoma-derived cells by direct inactivation of Twist1 function. *Oncogene*, 34(1), 53-62. <https://doi.org/10.1038/onc.2013.531>
- Rajavelu, A., Lungu, C., Emperle, M., Dukatz, M., Bröhm, A., Broche, J., Hanelt, I., Parsa, E., Schifflers, S., Karnik, R., Meissner, A., Carell, T., Rathert, P., Jurkowska, R. Z., & Jeltsch, A. (2018). Chromatin-dependent allosteric regulation of DNMT3A activity by MeCP2. *Nucleic Acids Research*, 46(17), 9044-9056. <https://doi.org/10.1093/nar/gky715>
- Rajput, P., Pandey, V., & Kumar, V. (2016). Stimulation of ribosomal RNA gene promoter by transcription factor Sp1 involves active DNA demethylation by Gadd45-NER pathway. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*, 1859(8), 953-963. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2016.05.002>
- Ramalho-Carvalho, J., Graça, I., Gomez, A., Oliveira, J., Henrique, R., Esteller, M., & Jerónimo, C. (2017). Downregulation of miR-130b~301b cluster is mediated by aberrant promoter methylation and impairs cellular senescence in prostate cancer. *Journal of Hematology & Oncology*, 10(1), 43. <https://doi.org/10.1186/s13045-017-0415-1>
- Ramsahoye, B. H., Biniszkiewicz, D., Lyko, F., Clark, V., Bird, A. P., & Jaenisch, R. (2000). Non-CpG methylation is prevalent in embryonic stem cells and may be mediated by DNA methyltransferase 3a. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(10), 5237-5242. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.10.5237>
- Reynolds, G., Gibbon, J. R., Pratt, A. G., Wood, M. J., Coady, D., Raftery, G., Lorenzi, A. R., Gray, A., Filer, A., Buckley, C. D., Haniffa, M. A., Isaacs, J. D., & Hilkens, C. M. U. (2016). Synovial CD4+ T-cell-derived GM-CSF supports the differentiation of an inflammatory dendritic cell population in rheumatoid arthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 75(5), 899-907. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2014-206578>
- Robertson, K. D. (2005). DNA methylation and human disease. *Nature Reviews. Genetics*, 6(8), 597-610. <https://doi.org/10.1038/nrg1655>
- Rochman, M., Postnikov, Y., Correll, S., Malicet, C., Wincovitch, S., Karpova, T. S., McNally, J. G., Wu, X., Bubunenko, N. A., Grigoryev, S., & Bustin, M. (2009). The Interaction of NSBP1/HMGN5 with Nucleosomes in Euchromatin Counteracts Linker Histone-Mediated Chromatin Compaction and Modulates Transcription. *Molecular Cell*, 35(5), 642-656. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2009.07.002>
- Rodriguez, J., Vives, L., Jordà, M., Morales, C., Muñoz, M., Vendrell, E., & Peinado, M. A. (2008). Genome-wide tracking of unmethylated DNA Alu repeats in normal and cancer cells. *Nucleic Acids Research*, 36(3), 770-784. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm1105>
- Rodríguez-Aguilera, J. R., Ecsedi, S., Goldsmith, C., Cros, M.-P., Domínguez-López, M., Guerrero-Celis, N., Pérez-Cabeza de Vaca, R., Chemin, I., Recillas-Targa, F., Chagoya de Sánchez, V., & Hernández-Vargas, H. (2020). Genome-wide 5-hydroxymethylcytosine (5hmC) emerges at early stage of in vitro differentiation of a putative hepatocyte progenitor. *Scientific Reports*, 10(1), 7822. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-64700-2>

- Romani, M., Daga, A., Forlani, A., Pistillo, M. P., & Banelli, B. (2019). Targeting of Histone Demethylases KDM5A and KDM6B Inhibits the Proliferation of Temozolomide-Resistant Glioblastoma Cells. *Cancers*, 11(6), 878. <https://doi.org/10.3390/cancers11060878>
- Rothbart, S. B., Krajewski, K., Nady, N., Tempel, W., Xue, S., Badeaux, A. I., Barsyte-Lovejoy, D., Martinez, J. Y., Bedford, M. T., Fuchs, S. M., Arrowsmith, C. H., & Strahl, B. D. (2012). Association of UHRF1 with methylated H3K9 directs the maintenance of DNA methylation. *Nature Structural & Molecular Biology*, 19(11), 1155-1160. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2391>
- Rothbart, S. B., & Strahl, B. D. (2014). Interpreting the language of histone and DNA modifications. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*, 1839(8), 627-643. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2014.03.001>
- Ryu, C. H., Yoon, W. S., Park, K. Y., Kim, S. M., Lim, J. Y., Woo, J. S., Jeong, C. H., Hou, Y., & Jeun, S.-S. (2012). Valproic Acid Downregulates the Expression of MGMT and Sensitizes Temozolomide-Resistant Glioma Cells. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2012, e987495. <https://doi.org/10.1155/2012/987495>
- Saadatpour, L., Fadaee, E., Fadaei, S., Nassiri Mansour, R., Mohammadi, M., Mousavi, S. M., Goodarzi, M., Verdi, J., & Mirzaei, H. (2016). Glioblastoma : Exosome and microRNA as novel diagnosis biomarkers. *Cancer Gene Therapy*, 23(12), 415-418. <https://doi.org/10.1038/cgt.2016.48>
- Sanai, N., Alvarez-Buylla, A., & Berger, M. S. (2005). Neural Stem Cells and the Origin of Gliomas. *New England Journal of Medicine*, 353(8), 811-822. <https://doi.org/10.1056/NEJMra043666>
- Santiago, M., Antunes, C., Guedes, M., Sousa, N., & Marques, C. J. (2014). TET enzymes and DNA hydroxymethylation in neural development and function—How critical are they? *Genomics*, 104(5), 334-340. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2014.08.018>
- Sasaki, H., & Matsui, Y. (2008). Epigenetic events in mammalian germ-cell development : Reprogramming and beyond. *Nature Reviews Genetics*, 9(2), 129-140. <https://doi.org/10.1038/nrg2295>
- Saxonov, S., Berg, P., & Brutlag, D. L. (2006). A genome-wide analysis of CpG dinucleotides in the human genome distinguishes two distinct classes of promoters. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(5), 1412-1417. <https://doi.org/10.1073/pnas.0510310103>
- Schaefer, M., & Lyko, F. (2010). Solving the Dnmt2 enigma. *Chromosoma*, 119(1), 35-40. <https://doi.org/10.1007/s00412-009-0240-6>
- Schmitz, K.-M., Mayer, C., Postepska, A., & Grummt, I. (2010). Interaction of noncoding RNA with the rDNA promoter mediates recruitment of DNMT3b and silencing of rRNA genes. *Genes & Development*, 24(20), 2264-2269. <https://doi.org/10.1101/gad.590910>
- Schoenfelder, S., & Fraser, P. (2019). Long-range enhancer-promoter contacts in gene expression control. *Nature Reviews Genetics*, 20(8), 437-455. <https://doi.org/10.1038/s41576-019-0128-0>
- Schön, A., Kaminska, E., Schelter, F., Ponkkonen, E., Korytiaková, E., Schiffers, S., & Carell, T. (2020). Analysis of an Active Deformylation Mechanism of 5-Formyl-deoxycytidine (fdC) in Stem Cells. *Angewandte Chemie International Edition*, 59(14), 5591-5594. <https://doi.org/10.1002/anie.202000414>

- Schulz, W. A., Steinhoff, C., & Florl, A. R. (2006). Methylation of Endogenous Human Retroelements in Health and Disease. In W. Doerfler & P. Böhm (Éds.), *DNA Methylation : Development, Genetic Disease and Cancer* (Vol. 310, p. 211-250). Springer Berlin Heidelberg. [https://doi.org/10.1007/3-540-31181-5\\_11](https://doi.org/10.1007/3-540-31181-5_11)
- Schutsky, E. K., Nabel, C. S., Davis, A. K. F., DeNizio, J. E., & Kohli, R. M. (2017). APOBEC3A efficiently deaminates methylated, but not TET-oxidized, cytosine bases in DNA. *Nucleic Acids Research*, 45(13), 7655-7665. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx345>
- Seal, R. L., Chen, L.-L., Griffiths-Jones, S., Lowe, T. M., Mathews, M. B., O'Reilly, D., Pierce, A. J., Stadler, P. F., Ulitsky, I., Wolin, S. L., & Bruford, E. A. (2020). A guide to naming human non-coding RNA genes. *The EMBO Journal*, 39(6), e103777. <https://doi.org/10.1525/embj.2019103777>
- Seibert, M., Krüger, M., Watson, N. A., Sen, O., Daum, J. R., Slotman, J. A., Braun, T., Houtsmüller, A. B., Gorbsky, G. J., Jacob, R., Kracht, M., Higgins, J. M. G., & Schmitz, M. L. (2019). CDK1-mediated phosphorylation at H2B serine 6 is required for mitotic chromosome segregation. *The Journal of Cell Biology*, 218(4), 1164-1181. <https://doi.org/10.1083/jcb.201806057>
- Seto, E., & Yoshida, M. (2014). Erasers of Histone Acetylation : The Histone Deacetylase Enzymes. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 6(4), a018713-a018713. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a018713>
- Shang, Q., Yang, Z., Jia, R., & Ge, S. (2019). The novel roles of circRNAs in human cancer. *Molecular Cancer*, 18(1), 6. <https://doi.org/10.1186/s12943-018-0934-6>
- Sharifi-Zarchi, A., Gerovska, D., Adachi, K., Totonchi, M., Pezeshk, H., Taft, R. J., Schöler, H. R., Chitsaz, H., Sadeghi, M., Baharvand, H., & Araúzo-Bravo, M. J. (2017). DNA methylation regulates discrimination of enhancers from promoters through a H3K4me1-H3K4me3 seesaw mechanism. *BMC Genomics*, 18(1), 964. <https://doi.org/10.1186/s12864-017-4353-7>
- Sharma, S. V., Lee, D. Y., Li, B., Quinlan, M. P., Takahashi, F., Maheswaran, S., McDermott, U., Azizian, N., Zou, L., Fischbach, M. A., Wong, K.-K., Brandstetter, K., Wittner, B., Ramaswamy, S., Classon, M., & Settleman, J. (2010). A chromatin-mediated reversible drug-tolerant state in cancer cell subpopulations. *Cell*, 141(1), 69-80. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.02.027>
- Shen, H., & Laird, P. W. (2013). Interplay between the Cancer Genome and Epigenome. *Cell*, 153(1), 38-55. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.03.008>
- Shen, J.-C., III, W. M. R., & Jones, P. A. (s. d.). *The rate of hydrolytic deamination of 5-methylcytosine in double-stranded DNA*. 5.
- Shen, L., Shi, Q., & Wang, W. (2018). Double agents : Genes with both oncogenic and tumor-suppressor functions. *Oncogenesis*, 7(3), 1-14. <https://doi.org/10.1038/s41389-018-0034-x>
- Shenoy, S. (2020). Cell plasticity in cancer : A complex interplay of genetic, epigenetic mechanisms and tumor micro-environment. *Surgical Oncology*, 34, 154-162. <https://doi.org/10.1016/j.suronc.2020.04.017>
- Shi, L., Chen, J., Yang, J., Pan, T., Zhang, S., & Wang, Z. (2010). MiR-21 protected human glioblastoma U87MG cells from chemotherapeutic drug temozolomide induced apoptosis by decreasing Bax/Bcl-2 ratio and caspase-3 activity. *Brain Research*, 1352, 255-264. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2010.07.009>

- Shi, Y., Lan, F., Matson, C., Mulligan, P., Whetstine, J. R., Cole, P. A., Casero, R. A., & Shi, Y. (2004). Histone Demethylation Mediated by the Nuclear Amine Oxidase Homolog LSD1. *Cell*, 119(7), 941-953. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.12.012>
- Shorstova, T., Foulkes, W. D., & Witcher, M. (2021). Achieving clinical success with BET inhibitors as anti-cancer agents. *British Journal of Cancer*, 124(9), 1478-1490. <https://doi.org/10.1038/s41416-021-01321-0>
- Si, W., Li, Y., Ye, S., Li, Z., Liu, Y., Kuang, W., Chen, D., & Zhu, M. (2020). Methyltransferase 3 Mediated miRNA m6A Methylation Promotes Stress Granule Formation in the Early Stage of Acute Ischemic Stroke. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 13. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2020.00103>
- Siegel, R. L., Miller, K. D., Fuchs, H. E., & Jemal, A. (2021). Cancer Statistics, 2021. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 71(1), 7-33. <https://doi.org/10.3322/caac.21654>
- Siegfried, Z., Eden, S., Mendelsohn, M., Feng, X., Tsuberi, B.-Z., & Cedar, H. (1999). DNA methylation represses transcription in vivo. *Nature Genetics*, 22(2), 203-206. <https://doi.org/10.1038/9727>
- Sielska, M., Przanowski, P., Pasierbińska, M., Wojnicki, K., Poleszak, K., Wojtas, B., Grzegorczyk, D., Ellert-Miklaszewska, A., Ku, M.-C., Kettenmann, H., & Kaminska, B. (2020). Tumour-derived CSF2/granulocyte macrophage colony stimulating factor controls myeloid cell accumulation and progression of gliomas. *British Journal of Cancer*, 123(3), 438-448. <https://doi.org/10.1038/s41416-020-0862-2>
- Silantyev, A., Falzone, L., Libra, M., Gurina, O., Kardashova, K., Nikolouzakis, T., Nosyrev, A., Sutton, C., Mitsias, P., & Tsatsakis, A. (2019). Current and Future Trends on Diagnosis and Prognosis of Glioblastoma : From Molecular Biology to Proteomics. *Cells*, 8(8), 863. <https://doi.org/10.3390/cells8080863>
- Simon, R., Wiegreffe, C., & Britsch, S. (2020). Bcl11 Transcription Factors Regulate Cortical Development and Function. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 13. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2020.00051>
- Simpson, R. T. (1978). Structure of the chromatosome, a chromatin particle containing 160 base pairs of DNA and all the histones. *Biochemistry*, 17(25), 5524-5531. <https://doi.org/10.1021/bi00618a030>
- Sims, R. J., Belotserkovskaya, R., & Reinberg, D. (2004). Elongation by RNA polymerase II : The short and long of it. *Genes & Development*, 18(20), 2437-2468. <https://doi.org/10.1101/gad.1235904>
- Singh, N., Miner, A., Hennis, L., & Mittal, S. (2020). Mechanisms of temozolomide resistance in glioblastoma—A comprehensive review. *Cancer Drug Resistance*. <https://doi.org/10.20517/cdr.2020.79>
- Singh, S. K., Clarke, I. D., Terasaki, M., Bonn, V. E., Hawkins, C., Squire, J., & Dirks, P. B. (2003). Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Research*, 63(18), 5821-5828.
- Slezak-Prochazka, I., Durmus, S., Kroesen, B.-J., & van den Berg, A. (2010). MicroRNAs, macrocontrol : Regulation of miRNA processing. *RNA*, 16(6), 1087-1095. <https://doi.org/10.1261/rna.1804410>
- Smallwood, S. A., & Kelsey, G. (2012). De novo DNA methylation : A germ cell perspective. *Trends in Genetics*, 28(1), 33-42. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2011.09.004>

- Song, C.-X., Szulwach, K. E., Fu, Y., Dai, Q., Yi, C., Li, X., Li, Y., Chen, C.-H., Zhang, W., Jian, X., Wang, J., Zhang, L., Looney, T. J., Zhang, B., Godley, L. A., Hicks, L. M., Lahn, B. T., Jin, P., & He, C. (2011). Selective chemical labeling reveals the genome-wide distribution of 5-hydroxymethylcytosine. *Nature Biotechnology*, 29(1), 68-72. <https://doi.org/10.1038/nbt.1732>
- Song, J., Teplova, M., Ishibe-Murakami, S., & Patel, D. J. (2012). Structure-Based Mechanistic Insights into DNMT1-Mediated Maintenance DNA Methylation. *Science*, 335(6069), 709-712. <https://doi.org/10.1126/science.1214453>
- Spada, F., Haemmer, A., Kuch, D., Rothbauer, U., Schermelleh, L., Kremmer, E., Carell, T., Längst, G., & Leonhardt, H. (2007). DNMT1 but not its interaction with the replication machinery is required for maintenance of DNA methylation in human cells. *Journal of Cell Biology*, 176(5), 565-571. <https://doi.org/10.1083/jcb.200610062>
- Spruijt, C. G., & Vermeulen, M. (2014). DNA methylation : Old dog, new tricks? *Nature Structural & Molecular Biology*, 21(11), 949-954. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2910>
- Stark, A. M., Doukas, A., Hugo, H.-H., Hedderich, J., Hattermann, K., Maximilian Mehdorn, H., & Held-Feindt, J. (2015). Expression of DNA mismatch repair proteins MLH1, MSH2, and MSH6 in recurrent glioblastoma. *Neurological Research*, 37(2), 95-105. <https://doi.org/10.1179/1743132814Y.0000000409>
- Stoetzer, O. J., Fersching, D. M. I., Salat, C., Steinkohl, O., Gabka, C. J., Hamann, U., Braun, M., Feller, A.-M., Heinemann, V., Siegele, B., Nagel, D., & Holdenrieder, S. (2013). Prediction of response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer patients by circulating apoptotic biomarkers nucleosomes, DNase, cytokeratin-18 fragments and survivin. *Cancer Letters*, 336(1), 140-148. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2013.04.013>
- Storey, K., Leder, K., Hawkins-Daarud, A., Swanson, K., Ahmed, A. U., Rockne, R. C., & Foo, J. (2019). Glioblastoma Recurrence and the Role of O<sup>6</sup>-Methylguanine–DNA Methyltransferase Promoter Methylation. *JCO Clinical Cancer Informatics*, 3, 1-12. <https://doi.org/10.1200/CCI.18.00062>
- Strahl, B. D., & Allis, C. D. (2000). The language of covalent histone modifications. *Nature*, 403(6765), 41-45. <https://doi.org/10.1038/47412>
- Straussman, R., Nejman, D., Roberts, D., Steinfield, I., Blum, B., Benvenisty, N., Simon, I., Yakhini, Z., & Cedar, H. (2009). Developmental programming of CpG island methylation profiles in the human genome. *Nature Structural & Molecular Biology*, 16(5), 564-571. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1594>
- Strichman-Almashanu, L. Z., Lee, R. S., Onyango, P. O., Perlman, E., Flam, F., Frieman, M. B., & Feinberg, A. P. (2002). A Genome-Wide Screen for Normally Methylated Human CpG Islands That Can Identify Novel Imprinted Genes. *Genome Research*, 12(4), 543-554. <https://doi.org/10.1101/gr.224102>
- Stroud, H., Feng, S., Morey Kinney, S., Pradhan, S., & Jacobsen, S. E. (2011). 5-Hydroxymethylcytosine is associated with enhancers and gene bodies in human embryonic stem cells. *Genome Biology*, 12(6), R54. <https://doi.org/10.1186/gb-2011-12-6-r54>
- Struhl, K., & Segal, E. (2013). Determinants of nucleosome positioning. *Nature Structural & Molecular Biology*, 20(3), 267-273. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2506>
- Stupp, R., Mason, W. P., van den Bent, M. J., Weller, M., Fisher, B., Taphoorn, M. J. B., Belanger, K., Brandes, A. A., Marosi, C., Bogdahn, U., Curschmann, J., Janzer, R. C., Ludwin, S. K.,

Gorlia, T., Allgeier, A., Lacombe, D., Cairncross, J. G., Eisenhauer, E., Mirimanoff, R. O., ... National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. (2005). Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *The New England Journal of Medicine*, 352(10), 987-996. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa043330>

Su, X., Xing, J., Wang, Z., Chen, L., Cui, M., & Jiang, B. (2013). microRNAs and ceRNAs : RNA networks in pathogenesis of cancer. *Chinese Journal of Cancer Research*, 25(2), 235-239. <https://doi.org/10.3978/j.issn.1000-9604.2013.03.08>

Subramanyam, D., Lamouille, S., Judson, R. L., Liu, J. Y., Bucay, N., Deryck, R., & Blelloch, R. (2011). Multiple targets of miR-302 and miR-372 promote reprogramming of human fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Nature Biotechnology*, 29(5), 443-448. <https://doi.org/10.1038/nbt.1862>

Suetake, I., Shinozaki, F., Miyagawa, J., Takeshima, H., & Tajima, S. (2004). DNMT3L Stimulates the DNA Methylation Activity of Dnmt3a and Dnmt3b through a Direct Interaction. *Journal of Biological Chemistry*, 279(26), 27816-27823. <https://doi.org/10.1074/jbc.M400181200>

Suganuma, T., & Workman, J. L. (2008). Crosstalk among Histone Modifications. *Cell*, 135(4), 604-607. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.10.036>

Sui, X., Chen, R., Wang, Z., Huang, Z., Kong, N., Zhang, M., Han, W., Lou, F., Yang, J., Zhang, Q., Wang, X., He, C., & Pan, H. (2013). Autophagy and chemotherapy resistance : A promising therapeutic target for cancer treatment. *Cell Death & Disease*, 4(10), e838-e838. <https://doi.org/10.1038/cddis.2013.350>

Sumazin, P., Yang, X., Chiu, H.-S., Chung, W.-J., Iyer, A., Llobet-Navas, D., Rajbhandari, P., Bansal, M., Guarnieri, P., Silva, J., & Califano, A. (2011). An Extensive MicroRNA-Mediated Network of RNA-RNA Interactions Regulates Established Oncogenic Pathways in Glioblastoma. *Cell*, 147(2), 370-381. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.09.041>

Sun, W., Lv, S., Li, H., Cui, W., & Wang, L. (2018). Enhancing the Anticancer Efficacy of Immunotherapy through Combination with Histone Modification Inhibitors. *Genes*, 9(12). <https://doi.org/10.3390/genes9120633>

Suzuki, K., Suzuki, I., Leodolter, A., Alonso, S., Horiuchi, S., Yamashita, K., & Peruchio, M. (2006). Global DNA demethylation in gastrointestinal cancer is age dependent and precedes genomic damage. *Cancer Cell*, 9(3), 199-207. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2006.02.016>

Suzuki, T., Shimizu, Y., Furuhata, E., Maeda, S., Kishima, M., Nishimura, H., Enomoto, S., Hayashizaki, Y., & Suzuki, H. (2017). RUNX1 regulates site specificity of DNA demethylation by recruitment of DNA demethylation machineries in hematopoietic cells. *Blood Advances*, 1(20), 1699-1711. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2017005710>

Sved, J., & Bird, A. (1990). The expected equilibrium of the CpG dinucleotide in vertebrate genomes under a mutation model. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87(12), 4692-4696. <https://doi.org/10.1073/pnas.87.12.4692>

Swayden, M., Chhouri, H., Anouar, Y., & Grumolato, L. (2020). Tolerant/Persister Cancer Cells and the Path to Resistance to Targeted Therapy. *Cells*, 9(12), 2601. <https://doi.org/10.3390/cells9122601>

- Tabouret, E., Boudouresque, F., Farina, P., Barrié, M., Bequet, C., Sanson, M., & Chinot, O. (2015). MMP2 and MMP9 as candidate biomarkers to monitor bevacizumab therapy in high-grade glioma. *Neuro-Oncology*, 17(8), 1174-1176. <https://doi.org/10.1093/neuonc/nov094>
- Tahiliani, M., Koh, K. P., Shen, Y., Pastor, W. A., Bandukwala, H., Brudno, Y., Agarwal, S., Iyer, L. M., Liu, D. R., Aravind, L., & Rao, A. (2009). Conversion of 5-Methylcytosine to 5-Hydroxymethylcytosine in Mammalian DNA by MLL Partner TET1. *Science*, 324(5929), 930-935. <https://doi.org/10.1126/science.1170116>
- Takeshima, H., & Ushijima, T. (2019). Accumulation of genetic and epigenetic alterations in normal cells and cancer risk. *Npj Precision Oncology*, 3(1), 7. <https://doi.org/10.1038/s41698-019-0079-0>
- Tan, L., & Shi, Y. G. (2012). Tet family proteins and 5-hydroxymethylcytosine in development and disease. *Development*, 139(11), 1895-1902. <https://doi.org/10.1242/dev.070771>
- Tatematsu, K., Yamazaki, T., & Ishikawa, F. (2000). MBD2-MBD3 complex binds to hemi-methylated DNA and forms a complex containing DNMT1 at the replication foci in late S phase. *Genes to Cells*, 5(8), 677-688. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2443.2000.00359.x>
- Tessarz, P., & Kouzarides, T. (2014). Histone core modifications regulating nucleosome structure and dynamics. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 15(11), 703-708. <https://doi.org/10.1038/nrm3890>
- The Cancer Genome Atlas Research Network. (2008). Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. *Nature*, 455(7216), 1061-1068. <https://doi.org/10.1038/nature07385>
- Toraño, E. G., García, M. G., Fernández-Morera, J. L., Niño-García, P., & Fernández, A. F. (2016). The Impact of External Factors on the Epigenome : In Utero and over Lifetime. *BioMed Research International*, 2016, 2568635. <https://doi.org/10.1155/2016/2568635>
- Trivedi, R. N., Almeida, K. H., Fornasaglio, J. L., Schamus, S., & Sobol, R. W. (2005). The Role of Base Excision Repair in the Sensitivity and Resistance to Temozolomide-Mediated Cell Death. *Cancer Research*, 65(14), 6394-6400. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-0715>
- Tsagaratou, A., Aijo, T., Lio, C.-W. J., Yue, X., Huang, Y., Jacobsen, S. E., Lahdesmaki, H., & Rao, A. (2014). Dissecting the dynamic changes of 5-hydroxymethylcytosine in T-cell development and differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(32), E3306-E3315. <https://doi.org/10.1073/pnas.1412327111>
- Tsuda, H., Takarabe, T., Kanai, Y., Fukutomi, T., & Hirohashi, S. (2002). Correlation of DNA Hypomethylation at Pericentromeric Heterochromatin Regions of Chromosomes 16 and 1 with Histological Features and Chromosomal Abnormalities of Human Breast Carcinomas. *The American Journal of Pathology*, 161(3), 859-866.
- Tucci, V., Isles, A. R., Kelsey, G., Ferguson-Smith, A. C., Tucci, V., Bartolomei, M. S., Benvenisty, N., Bourc'his, D., Charalambous, M., Dulac, C., Feil, R., Glaser, J., Huelsmann, L., John, R. M., McNamara, G. I., Moorwood, K., Muscatelli, F., Sasaki, H., Strassmann, B. I., ... Ferguson-Smith, A. C. (2019). Genomic Imprinting and Physiological Processes in Mammals. *Cell*, 176(5), 952-965. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.01.043>
- Turner, M. C., Andersen, Z. J., Baccarelli, A., Diver, W. R., Gapstur, S. M., Pope, C. A., Prada, D., Samet, J., Thurston, G., & Cohen, A. (2020). Outdoor air pollution and cancer : An

overview of the current evidence and public health recommendations. CA: A Cancer Journal for Clinicians, 70(6), 460-479. <https://doi.org/10.3322/caac.21632>

Urbanek-Trzeciak, M. O., Galka-Marciniak, P., Nawrocka, P. M., Kowal, E., Szwec, S., Giebing, M., & Kozlowski, P. (2020). Pan-cancer analysis of somatic mutations in miRNA genes. *EBioMedicine*, 61, 103051. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2020.103051>

Valinezhad Orang, A., Safaralizadeh, R., & Kazemzadeh-Bavili, M. (2014). Mechanisms of miRNA-Mediated Gene Regulation from Common Downregulation to mRNA-Specific Upregulation. *International Journal of Genomics*, 2014, 1-15. <https://doi.org/10.1155/2014/970607>

Valette, F. M., Olivier, C., Lézot, F., Oliver, L., Cochonneau, D., Lalier, L., Cartron, P.-F., & Heymann, D. (2019). Dormant, quiescent, tolerant and persister cells : Four synonyms for the same target in cancer. *Biochemical Pharmacology*, 162, 169-176. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2018.11.004>

Van den Ackerveken, P., Lobbens, A., Turatsinze, J.-V., Solis-Mezarino, V., Völker-Albert, M., Imhof, A., & Herzog, M. (2021). A novel proteomics approach to epigenetic profiling of circulating nucleosomes. *Scientific Reports*, 11(1), 7256. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-86630-3>

Vasudevan, S., Tong, Y., & Steitz, J. A. (2007). Switching from Repression to Activation : MicroRNAs Can Up-Regulate Translation. *Science*, 318(5858), 1931-1934. <https://doi.org/10.1126/science.1149460>

Velasco, G., Hube, F., Rollin, J., Neuillet, D., Philippe, C., Bouzinba-Segard, H., Galvani, A., Viegas-Pequignot, E., & Francastel, C. (2010). Dnmt3b recruitment through E2F6 transcriptional repressor mediates germ-line gene silencing in murine somatic tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(20), 9281-9286. <https://doi.org/10.1073/pnas.1000473107>

Velpula, K. K., Guda, M. R., Sahu, K., Tuszyński, J., Asuthkar, S., Bach, S. E., Lathia, J. D., & Tsung, A. J. (2017). Metabolic targeting of EGFRvIII/PDK1 axis in temozolomide resistant glioblastoma. *Oncotarget*, 8(22), 35639-35655. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.16767>

Vernimmen, D., & Bickmore, W. A. (2015). The Hierarchy of Transcriptional Activation : From Enhancer to Promoter. *Trends in Genetics: TIG*, 31(12), 696-708. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2015.10.004>

Vertino, P. M., Sekowski, J. A., Coll, J. M., Applegreen, N., Han, S., Hickey, R. J., & Malkas, L. H. (2002). DNMT1 is a Component of a Multiprotein DNA Replication Complex. *Cell Cycle*, 1(6), 416-423. <https://doi.org/10.4161/cc.1.6.270>

Viré, E., Brenner, C., Deplus, R., Blanchon, L., Fraga, M., Didelot, C., Morey, L., Van Eynde, A., Bernard, D., Vanderwinden, J.-M., Bollen, M., Esteller, M., Di Croce, L., de Launoit, Y., & Fuks, F. (2006). The Polycomb group protein EZH2 directly controls DNA methylation. *Nature*, 439(7078), 871-874. <https://doi.org/10.1038/nature04431>

Walton, E. L., Francastel, C., & Velasco, G. (2011). Maintenance of DNA methylation : Dnmt3b joins the dance. *Epigenetics*, 6(11), 1373-1377. <https://doi.org/10.4161/epi.6.11.17978>

Wang, B., Wang, M., Zhang, W., Xiao, T., Chen, C.-H., Wu, A., Wu, F., Traugh, N., Wang, X., Li, Z., Mei, S., Cui, Y., Shi, S., Lipp, J. J., Hinterdorfer, M., Zuber, J., Brown, M., Li, W., & Liu, X. S. (2019). Integrative analysis of pooled CRISPR genetic screens using

MAGECKFlute. *Nature Protocols*, 14(3), 756-780. <https://doi.org/10.1038/s41596-018-0113-7>

Wang, D., Berglund, A. E., Kenchappa, R. S., MacAulay, R. J., Mulé, J. J., & Etame, A. B. (2017). BIRC3 is a biomarker of mesenchymal habitat of glioblastoma, and a mediator of survival adaptation in hypoxia-driven glioblastoma habitats. *Scientific Reports*, 7(1), 9350. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-09503-8>

Wang, J., Wakeman, T. P., Lathia, J. D., Hjelmeland, A. B., Wang, X.-F., White, R. R., Rich, J. N., & Sullenger, B. A. (2009). Notch Promotes Radioresistance of Glioma Stem Cells. *Stem Cells*, N/A-N/A. <https://doi.org/10.1002/stem.261>

Wang, W., Rodriguez-Silva, M., Acanda de la Rocha, A. M., Wolf, A. L., Lai, Y., Liu, Y., Reinhold, W. C., Pommier, Y., Chambers, J. W., & Tse-Dinh, Y.-C. (2019). Tyrosyl-DNA Phosphodiesterase 1 and Topoisomerase I Activities as Predictive Indicators for Glioblastoma Susceptibility to Genotoxic Agents. *Cancers*, 11(10), 1416. <https://doi.org/10.3390/cancers11101416>

Wang, X. (2014). Composition of seed sequence is a major determinant of microRNA targeting patterns. *Bioinformatics*, 30(10), 1377-1383. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu045>

Wang, Y., Xiao, M., Chen, X., Chen, L., Xu, Y., Lv, L., Wang, P., Yang, H., Ma, S., Lin, H., Jiao, B., Ren, R., Ye, D., Guan, K.-L., & Xiong, Y. (2015). WT1 recruits TET2 to regulate its target gene expression and suppress leukemia cell proliferation. *Molecular Cell*, 57(4), 662-673. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.12.023>

Wang, Z., Hausmann, S., Lyu, R., Li, T.-M., Lofgren, S. M., Flores, N. M., Fuentes, M. E., Caporicci, M., Yang, Z., Meiners, M. J., Cheek, M. A., Howard, S. A., Zhang, L., Elias, J. E., Kim, M. P., Maitra, A., Wang, H., Bassik, M. C., Keogh, M.-C., ... Mazur, P. K. (2020). SETD5-Coordinated Chromatin Reprogramming Regulates Adaptive Resistance to Targeted Pancreatic Cancer Therapy. *Cancer Cell*, 37(6), 834-849.e13. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2020.04.014>

Wang, Z., Yao, H., Lin, S., Zhu, X., Shen, Z., Lu, G., Poon, W. S., Xie, D., Lin, M. C., & Kung, H. (2013). Transcriptional and epigenetic regulation of human microRNAs. *Cancer Letters*, 331(1), 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2012.12.006>

Wang, Z., Zang, C., Rosenfeld, J. A., Schones, D. E., Barski, A., Cuddapah, S., Cui, K., Roh, T.-Y., Peng, W., Zhang, M. Q., & Zhao, K. (2008). Combinatorial patterns of histone acetylations and methylations in the human genome. *Nature Genetics*, 40(7), 897-903. <https://doi.org/10.1038/ng.154>

Weber, M., Davies, J. J., Wittig, D., Oakeley, E. J., Haase, M., Lam, W. L., & Schübeler, D. (2005). Chromosome-wide and promoter-specific analyses identify sites of differential DNA methylation in normal and transformed human cells. *Nature Genetics*, 37(8), 853-862. <https://doi.org/10.1038/ng1598>

Wei, L., Chiu, D. K.-C., Tsang, F. H.-C., Law, C.-T., Cheng, C. L.-H., Au, S. L.-K., Lee, J. M.-F., Wong, C. C.-L., Ng, I. O.-L., & Wong, C.-M. (2017). Histone methyltransferase G9a promotes liver cancer development by epigenetic silencing of tumor suppressor gene RARRES3. *Journal of Hepatology*, 67(4), 758-769. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2017.05.015>

West, K. L., Ito, Y., Birger, Y., Postnikov, Y., Shirakawa, H., & Bustin, M. (2001). HMGN3a and HMGN3b, Two Protein Isoforms with a Tissue-specific Expression Pattern, Expand the

Cellular Repertoire of Nucleosome-binding Proteins \*. *Journal of Biological Chemistry*, 276(28), 25959-25969. <https://doi.org/10.1074/jbc.M101692200>

Wiles, E. T., & Selker, E. U. (2017). H3K27 methylation : A promiscuous repressive chromatin mark. *Current Opinion in Genetics & Development*, 43, 31-37. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2016.11.001>

Williams, S. C. P. (2015). News Feature : Capturing cancer's complexity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(15), 4509-4511. <https://doi.org/10.1073/pnas.1500963112>

Wilting, R. H., & Dannenberg, J.-H. (2012). Epigenetic mechanisms in tumorigenesis, tumor cell heterogeneity and drug resistance. *Drug Resistance Updates*, 15(1-2), 21-38. <https://doi.org/10.1016/j.drup.2012.01.008>

Wolbers, J. G. (2014). Novel strategies in glioblastoma surgery aim at safe, supra-maximum resection in conjunction with local therapies. *Chinese Journal of Cancer*, 33(1), 8-15. <https://doi.org/10.5732/cjc.013.10219>

Wong, C. Y., Shao, H., & Lee, H. (2021). Chapter 18—On-chip analysis of glioblastoma cell chemoresistance. In R. Paulmurugan & T. F. Massoud (Éds.), *Glioblastoma Resistance to Chemotherapy : Molecular Mechanisms and Innovative Reversal Strategies* (Vol. 15, p. 473-490). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-821567-8.00028-2>

Woodhouse, B. C., Dianova, I. I., Parsons, J. L., & Dianov, G. L. (2008). Poly(ADP-ribose) polymerase-1 modulates DNA repair capacity and prevents formation of DNA double strand breaks. *DNA Repair*, 7(6), 932-940. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2008.03.017>

Wozniak, R. J., Klimecki, W. T., Lau, S. S., Feinstein, Y., & Futscher, B. W. (2007). 5-Aza-2'-deoxycytidine-mediated reductions in G9A histone methyltransferase and histone H3 K9 di-methylation levels are linked to tumor suppressor gene reactivation. *Oncogene*, 26(1), 77-90. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209763>

Wu, D., Qiu, Y., Jiao, Y., Qiu, Z., & Liu, D. (2020). Small Molecules Targeting HATs, HDACs, and BRDs in Cancer Therapy. *Frontiers in Oncology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.560487>

Wu, H., Xu, H., Miraglia, L. J., & Crooke, S. T. (2000). Human RNase III is a 160-kDa protein involved in preribosomal RNA processing. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(47), 36957-36965. <https://doi.org/10.1074/jbc.M005494200>

Wu, L., Fan, J., & Belasco, J. G. (2006). MicroRNAs direct rapid deadenylation of mRNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(11), 4034-4039. <https://doi.org/10.1073/pnas.0510928103>

Wu, Q., Berglund, A. E., Wang, D., MacAulay, R. J., Mulé, J. J., & Etame, A. B. (2019). Paradoxical epigenetic regulation of XAF1 mediates plasticity towards adaptive resistance evolution in MGMT-methylated glioblastoma. *Scientific Reports*, 9(1), 14072. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-50489-2>

Wu, X., & Zhang, Y. (2017). TET-mediated active DNA demethylation : Mechanism, function and beyond. *Nature Reviews Genetics*, 18(9), 517-534. <https://doi.org/10.1038/nrg.2017.33>

Xin, L., Liu, L., Liu, C., Zhou, L., Zhou, Q., Yuan, Y., Li, S., & Zhang, H. (2020). DNA-methylation-mediated silencing of miR-7-5p promotes gastric cancer stem cell invasion via

increasing Smo and Hes1. *Journal of Cellular Physiology*, 235(3), 2643-2654.  
<https://doi.org/10.1002/jcp.29168>

Xu, K., Zhang, Z., Pei, H., Wang, H., Li, L., & Xia, Q. (2017). FoxO3a induces temozolomide resistance in glioblastoma cells via the regulation of β-catenin nuclear accumulation. *Oncology Reports*, 37(4), 2391-2397. <https://doi.org/10.3892/or.2017.5459>

Yan, H., Parsons, D. W., Jin, G., McLendon, R., Rasheed, B. A., Yuan, W., Kos, I., Batinic-Haberle, I., Jones, S., Riggins, G. J., Friedman, H., Friedman, A., Reardon, D., Herndon, J., Kinzler, K. W., Velculescu, V. E., Vogelstein, B., & Bigner, D. D. (2009). IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. *The New England Journal of Medicine*, 360(8), 765-773.  
<https://doi.org/10.1056/NEJMoa0808710>

Yang, G.-J., Zhu, M.-H., Lu, X.-J., Liu, Y.-J., Lu, J.-F., Leung, C.-H., Ma, D.-L., & Chen, J. (2021). The emerging role of KDM5A in human cancer. *Journal of Hematology & Oncology*, 14(1), 30. <https://doi.org/10.1186/s13045-021-01041-1>

Yang, J., Bashkenova, N., Zang, R., Huang, X., & Wang, J. (2020). The roles of TET family proteins in development and stem cells. *Development*, 147(2), dev183129.  
<https://doi.org/10.1242/dev.183129>

Yang, J., & Corces, V. G. (2011). Chromatin insulators : A role in nuclear organization and gene expression. *Advances in Cancer Research*, 110, 43-76.  
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386469-7.00003-7>

Yang, J.-M., Schiapparelli, P., Nguyen, H.-N., Igarashi, A., Zhang, Q., Abbadi, S., Amzel, L. M., Sesaki, H., Quiñones-Hinojosa, A., & Iijima, M. (2017). Characterization of PTEN mutations in brain cancer reveals that pten mono-ubiquitination promotes protein stability and nuclear localization. *Oncogene*, 36(26), 3673-3685.  
<https://doi.org/10.1038/onc.2016.493>

Yang, W., Xia, Y., Hawke, D., Li, X., Liang, J., Xing, D., Aldape, K., Hunter, T., Alfred Yung, W. K., & Lu, Z. (2012). PKM2 phosphorylates histone H3 and promotes gene transcription and tumorigenesis. *Cell*, 150(4), 685-696. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.07.018>

Yi, R., Qin, Y., Macara, I. G., & Cullen, B. R. (2003). Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes & Development*, 17(24), 3011-3016.  
<https://doi.org/10.1101/gad.1158803>

Yin, A., Zhang, L., Cheng, J., Dong, Y., Liu, B., Han, N., & Zhang, X. (2014). The Predictive but Not Prognostic Value of MGMT Promoter Methylation Status in Elderly Glioblastoma Patients : A Meta-Analysis. *PLoS ONE*, 9(1), e85102.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0085102>

Yin, J., Xie, X., Ye, Y., Wang, L., & Che, F. (2019). BCL11A : A potential diagnostic biomarker and therapeutic target in human diseases. *Bioscience Reports*, 39(11), BSR20190604.  
<https://doi.org/10.1042/BSR20190604>

Yoon, S., & Eom, G. H. (2016). HDAC and HDAC Inhibitor : From Cancer to Cardiovascular Diseases. *Chonnam Medical Journal*, 52(1), 1-11.  
<https://doi.org/10.4068/cmj.2016.52.1.1>

Young, R. M., Jamshidi, A., Davis, G., & Sherman, J. H. (2015). Current trends in the surgical management and treatment of adult glioblastoma. *Annals of Translational Medicine*, 3(9), 121. <https://doi.org/10.3978/j.issn.2305-5839.2015.05.10>

- Yu, W., Zhang, L., Wei, Q., & Shao, A. (2020). O6-Methylguanine-DNA Methyltransferase (MGMT) : Challenges and New Opportunities in Glioma Chemotherapy. *Frontiers in Oncology*, 0. <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.01547>
- Yuzhalin, A. E. (2019). Citrullination in Cancer. *Cancer Research*, 79(7), 1274-1284. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-18-2797>
- Zamudio, N., & Bourc'his, D. (2010). Transposable elements in the mammalian germline : A comfortable niche or a deadly trap? *Heredity*, 105(1), 92-104. <https://doi.org/10.1038/hdy.2010.53>
- Zeng, A.-L., Yan, W., Liu, Y.-W., Wang, Z., Hu, Q., Nie, E., Zhou, X., Li, R., Wang, X.-F., Jiang, T., & You, Y.-P. (2017). Tumour exosomes from cells harbouring PTPRZ1–MET fusion contribute to a malignant phenotype and temozolomide chemoresistance in glioblastoma. *Oncogene*, 36(38), 5369-5381. <https://doi.org/10.1038/onc.2017.134>
- Zeng, L., Zhang, Q., Li, S., Plotnikov, A. N., Walsh, M. J., & Zhou, M.-M. (2010). Mechanism and regulation of acetylated histone binding by the tandem PHD finger of DPF3b. *Nature*, 466(7303), 258-262. <https://doi.org/10.1038/nature09139>
- Zentner, G. E., & Henikoff, S. (2013). Regulation of nucleosome dynamics by histone modifications. *Nature Structural & Molecular Biology*, 20(3), 259-266. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2470>
- Zhang, C.-H., Wang, J., Zhang, L.-X., Lu, Y.-H., Ji, T.-H., Xu, L., & Ling, L.-J. (2017). Shikonin reduces tamoxifen resistance through long non-coding RNA uc.57. *Oncotarget*, 8(51), 88658-88669. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.20809>
- Zhang, G., Estève, P.-O., Chin, H. G., Terragni, J., Dai, N., Corrêa, I. R., & Pradhan, S. (2015). Small RNA-mediated DNA (cytosine-5) methyltransferase 1 inhibition leads to aberrant DNA methylation. *Nucleic Acids Research*, 43(12), 6112-6124. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv518>
- Zhang, H., Bajraszewski, N., Wu, E., Wang, H., Moseman, A. P., Dabora, S. L., Griffin, J. D., & Kwiatkowski, D. J. (2007). PDGFRs are critical for PI3K/Akt activation and negatively regulated by mTOR. *The Journal of Clinical Investigation*, 117(3), 730-738. <https://doi.org/10.1172/JCI28984>
- Zhang, H., Gao, Q., Tan, S., You, J., Lyu, C., Zhang, Y., Han, M., Chen, Z., Li, J., Wang, H., Liao, L., Qin, J., Li, J., & Wong, J. (2019). SET8 prevents excessive DNA methylation by methylation-mediated degradation of UHRF1 and DNMT1. *Nucleic Acids Research*, gkz626. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz626>
- Zhang, H., Ma, Y., Wang, H., Xu, L., & Yu, Y. (2019). MMP-2 expression and correlation with pathology and MRI of glioma. *Oncology Letters*, 17(2), 1826-1832. <https://doi.org/10.3892/ol.2018.9806>
- Zhang, H., Zhang, X., Clark, E., Mulcahey, M., Huang, S., & Shi, Y. G. (2010). TET1 is a DNA-binding protein that modulates DNA methylation and gene transcription via hydroxylation of 5-methylcytosine. *Cell Research*, 20(12), 1390-1393. <https://doi.org/10.1038/cr.2010.156>
- Zhang, S., Wan, Y., Pan, T., Gu, X., Qian, C., Sun, G., Sun, L., Xiang, Y., Wang, Z., & Shi, L. (2012). MicroRNA-21 Inhibitor Sensitizes Human Glioblastoma U251 Stem Cells to Therapeutic Drug Temozolomide. *Journal of Molecular Neuroscience*, 47(2), 346-356. <https://doi.org/10.1007/s12031-012-9759-8>

- Zhang, W., Klinkebiel, D., Barger, C. J., Pandey, S., Guda, C., Miller, A., Akers, S. N., Odunsi, K., & Karpf, A. R. (2020). Global DNA Hypomethylation in Epithelial Ovarian Cancer: Passive Demethylation and Association with Genomic Instability. *Cancers*, 12(3). <https://doi.org/10.3390/cancers12030764>
- Zhang, X., Ouyang, S., Kong, X., Liang, Z., Lu, J., Zhu, K., Zhao, D., Zheng, M., Jiang, H., Liu, X., Marmorstein, R., & Luo, C. (2014). Catalytic Mechanism of Histone Acetyltransferase p300: From the Proton Transfer to Acetylation Reaction. *The Journal of Physical Chemistry B*, 118(8), 2009-2019. <https://doi.org/10.1021/jp409778e>
- Zhang, Y., Liu, T., Meyer, C. A., Eeckhoute, J., Johnson, D. S., Bernstein, B. E., Nussbaum, C., Myers, R. M., Brown, M., Li, W., & Liu, X. S. (2008). Model-based Analysis of ChIP-Seq (MACS). *Genome Biology*, 9(9), R137. <https://doi.org/10.1186/gb-2008-9-9-r137>
- Zhang, Y., Tang, C., Yu, T., Zhang, R., Zheng, H., & Yan, W. (2017). MicroRNAs control mRNA fate by compartmentalization based on 3' UTR length in male germ cells. *Genome Biology*, 18(1), 105. <https://doi.org/10.1186/s13059-017-1243-x>
- Zhang, Z., Wang, Y., Chen, J., Tan, Q., Xie, C., Li, C., Zhan, W., & Wang, M. (2016). Silencing of histone deacetylase 2 suppresses malignancy for proliferation, migration, and invasion of glioblastoma cells and enhances temozolomide sensitivity. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 78(6), 1289-1296. <https://doi.org/10.1007/s00280-016-3188-2>
- Zhang, Z., Wippo, C. J., Wal, M., Ward, E., Korber, P., & Pugh, B. F. (2011). A packing mechanism for nucleosome organization reconstituted across a eukaryotic genome. *Science (New York, N.Y.)*, 332(6032), 977-980. <https://doi.org/10.1126/science.1200508>
- Zhang, Z., Yin, J., Lu, C., Wei, Y., Zeng, A., & You, Y. (2019). Exosomal transfer of long non-coding RNA SBF2-AS1 enhances chemoresistance to temozolomide in glioblastoma. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 38(1), 166. <https://doi.org/10.1186/s13046-019-1139-6>
- Zhao, C., Wang, H., Xiong, C., & Liu, Y. (2018). Hypoxic glioblastoma release exosomal VEGF-A induce the permeability of blood-brain barrier. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 502(3), 324-331. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.05.140>
- Zhou, D., Wan, Y., Xie, D., Wang, Y., Wei, J., Yan, Q., Lu, P., Mo, L., Xie, J., Yang, S., & Qi, X. (2015). DNMT1 mediates chemosensitivity by reducing methylation of miRNA-20a promoter in glioma cells. *Experimental & Molecular Medicine*, 47(9), e182-e182. <https://doi.org/10.1038/emm.2015.57>
- Zhou, W., Yu, X., Sun, S., Zhang, X., Yang, W., Zhang, J., Zhang, X., & Jiang, Z. (2019). Increased expression of MMP-2 and MMP-9 indicates poor prognosis in glioma recurrence. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 118, 109369. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.109369>
- Ziller, M. J., Gu, H., Müller, F., Donaghey, J., Tsai, L. T.-Y., Kohlbacher, O., De Jager, P. L., Rosen, E. D., Bennett, D. A., Bernstein, B. E., Gnirke, A., & Meissner, A. (2013). Charting a dynamic DNA methylation landscape of the human genome. *Nature*, 500(7463), 477-481. <https://doi.org/10.1038/nature12433>
- zur Hausen, H. (2002). Papillomaviruses and cancer: From basic studies to clinical application. *Nature Reviews. Cancer*, 2(5), 342-350. <https://doi.org/10.1038/nrc798>



**Titre :** Etude des mécanismes et dynamiques épigénétiques dans le glioblastome multiforme au cours de l'acquisition de la résistance au témozolomide.

**Mots clés :** glioblastome, témozolomide, résistance, épigénétique, transcriptome, biomarqueur

**Résumé :** Le glioblastome multiforme (GBM) est le cancer du cerveau le plus fréquent et le plus agressif chez l'adulte. La thérapie standard des glioblastomes nouvellement diagnostiqués comprend la chirurgie suivie d'une radiothérapie concomitante à de la chimiothérapie avec le témozolomide (TMZ) et d'un traitement adjuvant par le témozolomide seul. La grande hétérogénéité cellulaire et la plasticité des GBM et de leur microenvironnement tumoral entraînent rapidement l'apparition d'une résistance au TMZ, menant malheureusement à une impasse thérapeutique. Il se trouve que les dynamiques épigénétiques et les mécanismes d'adaptation transcriptomique tiennent un rôle majeur dans la résistance acquise des GBM au TMZ. Dans ce sens, des expériences ont été menées sur une lignée cellulaire de GBM à l'état sensible, tolérante et résistante au TMZ.

Premièrement, l'intégration de l'évolution du profil H3K27ac à celui du transcriptome a permis de prédire la surexpression de gènes/protéines candidats à des thérapies ciblées. Une partie de ces prédictions ont été validées *in vitro* par l'utilisation d'inhibiteurs sur des cellules tolérantes et résistantes au TMZ. Certaines, dosées dans le sérum de patients, ont révélées un potentiel biomarqueur. Deuxièmement, nos expériences d'invalidation CRISPR ont mis en évidence BCL11A comme acteur de la sensibilité au témozolomide des cellules de glioblastome. Dans leur ensemble, ces travaux appuient l'importance des biomarqueurs et leur utilité pour répondre à la nécessité d'une prise en charge personnalisée adaptée à la plasticité intra-tumorale. Ils ouvrent aussi des perspectives de de traitement pour lever la résistance au TMZ.

**Title:** Study of mechanisms and epigenetics dynamics in glioblastoma multiforme during the acquisition of temozolomide resistance.

**Keywords:** glioblastoma, temozolomide, resistance, epigenetics, transcriptome, biomarker

**Abstract:** Glioblastoma multiforme (GBM) is the most common and aggressive brain cancer in adults. Standard therapy for newly diagnosed glioblastoma includes surgery followed by radiotherapy with concurrent chemotherapy with temozolomide (TMZ) and adjuvant treatment with temozolomide alone. The high cellular heterogeneity and plasticity of GBMs and their tumour microenvironment rapidly lead to the development of resistance to TMZ, unfortunately conducting to a therapeutic impasse. It turns out that epigenetic dynamics and transcriptomic adaptation mechanisms play a major role in the acquired resistance of GBMs to TMZ. In this way, experiments were conducted on a TMZ-sensitive, tolerant and resistant GBM cell line.

Firstly, the integration of the evolution of the H3K27ac profile with that of the transcriptome allowed the prediction of the overexpression of candidate genes/proteins for targeted therapies. Some of these predictions were validated *in vitro* using inhibitors on TMZ tolerant and resistant cells. Several were also measured in patient serum and revealed biomarker. Secondly, our CRISPR invalidation experiments highlighted BCL11A as a player in temozolomide sensitivity of glioblastoma cells. Taken together, this work supports the importance of biomarkers and their usefulness in addressing the need for personalised management adapted to intra-tumour plasticity. It also opens up prospects for treatment to overcome TMZ resistance.

