

THESE DE DOCTORAT DE

NANTES UNIVERSITE

ECOLE DOCTORALE N° 605

Biologie Santé

Spécialité : Cancérologie

Par

Florestan COURANT

Etude des mécanismes épigénétiques et épitranscriptomiques impliqués dans l'acquisition de la résistance aux inhibiteurs du cycle cellulaire (CDK4/6) dans les cancers du sein hormono-dépendants.

Thèse présentée et soutenue à Nantes, le 17 octobre 2022

Unité de recherche : INSERM UMR 1307, CRCI^{NA}

Rapporteurs avant soutenance :

Fabienne MEGGETTO

Florence DALENC

Directrice de recherche, INSERM, Université de Toulouse

Professeure des Universités, Praticienne Hospitalier, Université de Toulouse

Composition du Jury :

Présidente :

Valérie GEOFFROY

Directrice de recherche, INSERM, Nantes Université

Examineurs :

Fabienne MEGGETTO

Directrice de recherche, INSERM, Université de Toulouse

Florence DALENC

Professeure des Universités, Praticienne Hospitalier, Université de Toulouse

Paul PEIXOTO

Maître de conférences, INSERM, Université de Franche Comté

Dir. de thèse :

Pierre-François CARTRON

Chargé de Recherche, INSERM, Nantes Université

Co-encadrant. de thèse : Jean-Sébastien FRENEL

Praticien Hospitalier, INSERM, Nantes Université

Invité :

Benjamin ORY

Maître de conférences hors classe, INSERM, Nantes Université

Titre : Etude des mécanismes épigénétiques et épitranscriptomiques impliqués dans l'acquisition de la résistance aux inhibiteurs du cycle cellulaire (CDK4/6) dans les cancers du sein hormono-dépendants.

Mots clés : Cancer du sein, épigénétique, épitranscriptomique, Palbociclib, résistance, biomarqueurs

Résumé. Depuis plusieurs années, la prise en charge des cancers du sein luminaux repose sur l'utilisation d'inhibiteurs du cycle cellulaire ciblant les kinases CDK4/6 (CDK4/6i) comme le Palbociclib. Malgré des résultats prometteurs, on constate que la plupart des patientes développent une résistance à ces inhibiteurs. Pour surmonter, éviter ou retarder cette résistance, des combothérapies peuvent être mises en place.

Afin de proposer un rationnel au design de combothérapies innovantes, nous avons émis l'hypothèse que les reprogrammations épigénétiques et épitranscriptomiques induites par les CDK4/6i pourraient générer des vulnérabilités thérapeutiques « dynamiques/transitoires » pouvant être inhibées par des molécules de thérapies ciblées. Les travaux présentés vont dans ce sens. La surexpression de la protéine BRD4 au sein de cellules Palbociclib-résistantes et l'intégration de résultats de 3'RNAseq et de

BRD4-ChIPseq nous ont conduit à mettre en évidence l'existence de trois options de combothérapies dynamique/adaptative. De plus, nos travaux identifient le niveau de méthylation du gène *BRD4* dans le sang des patientes comme pouvant être un biomarqueur de sensibilité à ces combothérapies.

L'étude des mécanismes et signatures épitranscriptomiques a ensuite montré que ceux-ci étaient modifiés au sein de cellules Palbociclib-résistantes et l'intégration de ces résultats nous a également permis de mettre en évidence l'existence d'options de combothérapies dynamiques/adaptatives.

En conclusion, l'ensemble de ces travaux supportent l'idée d'utiliser des biomarqueurs épigénétiques et/ou épitranscriptomiques pour le design de combothérapies innovantes s'inscrivant dans un cadre de traitement personnalisé et de précision des cancers.

Title: Study of epigenetic and epitranscriptomic mechanisms involved in acquiring resistance to cell cycle inhibitors (CDK4/6) in homono-dependant breast cancers.

Keywords : Breast cancer, epigenetic, epitranscriptomic, Palbociclib, resistance, biomarkers

Abstract. For several years, the management of luminal breast cancers has been based on the use of cell cycle inhibitors targeting CDK4/6 kinases (CDK4/6i) as the Palbociclib. Despite promising results, most patients develop resistance to these inhibitors. To overcome, avoid or delay this resistance, combotherapy can be implemented.

To propose a rationale for the design of innovative combotherapy, we hypothesized that the epigenetic/epitranscriptomic reprogramming induced by CDK4/6i could generate "dynamic/transitory" therapeutic vulnerabilities that could be inhibited by targeted-therapy molecules. The work presented is in line with this idea. The overexpression of BRD4 protein in Palbociclib-resistant cells and the integration of 3'RNAseq and BRD4-ChIPseq results led us

to highlight the existence of three options of dynamic/adaptive combotherapy. Furthermore, our work identifies the methylation level of *BRD4* gene in the blood of patients as a possible biomarker of sensitivity to these combotherapy. The study of epitranscriptomic mechanisms and signatures then showed that these were modified in Palbociclib-resistant cells and the integration of these results led us to highlight the existence of dynamic/adaptive combotherapy options.

In conclusion, all of this work supports the idea that epigenetic and/or epitranscriptomic biomarkers can be used to design innovative dynamic/adaptive combotherapy in a personalized and precision cancer treatment framework.

Remerciements

Ce travail de thèse a été réalisé au sein de l'ancienne équipe 9 du Centre de Recherche en Cancérologie et Immunologie U1232 (2019-2021) puis dans l'équipe 7 du Centre de Recherche en Cancérologie et Immunologie Intégrée Nantes Angers UMR1307 (2022) – Laboratoire de Biologie des Cancers et Théranostic (LaBCT) à l'Institut de Cancérologie de l'Ouest (ICO), René Gauducheau.

Je souhaiterais tout d'abord remercier historiquement **Marc GREGOIRE** pour m'avoir accueilli au sein du CRCINA ainsi que **François VALLETTE** en tant que responsable de l'équipe 9 puis **Philippe JUIN**, nouveau directeur du CRCI²NA et responsable de l'équipe 7. Merci à toi **Philippe** pour tes nombreux conseils, tes remarques souvent très réfléchies et éclairées, j'ai beaucoup apprécié nos discussions scientifiques. Merci également à **Mario CAMPONE**, directeur de l'ICO.

Je tiens également à remercier les rapporteuses de cette thèse : **Fabienne MEGGETTO** et **Florence DALENC**. Je vous remercie toutes les deux pour votre grande sympathie et votre flexibilité, je sais que les périodes de corrections et de soutenance en septembre/octobre ne sont pas les plus calmes, c'est pourquoi je vous suis vraiment reconnaissant d'avoir accepté ce rôle (même si cela n'était initialement pas prévu pour vous **Florence**, merci encore pour votre prémonition !). Merci également à **Valérie GEOFFROY**, **Paul PEIXOTO** et **Benjamin ORY** d'avoir accepté d'être membre du jury, pour votre disponibilité et votre flexibilité également pour la date et l'horaire de la soutenance. Merci **Benjamin** d'avoir accepté les différents changements de statut pour rendre ce jury compatible aux règles de l'école doctorale. Je suis heureux de tous pouvoir vous compter parmi les membres de ce jury de thèse et espère pouvoir profiter de vos expertises durant la soutenance.

Merci à **Eric HERVOUET** et **Delphine FRADIN** pour vos conseils, votre bienveillance et nos échanges durant mes comités de suivi.

J'exprime toute ma gratitude à la **région Pays de La Loire**, l'association **En Avant La Vie** et au programme **EpiSAVMEN** (Dynamique scientifique régional- région Pays de la Loire) d'avoir contribué au financement de ma thèse. Je remercie également **l'Institut de Cancérologie de l'Ouest** pour le soutien de ma thèse.

Je remercie la plateforme **Génomique GenoA**, membre de Biogenouest et de France Génomique, ainsi que la plateforme **Bioinformatique BiRD**, membre de Biogenouest et de l'Institut Français de Bioinformatique (IFB) (ANR-11-INBS-0013) pour leur contribution dans la réalisation des présents travaux

Un grand merci au **Cancéropôle Grand Ouest** d'avoir retenu mon abstract en 2019 (et les années suivantes) et de m'avoir permis de présenter mon poster de master. On dit que la vie est faite de rencontres et d'opportunités, et sans cela je n'aurais jamais eu l'occasion de réaliser cette thèse. Un grand merci à **Pierre-François CARTRON**, d'avoir été membre de mon jury de poster, puis après quelques conversations, mon directeur de thèse. Merci d'avoir cru en moi et de m'avoir donné la chance de continuer à travailler sur les cancers et l'épigénétique, mes deux « passions ». Merci pour tes nombreux conseils scientifiques, tu m'as appris une nouvelle façon de réfléchir et de considérer l'épigénétique dans les pathologies, avec une vision très prometteuse pour le futur. Merci pour la rédaction des publications, ton aide dans les différentes expériences, pour tes corrections, que ce soit pour les posters, les csi, les oraux et ce manuscrit. Merci également pour ton soutien dans les moments plus difficiles.

Merci à **Jean-Sébastien FRENEL**, mon co-directeur de thèse. Merci d'avoir apporté une dimension médicale à cette thèse et de m'avoir permis d'identifier les enjeux de la médecine actuelle. C'est un vrai plus d'avoir pu échanger avec toi et d'avoir eu conscience des problématiques cliniques pour les intégrer dans ces recherches. Merci également pour tes précieuses corrections.

Je souhaite également remercier l'ensemble des personnes de l'ancienne équipe 9 du CRCINA, de l'équipe 7 du CRCI²NA, de l'ICO et des autres équipes avec qui j'ai eu le plaisir de travailler durant ces 3 années de thèse. Un grand merci à l'ensemble des personnes qui ont contribué à la réalisation de ces différents travaux, sans qui rien n'aurait été possible : **Pierre-François CARTRON, Jean-Sébastien FRENEL, Philippe JUIN, Gwénola BOUGRAS-CARTRON, Aurélien SERANDOUR, Vincent GUEN, Catherine GUETTE, Julie ROUL, Adrien BRETON, Klara EDERN, Elen GOUJON, Yuna LANDAIS et Quentin ARBERET.**

Et merci aussi aux personnes qui m'ont entouré durant ces 3 années, et même avant cela :

Martine DECOVILLE : merci de m'avoir initié à l'épigénétique durant les cours et ma mini thèse au CBM. Mine de rien j'y serais resté 3 ans quand même !! Merci pour vos conseils avisés, votre patience et gentillesse, vos encouragements et de m'avoir poussé à donner le meilleur de moi-même, finalement je l'aurais fait cette thèse !

Marie-Pierre : merci pour ta bonne humeur sans faille, tes conseils et ta bienveillance, pour nos discussions sur la pâtisserie, notre grande passion. Je te souhaite une bonne retraite, tu l'as bien mérité.

Lisenn : merci pour tes conseils (scientifiques et véto), ton calme en toutes circonstances, et tes remarques pertinentes.

Gwénola : merci beaucoup pour ta gentillesse, ton aide dans les situations difficiles, ton soutien et tes encouragements, merci pour l'organisation des différents séminaires avec **Morgan**.

Nolwenn : merci pour ta force de caractère et ta rigueur, même si nos équipes se sont séparées en chemin, ça a toujours été un plaisir de discuter et rigoler avec toi.

Une pensée pour les autres membres du LaBCT, présent et passé : **Vincent P, Manon P, Axelle, Didier, Ahlem, Antoine A, Dominique, Laurie, Perrine**. Merci **Javier, Emilie, Denis** pour les différents services que vous avez pu me rendre, pour les formations sur les appareils ou le dépannage de matériel ! Merci **Aurélien** pour ton initiation à la bio-informatique et ta rigueur scientifique. Merci à mes collègues de l'équipe 7 pour votre bienveillance : **Philippe, Fred S, Fred N, Sophie, Laurent, Vincent, Magali, Floriane, Aurélie, Julie, Judith, Marie, Alison, Florian, Chloé**.

Merci au personnel du service technique, **Stéphane, Greg, Christian, Matthieu, Jimmy** et **Nico**, les petites souris du labo, toujours prêt à nous rendre service et réparer le matos cassé. Bon voyage **Jimmy**, c'était un plaisir de te croiser et d'échanger avec toi, PS : la recette de ton punch est incroyable. **Nico**, désolé pour les réparations douteuses du microscope à base d'aluminium... Merci à tous les deux pour votre bonne humeur.

Merci à l'équipe du DBO : **Estelle** et **Vanessa** pour les préparations des prélèvements et l'aide dans l'envoi des colis, à **Céline** pour la gestion des commandes.

Merci à l'équipe de **Catherine GUETTE, Alice et Cécile** pour leur aide et la préparation des échantillons pour la spectrométrie de masse.

A mes amis, par où commencer ? **Tanguy, Marc, Christopher**, plus de 20 ans d'amitié, même si on se perd de vue avec les études, c'est toujours bon de se revoir et de refaire des soirées à l'ancienne avec des bons fous rires. **Gabriel**, on en aura fait des choses depuis l'internat, merci pour ton second degré hors pair, vivement les vacances à Malte !!! **Ferdinand, Laura, Alexis**, la dream team, de loin mes meilleures années d'étude à la FAC avec vous, le β -propeller restera gravé dans les annales ! Je pense également à **Elodie, Christophe, Valentin, Yasmine et Mélanie**, on aura bien rigolé aussi pendant nos stages.

Et puis l'aventure de la thèse est arrivée, sacré épreuve, sans parlé du COCO et des confinements... Mais j'ai pu rencontrer des personnes incroyables. Une pensée pour mes collègues de **NAN'THESE**, en particulier à **Lisa**, avec qui j'ai eu le plaisir de monter différents projets. Merci à mes voisins de pallier, **Eloïse et Louis**, pour les soirées improvisées toujours bon délire. Merci à **Joséphine**, notre mentor à tous, pour tes précieux conseils et le temps passé à relire mon intro. **Manon**, la seule, l'unique « avec tes news balance et... » TMTTC la suite. Merci pour ton franc parlé, tes conseils et ton soutien, comme tu l'as dit dans ta thèse, on a vécu les galères ensemble mais on s'en est toujours sorti, c'était un vrai plaisir de passer ces deux ans avec toi, merci pour ta bonne humeur et ton grand sens de l'humour. **Camille**, la petite Sherlock du labo, merci pour ton empathie et ta bienveillance, tu as été un précieux soutien dans les moments difficiles. Merci pour toutes nos discussions et débats interminables mais toujours constructifs, pour tes talents de réalisatrice et d'actrice dignes des plus grands. **Emilien**, notre musicien, merci pour tous tes conseils scientifiques, c'est toujours enrichissant de discuter avec toi. **Marie**, notre chanteuse officielle, même si entre les manips, le covid, ta rédaction et ton départ au pays des caribous on ne s'est pas beaucoup croisé, on aura énormément rigolé. **Adrien**... no comment ahaha. Merci d'être toi, tu nous fais rire autant que tu nous fatigue avec tes histoires improbables, ta vie est incroyable ! Merci pour ton soutien, tu as toujours su être juste et impartial et c'est une de tes grandes qualités. **Maxime**, « mon stagiaire », bravo pour ta persévérance, merci pour ton humour, j'espère que tu passeras à mon pot de thèse, il devrait rester une part de flan... **Luc**, la crème de la crème des médecins, tu m'as toujours impressionné, dans ta manière de rester calme et posé tout en enchaînant un travail monstrueux, ton autonomie au laboratoire durant ton stage de master alors que

c'était la première fois que tu mettais les pieds du côté de la recherche, les heures passées devant le microscope, les publis que tu as réalisés en parfaite autonomie tout en gérant 1 milliards de réunions, ton sarcasme toujours placé au bon moment, tes talents de cuistot insoupçonnés... Merci beaucoup pour tous ces moments. Bon courage à toi et **Pauline**, profitez bien de votre petite. **Gaëlle**, je te souhaite plein de courage pour la fin de ta thèse, tout comme pour **Luc**, bravo pour tout ce que tu fais. **Antoine B**, notre deuxième médecin, toi aussi tu sembles tellement relax alors que pourtant t'enchaînes entre recherche et consultations, vraiment bravo pour tout ce que tu fais. Bon courage pour la fin de ta thèse ! **Aurélie, Thomas** un couple merveilleux. Merci d'avoir été là dès le début de cette aventure, on est très vite devenu inséparable, dans les bons moments comme dans les plus durs, vous êtes ma deuxième famille. On partage les mêmes valeurs, vous êtes des battants tous les deux. Dans la catégorie des battantes on a aussi notre docteur **Claire**, tu fais partie des belles rencontres que j'ai pu faire durant ces 3 ans. Tu es impressionnante, toujours à 200% dans ce que tu fais. Sans toi je n'aurai jamais eu ma petite **Freyja**, je te remercie beaucoup pour tout ce que tu as fait. Merci à tous les trois de prendre soin de ma petite poulette, même en urgence le dimanche soir. Une pensée pour nos stagiaires, **Nicolas**, bravo pour tes progrès et merci pour ton aide sur mes derniers mois de manip, bon courage pour ton M2, **Morgane**, bon courage si tu prends la relève, **Louis, Yuna, Elen, Quentin et Klara**, nos bio-informaticiens sans qui beaucoup d'analyses n'auraient pu être réalisées, **Amine, Marjorie, Mélissande, Mattisse, Marion, Youssef, Océane, Aristide** et ceux que j'aurais oublié.

Enfin, un grand merci à ma famille et principalement à mes parents, qui m'ont toujours soutenu et permis de faire les études que je souhaitais, même s'ils n'ont pas toujours tout compris de ce que je faisais, merci de m'avoir aidé dans les galères. **Faustin et Abigaël**, bravo pour vos diplômes, on aura fini les études en même temps ! **Déborah**, ma marraine, merci d'être toujours là pour moi. Ma **Freyja**, oui je vous vois entrain de scruter les remerciements savoir si j'allais écrire un mot pour mon chien !! et oui. Cette chipie incroyablement intelligente qui me tient compagnie depuis plus d'un an déjà, le meilleur des soutiens. Une pensée à mes grands-pères : **Bernard**, que je n'aurai malheureusement pas connu longtemps, et **Pierre**, papy gâteaux, merci pour tout ce que tu as fait pour moi, tu as été un grand père formidable, tu m'as transmis tes talents de pâtissier et je compte bien les faire perdurer. Je

vous dédie ces travaux, en espérant que ceux-ci contribueront à améliorer le traitement des cancers et à apporter une nouvelle façon de considérer ces maladies.

Un grand merci à l'ensemble des personnes qui ont contribué de près ou de loin à ces travaux ou plus largement que j'ai pu croiser durant toutes ces années d'études et que j'aurai oublié de citer dans ces remerciements incroyablement longs...

MERCI

ABREVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES

2

2HG · - 2-hydroxyglutarate

5

5caC · - 5-carboxylcytosine

5fC · - 5-formylcytosine

5hmC · - 5-hydroxyméthylcytosine

5mC · - 5-méthylcytosine

7

7βS · - Seven-beta-strange

A

acétyl-COA) · - Acétyl-coenzyme A

AGO · - Argonaute

ANSM · - Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé

APOBEC3A · - Apolipoprotéins B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like

ARN Pol II · - ARN polymérase II

ARNInc · - Longs ARNs non codants

ARNm · - ARN messenger

ARNnc · - ARNs non codants

B

BAH · - Bromo-adjacent homology

BET · - Bromodomain and Extra-Terminal Domain

BRCA1 · - BREast CAncer 1 et 2

BrD · - Bromodomain

buffy coat · - Cellules sanguines

C

CDK4/6 · - Cyclin dependant kinase

cellules ES · - Cellules souches embryonnaires

cfDNA · - ADN circulant librement dans le sang

CGI · - Ilots CpG

Co-IP · - Co-immunoprécipité

CoREST · - Repressor Element 1 Silencing Transcription factor Corepressor

CTM · - C-terminal motif

CXXC · - Domaine à doigt de zinc

D

DBP · - DNA Binding Protein

DDX · - DEAD-box Helicases

DMAP1 · - DNMT1 associated protein 1 binding domain

DMEM · - Dullecco's modified Eagle's

DNMT · - DNA MéthylTransférases DNA MéthylTransférases

DPF · - Double domaine PHD

DSBH · - Hélice β double brin

E

EMT · - Epithelial cell-mesenchymal transition

EXD · - Epigenetic player/protein-X-disruptor

F

FAD · - Adénine flavine dinucléotide

FDA · - U.S Food and Drug Administration

FT · - Facteurs de transcriptions

FTO · - Fat mass and obesity associated gene

G

GBM · - Glioblastomes multiformes

H

HATs · - Histones Acétyle Transférases, - Histones acétyle transférases

HDM · - Histones déméthylases

HER2 · - Human epidermal growth factor receptor 2

HKMT · - Histones lysines méthyltransférases

HMT · - Histones méthyle transférases

HNRNP · - Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins

HP1 · - Heterochromatin protein 1

I

iCDK4/6 · - Inhibiteurs de CDK4/6

IDH1/2 · - Isocitrate déhydrogénase 1/2

IP · - Immunoprécipitations

IP-MS · - Immunoprécipitation-Spéctrométrie de Masse

J

JmjC · - Jumonji C

K

kb · - Kilo bases

KD · - Knock down

KDM1 · - Amino oxidase homolog lysine demethylase 1

KO · - Knockout

L

LATs · - Lysines Acétyltransférases

LH · - Hormone lutéinisante

LHRH · - Lutéinostimuline

LINES · - Long interspersed nuclear element

LTR · - Long terminal repeat

M

m1A · - 1-méthyladénosine (ARN)

m5C · - 5-méthylcytosine (ARN)

m6A · - 6-méthyladénosine (ARN)

m7G · - 7-méthylguanosine (ARN)

MAP kinases · - Mitogen activated protein kinases

MBC · - Cancer métastatique

MBD · - Methyl CpG binding domain)

METTL3 · - Méthyltransferase like 3

miRNAs · - Micros ARNs

MTA70 · - pour N6-méthyltransférase 70kDa subunit

N

NELF · - Negative elongation factor

NGS · - Next-generation sequencing

NLS · - Signal d'adressage nucléaire

nt · - Nucléotides

P

PABPC1 · - Polyadénylate-binding protein 1

PAF15 · - PCNA associated factor 15

pb · - Paires de bases

PCNA · - Proliferating cell nuclear antigen

PGCs · - Cellules germinales primordiales

PHD fingers · - Protéines à doigts de zinc

PRMT · - Arginines méthyltransférases

P-TEFb · - Positive transcription elongation factor b

PTMs · - Modifications post-traductionnelles

Q

qMSRE · - Methylation Sensitive Restriction Enzyme
couplée à de la qPCR

qPCR · - Quantitative Polymerase Chain Reaction

R

RB · - Protéine du rétinoblastome

RBP · - RNA Binding Protein

reads · - Fragments d'ADN séquencés

RFTS · - Replication foci targeting sequence

RH · - Récepteurs hormonaux

RIP · - Immunoprécipitation d'ARNs

RPS3 · - Ribosomal Protein S3

RT · - Température ambiante

S

SAH · - S-adénosylhomocystéine

SAM · - S-adénosylméthionine

SINEs · - Short interspersed nuclear element

smallRNA · - Petits ARNs non cod

SVF · - Sérum de veau fœtal

T

TADs · - Topological associating domains

TDG/BER · - Thymine DNA Glycosylase/ Base Excision
Repair

TET · - Ten-Eleven-Translocation

TFBD · - Transcription Factor Binding Site

tRNA · - ARN de transfert

TSS · - Transcription start site

U

UHRF1 · - Ubiquitin-like with PHD and ring finger
domains 1

α

α-KG · - Alpha-cétoglutarate

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1 : Répartition du nombre de CpG dans le génome humain -----	5
Figure 2 : Représentation des différents domaines des protéines de la famille DNMT (a) et de la réaction de cytosine méthylation qu'elles catalysent (b)-----	7
Figure 3 : Métabolisme du S-adenosylméthionine et régulation de l'activité DNMT -----	8
Figure 4: Gènes soumis à empreinte et disomie parentale-----	9
Figure 5 : Déméthylation et méthylation de novo de l'ADN dans un embryon de souris -----	11
Figure 6 : Représentation du devenir des cellules souches embryonnaires au cours du développement -----	13
Figure 7: Modèle de régulation allostérique de la méthylation de maintenance de l'ADN médiée par DNMT1 -----	18
Figure 8: Mécanisme de déméthylation passive de l'ADN-----	19
Figure 9 : représentation des mécanismes de déméthylation active de l'ADN médiée par les protéines TETs -----	21
Figure 10: Illustration des différents niveau de compaction de la chromatine -----	25
Figure 11: Représentation des différentes formes de méthylation des lysines et arginines --	27
Figure 12: liste des HKMTs identifiées chez l'homme-----	29
Figure 13: liste des méthylations, acétylations et phosphorylation post-traductionnelles des histones canoniques et leurs fonctions -----	29
Figure 14: représentation des domaines fonctionnels des protéines de la famille BET -----	34
Figure 15: Représentation de la formation d'une boucle de transcription médiée par BRD4	37
Figure 16: Initiation de la répression des gènes médiée par REST -----	38
Figure 17: Initiation de la répression des gènes médiée par CoREST -----	39
Figure 18: Régulation métabolique des enzymes épigénétique -----	40
Figure 19 : Biogenèse des miRNAs -----	43
Figure 20 : Exemple des complexes connus dans la 6-adenosine méthylation et déméthylation des ARNm -----	46
Figure 21 : Rôle de METTL1 dans le processus de maturation des miRNAs-----	49

Figure 22 : Liste des principaux epi-miRNAs impliqués dans des cancers et le pronostique associé à leur niveau d'expression -----	52
Figure 23: Comparaison de la régulation épitranscriptomique de la biogenèse et de l'activité des miRNAs entre une cellule tumorale et non tumorale -----	54
Figure 24 : Schéma stratégique modélisant le choix du traitement des carcinomes hépatocellulaires basée sur le niveau d'expression des miRNA-4454, 4530, 4443 et 449 -----	57
Figure 25 : Mécanismes moléculaires de la transition entre les phases G1/S du cycle cellulaire -----	67
Figure 26 : Algorithme de traitement des cancers du sein RH+/HER2- métastatiques -----	70
Figure 27 : Principaux mécanismes de résistance aux inhibiteurs de CDK4/6. -----	74
Figure 28 : Exemple de profil de librairie NGS obtenu pour un échantillon avec le Bioanalyzer 2100 Agilent -----	82
Figure 29 : illustration de la voie de signalisation KRas dans le cancer du poumon non à petites cellules et des thérapies ciblées pour ces acteurs -----	134
Figure 30 : Western Blot des protéines EIF4G1, HNRNPU, HNRNPM comparées à l'actine -	170
Tableau 1 : Liste des domaines capables de reconnaître la méthylation des lysines et leurs cibles	31
Tableau 2 : Liste des caractéristiques, fonctions, tailles et dénominations des ARNs non codants, d'après (Zhang et al., 2019)	42
Tableau 3 : Prévalence des sous types moléculaires des cancers du sein dans la population d'Ecosse entre 2009 et 2016, d'après Mesa-Eguiagaray et al., 2020	64
Tableau 4 : Liste des iCDK4/6 autorisés dans le traitement des cancers du sein RH+/HER2- ..	68
Tableau 5 : Liste des anticorps utilisés pour les Western Blot	86
Tableau 6 : Liste des siRNA et miRNA utilisés pour les transfections	87

TABLES DES MATIERES

INTRODUCTION	1
1. L'épigénétique	2
1.1. Historique et définition	2
1.2. Méthylation de l'ADN	4
1.2.1. Généralités et principaux acteurs de la méthylation de l'ADN	4
1.2.2. Rôle de l'épigénétique dans le développement embryonnaire	8
1.2.3. Généralités sur le rôle de l'épigénétique dans la spécialisation tissulaire (d'après la revue de (Rasmussen, 2003)	11
1.2.4. Les mécanismes de méthylation de l'ADN	13
1.2.4.1. Méthylation de novo de l'ADN	13
1.2.4.2. Maintien de la méthylation au cours des divisions cellulaires	16
1.2.4.3. Déméthylation passive et active de l'ADN	19
1.2. Modification post-traductionnelle des histones	23
1.2.1. Les protéines histones, d'après (Annunziato, 2008)	23
1.2.2. Méthylation des histones	27
1.2.3. Acétylation des histones	32
1.2.4. Dynamique de remodelage de la chromatine : cross talk entre méthylation d'ADN/PTMs d'histones et métabolisme	35
2. Epitranscriptomique	41
2.1. Définition	41
2.2. Rôle des miRNAs dans la vie d'une cellule	42
2.3. Principaux acteurs et rôle des méthylations des miRNAs	44
2.3.1. METTL3 et m6A	44
2.3.2. DNMT3A et m5C	47

2.3.3. METTL1 et m7G	48
3. Epigénétique/épitranscriptomique et cancers	49
3.1. Profil épigénétique et épitranscriptomique des cancers	50
3.2. Marqueurs prédictifs de l'évolution d'un cancer ou d'une réponse à un traitement	54
3.3. Cibles thérapeutiques et épiprodrogues	58
4. Les cancers du sein	63
4.1. Généralités	63
4.2. Prise en charge des cancers du sein RH+/HER2- localisés	64
4.3. Cancer du sein métastatique RH+/HER2-	65
4.3.1. Généralités	65
4.3.2. Arsenal thérapeutique	66
4.3.3. Stratégie de traitement des cancers du sein RH+/HER2- métastatique (Gennari et al., 2021)	68
4.4. Mécanisme résistance aux iCDK4/6 et à l'hormonothérapie	70
OBJECTIFS	75
MATERIEL ET METHODES	78
Culture cellulaire	79
Génération du modèle de cellules résistantes au palbociclib	79
Test de prolifération et calcul du temps de doublement	79
Viabilité cellulaire	80
Culture d'organoïdes et traitement au palbociclib	80
Marquage d'immunofluorescence	81
Immunoprécipitation de Chromatine (chIP)	81
Analyse ChIP-seq	82
Extraction d'ARN et séquençage (3'RNA-seq)	83

Analyse des résultats de 3'RNA-seq _____	83
Purification du plasma à partir d'échantillons sanguins de patients _____	83
Purification des miRNA contenu dans les exosomes sanguins _____	84
Extraction d'ADN et de cfcDNA _____	84
Extractions protéiques (pour Western Blot/ELISA) _____	84
Extraction d'ARNs _____	84
Extraction de miRNAs _____	84
ELISA _____	85
Western Blot _____	85
qMSRE _____	86
Transfection de siRNA et miRNA _____	87
Préparation des échantillons pour spectrométrie de masse (Co-IP METTL3) _____	88
Spectrométrie de masse _____	88
Analyse des résultats de spectrométrie de masse _____	89
Immunoprécipitation des miRNAs méthylés et analyse du niveau de méthylation _____	90
RT-qPCR _____	91
Analyses statistiques _____	91
Patients et échantillons _____	91
RESULTATS ET DISCUSSION _____	92
Chapitre 1 : Etude des voies de signalisations induites par BRD4 pour l'identification de nouvelles options thérapeutiques permettant d'inhiber la résistance au palbociclib dans le cancer du sein. _____	93
1. Préambule _____	93
2. Article soumis (voir annexe) _____	94
3. Discussion _____	132

Chapitre 2 : Le décodage de l'interactome de METTL3 permet d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques et biomarqueurs permettant l'inhibition de l'acquisition de la résistance au palbociclib dans le cancer du sein RH+/HER2-	138
1. Préambule	138
2. Article (en cours de rédaction)	139
3. Discussion	168
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	175
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	179
ANNEXE	204

INTRODUCTION

1. L'épigénétique

1.1. Historique et définition

L'épigénétique signifie ce qui est « au-dessus » de la génétique. La génétique se définit comme l'étude de la transmission des caractères héréditaires portés par les gènes. Dans le dictionnaire, la génétique est définie comme " partie de la biologie qui étudie les lois de l'hérédité" (Larousse, n.d.). L'épigénétique se caractérise donc comme l'ensemble des mécanismes qui modifient l'expression des gènes sans en changer la séquence. Ces mécanismes sont réversibles et transmissibles, lors des divisions cellulaires mais aussi à la descendance.

La notion d'épigénétique est apparue en 1942 avec la publication de Conrad Waddington (Waddington, 2012). Waddington est un embryologiste qui s'intéresse à la différenciation cellulaire et aux mécanismes associés. A cette époque, les mécanismes liés au développement cellulaire sont peu connus. La question principale est : comment d'une même cellule peut-on générer un organisme complet avec des tissus spécialisés ? Car en principe, si toutes les cellules disposent d'un même ADN, celles-ci devraient toutes se développer de la même manière. Pendant longtemps, il était admis de dire que l'embryon était un « mini organisme » qui grandissait avec le temps (théorie de préformationnisme). En parallèle, la théorie de l'épigénèse suggère que les différents tissus apparaissent au cours du temps grâce à des interactions successives des constituants de l'embryon et du sperme (Speybroeck *et al.*, 2002). Pour Waddington, la clef réside dans les deux hypothèses : dans la théorie de préformation, l'ADN peut être considéré comme le matériel de base pour la mise en place des différents tissus et organes de l'organisme : il représente l'ensemble des gènes dans leur état statique. Dans la deuxième théorie, l'ensemble des mécanismes liés à l'épigénèse donneraient une dynamique à l'expression des gènes, expression hiérarchisée et temporalisée. C'est cette vision des choses qui donnera naissance à la définition suivante de l'épigénétique : « branche de la biologie qui étudie les interactions causales entre les gènes et leurs produits qui font naître le phénotype » (Waddington, 1968; Dupont *et al.*, 2009). Dans cette nouvelle théorie, Waddington considère qu'au cours du développement embryonnaire, les cellules initialement toutes identiques, vont prendre des chemins différents selon les gènes qui vont être exprimés. Cette modification d'expression des gènes intervient à un moment critique où les cellules vont

se spécialiser. Ainsi, il décrit le « paysage épigénétique » qui déterminera le phénotype que va développer une cellule en fonction du chemin qu'elle prendra : d'un même patrimoine génétique, il existe une multitude de possibilités en fonction des gènes exprimés. De ce fait, même si toutes les cellules d'un organisme disposent du même patrimoine génétique, grâce à l'épigénétique, l'expression des gènes diffère selon le type cellulaire et permet d'avoir des cellules spécialisées propre à chaque organe. Waddington caractérise également les mécanismes épigénétiques comme étant sous l'influence de l'environnement.

Une description plus aboutie des mécanismes épigénétiques et qui ont permis de compléter la définition de Waddington est apparue en 1987 (Holliday, 1987) avec la description de la méthylation de l'ADN, du maintien de cette méthylation au cours des divisions cellulaires mais également dans les lignées germinales. Holliday introduit également le phénomène des épimutations, définies comme étant des mutations épigénétiques (et non de la séquence de l'ADN) réparables, mais pouvant entraîner des instabilités génomiques transmissibles à la descendance.

Ces mécanismes ont donc une place importante dans la régulation de l'expression des gènes. Ils dépendent de l'environnement, de l'alimentation, de l'état émotionnel et de l'activité physique des individus.

Il existe différents mécanismes épigénétiques dont les deux principaux sont: la méthylation de l'ADN et les modifications post-traductionnelles des protéines histones (PTMs), qui, ensemble, vont permettre un remodelage de la chromatine (ensemble d'ADN et de protéines) et son accessibilité, ce qui va permettre de réguler l'expression des gènes.

Un troisième mécanisme qui est plus débattu en raison de l'interprétation de la définition de l'épigénétique, inclus les ARNs non codants et notamment les longs ARNs non codants (ARNlnc), dont l'exemple le plus connu est l'ARN XIST capable de compacter, et donc d'inactiver, l'un des 2 chromosomes X de la femme (Morlando and Fatica, 2018). Ce type de régulation ne sera pas décrit dans cette introduction.

1.2. Méthylation de l'ADN

1.2.1. Généralités et principaux acteurs de la méthylation de l'ADN

Un des principaux mécanismes épigénétique passe par la méthylation de l'ADN. Cela consiste en l'ajout d'un groupement méthyle (CH₃) en position 5 des cytosines et forme alors une 5-methylcytosine (5mC). Cette méthylation apparaît principalement sur un motif bien particulier : une cytosine suivie d'une guanosine (motif CpG). La méthylation de cytosines dans des motifs non CpG est très rare, elle est retrouvée dans les cellules souches embryonnaires et au cours du développement mais ce type de 5mC disparaît par la suite (Ramsahoye *et al.*, 2000; Lister *et al.*, 2009).

D'après la teneur en cytosines guanosines de l'ADN (~42%), il devrait y avoir 4,4% de CpG. Or, la proportion de CpG observés dans le génome humain est inférieure à 1% (Bird, 1980). Cette différence de proportion s'explique car les cytosines méthylées ont un haut potentiel de mutation de par leur conversion en thymine (C>T) lors d'un phénomène de désamination. En effet, si une désamination apparaît sur une cytosine méthylée, celle-ci se transforme en thymine. Cette désamination se fait de manière passive ou via l'enzyme APOBEC3A (Apolipoprotéins B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like) (Wijesinghe and Bhagwat, 2012). Parmi ces 1% de CpG, 67,7% sont méthylés (valeur pour des lignées primaires de fibroblastes humains). Ce taux de méthylation peut varier selon le tissu mais également dans les cancers avec une diminution de la méthylation globale de l'ADN (Crider *et al.*, 2012).

La répartition des CpG n'est pas homogène dans l'ensemble du génome humain, il existe :

- des régions enrichies en CpG appelées îlots CpG (CGI) qui représentent 2% des CpG du génome et qui sont localisées surtout au niveau des régions promotrices des gènes,
- des séquences répétées, issus d'éléments transposables (SINEs, LINEs, LTR), qui représentent au total 50,6% des CpG du génome (**Figure 1**) (Luo *et al.*, 2014).

Les 47,4% de CpG restants sont réparties dans le reste du génome (introns, exons, éléments régulateurs, etc).

Les éléments répétés comportent la plus grande proportion des CpG méthylés de l'ADN génomique (environ 70% de ces séquences sont méthylées (Babenko *et al.*, 2017)). Ceci

participe au maintien de la stabilité génomique via le recrutement d'hétérochromatine qui empêche la rétrotransposition de ces éléments.

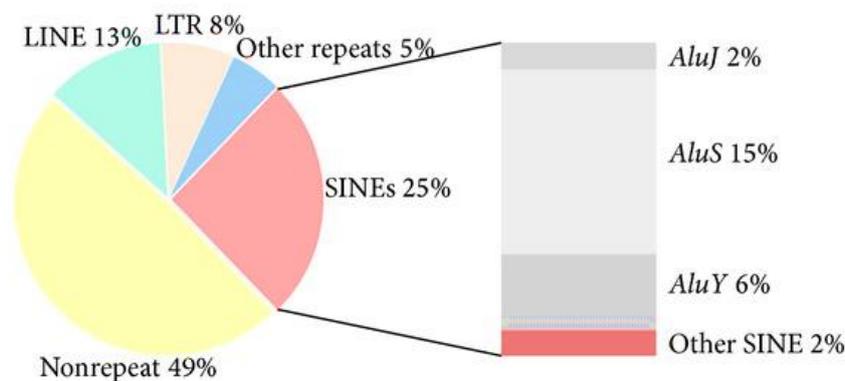


Figure 1 : Répartition du nombre de CpG dans le génome humain

Les éléments répétés contiennent plus de 50% des CpG du génome dont la plus part font partie des éléments SINEs d'après la base de données hg19. LINE: Long Interspersed Nuclear Element ; LTR : Long Terminal Repeat ; SINE : Short Interspersed Element. D'après Luo et al 2014.

Les CGI peuvent se caractériser par leur taille (entre 300 et 3000 paires de bases (pb)) et leur teneur en CG qui doit être supérieur à 50% avec un ratio $\frac{\text{« nombre de CpG observé »}}{\text{« nombre de CpG attendu »}} \geq 0,6$. Les CGI sont présents majoritairement au niveau des promoteurs des gènes et sont impliqués dans la régulation de la transcription. De manière générale, on retrouve une hypométhylation des îlots CpG au niveau du promoteur d'un gène transcrit et une hyperméthylation dans le corps de ce gène. Inversement, un gène non transcrit aura une hyperméthylation au niveau de son promoteur et une hypométhylation dans son corps (Sproul and Meehan, 2013). Selon le statut de méthylation du promoteur, les complexes protéiques se liants à l'ADN vont différer. Par exemple, si le promoteur est déméthylé, les facteurs de transcriptions (FT) vont pouvoir se fixer sur l'ADN et initier la transcription. Dans le cas contraire, d'une part, la présence des groupements méthyles va occasionner une gêne stérique et empêcher la fixation des FT, et d'autre part, les CpG méthylés vont être reconnus par des protéines MBD (methyl CpG binding domain) comme MeCP2, qui vont se fixer sur l'ADN et empêcher la fixation des FT (Dhasarathy and Wade, 2008). Contrairement aux éléments répétés, on estime que 70% des îlots CpG sont hypométhylés dans un contexte non tumoral (Babenko *et al.*, 2017).

La 5mC de l'ADN est réalisée par une famille de protéines appartenant à la catégorie des méthyltransférases : les DNMTs (DNA MéthylTransférases). On compte 5 enzymes appartenant à cette famille: DNMT1, DNMT2, DNMT3A, DNMT3B, DNMT3L. Les DNMT1, 3A et 3B sont les principales méthyltransférases de l'ADN (Lyko, 2018). Elles possèdent un large domaine catalytique en C-terminale et un domaine de régulation en N-terminale et ont différents rôles dans l'ajout et le maintien de la méthylation sur l'ADN qui seront décrits dans les parties suivantes (**Figure 2.a**). DNMT3L possède un domaine catalytique tronqué qui n'est pas fonctionnel seul (Ren *et al.*, 2018)). Cependant, DNMT3L forme un complexe avec DNMT3A et DNMT3B, ce qui stimule leur activité méthyltransférase, notamment lors du développement embryonnaire et dans la lignée germinale chez les souris (Moore *et al.*, 2013).

DNMT2 présente une forte homologie avec les autres DNMT (**Figure 2.a**), celle-ci présente une faible activité ADN méthyltransférase. Hermann et son équipe ont montré que DNMT2 possède une faible activité catalytique mais est toutefois capable de méthyler l'ADN au niveau d'une séquence spécifique ttnCGga(g/a) (Hermann *et al.*, 2003). Cette séquence correspond à la séquence de fixation de facteurs de transcription de la famille ETS impliqués dans différentes voies de signalisations et le recrutement des protéines histones acétyl transférase (HATs) (Sharrocks, 2001). Les travaux de Goll et ses collaborateurs ont démontré que DNMT2 possède une activité ARN méthyltransférase, principalement au niveau de l'ARN de transfert (tRNA) de l'acide aspartique (Goll *et al.*, 2006) et contribuera à la biogenèse des tRNAs Cette activité est plus forte que l'activité ADN méthyltransférase de DNMT2. Les travaux de Kaiser montrent que DNMT2 est capable de méthyler des hybrides ADN-ARN possédants une structure similaire aux tRNAs (Kaiser *et al.*, 2016).

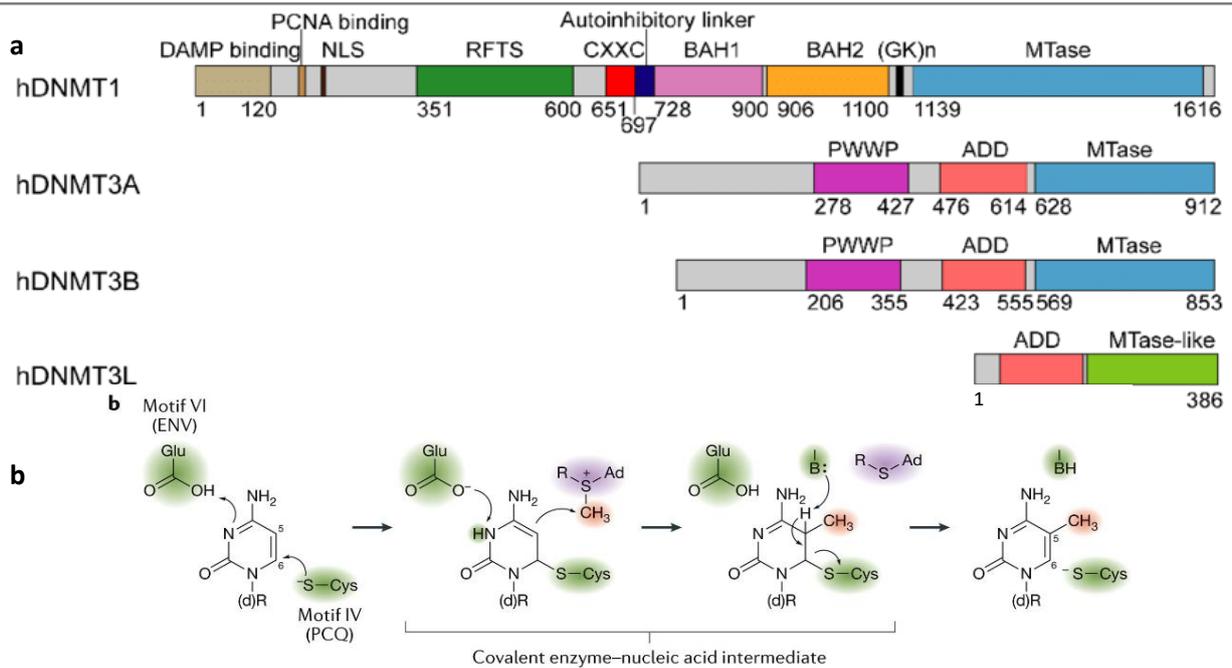


Figure 2 : Représentation des différents domaines des protéines de la famille DNMT (a) et de la réaction de cytosine méthylation qu’elles catalysent (b)

a) DNMT1, DNMT3A, DNMT3B et DNMT3L possèdent un domaine catalytique très conservé en C-terminal (MTase) et d’un domaine régulateur en N-terminal. Le domaine régulateur de DNMT1 est plus complexe que pour les autres DNMT. DMAPD : domaine d’interaction de la protéine 1 associée à la méthyltransférase de l’ADN ; PCNA binding : domaine de liaison à PCNA ; NLS : signal de localisation nucléaire ; RFTS : domaine de ciblage des foyers de réplication ; CXXC : domaine CXXC ; Autoinhibitory linker : domaine d’auto-inhibition ; BAH1 et BAH2 : domaine d’homologie bromo-adjacents 1 et 2 ; (GK)n : répétition de glycine lysine séparant la partie N-term et C-term ; PWWP : domaine PWWP ; ADD : Domaine ATRX-DNMT3-DNMT3L d’après Ren et al 2018. b) Initiation de la méthylation de l’ADN par l’attaque nucléophile de la cystéine du motif VI du site catalytique des DNMTs sur le carbone C6 de la cytosine. Le groupe méthyle du SAM est ensuite transféré au C5 de la cytosine, possiblement médiée par une base de l’enzyme (B:). En vert : les acides aminés de l’enzyme impliqués dans la réaction ; en violet : le cofacteur SAM ; en rouge : le groupement méthyle. D’après Lyko 2018.

La réaction de cytosine méthylation catalysée par les DNMTs se produit par une succession d’interactions covalentes entre les acides aminés constituant le site catalytique de la protéine, la cytosine receveuse du groupement méthyle et une molécule qui va donner le groupement méthyle (**Figure 2.b**) (Lyko, 2018). La molécule dite « donneuse » de méthyle, aussi appelée coenzyme ou cofacteur, va céder un groupement méthyle lors de la réaction. Le cofacteur utilisé par les DNMTs est le SAM (S-adénosylméthionine) qui va être transformé en SAH (S-adénosylhomocystéine) puis être régénéré en SAM via le cycle du folate et le cycle SAM (**Figure 3**). L’activité des DNMTs est directement régulée par la concentration de SAH : si celle-ci est trop forte, alors l’activité est inhibée (**Figure 3**) (Rowling *et al.*, 2002; Crider *et al.*, 2012).

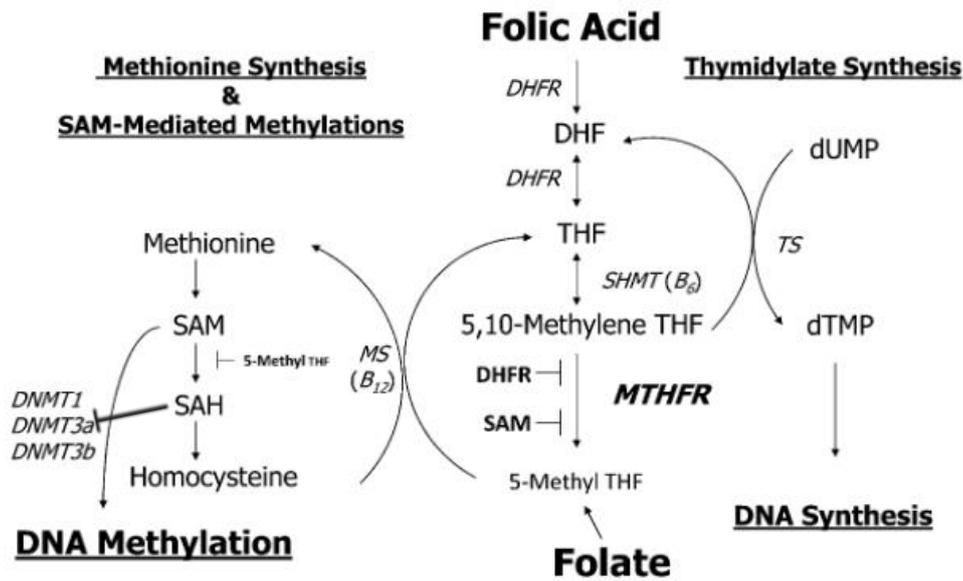


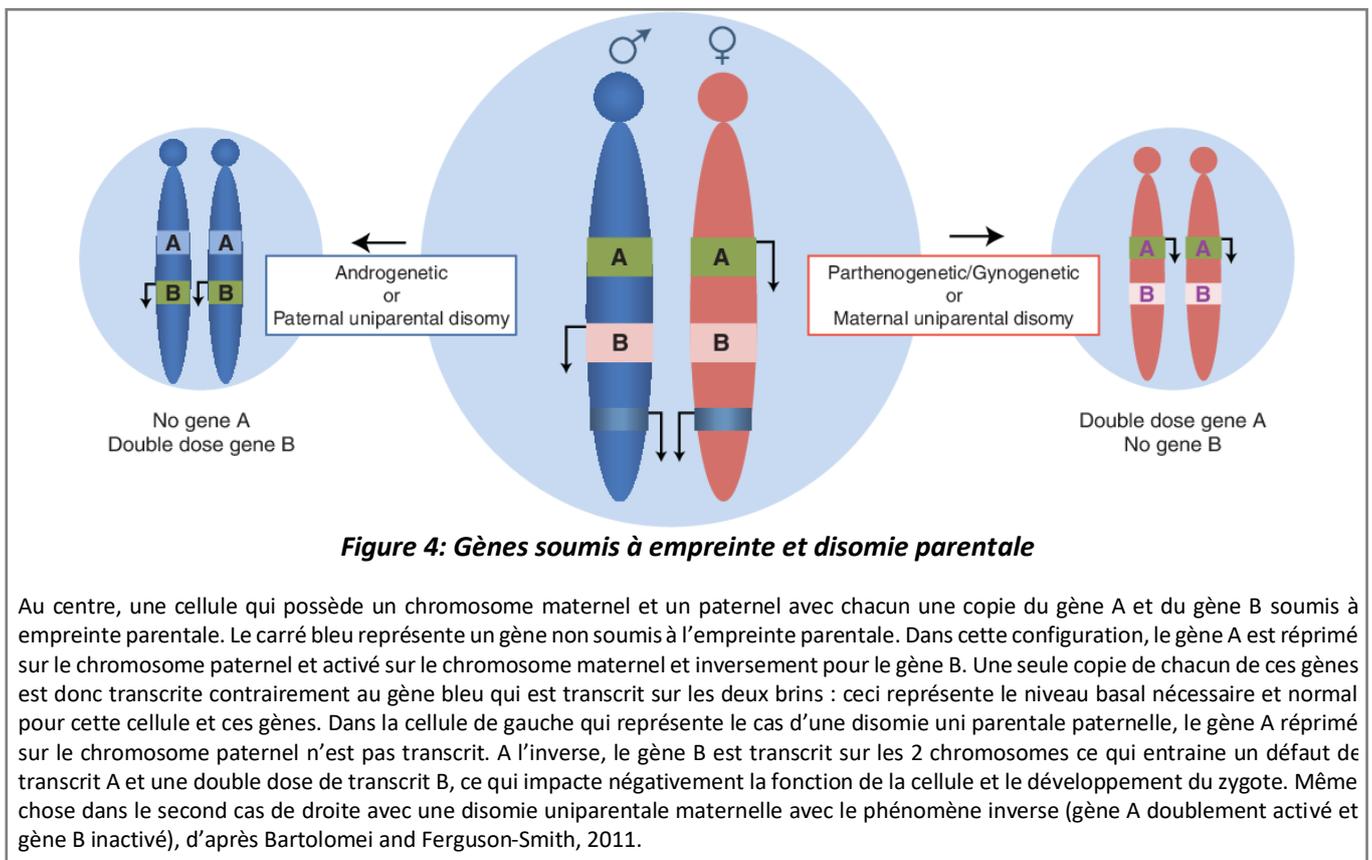
Figure 3 : Métabolisme du S-adenosylméthionine et régulation de l'activité DNMT

DHF, dihydrofolate; DHFR, dihydrofolate reductase; DNMT, DNA methyltransferase; dTMP, thymidylate; dUMP, deoxyuridine monophosphate; MS, methionine synthase; MTHFR, methylenetetrahydrofolate reductase; SAH, S-adenosylhomocysteine; SAM, S-adenosylmethionine; SHMT, serine hydroxymethyltransferase; THF, tetrahydrofolate; TS, thymidylate synthase, d'après Crider et al., 2012.

1.2.2. Rôle de l'épigénétique dans le développement embryonnaire

La méthylation *de novo* consiste en l'ajout de nouvelles marques de méthylation sur un ADN non méthylié. La méthylation *de novo* est un mécanisme qui se fait principalement à 2 moments dans la vie d'un individu : lors de la gamétogenèse et lors du développement embryonnaire. Après fécondation, une déméthylation asymétrique du génome chez le zygote se produit : une déméthylation rapide du génome paternel appelée déméthylation active et une déméthylation plus lente du génome maternel, appelée déméthylation passive (voir chapitre 1.2.4). Seules les régions soumises à l'empreinte parentale et certaines régions contenant des éléments transposables restent méthyliées. L'empreinte parentale correspond à des régions d'ADN différenciellement méthyliées entre le génome maternel et paternel, ce qui signifie que certains gènes vont être exprimés grâce au génome maternel et d'autres grâce au génome paternel. Les gènes soumis à l'empreinte parentale sont principalement des gènes impliqués dans le développement embryonnaire. Ce phénomène fut mis en évidence en 1984 : les chercheurs ont observé que des embryons reconstitués avec deux pronucléus femelles (gynogéniques) ou 2 pronucléus mâles (androgéniques) se développent très faiblement après implantation tandis que ceux reconstitués avec un pronucléus mâle et

femelle se développaient à terme (McGrath and Solter, 1984; Surani *et al.*, 1984). Ces résultats suggèrent que chaque génome possède un rôle pour le développement embryonnaire, indépendamment de leur séquence génétique, mais dépendant de l’empreinte parentale propre au sexe du donneur. Il a d’ailleurs été montré par la suite que le phénomène de disomie uni parentale, c’est-à-dire la présence de deux chromosomes homologues issus d’un seul parent dans une cellule, entraîne des maladies génétiques différentes selon que le doublet de chromosome provienne du père ou de la mère pour une même région soumise à empreinte parentale (**Figure 4**) (Bartolomei and Ferguson-Smith, 2011; Lalande, 1996).



La reprogrammation épigénétique post-fécondation permet une remise à zéro de la plupart des marques épigénétiques propres aux parents et de redonner un aspect de totipotence caractéristique des cellules souches embryonnaires. Après implantation et au cours des divisions cellulaires et de la formation des différents tissus et organes, les cellules vont progressivement retrouver un niveau de méthylation élevé, associé à la perte de leur totipotence et l’acquisition des caractéristiques de cellules somatiques spécialisées. Durant le développement embryonnaire, de nombreux mécanismes vont se mettre en place. Ceux-ci

permettent la polarisation de l'embryon, l'expression de facteurs de transcription spécifiques avec des gradients selon la polarité de l'embryon. Ces gradients de facteurs de transcription vont entraîner la formation de complexes protéiques localisés et temporalisés permettant la formation des différentes structures du futur fœtus. Cette temporalisation va nécessiter l'implication des mécanismes épigénétiques qui vont permettre cette régulation fine de l'expression des facteurs de transcriptions comme la famille des gènes *Hox* par exemple (Soshnikova and Duboule, 2009). Ces facteurs de transcription, nécessaires au développement embryonnaire, sont caractérisés comme oncogènes dans les cellules somatiques et sont inactivés par les mécanismes épigénétiques (méthylation de l'ADN, modifications d'histones et remodelage de la chromatine) empêchant leur transcription. C'est pourquoi la reprogrammation épigénétique post-fécondation est importante : elle permet de retrouver l'expression séquentielle de ces gènes, permettant la formation des différents tissus du nouvel individu.

La deuxième reprogrammation épigénétique est celle qui se produit dans les cellules précurseurs de la lignée germinale au cours du développement embryonnaire, aussi appelées cellules germinales primordiales (PGCs). Chez la souris, cette reprogrammation débute 7.25 jours après la fécondation (stade E7.25) où une cinquantaine de cellules de l'épiblaste vont proliférer et migrer vers la crête génitale qui donnera les gonades par la suite. Ce phénomène de prolifération et de migration va durer jusqu'aux jours E10.5/11.5 et est accompagné d'une déméthylation importante de l'ADN pour revenir à un statut de cellules pluripotentes, suivie d'une suppression de marques d'histones et le remplacement de protéines histones par des variants une fois la migration finie (Hajkova *et al.*, 2008). Contrairement à la reprogrammation épigénétique post-fécondation, celle-ci va également remettre à zéro les modifications des gènes soumis à empreinte. Lors de la gamétogenèse, le génome des gamètes est progressivement reméthylé au cours des étapes de différenciation des cellules avec la réimposition des marques, notamment au niveau des gènes soumis à empreinte, qui, cette fois ci, dépendra du sexe de l'embryon ; si l'embryon est de sexe masculin, les gènes soumis à empreinte auront les mêmes empreintes que le génome d'origine paternelle et inversement si l'embryon est du sexe féminin. La méthylation *de novo* dans les embryons mâles se fait avant la méiose dans les prospermatogonies et est complète avant la naissance tandis que dans les embryons femelles, la reméthylation se fait après la naissance pendant la croissance folliculaire et des ovocytes (**Figure 5**) (Smallwood and Kelsey, 2012).

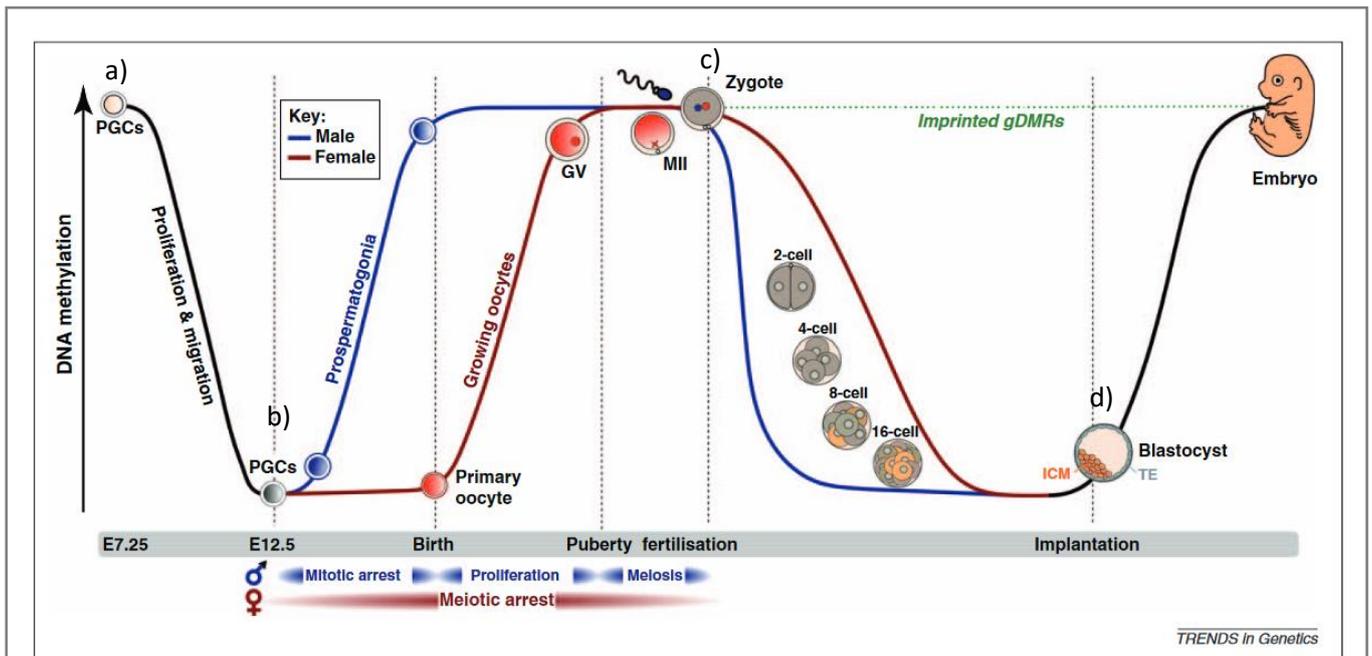


Figure 5 : Déméthylation et méthylation *de novo* de l'ADN dans un embryon de souris

a) Les PGCs entament leur prolifération et migration de l'épiblaste jusqu'à la crête génitale à partir du stade E7.25 avec une déméthylation globale de leur ADN. b) En fonction du sexe de l'embryon, une méthylation *de novo* a lieu dans les cellules germinales précurseurs de manière asymétrique entre mâle et femelle : dans les embryons mâles, la méthylation *de novo* a lieu avant la méiose dans les prospermatogonies, en arrêt mitotique (phase G1, ligne bleue) et se finit avant la naissance. Dans les embryons femelles, les oocytes primaires entrent en méiose et s'arrêtent en prophase I au stade diplotène. La méthylation *de novo* est réalisée après la naissance durant le développement folliculaire (ligne rouge). c) L'autre vague de déméthylation (chronologiquement la première du point de vue du zygote), apparaît suite à la fécondation et est asymétrique : une déméthylation rapide et active du génome paternel (ligne bleue) et une déméthylation lente et passive du génome maternel (ligne rouge). Cette vague de déméthylation n'inclut pas les gènes soumis à empreinte (ligne verte). d) La reméthylation du génome de l'embryon a lieu entre l'implantation du blastocyste et la détermination des lignées cellulaires. D'après Smallwood and Kelsey, 2012.

1.2.3. Généralités sur le rôle de l'épigénétique dans la spécialisation tissulaire (d'après la revue de (Rasmussen, 2003))

Au cours du développement embryonnaire et foetal, les différents tissus vont progressivement se mettre en place (ectoderme, endoderme, mésoderme). Lors de l'apparition de ces tissus, les cellules souches vont progressivement se différencier et perdre leur capacité de totipotence (vers le stade blastula). Les cellules souches embryonnaires deviennent pluripotentes : elles sont capables de former les trois feuillets embryonnaires mais ne peuvent plus former tous les tissus annexes comme le placenta par exemple. Dans ces feuillets, les cellules vont progressivement passer de pluripotentes à multipotentes au cours des divisions cellulaires : les cellules sont capables de se différencier uniquement en cellules

du tissu. Lorsque les différents organes sont mis en place, certaines cellules souches vont conserver leur capacité de multipotence mais vont produire des cellules unipotentes capables de donner un seul type cellulaire avec une fonction propre au tissu : les cellules spécialisées **Figure 6**. Cette présence de cellules multipotentes permet de régénérer les cellules différenciées qui sont spécialisées mais quiescentes.

Cette spécialisation progressive est possible grâce aux mécanismes épigénétiques qui vont se mettre en place au cours des divisions cellulaires et faire en sorte que les cellules expriment uniquement des gènes propres à leurs fonctions. L'épigénétique représente également un moyen de réguler la dépense énergétique des cellules puisque chaque phénomène de réplication, transcription et traduction consomme de l'énergie. Une cellule ne pourrait pas être totipotente et spécialisée car son coût énergétique serait trop important. C'est pourquoi lors de la spécialisation, les cellules perdent l'expression des gènes dit oncogènes, nécessaires à la prolifération cellulaire, ainsi que l'expression de tous les gènes non nécessaires à sa fonction. Par exemple un neurone va exprimer des protéines synaptiques et de communication nerveuses tandis que certaines cellules pulmonaires vont produire du mucus.

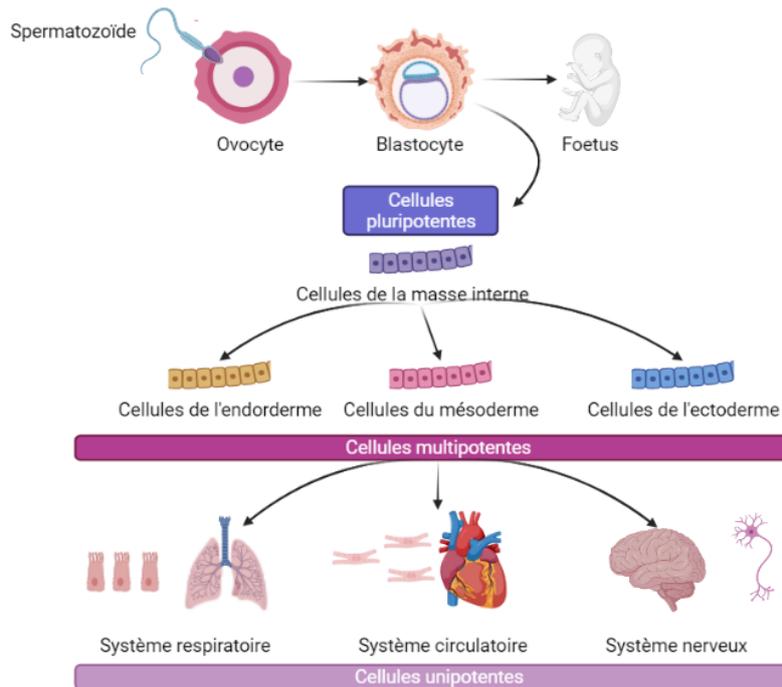


Figure 6 : Représentation du devenir des cellules souches embryonnaires au cours du développement

Au départ, les cellules souches embryonnaires sont totipotentes et peuvent former l'ensemble des tissus du zygote. Au cours des divisions, certaines cellules souches vont perdre leur totipotence et devenir pluripotentes : elles sont alors capables de former les 3 feuillets embryonnaires (endoderme, mésoderme et ectoderme). Lors de la formation des organes, ces cellules vont se différencier, gagner en spécialisation et perdre leur multipotence pour devenir unipotentes. Image créée à partir de Biorender.com.

1.2.4. Les mécanismes de méthylation de l'ADN

1.2.4.1. Méthylation de novo de l'ADN

Dans la famille des DNMTs, le rôle de la méthylation *de novo* est attribué au complexe DNMT3A, DNMT3B et DNMT3L. DNMT3A et 3B ont une structure très proche et sont toutes les deux capables de méthyler de l'ADN non méthylié et hémiméthylié, sur les CpG dans les cellules somatiques ou non CpG dans les cellules souches embryonnaires (Gao *et al.*, 2020). DNMT3B est très exprimée lors du développement embryonnaire précoce et très peu dans les cellules différenciées (à l'exception de la thyroïde, des testicules et de la moelle osseuse), tandis que DNMT3A est exprimé de manière ubiquitaire, au cours du développement embryonnaire mais aussi dans les cellules différenciées (Xie *et al.*, 1999). La temporalité d'expression des DNMT3 est corrélée avec les différentes phases de reprogrammation épigénétique du génome au cours du développement embryonnaire. DNMT3B est exprimé dans les phases précoces du développement embryonnaire post et préimplantatoire (E4.5-E7

pour des embryons de souris), principalement au niveau du trophoctoderme au stade blastula, tandis que l'expression de DNMT3A est détecté à partir du jour E10.5 au niveau des membres postérieurs et de la queue et dans les membres antérieurs à partir de E14.5 (Watanabe et al., 2002). De même, DNMT3L est très exprimé dans les cellules germinales en développement et dans les phases précoces de l'embryogenèse, notamment dans les cellules ES, mais elle n'est plus exprimée dans les cellules différenciées (Veland et al., 2019). Le niveau d'ARN messager (ARNm) de DNMT3A et DNMT3B est plus important dans les cellules ES que dans les cellules différenciées. DNMT3A et DNMT3B contribuent à la mise en place de modifications épigénétiques tissus spécifiques de par leur différence de temporalité d'expression, de localisation et de recrutement par leurs partenaires (Watanabe et al., 2002). Le knockout (KO) de DNMT3B dans les embryons de souris entraîne l'arrêt du développement et la létalité de l'embryon, tandis que le KO de DNMT3A n'empêche pas le développement de l'embryon mais la survie des individus (mort des souris 4 semaines après leur naissance). Le KO de DNMT3L induit une sous expression de l'isoforme DNMT3A2 et un hypométhylation au niveau de ses cibles. Cela n'impacte pas le développement embryonnaire ni la survie des individus mais leur fécondité : le manque de méthylation *de novo* provoque la réactivations d'éléments transposables dans les spermatogonies et spermatocytes chez les mâles et un manque de d'apposition des empreintes maternelles, entraînant la stérilité des individus (Hata et al., 2002; Bourc'his and Bestor, 2004). DNMT3A et DNMT3B semblent donc avoir différentes cibles de méthylation malgré leur homologie de séquence, dépendant du complexe dans lequel les protéines sont recrutées (DNMT3A-DNMT3B-DNMT3L, DNMT3A-DNMT3A-DNMT3L) mais également de leurs domaines PWWP et ADD. En effet, DNMT3B est recruté préférentiellement via son domaine PWWP qui reconnaît la tri-méthylation de la lysine 36 de l'histone H3 (H3K36me3) retrouvé dans le corps des gènes et permet la formation de l'hétérochromatine (Baubec et al., 2015). DNMT3A est recruté via son domaine ADD qui reconnaît la lysine 4 de l'histone H3 non modifiée (H3K4me0), au niveau des enhancers de gènes impliqués dans la pluripotence cellulaire et entraîne leur inactivation (Petell et al., 2016). DNMT3L est également capable de reconnaître H3K4me0 et de médier la méthylation *de novo* (Ooi et al., 2007). DNMT3L ne possède pas de domaine catalytique, mais son interaction avec DNMT3A et DNMT3B permet de stimuler leur activité catalytique (notamment celle de DNMT3A) et joue un rôle dans leur recrutement au niveau de la chromatine (Veland et al., 2019).

Même si la façon dont elles reconnaissent leurs cibles n'est pas clairement identifiée, des mécanismes ont été proposés, impliquant l'interface homodimérique des complexes et la différence de conformation comme étant responsable de la différence d'activité catalytique observée entre DNMT3A et DNMT3B. DNMT3A possède une plus forte affinité pour les CpG méthylés de par son domaine PWWP qui est plus spécifique que celui de DNMT3B (Gao *et al.*, 2020). Dans les cellules souches embryonnaires (cellules ES) de souris, DNMT3B est impliquée dans la méthylation des centromères et des séquences satellites mineures (portion de 600 kilo bases (kb) contenant des répétitions de 120pb) tandis que DNMT3A méthyle les séquences satellites majeures péri-centromériques (portions de 6 mégabases contenant des répétitions de 234pb) : les protéines ne sont pas recrutées au niveau des mêmes cibles et possèdent des rôles particuliers dans le maintien de la stabilité chromatinienne (Okano *et al.*, 1999).

D'autre part, la capacité des DNMTs à induire la méthylation de l'ADN sur des séquences spécifiques est possible via un phénomène dit de transcription factor directed DNA méthylation. En effet, il a été montré en 2009 par Hervouet et ses collaborateurs, que des facteurs de transcriptions comme c-myc, sont capables de recruter DNMT3A sur des séquences spécifiques de l'ADN et induire la méthylation des CG incluant ou juxtaposant le site de fixation. Le complexe c-myc-DNMT3A est impliqué dans la méthylation de séquences spécifiques reconnus par c-myc, comme par exemple les gènes codants pour *CDKN1a*, *CCND1* et *TIMP2* dans les glioblastomes multiformes (GBM) (Hervouet *et al.*, 2009). D'autres exemples de ces mécanismes de recrutement médié par des FT est par exemple le recrutement du complexe MBD2-MBD3-GCNF-DNMT3A-DNMT3B au niveau des boîtes RAREs qui sont reconnues par le répresseur GCNF. L'interaction avec l'hélicase WRNp et l'histone méthyltransférase G9a au niveau du promoteur d'*OCT-4* et du complexe MBD2-MBD3-GCNF-DNMT3A-DNMT3B recruté par GCNF entraîne le silencing d'*OCT-4* durant le développement embryonnaire (Athanasidou *et al.*, 2010). Bien que DNMT3L soit dépourvu d'activité catalytique, elle est capable d'interagir avec des facteurs de transcriptions avec lesquels DNMT3A et DNMT3B sont incapables d'interagir seuls, ce qui permet le recrutement des complexes DNMT3A-DNMT3B-DNMT3L ou DNMT3A-DNMT3A-DNMT3L vers de nouvelles cibles via les partenaires d'interactions de DNMT3L (Pacaud *et al.*, 2014).

Les FT interagissant avec DNMT3A peuvent être différents de ceux interagissant avec DNMT3B ou DNMT3L. De même, l'expression et le recrutement des DNMTs par leurs FT varient au cours du cycle cellulaire et de l'expression de ceux-ci. Les FT sont capables de

reconnaitre des séquences spécifiques de l'ADN. Leur capacité à interagir avec les DNMTs permet de les recruter au niveau de leurs cibles et la méthylation de celles-ci (Hervouet et al., 2018).

1.2.4.2. Maintien de la méthylation au cours des divisions cellulaires

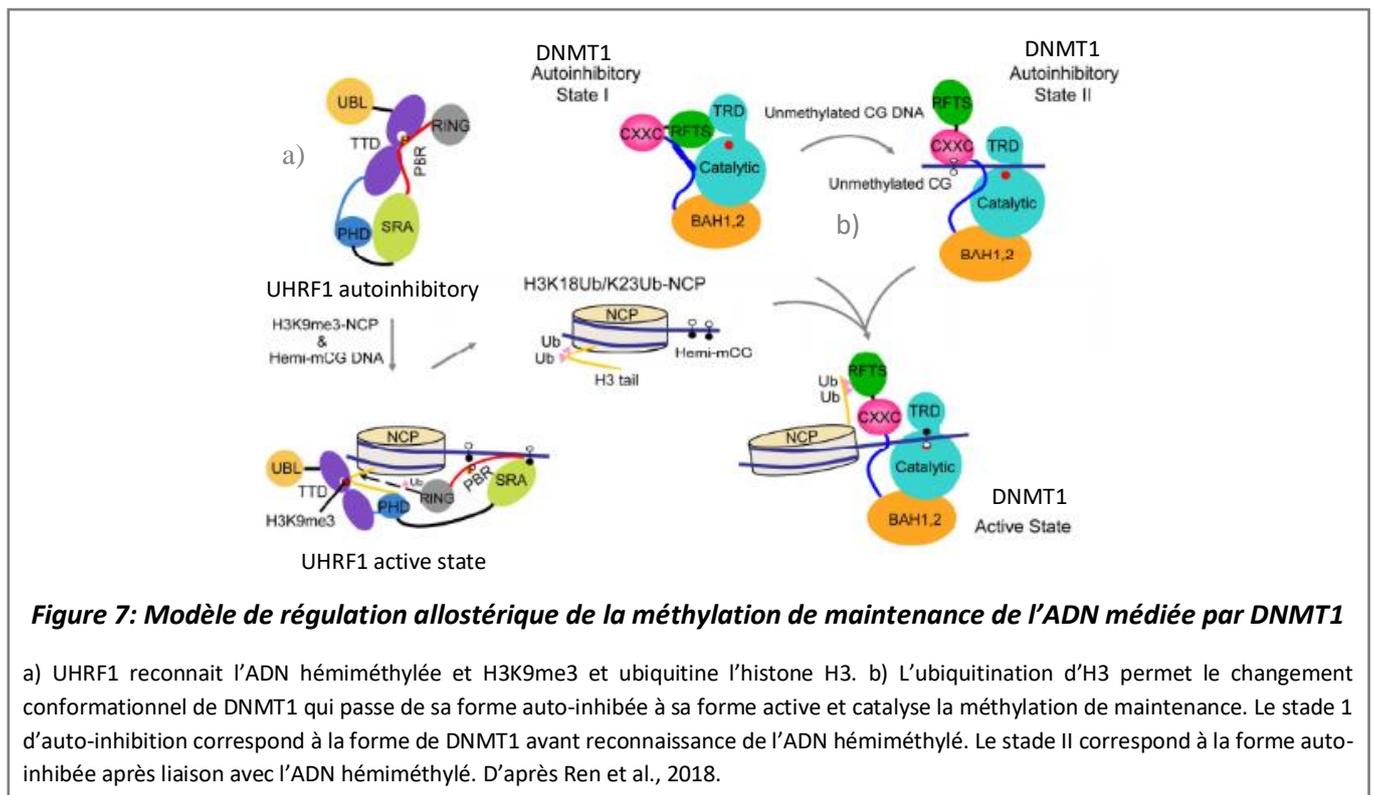
Lors de la réplication de l'ADN, l'ADN polymérase III ajoute les bases complémentaires du brin matrice pour reformer un ADN double brin néo synthétisé. Les acides nucléiques ajoutés ne comportent aucune modification. La nouvelle molécule d'ADN est donc hémiméthylé : sans mécanismes de maintenance de la méthylation de l'ADN (aussi appelé méthylation de maintenance), au bout de deux divisions cellulaires, des cellules auraient des molécules d'ADN complètement déméthylées, ce qui causerait de graves problèmes d'instabilité génomique.

Parmi les cinq DNMTs qui composent le génome humain, il a été montré que DNMT1 joue un rôle prépondérant dans le maintien de la méthylation au cours du temps en méthylant le brin néo-synthétisé en recopiant la méthylation du brin matrice (Bostick et al., 2007; Sharif et al., 2007). L'inactivation de DNMT1 au stade précoce du développement embryonnaire entraîne la létalité des embryons chez les souris, de même avec la mutation du domaine catalytique de DNMT1 qui provoque un arrêt post-gastrulation avec une perte de méthylation de l'ADN mais également des accidents mitotiques (Chen et al., 2007; Takebayashi et al., 2007). DNMT1 est donc essentielle au développement des mammifères puisque la majeure partie de la méthylation de l'ADN est régulée par DNMT1. En regardant de plus près les différents domaines qui la composent présenté sur la **Figure 2**, DNMT1 possède un signal d'adressage nucléaire (NLS), un domaine à doigt de zinc capable de reconnaître les CpG non méthylés (domaine CXXC) qui inhibe la méthylation *de novo* de DNMT1 en bloquant l'accès au site actif, 2 domaines BAH (Bromo-adjacent homology) qui possèdent deux rôles distincts : BAH1 qui contribue au rôle du domaine CXXC et BAH2 dont le rôle n'est pas clairement défini (Yarychivska *et al.*, 2018). Seule, DNMT1 est capable de reconnaître les CpG hémiméthylés via son domaine N-terminal (Araujo et al., 2001). Comme DNMT3A, DNMT3B et DNMT3L, DNMT1 peut interagir avec différentes protéines pour être recruté au niveau de leurs cibles. DNMT1 possède différents domaines qui lui permettent d'être recrutée au niveau des fourches de réplication durant la phase S : un domaine RFTS (replication foci targeting sequence) qui interagit avec UHRF1 (Ubiquitin-like with PHD and ring finger domains 1)

également au niveau des centromères (Jeltsch and Jurkowska, 2016) et un domaine PCNA binding qui permet à DNMT1 d'interagir avec la protéine PCNA (proliferating cell nuclear antigen) qui est un facteur d'élongation présent dans les fourches de réplication et dans les processus de réparation de l'ADN. Le recrutement de DNMT1 via PCNA permet de maintenir la méthylation de l'ADN au cours de la synthèse du nouveau brin. Le complexe PCNA/DNMT1 se forme uniquement lorsque PCNA interagit avec l'ADN (Iida *et al.*, 2002). Les mécanismes de maintenance de la méthylation de l'ADN par DNMT1 et son interaction avec la machinerie de réplication ne sont pas clairement définis : bien que l'activité méthyltransférase soit plus rapide lors de l'interaction PCNA-DNMT1 (deux fois plus qu'avec une mutation du site PCNA-binding de DNMT1), cette interaction n'est pas nécessaire pour la méthylation de maintenance (Schermele *et al.*, 2007). DNMT1 est également recrutée au niveau des cytosines hémiméthylées via UHRF1 qui reconnaît certains résidus d'histones (notamment la tri-méthylation de la lysine 9 de l'histone H3 : H3K9me3 couplée à l'arginine 2 non méthylée : H3R2me0). En parallèle, UHRF1 reconnaît l'ADN hémiméthylé grâce à son domaine SRA (SET and RING associated domain). Le domaine RING, qui possède une activité ubiquitine ligase E3, a été identifié comme responsable de l'ubiquitination des lysines 14, 18 et ou 23 de l'histone H3, ce qui serait nécessaire au recrutement de DNMT1 au cours de la phase S, via une reconnaissance par le motif RFTS et un changement de conformation qui permet de rendre le site actif accessible à la cytosine non méthylée (Ren *et al.*, 2018). Il a également été montré qu'UHRF1 joue un rôle dans la formation du complexe PCNA-DNMT1 en ubiquitinylant le facteur PAF15 (PCNA associated factor 15) au début de la phase S (Nishiyama *et al.*, 2020). Nishiyama et ses collaborateurs ont suggéré que le recrutement de DNMT1 au niveau des histones ubiquitinyllées et un mécanisme de sauvegarde permettant de maintenir la méthylation de l'ADN en dépit d'une perturbation avec la machinerie de réplication. Contrairement au complexe PCNA-DNMT1, le complexe PCNA-PAF15-DNMT1-UHRF1 est essentiel pour le maintien de la stabilité génomique et de la méthylation de l'ADN : Hervouet et ses collaborateurs ont montré que l'inhibition de ce complexe dans des cellules de GBM humain conduit à une hypométhylation globale de l'ADN entraînant une instabilité génomique et la surexpression de gènes spécifiques comme *PDGF-B*, *survivine*, *H-ras* et *MGMT* (Hervouet *et al.*, 2010). Le recrutement de DNMT1 par des facteurs de transcription a également été observé, comme avec E2F1, Rb et HDAC1. L'interaction Rb-E2F1-HDAC1-DNMT1 permet de

méthyler les promoteurs sur lesquels E2F1 est recruté et de contrôler la transcription, la réplication de l'ADN et la tumorigénèse (Robertson et al., 2000).

L'ensemble des interactions de DNMT1 dans les différents complexes qui l'impliquent entraîne des changements structuraux qui vont réguler son activité de manière positive ou négative. De ce fait, son domaine catalytique va être soit accessible soit bloqué (**Figure 7**) (Ren et al., 2018). Ce processus de régulation strict confère donc à DNMT1 un rôle prépondérant dans la méthylation de maintenance. Des études de 2010 suggèrent un rôle dans la méthylation *de novo* mais les mécanismes sont encore peu compris. Cette méthylation *de novo* impliquerait le domaine DMAP1 (DNMT1 associated protein 1 binding domain). Le rôle du complexe DNMT1/DMAP1 est peu décrit même s'il semble jouer un rôle dans la stabilité génomique après réparation des cassures d'ADN en méthylant localement au niveau du site de réparation, ce qui donnerait à DNMT1 un rôle dans la méthylation *de novo* de l'ADN (Lee et al., 2010).



1.2.4.3. Déméthylation passive et active de l'ADN

Comme l'indique la définition de l'épigénétique, ces modifications sont réversibles. Il existe plusieurs mécanismes responsables de la déméthylation de l'ADN impliquant des phénomènes passifs ou actifs comme les protéines TETs ou le système de réparation de l'ADN.

Un des mécanismes de déméthylation de l'ADN correspond à la déméthylation passive. Cette déméthylation se fait par phénomène de « dilution » au cours des divisions cellulaires, par manque de méthylation de maintenance causée par un défaut d'expression de DNMT1, ou une modification de son activité en raison de modifications métaboliques (Battle and Hawkins, 2020). Lors du phénomène de déméthylation passif, après la première division cellulaire, deux cellules avec de l'ADN hémiméthylé sur certaines séquences sont obtenues. Lors de la deuxième division cellulaire quatre nouvelles cellules sont formées : deux avec des séquences hémiméthylées et deux avec des séquences déméthylées (**Figure 8**).

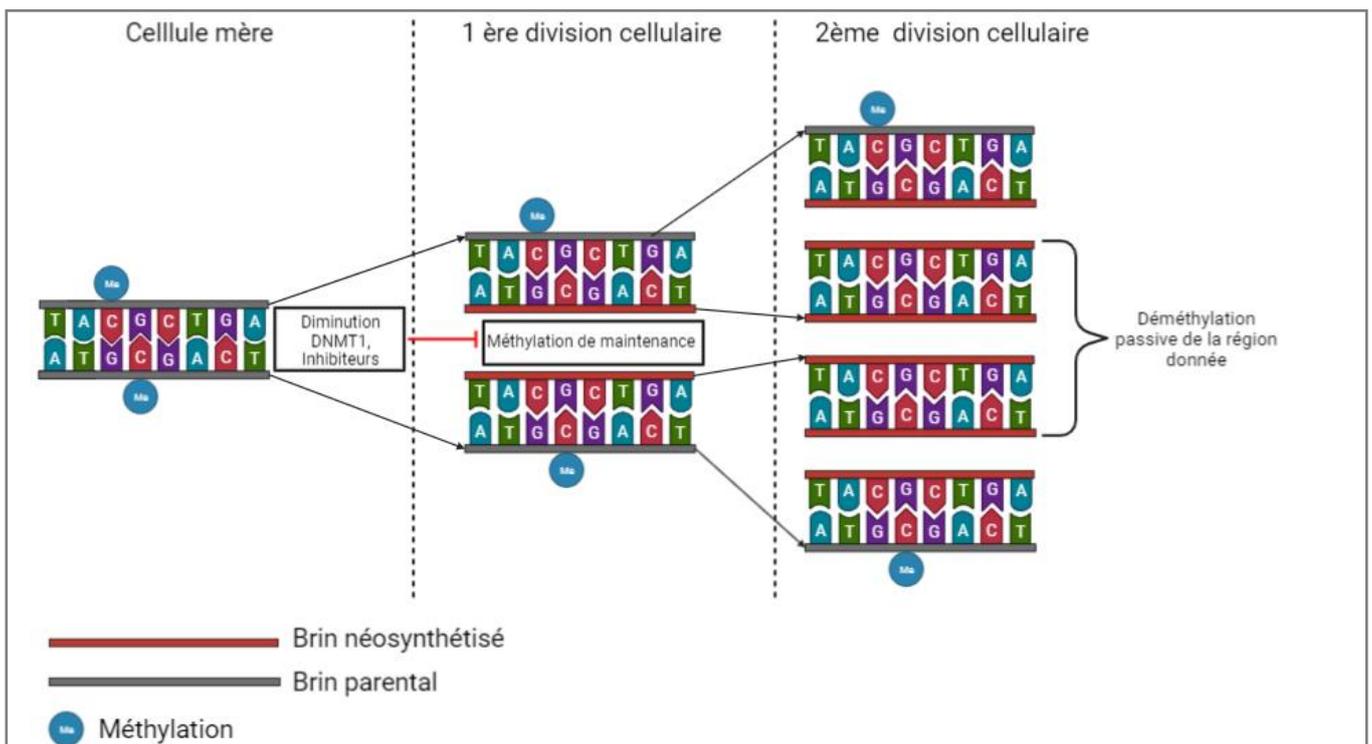


Figure 8: Mécanisme de déméthylation passive de l'ADN

La déméthylation passive intervient lors d'une diminution de l'expression de DNMT1, une absence de recrutement au niveau de ses cibles, par son inhibition via des inhibiteurs spécifiques ou une modification du métabolisme. Lors des réplifications suivantes, les régions concernées sur le brin néosynthétisé ne sont pas reméthylées lors de la méthylation de maintenance, ce qui entraîne l'apparition de régions hémiméthylées qui seront totalement déméthylées lors des divisions suivantes (phénomène de dilution). Image créée à partir de Biorender.com.

La déméthylation active de l'ADN est initiée par la famille d'enzymes TET (Ten-Eleven-Translocation). On compte trois membres de cette famille : TET1, TET2 et TET3 qui présentent une grande homologie de structure, notamment au niveau du domaine catalytique, constitué d'une région riche en cystéine et d'un domaine DSBH (hélice β double brin) très conservé entre les différents membres de la famille (**Figure 9.a**). TET1 et TET3 possèdent un domaine à doigt de zinc CXXC (comme celui de DNMT1) qui est impliqué dans leur recrutement au niveau de l'ADN sur des CpGs non méthylés, ce qui prévient de méthylations aberrantes (Xu *et al.*, 2011). Le domaine CXXC de TET3 en revanche, montre plus d'affinité pour les CpGs contenant des modifications de 5-carboxylCytosine (Jin *et al.*, 2016). Cependant, ce domaine ne semble pas être le seul mécanisme de recrutement à l'ADN puisque TET2 en est dépourvu à la suite d'une inversion dans son gène durant l'évolution, séparant le domaine CAAX du reste du gène et formant un nouveau gène : *Idax* (Ko *et al.*, 2013). Certaines isoformes de TET1 et TET3 sont également dépourvues de ce domaine. Chaque isoforme semble avoir une expression différente au cours du développement embryonnaire, du type cellulaire, mais également une activité catalytique ou un recrutement plus ou moins efficace. Les mécanismes de recrutement des enzymes TETs semblent être relativement complexes et sont encore peu connus même si différents modes de recrutement sont proposés : l'un impliquant le domaine CXXC dépendant qui va varier selon l'isoforme, l'autre via des protéines capable de les recruter à l'ADN (DNA-binding-factors) pour un recrutement à des *loci* particuliers, mécanisme similaire à celui des FT capables de recruter les DNMTs (Melamed *et al.*, 2018). C'est par exemple le cas avec les isoformes courts de TET3, dépourvus de domaine CXXC, qui sont recrutés au niveau de l'ADN des cellules de la rétine via REST, un facteur de transcription. Dans le même contexte, ces isoformes de TET3 interagissent avec NSD3, méthyltransférase de la lysine 36 de l'histone H3 (H3k36me3). Le recrutement de TET3 sur l'ADN au niveau des cibles de REST permettrait la formation de 5hmC séquence spécifique et le recrutement de NSD3 et la triméthylation d'H3K36 suivie l'activation de la transcription (Perera *et al.*, 2015).

D'autres travaux montrent également un cross talk entre les modifications d'histones et le recrutement des enzymes TETs au niveau d'îlots CpGs, notamment TET1 qui est retrouvé enrichie dans des régions contenant de la triméthylation des lysines 4 et 27 de l'histone H3 (H3k4me3 et H3k27me3) (Wu *et al.*, 2011).

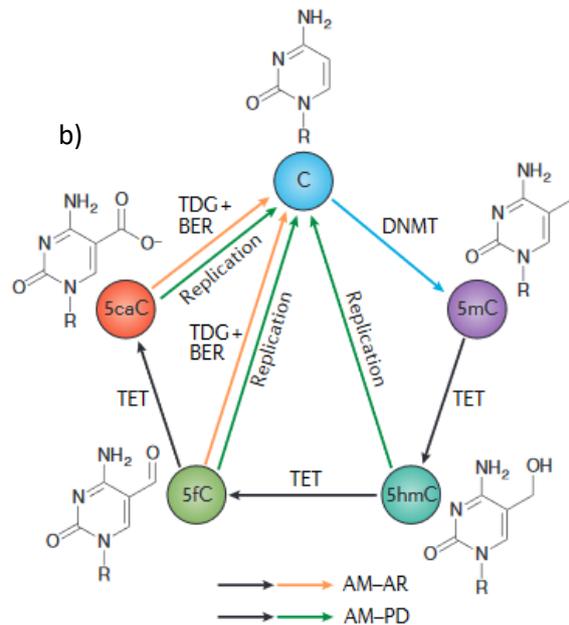
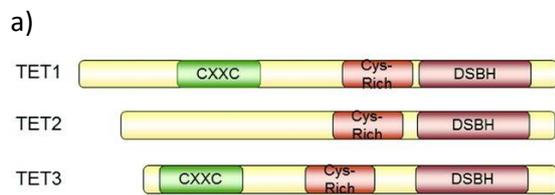


Figure 9 : représentation des mécanismes de déméthylation active de l'ADN médiée par les protéines TETs

a) Représentation des différents domaines des protéines TETs : CXXC : domaine CXXC, Cys-Rich : région riche en cystéine, DSBH : hélice double brin. Les domaines Cys-Rich et DSHB constituent le cite catalytiques des enzymes TETs. D'après, Kao et al., 2016. b) Cycle de méthylation et déméthylation de l'ADN : une DNMT convertit une cytosine non méthylée en 5mC. Les protéines TETs permettent le retour à la forme non méthylée en catalysant la réaction d'oxydation vers les formes 5hmC puis 5fC et pour finir 5caC. Les formes 5fC et 5caC sont prises en charge par le système d'excision de bases et réparation de l'ADN (TDG/BER) qui va remplacer la cytosine modifiée par une cytosine non modifiée, ce qui complète le cycle de déméthylation (noté AM-AR sur le schéma pour Active Modification- Active Removal). Les différentes modifications de cytosines peuvent également être éliminées par déméthylation passive au cours de la réplication de l'ADN (notée AM-PD sur le schéma pour Active Modification-Passive Dilution). D'après Wu and Zhang, 2017.

L'ensemble des enzymes TETs possèdent une activité identique, dépendante de l'oxygène, de l'alpha-cétoglutarate (α -KG) et du fer comme co-facteur. La réaction d'oxydation médiée par les enzymes TETs a pour produit du CO_2 et du succinate. L'activité des enzymes de la famille TET est directement régulée par le métabolisme des cellules et le ratio $\frac{\text{substrat}}{\text{produit}}$ (Lu et al., 2015).

Malgré leur différence de recrutement et d'affinité pour les différentes formes de cytosines, les 3 enzymes TETs sont capables de catalyser l'ensemble des réactions de l'oxydation de la 5-méthylcytosine en 5-hydroxyméthylcytosine (5hmC) puis en 5-formylcytosine (5fC) et pour finir en 5-carboxylcytosine (5caC) même si leur vitesse de réaction est plus grande pour la conversion de la 5mC en 5hmC que la conversion 5hmC en 5fC (Ito et al., 2011). La déméthylation médiée par les enzymes TETs peut également être couplée au système de réparation de l'ADN : TDG/BER (Tymine DNA Glycosilase/ Base Excition Repair) comme présenté sur la **Figure 9.b**. TDG reconnaît les formes 5fC et 5caC et entraîne l'excision

des bases oxydées (He *et al.*, 2011). Cela génère un site abasique reconnu par une endonucléase qui va cliver la liaison sucre-phosphate. Une ADN polymérase est alors recrutée et va insérer une cytosine non méthylée. L'inactivation du gène *Tdg* dans des embryons de souris entraîne une augmentation du niveau de méthylation de certains promoteurs ou enhancers lié à une dérégulation d'expression des gènes concernés, notamment des gènes du développement embryonnaire (Cortázar *et al.*, 2011).

L'autre mécanisme de déméthylation couplé à l'oxydation de la 5mC se fait par déméthylation passive : lors des divisions, l'ADN néosynthétisé ne sera pas reméthylé car le complexe DNMT1/UHRF1 présente moins d'affinité pour les formes 5hmC, 5fC et 5caC. La cytosine n'est alors pas reconnue comme méthylée et ne sera pas reméthylée sur le brin néosynthétisé (Frauer *et al.*, 2011; Hashimoto *et al.*, 2012). De plus, les différentes formes d'oxydation des cytosines méthylées peuvent être reconnues par des protéines et jouer diverses rôles dans la transcription et le remodelage de la chromatine. Par exemple la 5hmC est retrouvée au niveau de régions transcriptionnellement actives du génome, dans le corps des gènes et dans les enhancers. Les protéines capables de reconnaître la 5hmC sont peu connues. MeCP2 est la principale protéine identifiée comme capable de reconnaître la 5hmC dans le système nerveux et permet la régulation de la structure de la chromatine et de la transcription des gènes (Mellen *et al.*, 2012). Comme pour la 5hmC, la 5fC est associée à l'activation de la transcription. Elle est retrouvée au niveau des CGI des promoteurs et dans les exons. Les promoteurs enrichies en 5fC en comparaison avec de la 5mC ou de la 5hmC sont transcriptionnellement plus actifs et ont un niveau de triméthylation de la lysine 4 de l'histone H3 plus élevé (marque d'histone également associée avec des régions transcriptionnellement actives) (Raiber *et al.*, 2012). La 5fC est reconnue par diverses protéines de la famille de facteurs de transcriptions FOX et de facteurs de régulations RFX ainsi que les protéines à domaine SCAN (Bai *et al.*, 2021). La 5caC est retrouvée au niveau d'enhancers et de régions régulatrices distales. La 5caC permet le recrutement des facteurs de transcriptions TCF4 et MAX au niveau d'E-box et la transcription des gènes associés (Yang *et al.*, 2019). La présence des protéines « readers » de ces différentes formes de cytosines oxydées les protèges de la déméthylation active et contribue à la déméthylation passive de l'ADN (Iurlaro *et al.*, 2013). Ces différentes formes de méthylation semblent jouer un rôle important durant le développement embryonnaire et la première phase de reprogrammation épigénétique, notamment sur la déméthylation active du génome paternel. En effet, il a été observé une

augmentation de la quantité de 5fC et de 5caC génomique durant la période préimplantatoire d'embryons humains, avec une distribution particulière de ces marques dans le génome d'origine paternel (Pendina et al., 2018).

1.2. Modification post-traductionnelle des histones

1.2.1. Les protéines histones, d'après (Annunziato, 2008)

Pour comprendre le rôle des protéines histones, il faut connaître la structure 3D de l'ADN. Sans parler de la structure en double hélice et de l'appariement Watson-Crick des bases, ici je m'intéresserai aux phénomènes de compaction et décompaction de l'ADN. En effet, l'ADN du génome humain mesure environ deux mètres, or, le noyau d'une cellule eucaryote à un diamètre de 5 à 6 μm ... C'est là que les protéines histones entrent en jeu dans un premier temps. Il existe quatre types de protéines histones canoniques appelées H2A, H2B, H3 et H4, une histone de liaison appelée H1 ainsi que leurs différents variants qui peuvent avoir un rôle dans la réparation de l'ADN, la viabilité et le développement, la réplication de l'ADN ou bien l'inactivation du chromosome X chez la femme (Talbert and Henikoff, 2021).

Les histones canoniques s'assemblent en octamère (2 protéines de chaque histone canonique) pour former le cœur histone ou cœur du nucléosome. Le nucléosome est formé du cœur histone et d'ADN qui s'enroule autour de ce cœur. Ce premier niveau de compaction est décrit comme une structure en « collier de perles » : les nucléosomes sont espacés de 54pb et 146pb sont enroulées autour du cœur histone, formant une fibre de 11nm de diamètre (**Figure 10.a**). Le deuxième niveau de compaction implique l'histone H1 capable de se fixer sur l'ADN entre deux nucléosomes et induit une courbure de la chromatine et conduit à sa spiralisation. Ceci est appelé fibre solénoïde ou fibre chromatinienne d'un diamètre de 30nm (**Figure 10.b**). Cette fibre est capable de former une hélice. Un tour de cette hélice mesure 11nm et comporte 6 nucléosome, ce qui correspond à une compaction d'un facteur 40 de l'ADN. Un niveau de compaction encore supérieur peut-être atteint lors d'une association avec des protéines non histones sous forme de « charpente » : les fibres de chromatines forment alors des boucles, la structure possède un diamètre de 300nm, soit un facteur de compaction de 1000 (**Figure 10.c**). Ce sont les constituants principaux de

l'euchromatine : région de l'ADN peu dense aux électrons et accessible aux ARN polymérase. Ces régions sont associées avec la transcription de l'ADN. À l'inverse, l'hétérochromatine se forme lorsque ces structures en charpente se replient sur elle-même pour former de nouvelles boucles (**Figure 10.d**). L'hétérochromatine est une structure compactée de l'ADN qui, en microscopie, est dense aux électrons, et non accessible aux ARN polymérase. L'hétérochromatine se retrouve donc principalement dans les régions contenant des éléments répétés. Cette hétérochromatine est dite constitutive, elle est commune à toutes les cellules, notamment au niveau des centromères et des télomères. Un deuxième type d'hétérochromatine est également retrouvé dans les régions non exprimées, dépendant du type cellulaire, appelée chromatine facultative. Celle-ci peut être modifiée au cours du temps. Ces structures apparaissent notamment lors des phases de compaction de l'ADN qui précèdent la mitose. Petit à petit, l'ADN va se surcompacter jusqu'à la formation de chromosomes distincts, tels qu'observé lors de la métaphase. Ce dernier niveau de compaction correspond à un facteur de 10 000 (**Figure 10.e**).

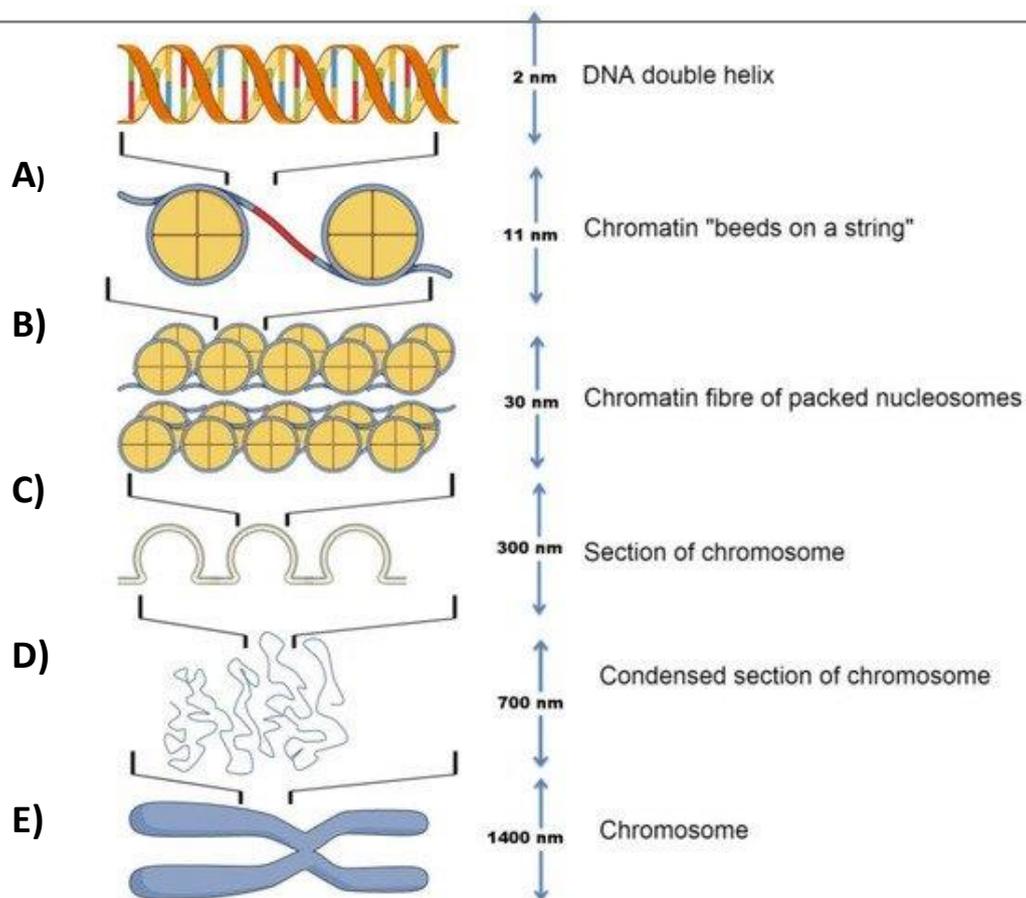


Figure 10: Illustration des différents niveau de compaction de la chromatine

a) structure en collier de perles, b) fibre chromatinienne, c) Boucle de chromatine, composant de l'euchromatine, d) chromatine condensée, composant de l'hétérochromatine, e) Chromosome mitotique. d'après McAnena et al., 2017

Les interactions histones-ADN sont possibles grâce aux charges des protéines histones, majoritairement composées d'arginines et de lysines, des acides aminés chargés positivement. Durant remodelage de la chromatine facultative, nécessaire à l'expression de gènes spécifiques, ces interactions peuvent être modifiées par l'ajout de différents groupements chimiques (méthylation, acétylation, phosphorylation) ou de peptides (sumoylation) (Bannister and Kouzarides, 2011) sur l'extrémité N-terminal, aussi appelée « queue » des histones. Ces modifications permettent de renforcer ou de diminuer l'interaction avec l'ADN soit en diminuant la charge des protéines histones (acétylation des lysines), soit via l'ajout de groupements chargés négativement (phosphorylation) ou par la réduction de la formation de liaisons hydrogènes et le renforcement de l'hydrophobicité et la taille des acides aminés (méthylation des lysines) (Luo, 2018).

Ces modifications n'ont pas seulement comme rôle de diminuer ou renforcer les liaisons entre l'ADN et les protéines histones, ils servent également de marqueurs capables d'être reconnus par diverses protéines et de jouer un rôle dans le remodelage de la chromatine, l'initiation de la transcription ou sa répression. Ces mécanismes sont appelés « code histones » et sont de plus en plus étudiés depuis les années 90. Les modifications d'histones sont maintenant connues pour jouer un rôle au cours du développement embryonnaire, dans la spécialisation des cellules mais également dans des pathologies dont les cancers (Bannister *et al.*, 2002). De manière générale, on décrit trois types d'acteurs de ce code :

-les protéines dites « writers » qui sont responsables de l'apposition de la modification chimique (aussi appelée marque).

-les protéines dites « readers » capables de reconnaître les marques et de recruter d'autres acteurs.

-les protéines dites « erasers » capables de retirer les marques.

Par la suite nous allons nous intéresser aux deux principales modifications d'histones, celles qui sont les plus décrites à l'heure actuelle et qui jouent les rôles les plus importants dans l'activation et l'inhibition de la transcription des gènes : la méthylation et l'acétylation des protéines histones.

1.2.2. Méthylation des histones

Les MPT des histones ont une nomenclature bien particulière, basée sur la protéine histone qui est modifiée (H3 ou H4 principalement), le résidu lysine (K) ou arginine (A), la position de l'acide aminé sur la queue de l'histone, sa modification : acétylation (ac) ou sa méthylation (me) et son niveau de méthylation noté meX. Par exemple pour la tri-méthylation de la lysine 4 de l'histone H3, la notation correspondante est H3K4me3 et son acétylation H3K4ac.

La méthylation des histones consiste en l'ajout d'un groupement -CH₃ principalement sur les résidus arginine et lysines des extrémités N-terminales des protéines histones (**Figure 11.a**).

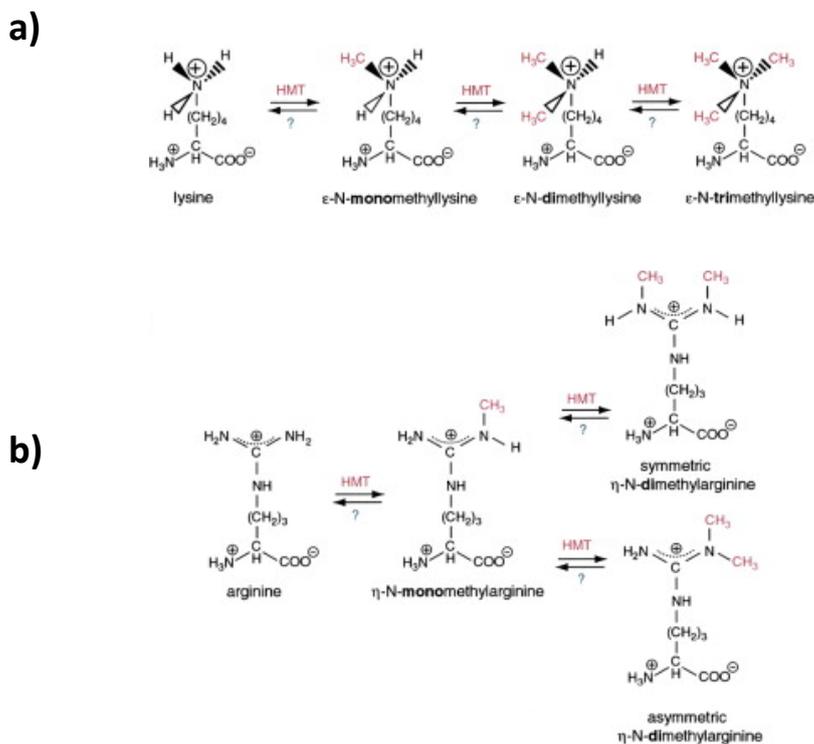


Figure 11: Représentation des différentes formes de méthylation des lysines et arginines

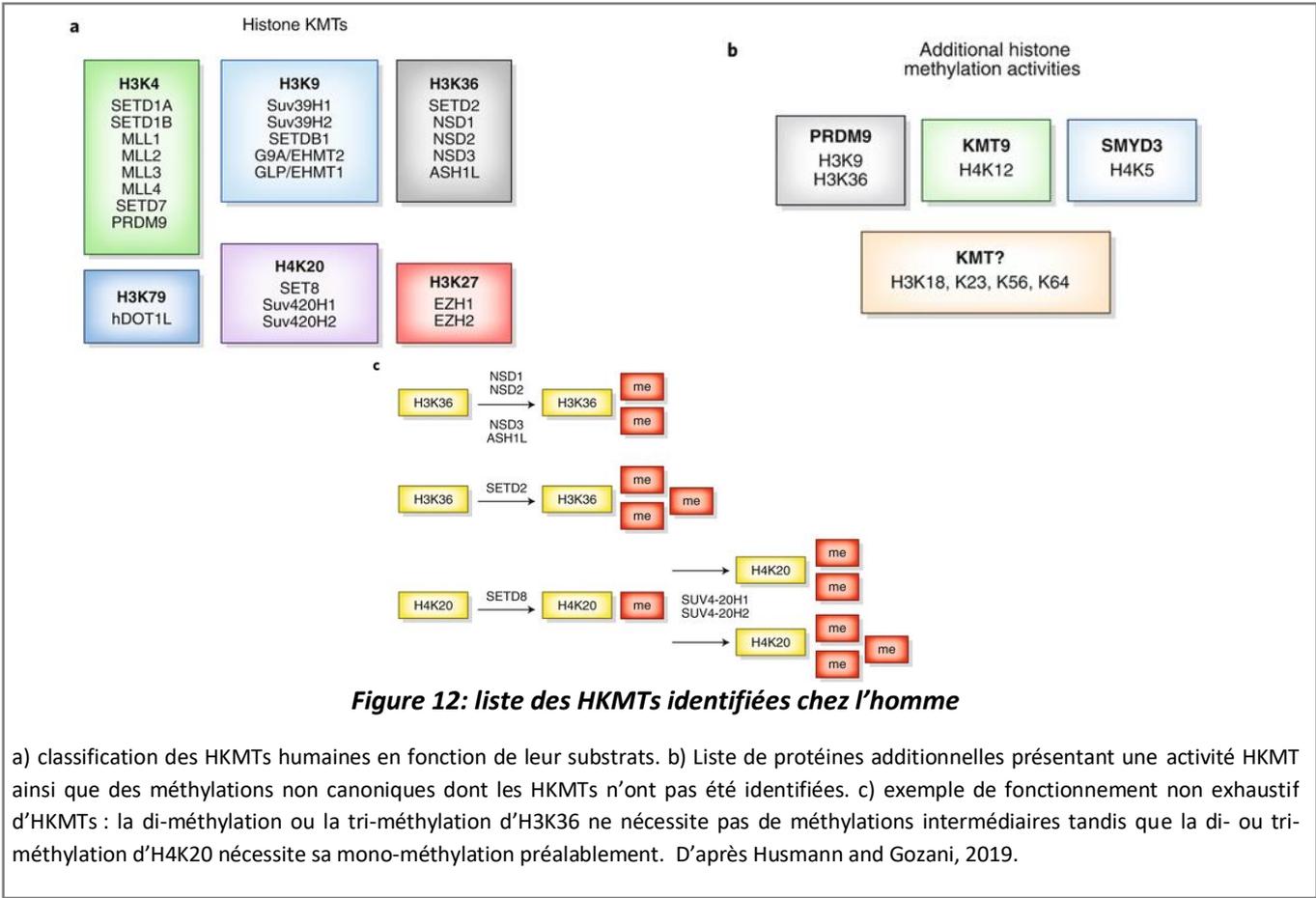
a) Les différentes formes de lysine méthylée, b) les différentes formes d'arginine méthylée. D'après Bannister et al., 2002.

La méthylation des histones, contrairement à la méthylation de l'ADN, peut être associée à la fois à l'activation de la transcription ou à sa répression en fonction du nombre de groupements ajoutés (jusqu'à trois groupements méthyle sur une lysine), de l'histone modifiée et de la position de l'acide aminé sur la queue histone. La méthylation des arginines

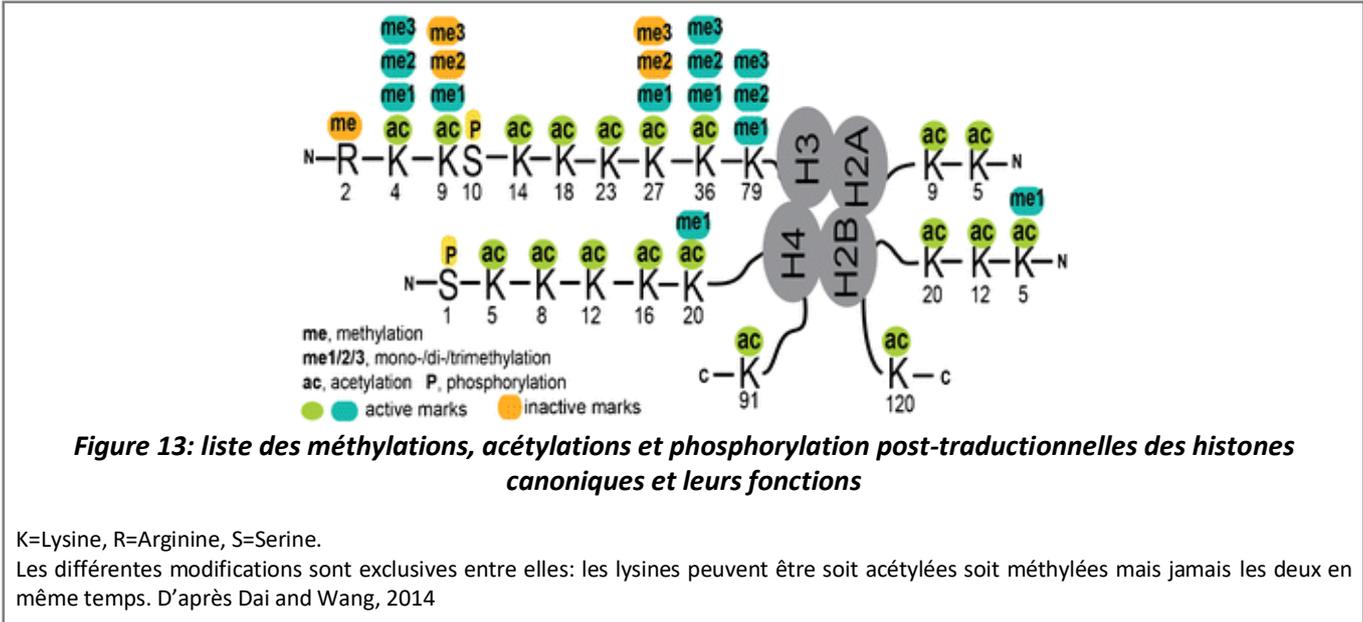
est plus complexe : les arginines peuvent être soit mono-méthylée soit di-méthylées, de manière symétrique ou non, entraînant une modulation de l'expression des gènes différentes. Par exemple, H3R3 di-méthylé symétriquement inhibe la transcription, tandis que sa di-méthylation asymétrique entraîne l'activation de la transcription ((Guccione and Richard, 2019), **Figure 11.b**). Par la suite, je vais développer uniquement les méthylations des lysines, leurs rôles et leur déméthylation car ce sont celles les plus décrites dans la littérature.

Par exemple, la mono- di ou tri-méthylation d'H3K4 est associée avec l'activation de la transcription tandis que la di- ou tri-méthylation d'H3K9 est associée avec l'inactivation de la transcription alors que sa mono-méthylation est associée à de l'activation de la transcription. La méthylation des histones ne modifie pas la charge des acides aminés contrairement à d'autres modifications. Son effet sur l'activation ou l'inhibition de la transcription se fait par le recrutement de protéines et le remodelage de la chromatine.

La grande famille de protéines capable de méthyler les protéines histones sont appelées histones méthyle transférases (HMT). Parmi ces enzymes, il existe deux sous-catégories capables de méthyler les lysines ou les arginines : les histones lysines méthyltransférases (HKMT) et les protéines arginines méthyltransférases (PRMT). Toutes les HMTs, comme les DNMTs, utilisent le même co-facteur pour catalyser la réaction : le SAM. La première HMT a été découverte chez *Drosophila Melanogaster* et son gène a été nommé *Su(var)3-9*, une méthylase spécifique d'H3k9me1 qui catalyse la réaction de tri-méthylation d'H3K9 (Tschiersch et al., 1994; Schotta et al., 2002). Des analyses chez l'Homme ont permis d'identifier 55 protéines contenant un domaine nommé SET (*Su(var)3-9*, *enhancer of zeste* and *trithorax*) (Petrossian and Clarke, 2011). Sur ces 55 protéines, la moitié possède une activité de HKMT (**Figure 12.a**). Seules 2 HKMT (DOT1L et DOT1) ne possèdent pas de domaine SET mais un domaine 7βS (seven-beta-strange). Cette catégorie de méthyltransférase est principalement impliquée dans la méthylation de métabolites, lipides ou acides nucléiques (Falnes et al., 2016).



Les méthylations des lysines se font sur les lysines 4, 9, 27, 36 et 79 pour la version canonique d'H3, la lysine 5 d'H2B et sur la lysine 20 de l'histone canonique H4, les lysines 56 et 64 de la version non canonique d'H3 et sur la lysine 12 pour la version non canonique d'H4 (Figure 13).



Chacune de ces marques est reconnue par des protéines possédant divers domaines de liaisons : chromodomaine, Bromo Adjacent Homology (BAH), ATRX-DNMT3A-DNMT3B (ADD), ankyrine, WD40, PWWP, Malignant Brain Tumor (MBT), Tandem Tudor Domain (TDD), Tudor, zf-CW, capables de reconnaître les différentes formes de méthylation des lysines (**Tableau 1**) (Musselman *et al.*, 2012). Ces « readers » sont par la suite capables de recruter différents acteurs au niveau de la chromatine, permettant d'initier la transcription des gènes cibles, la réplication de l'ADN ou de sa recombinaison, la réparation de l'ADN ou bien le remodelage de la chromatine par la propagation de la méthylation de l'ADN et des marques répressives des histones. C'est par exemple le cas avec le complexe SUV39H1/2-DNMT3A/B qui est recruté par HP1 (heterochromatin protein 1) pour méthyler les régions enrichies en H3K9 méthylée dans l'hétérochromatine constitutive et renforcer la condensation de l'ADN (Fuks *et al.*, 2003). Ceci n'est pas le seul exemple de cross talk entre DNMTs et PTMs d'histones. En effet, comme il a été développé dans la **partie 1.2.4.2**, UHRF1 est capable de reconnaître H3K9me3 pour guider la méthylation de maintenance médiée par DNMT1. D'autres interactions impliquant DNMT3A/B et les PTMs d'histones dans la méthylation facultative ont aussi été observées (Epsztejn-Litman *et al.*, 2008). A l'inverse, la méthylation d'H3K4 inhibe le recrutement de DNMT3A par DNMT3L et la méthylation *de novo* (Ooi *et al.*, 2007). H3K4me3 se trouve être très présente au niveau des régions promotrices des gènes transcrits et les travaux de Milne et ses collaborateurs ont montré une interaction entre l'ARN polymérase II (ARN Pol II) et KMT2A, la méthyltransférase responsable de la tri-méthylation d'H3K4, ce qui suggère une interdépendance de la méthylation d'H3K4 et de la machinerie transcriptionnelle (Milne *et al.*, 2005).

	Reader	PTM d'histone
lysine méthylées	ADD	H3K9me3
	Ankyrine	H3K9me2, H3K9me1
	BAH	H3K20me2
	Chromo-barrel	H3K36me3, H3K36me2, H4K20me1, H3K4me1
	Chromodomaine	H3K9me3, H3K9me2, H3K27me3, H3K27me2
	DCD	H3K4me3, H3K4me2, H3K4me1
	MBT	H3Kxme1, H3Kxme2, H4Kxme1, H4Kxme2
	PHD	H3K4me3, H3K4me2, H3K9me3
	PWWP	H3K36me3, H4K20me1, H4K20me3, H3K79me3
	TTD	H3K4me3, H3K9me3, H4K20me2
	Tudor	H3K36me3
	WD40	H3K27me3, H3K9me3
	zf-CW	H3K4me3

Tableau 1 : Liste des domaines capables de reconnaître la méthylation des lysines et leurs cibles

X=n'importe quelle lysine. D'après Musselman et al, 2012.

Pour finir, comme toutes marques épigénétiques, la méthylation des histones est réversible. Le mécanisme principal de déméthylation des histones implique une catégorie d'enzymes appelées histones déméthylases (HDM). Celles-ci se regroupent en deux grandes familles : KDM1 (amino oxidase homolog lysine demethylase 1) et les protéines déméthylases contenant un domaine JmjC (Jumonji C), di-oxygénases dépendantes du 2-oxoglutarate de Fe^{2+} et d'oxygène pour catalyser la réaction d'hydroxylation conduisant à la déméthylation des lysines. Les protéines de la famille KDM1, comme LSD1, sont capables de déméthyliser uniquement H3k4 et H3K9 mono- ou di-méthylées (Shi *et al.*, 2004). Cette famille de déméthylases possède une homologie de séquence avec les amines oxydases nucléaires dépendantes de l'adénine flavine dinucléotide (FAD). La réaction oxydative catalysée par la famille KDM1 conduit en la formation d'une imine intermédiaire hydrolysée spontanément formant du carbinolamine, un groupe instable qui donne par la suite du formaldéhyde et la lysine déméthylée. Les déméthylases de la famille JmjC sont capable de déméthyliser toutes les formes de lysines méthylées avec une affinité plus importante pour les lysines tri-méthylées (Couture *et al.*, 2007). Le remplacement des histones canoniques par leurs variants qui comportent quelques variations de séquence semble également être impliqué dans ces phénomènes de déméthylation. Les variants d'histones sont également utile au cours du cycle

cellulaire et permette un remodelage de la chromatine plus important qu'avec les histones canoniques (Henikoff and Smith, 2015).

1.2.3. Acétylation des histones

Les lysines des histones sont chargées positivement, ce qui permet une forte interaction avec l'ADN. L'acétylation des lysines permet de diminuer leur charge et donc leur interaction avec l'ADN, ce qui contribue à l'ouverture de la chromatine et à la rendre accessible aux facteurs de transcriptions et autres acteurs du remodelage de la chromatine (Luger and Richmond, 1998).

L'acétylation des histones est catalysée par la grande famille des Histones Acétyl Transférases (HATs), et plus particulièrement les Lysines Acétyltransférases (LATs) divisées en sous-familles selon leur domaine catalytique et leur séquence. Il existe 5 sous-familles qui sont : HAT1, Gcn5/PCAF, MYST, p300/CBP et Rtt109 (Yang, 2004; Berndsen and Denu, 2008). Ces HATs ont toutes la même spécificité de substrats pour les lysines et le co-facteur acétyl-coenzyme A (acétyl-COA) qui est le donneur d'acétyl pour la réaction. L'acétylation et la méthylation des lysines se faisant sur le même site, celles-ci sont exclusives.

Les protéines capables de lire l'acétylation des lysines d'histones (readers) possèdent pour la plus-part un bromodomaine (BrD). Ce domaine est également retrouvé chez certaines HATs et des protéines de remodelage de la chromatine ATP-dépendantes, nécessaires pour la progression de la transcription et le déplacement des nucléosomes pour lever la barrière transcriptionnelle qu'ils constituent, empêchant la progression de l'ARN Pol II (Petesch and Lis, 2012). Plus récemment, il a été montré que des protéines à doigts de zinc (PHD fingers) ou double domaine PHD (DPF), initialement connues pour interagir avec les lysines méthylées, sont également capables de reconnaître des lysines acétylées (H3K14ac) (Klein *et al.*, 2017; Zeng *et al.*, 2010).

Le domaine BrD est très conservé et présente une structure en faisceau de quatre hélices alphas à pas gauches et deux boucles inter hélicoïdales capable de reconnaître les lysines acétylées. Les résidus flanquant l'un ou l'autre des côtés de la lysine acétylée permettent d'augmenter la spécificité de liaison (Marmorstein and Zhou, 2014). Certaines protéines contenant un BrD sont capables de reconnaître plusieurs lysines acétylées

simultanément. Le bromodomaine est historiquement le premier domaine identifié comme pouvant reconnaître l'acétylation des histones (Dhalluin *et al.*, 1999). Au total, 42 protéines à bromodomaines ont été identifiées. Chacune de ces protéines possède entre 1 à 6 bromodomaines qui peuvent avoir différentes séquences (56 bromodomaines individuels uniques ont été recensés au total) (Sanchez and Zhou, 2009). Parmi l'ensemble des protéines possédant un bromodomaine, il existe une famille nommée BET (Bromodomain and Extra-Terminal Domain) incluant les protéines BRD2, BRD3, BRD4 et BRDT (testiculaire, non détaillée ici) issus de gènes paralogues dupliqués durant l'évolution. Ces protéines possèdent un double domaine BrD et un domaine extra-terminal. BRD4 possède plusieurs isoformes, une longue avec un domaine CTM (C-terminal motif) et deux courtes qui comportent toutes les trois un site de phosphorylation N-terminal (**Figure 14**). Les membres de la famille BET sont connus pour jouer un rôle important dans la régulation de la transcription des gènes au cours de la prolifération et de la différenciation cellulaire. Pour comprendre le rôle des protéines de cette famille, il faut savoir que le génome s'organise en diverses structures 3D complexes, entraînant la formation de compartiments nucléaires et de territoires chromosomiques. Au sein de chaque territoire, la chromatine va s'organiser selon différentes régions : permissives (compartiments A) ou répressives (compartiment B). Les interactions au sein de ces compartiments vont former des structures appelées TADs (topological associating domains), structures délimitées par des régions enrichies en Cohésine et en CTCF (protéine isolateur). L'ensemble de ces structures, leurs rôles et régulation sont particulièrement bien détaillées dans la revue de Pongubala et Murre (Pongubala and Murre, 2021).

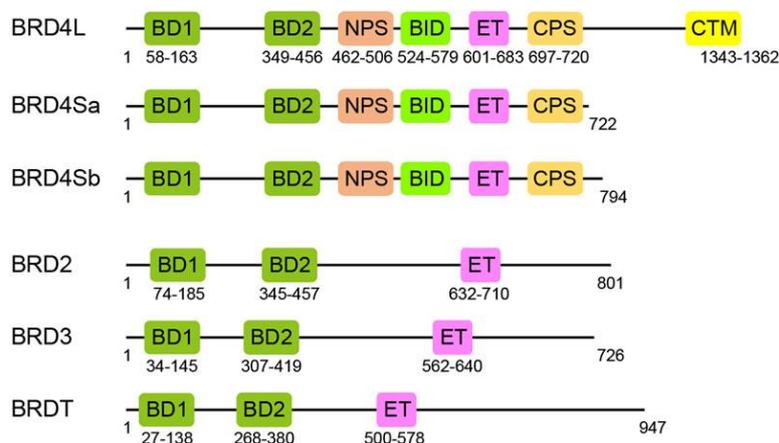


Figure 14: représentation des domaines fonctionnels des protéines de la famille BET

BRD4L : isoforme longue de BRD4, BRD4Sa : isoforme courte a de BRD4, BRD4Sb : isoforme courte b de BRD4.

BD1 : premier bromodomaine, BRD2 : deuxième bromodomaine, NPS : site de phosphorylation N-terminal, BID : domaine d'interaction enrichie en résidu basique, ET : domaine extra terminal, CPS : site de phosphorylation C-terminal, CTM : motif C-terminal. D'après Cheung et al., 2021.

Chaque membre de la famille des BETs possède une spécificité pour une ou plusieurs lysines acétylées de par leurs bromodomaines : BRD2 reconnaît préférentiellement H4K12ac et H4K5ac, et active le recrutement de facteurs de transcriptions, la transcription et l'élongation en interaction avec BRD3 (Kanno *et al.*, 2004). Le complexe BRD2/BRD3 est également capable de reconnaître l'acétylation d'H3K14 dans les portions de chromatine enrichies en H4K5ac, H3K12ac et une faible proportion en H3K9me2 (LeRoy *et al.*, 2008). BRD4 est capable de moduler la prolifération cellulaire en régulant l'expression de facteurs de transcriptions dans des lignées cellulaires de souris (Dey *et al.*, 2000). BRD4 interagit et stimule l'activité du complexe P-TEFb (positive transcription elongation factor b, formé par la Cycline T1 et Cdk9) impliqué dans la plupart des mécanismes de transcription médiés par l'ARN Pol II. Le complexe est capable d'activer l'ARN Pol II en la phosphorylant. Le recrutement de ce complexe au niveau de la chromatine est dépendant du niveau d'acétylation qui est reconnu par le bromodomaine de BRD4, notamment H3K27ac (Jang *et al.*, 2005). BRD4 est recruté sur de nombreux gènes impliqués dans la transition G1-S du cycle cellulaire et permet leur activation (Mochizuki *et al.*, 2008). BRD4 est également connu pour réguler la transcription via l'activation d'enhancers/super-enhancers. Les enhancers sont des séquences non-codantes *cis*-régulatrices capable d'activer la transcription d'un ou plusieurs gènes situés sur le même chromosome. Ces régions peuvent réguler l'expression d'un ou plusieurs gènes indépendamment de leur orientation, de la distance et de leur localisation. Les enhancers

peuvent se retrouver dans une même région, ce cluster est appelé super-enhancer. Les enhancers sont majoritairement situés dans des régions intergéniques et introniques, et de manière plus rare dans des exons. Les enhancers possèdent de nombreux sites de fixation pour des facteurs de transcriptions. Lors de l'initiation de la transcription par les enhancers, les facteurs de transcriptions et des protéines de remodelage de la chromatine, et des protéines architecturales comme la cohésine et la condensine vont reconnaître les enhancers et modifier la structure de la chromatine pour former des boucles et rapprocher l'enhancer et les facteurs de transcription de la région promotrice du ou des gènes à transcrire, et permettre le recrutement de l'ARN Pol II et son activation (Panigrahi and O'Malley, 2021). Ces régions sont particulièrement enrichies en H3K27ac lorsqu'elles sont transcriptionnellement actives (Lovén *et al.*, 2013). La structure d'une boucle de transcription formée par un super-enhancers et BRD4 est présentée plus bas sur la **Figure 15**.

Un autre rôle des protéines à bromodomains contribue à la maintenance de l'euchromatine en empêchant les phénomènes de désacétylation de par leur présence sur la chromatine. BRD2 et BRD4 semblent jouer un rôle dans ce phénomène au cours des divisions cellulaires : en effet, BRD2 et BRD4 sont retrouvés au niveau de la chromatine durant la mitose, phénomène très peu observé pour d'autres protéines à BrD et de manière globale ou la plus part des protéines liées à la chromatine sont expulsées de la chromatine à cette étape du cycle cellulaire (Kanno *et al.*, 2004).

La désacétylation des histones est catalysée par des histones désacétylases (HDACs) comprenant 18 protéines chez les mammifères, divisées en 4 sous-groupes réparties selon leur homologie de séquences : HDACs I (HDAC 1, 2, 3 et 8), II (HDAC 4, 5, 6, 7, 9 et 10) et IV (HDAC 11) qui sont des amidohydrolases dépendantes du zinc. La troisième catégorie d'HDACs, appelées sirtuines, diffèrent de par leur fonction catalytique qui dépend du NAD (nicotinamide adenine dinucleotide). Les sirtuines sont également capables de désacétyler des protéines non histones comme p53 (SIRT1) et l' α -tubuline (SIRT2) (Park and Kim, 2020).

1.2.4. Dynamique de remodelage de la chromatine : cross talk entre méthylation d'ADN/PTMs d'histones et métabolisme

Comme nous avons pu le voir dans chaque sous-partie de ce chapitre, les mécanismes épigénétiques contribuent à la structuration et au maintien de la chromatine au cours des divisions et de la différenciation cellulaire et jouent un rôle important dans la régulation de

l'expression des gènes. Bien que présentés individuellement, l'ensemble de ses mécanismes forment un tout, un code très précis et finement régulé, un cross talk permanent entre méthylation de l'ADN et modifications post-traductionnelles d'histones avec des acteurs que l'on pourrait caractériser de bivalents, capables de reconnaître à la fois les modifications de l'ADN et d'histones (*cf* UHRF1) pour pouvoir recruter diverse complexes impliqués dans le remodelage de la chromatine en propageant les marques, soit de répression, soit d'activation, de la transcription ou dans le recrutement de facteurs de transcription par exemple.

Dans cette sous-partie, j'ai décidé de traiter deux exemples de phénomènes épigénétiques impliquant des complexes, d'une part associés à l'activation de la transcription, et, d'autre part, à la formation de l'hétérochromatine.

Le premier exemple concerne la protéine BRD4 qui reconnaît H3K27ac qui est particulièrement enrichie dans les super-enhancers, via ses domaines BrD et recrute le complexe P-TEFb, responsable de l'activation de l'ARN Pol II et de l'inactivation de NELF (negative elongation factor) via leur phosphorylation (Jang *et al.*, 2005). La phosphorylation du NELF inhibe sa capacité de fixation aux facteurs de transcriptions et aux cofacteurs, les rendant disponible pour être recruté sur la chromatine. La phosphorylation de l'ARN Pol II est dépendante de BRD4, qui présente une activité kinase (Devaiah *et al.*, 2012). BRD4 est également retrouvé associé au complexe Médiateur au niveau des super-enhancers mais aussi au niveau des TSS (transcription start site) des régions promotrices, enrichies en H3K4me3. BRD4 est capable d'interagir avec des HATs comme P300, des histones arginines déméthylases comme JMJD6, et des histones méthyltransférases comme NSD3 (H3K36, associée à l'activation de la transcription) via son domaine extra terminal ou son CTM ainsi qu'avec des enzymes de remodelage des nucléosomes (CDH4, SWIF/SNF) (Ali *et al.*, 2022). L'ensemble de ces mécanismes contribuent au remodelage de la chromatine et son ouverture, favorisant à la fois le recrutement de facteurs de transcriptions mais aussi l'initiation de la transcription et son élongation (**Figure 15**).

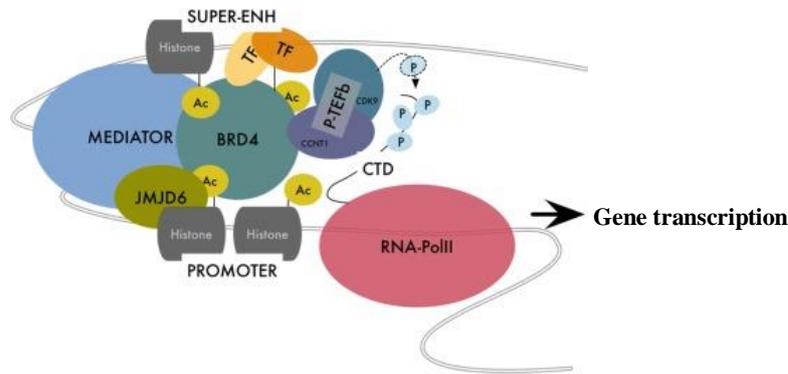


Figure 15: Représentation de la formation d'une boucle de transcription médiée par BRD4

BRD4 reconnaît les régions de la chromatine hyper acétylée (notamment au niveau du super-enhancer) puis recrute le complexe Médiateur qui constitue la plateforme d'assemblage des protéines régulatrices de la transcription. Cette structure permet de créer le rapprochement spatial entre le super enhancer et le promoteur, favorisant et stabilisant l'interaction de l'ARN Pol II. L'interaction de BRD4 avec le P-TFEB permet la phosphorylation de l'ARN Pol II et l'initiation de l'élongation. D'après Donati et al., 2018.

Le deuxième exemple correspondant à la formation de l'hétérochromatine implique le recrutement d'histones déméthylases médiée par les protéines CoREST et REST.

Les HDMs sont retrouvées dans différents complexes permettant de les guider sur leurs cibles, comme par exemple le complexe CoREST impliquant LSD1 et permettant de stimuler son activité et de la recruter au niveau des nucléosomes. En dehors de ce complexe, LSD1 présente une activité H3K4me1,me2 déméthylase sur des peptides ou des monomères d'histones mais pas sur des nucléosomes. C'est son recrutement dans le complexe impliquant la protéine CoREST (Repressor Element 1 Silencing Transcription factor Corepressor) qui permet de guider LSD1 sur les nucléosomes et d'augmenter sa spécificité et son activité déméthylase. Le complexe composé de CoREST, de la protéine REST qui joue le rôle de plateforme d'assemblage du complexe et de guide et reconnaît une séquence de 21 paires de bases très conservées de l'ADN (séquence RE1). On dénombre environ 2000 gènes possédant cette séquence (Bruce *et al.*, 2004). Le complexe CoREST semble jouer un rôle prédominant principalement dans le développement du système nerveux (Abrajano *et al.*, 2010). L'association avec les HDAC1/2 et la méthyltransférase G9a (qui méthyle H3K9) entraîne le remodelage de la chromatine par la désacétylation d'H3K9 puis sa méthylation via G9a associée avec la déméthylation d'H3k4 par LSD1. L'apposition de ces nouvelles marques a pour but de recruter les protéines MeCP2 et HP1, impliquées dans la condensation de la chromatine (Figure 16)(Maksour *et al.*, 2020).

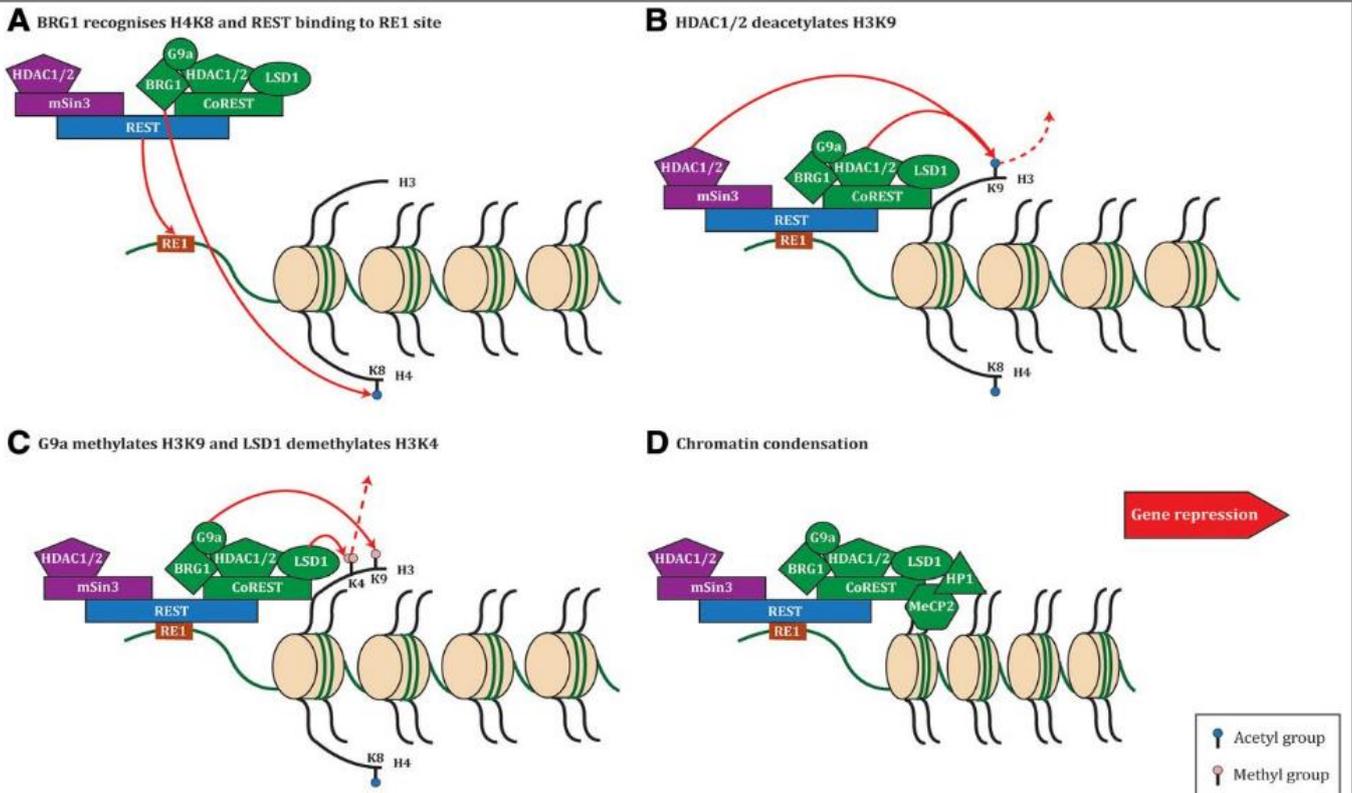
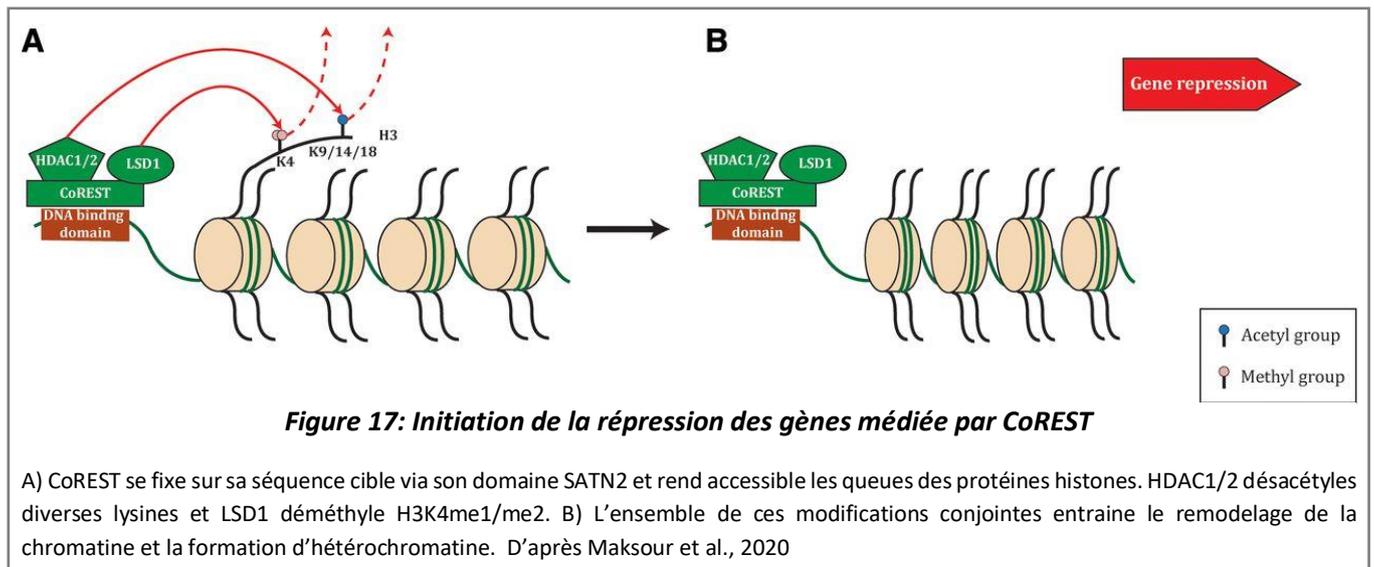


Figure 16: Initiation de la répression des gènes médiée par REST

REST sert de plateforme pour le recrutement de mSin3-HDAC1/2 sur sa partie N-terminale et CoREST-BRDG1-HDAC1/2-LSD1-G9a sur sa partie C-terminale. A) REST se fixe à la séquence RE1, l'interaction est renforcée par BRG1 qui reconnaît l'acétylation d'H4K8. B) HDAC1/2 initie la désacétylation d'H3K9. C) LSD1 déméthyle H3K4me1/me2 et G9a méthyle H3K9. D) Formation d'hétérochromatine via le recrutement de MeCP2 et HP1 au niveau H3K9. D'après (Maksour et al., 2020).

Il a également été observé que la protéine CoREST seule est capable de se lier à l'ADN sur des sites spécifiques via son domaine SANT2 et de médier la désacétylation d'H3K9, K14 et K18 et la déméthylation d'H3K4 via le recrutement d'HDAC1/2 et de LSD1 (Barrios *et al.*, 2014; Pilotto *et al.*, 2015), ceci conduisant également à la formation d'hétérochromatine (Figure 17).



Le « code histone » est donc relativement complexe et régulé finement, permettant le remodelage de la chromatine de manière temporalisée (*cf* lors du développement embryonnaire) et localisée. Certaines marques ont pour but de réprimer les mécanismes inverses, par exemple, l'acétylation d'H3K14 inhibe la déméthylation d'H3K4 et contribue au maintien de l'euchromatine (Wu *et al.*, 2018). Ainsi, l'ensemble des modifications épigénétiques (*i.e* méthylation de l'ADN et PTMs d'histones) sont en crosstalk permanent pour initier ou réprimer l'expression des gènes, lors des étapes du développement embryonnaire, des divisions cellulaires et tout au long de la vie de la cellule. D'autres complexes majeurs qui ne seront pas détaillés ici sont également impliqués dans ces crosstalk et remodelages de la chromatine, comme les complexes polycomb (PcG) avec par exemple le complexe PRC2, et trithorax (TrxG) avec les complexes SWI/SNF (Margueron and Reinberg, 2011; Schuettengruber *et al.*, 2017).

Tous ces mécanismes dépendants de co-facteurs issus de voies métaboliques sont donc susceptibles d'être modifiés rapidement par de nombreux paramètres tels que l'environnement, le stress, le régime alimentaire ou bien l'exposition à des pesticides ou des produits chimiques (aussi bien polluants que médicaments) qui peuvent modifier le métabolisme des cellules. Comme toutes réactions chimiques, la catalyse des réactions de méthylation/acétylation/phosphorylation et autres ainsi que leur réaction inverse dépend de la proportion de substrat et de produits de la réaction. Si une forte concentration de donneur de méthyle est disponible, alors la réaction de méthylation sera favorisée par rapport à la

déméthylation, et inversement si la concentration en donneur de méthyle est faible, la déméthylation sera favorisée (Figure 18)(Reid *et al.*, 2017).

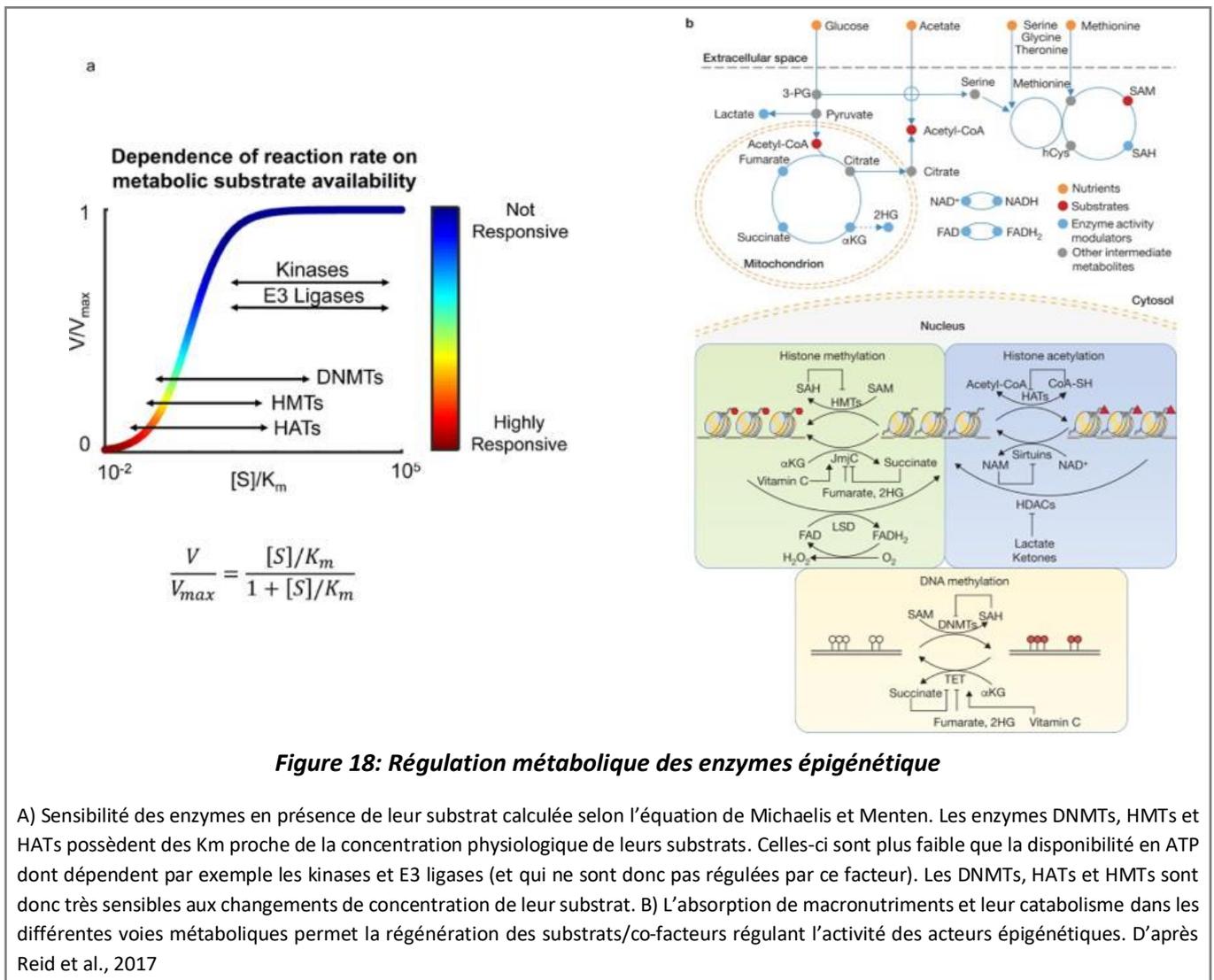


Figure 18: Régulation métabolique des enzymes épigénétique

A) Sensibilité des enzymes en présence de leur substrat calculée selon l'équation de Michaelis et Menten. Les enzymes DNMTs, HMTs et HATs possèdent des K_m proche de la concentration physiologique de leurs substrats. Celles-ci sont plus faible que la disponibilité en ATP dont dépendent par exemple les kinases et E3 ligases (et qui ne sont donc pas régulées par ce facteur). Les DNMTs, HATs et HMTs sont donc très sensibles aux changements de concentration de leur substrat. B) L'absorption de macronutriments et leur catabolisme dans les différentes voies métaboliques permet la régénération des substrats/co-facteurs régulant l'activité des acteurs épigénétiques. D'après Reid *et al.*, 2017

Après avoir mis en évidence les mécanismes épigénétiques impliqués dans le remodelage de la chromatine et la régulation de l'expression des gènes, nous allons nous intéresser à un autre mécanisme qui rajoute un niveau de complexité à ces phénomènes de régulation de l'expression des gènes. Celui-ci intervient au niveau post-transcriptionnel et est capable de réguler la traduction des ARNm via différentes modifications de l'ensemble des catégories d'ARNs : l'épitranscriptomique.

2. Epitranscriptomique

2.1. Définition

L'épitranscriptomique est une discipline qui, sur le même principe que l'épigénétique, s'intéresse à l'étude des modifications post-transcriptionnelles des ARNs (ARNs messagers, ribosomaux, de transferts, ARNs long non codants, micro ARNs et autres catégories d'ARNs). En effet, il a été mis en évidence 109 modifications post-transcriptionnelles dont la plupart sur des ARNs de transferts (ARNt) ou ribosomaux (ARNr) (Cantara *et al.*, 2011). Bien que le rôle de certaines modifications ne soit pas totalement compris, d'autres comme la coiffe 5' sont parfaitement caractérisées et permettent la maturation et la prise en charge des ARNm dans les processus de traduction (Byszewska *et al.*, 2015). Une des modifications de base retrouvée sur les ARNs est leur méthylation. Comme pour l'ADN, on retrouve la méthylation de la cytosine en position 5 (m5C) et la méthylation de l'adénosine en position 6 (m6A). On retrouve également la méthylation de la guanosine en position 7 (m7G) et d'autres types de méthylations comme la méthylation en position 1 de l'adénosine (m1A) (Zhao *et al.*, 2017). Toutes ces modifications jouent un rôle dans l'épissage alternatif, l'export nucléaire, la stabilité et la traduction des ARNs.

L'étude de la méthylation de la catégorie des ARNs non codants (ARNnc) est particulièrement intéressante car elle joue un rôle important dans la régulation de la traduction. Que ce soit grâce aux ARNs dits de ménages ou les ARNs régulateurs, comme la catégorie des micros ARNs (miRNAs) qui est de plus en plus étudiée depuis les dernières années. En effet, à eux seuls, cette catégorie d'ARNs non codants permet la régulation post-transcriptionnelle d'un tiers du génome (Zendjabil *et al.*, 2017). La méthylation des miRNAs est encore peu décrite, mais elle joue un rôle important dans leur biogenèse (maturation), leur régulation (activation ou inactivation) et leur stabilité (Alarcón *et al.*, 2015b; Berulava *et al.*, 2015; Briand *et al.*, 2020; Cheray *et al.*, 2020). Leur expression et leur méthylation est également modifiée dans les cancers et peuvent être analysés dans le sang des patients, ce qui leur confère un rôle important en tant que biomarqueurs dans le dépistage des cancers et la réponse aux traitements (Briand *et al.*, 2020; Cheray *et al.*, 2020; Konno *et al.*, 2019).

2.2. Rôle des miRNAs dans la vie d'une cellule

Les miRNAs font partie d'une sous-catégorie d'ARNs dits non codants qui caractérisent l'ensemble des ARNs qui ne sont pas traduits en protéines. Pendant longtemps, cette catégorie d'ARNs était considérée comme des sous-produits ou déchets de la transcription, jusqu'à l'identification des ARNr et ARNt dans les années 50 ainsi que la découverte progressive des longs ARN non codants dont la taille est supérieure à 200 nucléotides (nt) (ARNlnc) et des petits ARNs non codants dont la taille est inférieure à 200nt (smallRNA, **Tableau 2**) (Delihias, 2015; Zhang *et al.*, 2019).

Type	Abbreviation	Full name	Size
Housekeeping ncRNAs	rRNA	ribosomal RNA	120-4,500 nt
	tRNA	tansfer RNA	76-90 nt
	snRNA	small nuclear RNA	100-300 nt
	snoRNA	small nucleolar RNA	60-400
	TERC	telomerase RNA	/
	tRF	tRNA-Derived Fragments	16-28 nt
	tiRNA	tRNA halves	29-50 nt
Regulatory ncRNAs	miRNA	microRNA	21-23 nt
	siRNA	small interfering RNA	20-25 nt
	piRNA	piwi-interacting RNA	26-32 nt
	eRNA	enhancer RNA	50-2,000 nt
	lncRNA	long non-coding RNAs	>200 nt
	circRNA	circular RNA	100-10,000 nt
	Y RNA	Y RNA	/

Tableau 2 : Liste des caractéristiques, fonctions, tailles et dénominations des ARNs non codants, d'après (Zhang *et al.*, 2019)

Les miRNAs se caractérisent par leur taille (~21-24nt) et sont produits à partir de transcrits possédant une structure en épingle à cheveux (O'Brien *et al.*, 2018). Proportionnellement, les miRNAs représentent les ARNnc les plus abondants dans une cellule. En 2019, 2654 miRNAs humain matures ont été recensés dans la banque de donnée mirbase 22 (Kozomara *et al.*, 2019; Plotnikova *et al.*, 2019). Les miRNAs possèdent la capacité de s'hybrider totalement ou partiellement aux régions 3' (plus rarement sur la région 5') des ARNm et inhibent leur traduction en entraînant leur séquestration ou leur dégradation (**Figure 19**).

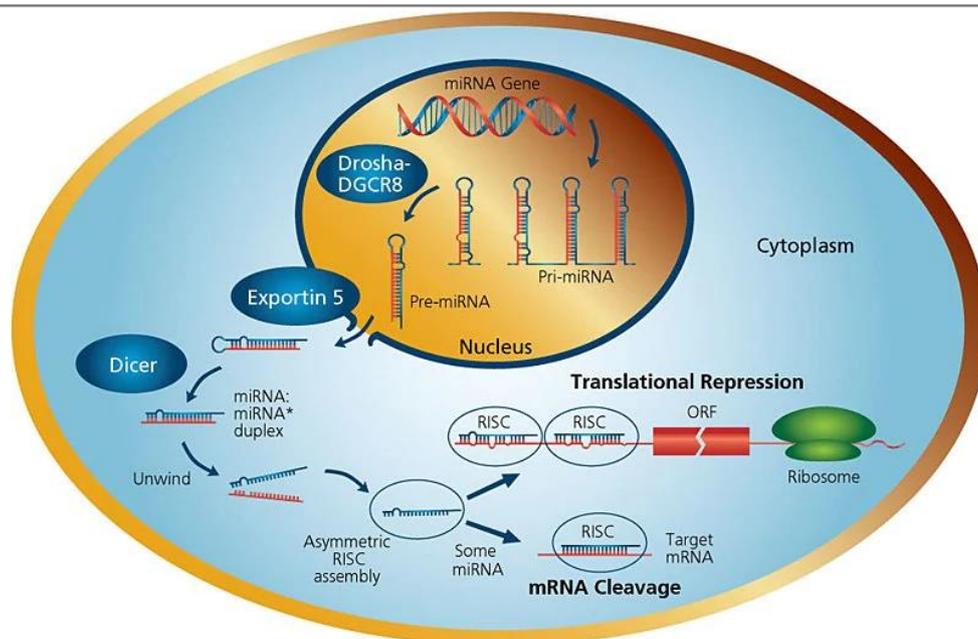


Figure 19 : Biogenèse des miRNAs

Après transcription du miRNA-gène par l'ARN Pol II ou III, le Pri-miRNA est pris en charge par le complexe microprocesseur DROSHA/DGCR8 pour être clivé en Pré-miRNA puis exporté via l'exportine 5 dans le cytoplasme où il va de nouveau être clivé par DICER en miRNA double brin. L'ARN double brin va se séparer en deux (structure instable) puis être recruté par la protéine RISC qui va permettre de guider le miRNA sur sa cible et d'entraîner sa répression post-transcriptionnelle. Source : Merk.

Ce niveau de régulation post-transcriptionnelle permet le contrôle de l'ensemble des fonctions d'une cellule, de sa survie à sa mort en passant par sa prolifération jusqu'à sa différenciation. Depuis plus récemment, leur rôle dans diverses pathologies comme les cancers ont été mis en évidence (Reddy, 2015), ceux-ci seront détaillés dans la partie 3 de l'introduction.

Comme pour tout ARNs, les miRNAs, sont régulés de manière épigénétique au niveau de leur promoteur et leur gène (méthylation d'ADN, PTMs d'histones) et sont transcrits par l'ARN Pol II et dans de rares cas par l'ARN Pol III (Zhou *et al.*, 2008). Lors de leur synthèse, la première forme de miRNA produite est appelée Pri-miRNA qui va être clivée par le complexe microprocesseur (DROSHA-DGCR8). Le Pre-miRNA produit va ensuite être pris en charge par l'exportine 5 pour être transporté vers le cytoplasme. La protéine Dicer reconnaît le Pre-miRNA et initie un deuxième clivage qui libère un complexe instable de miRNAs double brin qui va se séparer en deux. Le brin le plus stable est pris en charge par le complexe Pre-RISC (RNA-induced silencing complex) formé de la protéine RISC et d'une protéine Argonaute (AGO) qui permet de guider le miRNA sur sa cible (miRNA binding site) et d'initier la

dégradation de l'ARNm ou l'inhibition de sa traduction (Rani and Sengar, 2022). Le deuxième brin quant à lui est dégradé. Si les deux brins ont une bonne stabilité, alors ils sont tous les deux pris en charge dans des complexes RISC et sont capable de réprimer leur cible (l'un en 3', l'autre en 5' : d'où la notation miRNA-XXX-3p ou miRNA-XXX-5p).

Chaque étape de la biogenèse des miRNAs ou de leur rôle biologique est régulée par des modifications épitranscriptomiques notamment la méthylation.

2.3. Principaux acteurs et rôle des méthylations des miRNAs

Les principaux acteurs (méthyltransférases) identifiés dans la méthylation des miRNAs sont connus comme étant impliqués dans la méthylation d'ARNm, ARNt ou même, de l'ADN. Parmi ces acteurs, on retrouve les protéines METTL3 (m6A), DNMT3A (m5C) et METTL1 (m7G). L'étude de la méthylation des miRNAs étant relativement récente (Alarcón *et al.*, 2015b; Berulava *et al.*, 2015), l'ensemble des acteurs protéiques impliqués dans ces mécanismes n'est, à l'heure actuelle, pas encore pleinement déterminé. Une partie de l'interactome de ces enzymes a été caractérisé comme nécessaire à la méthylation de différents ARNs (messenger ou transfert) ou même de l'ADN, mais ne sont pas caractérisés dans la méthylation des miRNAs. Ces observations suggèrent que certaines protéines de l'interactome permettent l'adressage des méthyltransférases vers leurs différentes cibles (ARNm, ARNt ou miRNAs), adressage qui pourrait différer selon le complexe formé.

2.3.1. METTL3 et m6A

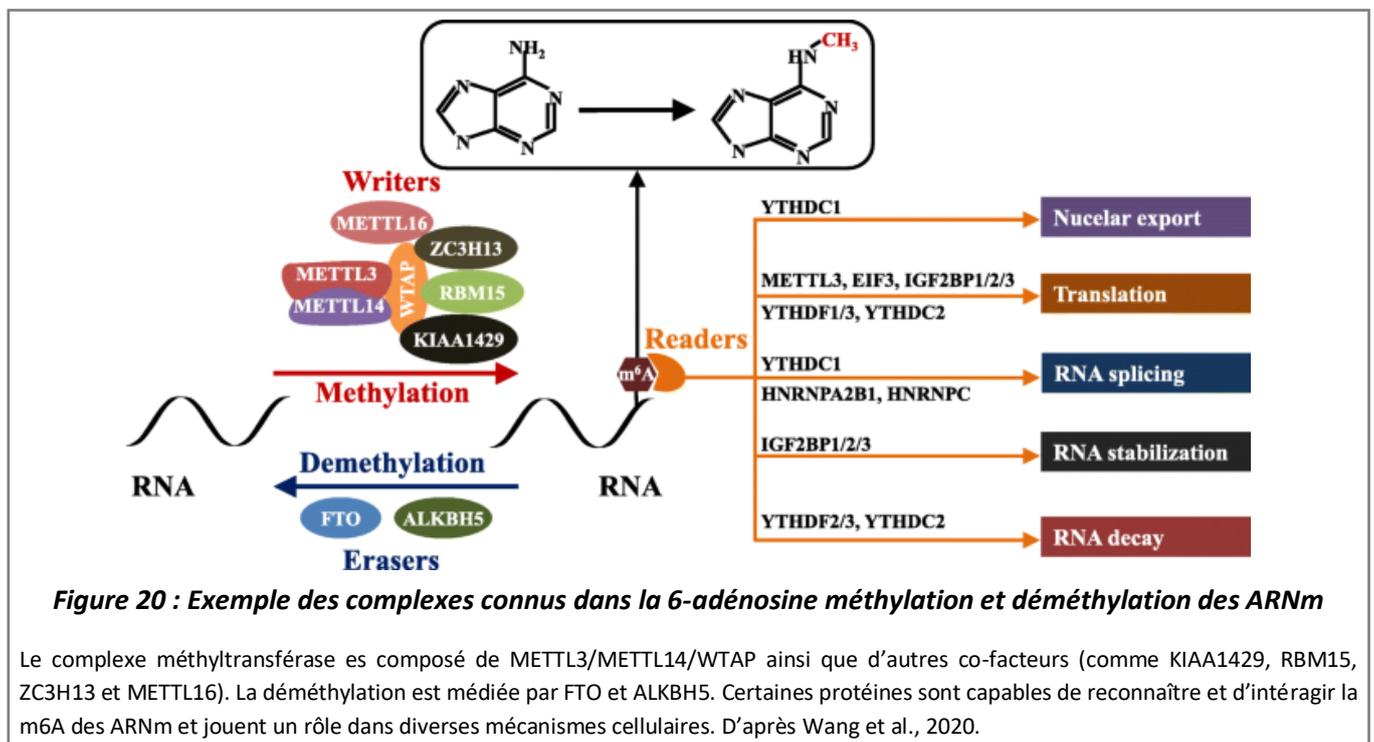
La N-6méthyladénosine a été identifiée pour la première fois en 1974 par Desrosiers, Friderici et Rottman sur des ARNm de rat (Desrosiers *et al.*, 1974) et a, par la suite, été caractérisée comme la modification post-transcriptionnelle la plus fréquente des ARNm de diverses espèces (plantes, mammifères, mouches...) (Zhao *et al.*, 2017). La première description de la methyltransférase like 3 connue sous le nom de METTL3 (également appelée MTA70 pour N6-méthyltransférase 70kDa subunit) en tant que méthyltransférase des ARNm, a été faite en 2002 (Bujnicki *et al.*, 2002; Clancy *et al.*, 2002). C'est depuis 2013 que le nombre de publications sur METTL3 augmente considérablement et que son rôle dans les processus de maturation des ARNm, puis des miRNA est mis en évidence pour finir par son rôle dans de nombreuses maladies et cancers. La première publication évoquant le rôle de METTL3 dans la méthylation des miRNA est celle d'Alarcón et ses collaborateurs en 2015 qui montrent le rôle

de la m6A médiée par METTL3 dans la maturation des miRNAs (Alarcón *et al.*, 2015b). La méthylation des Pri-miRNAs par METTL3 permet leur prise en charge par DGCR8 et leur clivage par le complexe microprocesseur. Dans leur étude, ils ont montré qu'une perte d'expression de METTL3 entraîne une accumulation de miRNA non matures. Il a été montré que la m6A des ARNm était particulièrement enrichie sur la séquence consensus DRACH et sur la séquence consensus RRACH des Pri-miRNAs ou miRNAs matures (D=A,G ou U; R=G ou A; H=A,C ou U) (Linder *et al.*, 2015; Berulava *et al.*, 2015).

METTL3 est une protéine constituée de 580 acides aminés dont la séquence primaire permet de distinguer deux domaines à doigt de zinc (en position 259-336) et un domaine catalytique en C-terminal (357-580) avec 3 régions permettant la prise en charge du SAM (377-378, 536-539, 549-550), nécessaire à la réaction de méthylation (Wang *et al.*, 2016). METTL3 possède également un site de liaison aux ARNs chargé positivement en position 465-478 ainsi qu'une capacité de liaison à l'ADN, en moindre mesure, via ses deux domaines à doigt de zinc, permettant l'adénosine méthylation de l'ADN (Qi *et al.*, 2022). METTL3 est à la fois retrouvée dans le noyau grâce à sa séquence d'adressage NLS en position 210-215, mais aussi dans le cytoplasme en interaction avec des ribosomes lors de la traduction des ARNm (Lin *et al.*, 2016a). Cette double localisation permet à METTL3 d'être à la fois recrutée pour la maturation des Pri-miRNAs mais aussi pour leur méthylation sous leurs formes mature dans le cytoplasme, qui a été décrite comme entraînant un changement structurel des miRNAs et une inhibition de leur recrutement dans le complexe RISC et leur adressage sur leurs ARNm cibles (Konno *et al.*, 2019; Briand *et al.*, 2020).

METTL3 fait partie du complexe appelé N6-méthyltransférase principalement composé de l'hétérodimère METTL3-METTL14 dans lequel METTL14 joue un rôle prédominant dans l'adressage de METTL3 sur ces cibles afin d'augmenter son activité méthyltransférase. METTL14 possède une homologie de séquence de 43% avec METTL3 mais son site actif n'est pas fonctionnel (Liu *et al.*, 2014). Le complexe N6-méthyltransférase peut également interagir avec les protéines WTAP, VIRMA, ZC3H13 et/ou RBM15/15b (mRNA-splicing protein) pour la méthylation des ARNm, mais ce type d'interaction n'a pas été décrite pour la méthylation des miRNAs (**Figure 20**). Cependant, la plus part des acteurs de ce complexe permettent le recrutement de METTL3-METT14 au niveau nucléaire (ZC3H13), sur les régions 3'UTR des ARNs (VIRMA) et des séquences spécifiques (RBM15/15b) : le complexe N6-méthyltransférase

est donc recruté via un ensemble de protéines que l'on peut caractériser de guides, bien que cela ne soit pas leur seul rôle dans le complexe (Han *et al.*, 2021). D'autres études montrent que la m6A des miRNAs est reconnue par des protéines capables de se lier aux ARNs (RNA binding protein) comme des membres de la famille HNRNP. Par exemple, HNRNPA2B1 qui intervient dans la maturation des miRNAs en permettant le recrutement de DGCR8 et la prise en charge par le microprocesseur (Alarcón *et al.*, 2015a), HNRNPC reconnaît le Pri-miRNA-21 possédant de la m6A et permet sa maturation en miRNA-21 (Park *et al.*, 2012). D'autres RNA binding protein sont impliquées dans le processus de déméthylation des ARNm ou miRNAs. Parmi ces protéines se trouve DDX3 qui participe à la fois à la déméthylation en position 6 des adénosines des ARNm en interagissant avec la déméthylase ALKBH5 et régule la déméthylation des miRNAs par son interaction avec les protéines AGO2 et ALKBH5 (Shah *et al.*, 2017). Une autre protéine est également connue pour jouer un rôle important dans la déméthylation des miRNAs : FTO (fat mass and obesity associated gene). Son KO entraîne une accumulation de miRNA contenant de la m6A, qui, en absence de KO, ne sont pas retrouvés comme méthylés (Berulava *et al.*, 2015). FTO contribue à la biogenèse et à la stabilité des miRNAs. Une diminution de son expression peut conduire à une accumulation de miRNAs inactivés par gain de méthylation (Berulava *et al.*, 2015).



Pour finir, le complexe METTL3-METTL14 semble également interagir avec des facteurs de transcription comme SMAD2/3. Ces interactions ont été mises en évidence par immunoprécipitations (IP) de METTL3 et METTL14 et confirmé également par reverse co-IP des protéines SMAD2/3 (Bertero *et al.*, 2018). Ces interactions avec SMAD2/3 permet le recrutement de METTL3/METTL14 sur un sous ensemble de transcrits reconnus par le TFBD (Transcription Factor Binding Site) de SMAD2/3. D'autres travaux datant de 2021 décrivent des interactions avec des facteurs de transcription tel que ZEB2 (Covelo-Molares *et al.*, 2021) avec comme hypothèse que cette interaction permettrait de promouvoir la m6A de certains transcrits comme pour SMAD2/3.

Le phénomène de recrutement de METTL3-METTL14 semblerait donc homologue au phénomène de méthylation de l'ADN dirigé par des facteurs de transcription existants pour la méthylation de l'ADN médiée par les DNMTs (**pages 15, 17**). Le phénomène de l'adénosine méthylation des ARNs et miRNAs semblerait donc régulé par un phénomène dit de transcription factor-directed (mi)RNA methylation.

2.3.2. DNMT3A et m5C

La découverte de DNMT3A comme méthylase des miRNAs date de 2020 et a été réalisée par Cherray et ses collaborateurs (Cheray *et al.*, 2020). Dans cette publication, les auteurs ont montré que le complexe DNMT3A-AGO4 est capable de méthyler les miRNAs. Ceci a été mis en évidence grâce à l'inhibition via des siRNAs de différentes 5-méthyltransférases de l'ADN et ARNs connus comme NSUN2 et DNMT2, qui étaient par alors décrites comme impliquées dans la m5C des ARNt (Tuorto *et al.*, 2012). Leurs résultats ont montré que l'inhibition de DNMT3A ou de la protéine argonaute AGO4 entraînent une diminution de la méthylation du miRNA-181a-5p sans modifier son niveau d'expression. Ils ont par ailleurs démontré l'interaction DNMT3A/AGO4 et l'implication du complexe dans la m5C des miRNAs par diverses expériences de Co-IP et reverse Co-IP, de proximity ligation assay (PLA) et de mesure d'incorporation de groupement méthyle radiomarqué sur des miRNA-181a-5p synthétiques après inhibition de DNMT3A et/ou AGO4. Ces résultats, bien qu'à première vue étonnants puisque DNMT3A a surtout été décrite dans les mécanismes de méthylation *de novo* de l'ADN, font finalement sens en considérant les différents mécanismes de recrutement des acteurs protéiques sur leur cibles mais également que DNMT2, qui fait partie de la grande

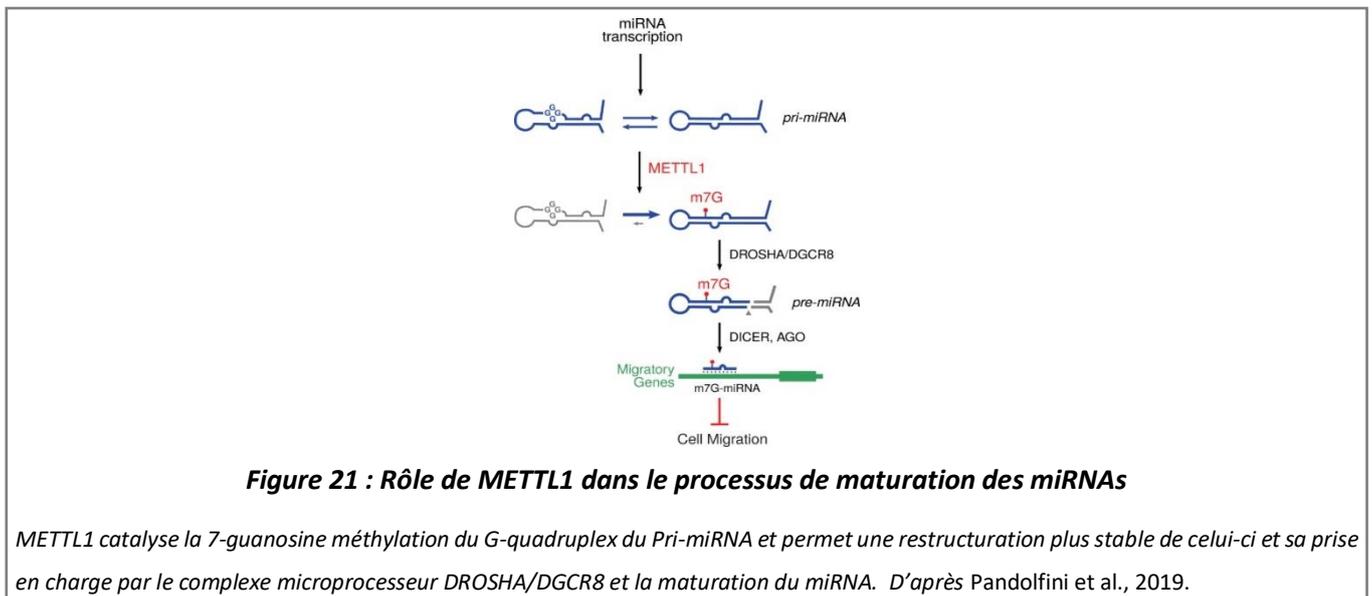
famille des DNA méthyltransférases, possède la capacité de méthyler les ARNs de transfert. L'absence de séquence NLS de DNMT3A lui permet d'être recrutée à la fois au niveau nucléaire mais aussi dans le cytoplasme, en fonction des protéines avec lesquelles elle va interagir (Kim *et al.*, 2002). Cette double localisation de DNMT3A renforce son rôle de candidat en tant que méthyltransférases des miRNAs. D'autre part, les protéines de la famille Argonaute sont décrites pour interagir avec les miRNAs et les ARNm et pour jouer un rôle dans l'adressage des miRNAs dans le complexe RISC : ceci conforte le phénomène dit de transcription factor-directed (mi)RNA methylation évoqué dans la sous partie précédente.

La suite des travaux de Cheray et ses collaborateurs ont montré que la m5C des miRNA-181a-5p, 193a-5p et 451a matures joue un rôle dans l'inhibition de la formation du complexe miRNA/mRNA, inhibant ainsi la fonction de ces miRNAs. Ce phénomène d'inhibition de la fonction des miRNAs mature via la m5C a également été décrit auparavant par Konno *et al* (Konno *et al.*, 2019).

2.3.3. METTL1 et m7G

La protéine METTL1 fait partie de la même grande famille que METTL3 (Wong and Eirin-Lopez, 2021). C'est une protéine de 276 acides aminés qui dispose de 3 régions de liaison à la molécule SAM (107-109, 140-141, 238-240, UniProtKB-Q9UBP6), une région méthyltransférase (156-200) ainsi qu'un site de phosphorylation en position 27 qui permet son inhibition par PKB et RSK (Cartlidge *et al.*, 2005). Initialement connue pour son rôle dans la méthylation des guanosines en position 7 sur les ARNt et ARNm, METTL1 a été récemment décrite comme méthylant les miRNAs par Pandolfini et son équipe (Pandolfini *et al.*, 2019). Cette m7G interne permet de modifier la structure G quadruplex des Pri-miRNAs riches en guanosine et d'initier sa prise en charge par le complexe microprocesseur (**Figure 21**). Pour le moment, peu de choses sont connues sur la m7G des miRNAs et les complexes qui y contribuent, les readers ou erasers. Seules des suppositions basées sur ce qui a déjà été décrit pour les autres types d'ARNs peuvent être faites. METTL1 interagit avec la protéine WRD4 qui est une sous unité non catalytique impliquée dans la m7G en position 46 des ARNt (UniProtKB-A0A8C8XRJ4) ainsi que sur des ARNm. Lin *et al.* et Bao *et al.* ont identifié des séquences consensus sur lesquels la m7G était enrichie dans différents types d'ARNs : RAGGU (R=A ou G) et UUCG (Bao *et al.*, 2018; Lin *et al.*, 2018). Il serait donc envisageable de regarder si ce type

de séquence est retrouvé dans les miRNAs pour confirmer par la suite l'implication du complexe METTL1-WRD4 dans la m7G des miRNAs.



L'ensemble des phénomènes épigénétiques et épitranscriptomiques contribuent donc à l'homéostasie de l'organisme. Cependant, nous avons vu que ces mécanismes sont finement régulés et très sensibles. La moindre dérégulation peut avoir des conséquences néfastes sur l'expression des gènes et entraîner un dérèglement de la machinerie cellulaire. C'est ce genre de dérèglements qui sont de plus en plus étudiés à l'heure actuelle dans les cancers car leur existence n'est plus à prouver. L'étude des mécanismes épigénétiques et épitranscriptomiques offrent de nouvelles potentialités dans le dépistage et la mise en place des traitements. C'est ce que nous allons étudier dans le chapitre suivant.

3. Epigénétique/épitranscriptomique et cancers

L'évocation du rôle de l'épigénétique dans le développement des cancers est apparue dans les années 1970 (Sherbert, 1970), mais c'est seulement à partir des années 2000 que le rôle de ces mécanismes a été de plus en plus étudié, avec le développement notamment des nouvelles technologies de séquençage haut débit. Concernant l'épitranscriptomique, l'identification de l'implication de ces mécanismes dans les cancers remonte aux alentours de 2010 avec les premières descriptions des modifications post-transcriptionnelles des ARNm et progressivement de la modification d'expression des enzymes qui les régulent (Tusup *et al.*,

2018). La première description des modifications épitranscriptomiques des miRNAs dans les cancers a été faite en 2019 par Konno et ses collaborateurs et sont de plus en plus étudiées à ce jour (Konno *et al.*, 2019).

3.1. Profil épigénétique et épitranscriptomique des cancers

Comme nous avons pu le voir dans les parties précédentes, les gènes exprimés sont souvent hypométhylés au niveau des CGI dans leurs régions promotrices et hyperméthylés dans le corps du gène et inversement pour les gènes non exprimés. Dans les cancers, l'ADN est globalement hypométhylé avec une hyperméthylation aberrante des CGI des promoteurs et premiers exons (Ando *et al.*, 2019). Cette modification du profil épigénétique peut faire penser à la reprogrammation qui a lieu durant le développement embryonnaire. Cette reprogrammation, qui pourrait être qualifiée de reprogrammation épigénétique cancéreuse, a pour finalité une ré-expression d'oncogènes avec une inhibition des gènes anti-tumoraux (Gaudet *et al.*, 2003). Elle entraîne également une instabilité du génome avec une réactivation possible d'éléments transposables qui peuvent se répliquer et s'intégrer à d'autres endroits dans le génome, provoquant ainsi des mutations ou des modifications d'expression de gènes (Daskalos *et al.*, 2009). L'hyperméthylation aberrante des CGI provoque une augmentation de la probabilité de mutations C>T (*cf* partie 1.2.1) pouvant contribuer à la carcinogenèse (Esteller *et al.*, 2001).

Cette reprogrammation épigénétique cancéreuse peut être causée par différents facteurs comme l'altération du métabolisme des cellules tumorales et du microenvironnement, qui modifie l'activité des DNMTs et autres enzymes impliquées dans les PTMs d'histones et donc le remodelage de la chromatine. C'est par exemple le cas dans les tumeurs hypoxiques où les réactions dépendantes d'oxygène seront inhibées (van den Beucken *et al.*, 2014). Des modifications de l'expression des enzymes épigénétiques, qui divergent selon le type de cancers, ainsi que des mutations dans leurs gènes, sont également retrouvées. C'est par exemple le cas dans certains carcinomes mammaires où DNMT1, 3A et 3B sont surexprimés, associé à un faible pronostic de survie dans le cas d'une forte surexpression de DNMT3A (Mirza *et al.*, 2013; Coronel-Hernández *et al.*, 2021). Dans d'autres cancers comme les GBM, des mutations dans le variant d'histone H3.3 sont retrouvées comme étant à l'origine, dans certains cas, de la pathologie pour les jeunes enfants (Bjerke *et al.*,

2013). De même, la mutation du gène IDH1/2 (isocitrate déhydrogénase 1/2) entraîne une réduction de l' α -KG en 2-hydroxyglutarate (2HG) et l'inhibition des protéines TETs et histones déméthylases, ce qui provoque indirectement l'hyperméthylation de l'ADN et le développement de GBM (Raineri and Mellor, 2018). Dans d'autres cas, la perte d'intégrité du complexe DNMT1-PCNA-UHRF1 conduit à une hypométhylation de l'ADN et à une instabilité génomique et l'expression d'oncogènes (Hervouet et al., 2010; Pacaud et al., 2014).

Par ailleurs, des modifications dans l'expression de miRNAs capables d'inhiber des acteurs épigénétiques ou épitranscriptomiques ont été décrites. Dans les revues de Karimzadeh et Papadimitriou, ce type de miRNAs est caractérisé d'épi-miRNAs et sont référencés par leurs cibles, les types de cancers dans lesquels ils sont impliqués et leur facteur de pronostic (**Figure 22**) (Karimzadeh *et al.*, 2021; Papadimitriou *et al.*, 2022). Dans certains cancers comme les leucémies aiguës myéloïdes, la surexpression du miRNA-29b inhibe la traduction de l'ARNm codant pour la protéine SP1 qui est impliquée dans la transcription du gène de DNMT1. Ceci entraîne l'hypométhylation du génome par défaut de méthylation de maintenance. Ce même miRNA est capable d'inhiber directement la traduction des protéines DNMT3A et DNMT3B par interaction avec la partie 3'UTR de leurs ARNm, réduisant également la méthylation *de novo* et contribuant à l'hypométhylation des cellules cancéreuses (Garzon *et al.*, 2009). Cet exemple de mécanisme démontre le rôle des miRNAs dans la régulation indirecte de la méthylation de l'ADN et des mécanismes épigénétiques.

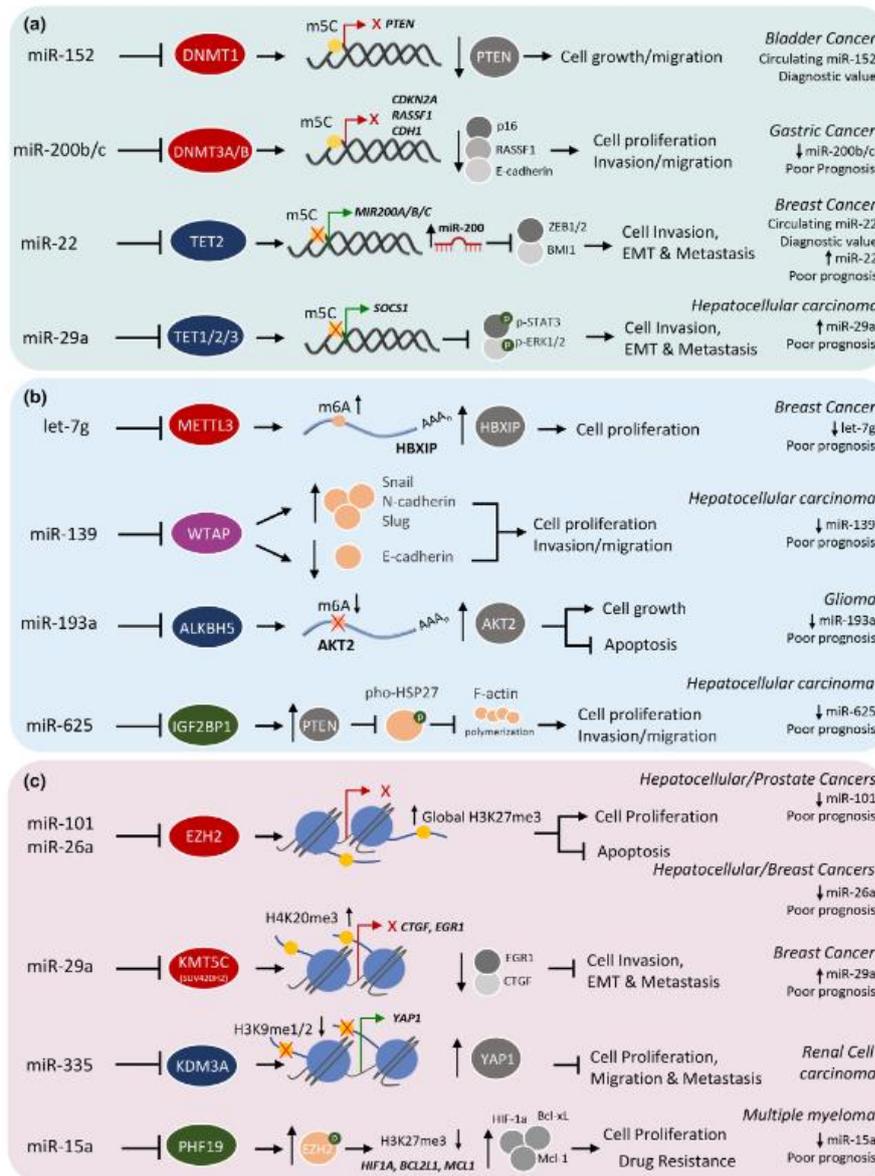


Figure 22 : Liste des principaux epi-miRNAs impliqués dans des cancers et le pronostic associé à leur niveau d'expression

Epi-miRNA ciblant des membres de la machinerie: a) de méthylation l'ADN, b) de méthylation des ARNs, c) des modifications d'histones. D'après Papadimitriou et al., 2022.

Les gènes codants pour les miRNAs subissent la même régulation épigénétique que les n'importe quel autre gène. Les miRNAs peuvent jouer des rôles pro-tumoraux (s'ils ciblent des ARNm codants pour des protéines anti-tumorales) ou anti-tumoraux (s'ils ciblent des ARNm codants pour des protéines pro-tumorales) et certains peuvent avoir un rôle bivalent, dépendant du contexte et du type cellulaire (Svoronos *et al.*, 2016).

Dans les cancers, l'ensemble des mécanismes qui régulent la biogenèse des miRNAs, de leur transcription à leur maturation, peuvent être dérégulés (**Figure 23**). Ainsi, des mutations ou hyperméthylations des promoteurs des gènes codants pour les miRNAs entraînent une diminution de l'expression des miRNAs en questions et la ré-expression des protéines dont ils inhibent la traduction (Calin et al., 2002; Hoareau-Aveilla and Meggetto, 2017). La modification d'expression des enzymes METTL3, METTL1, DNMT3A ou l'ensemble de leurs interactants peut modifier le niveau de méthylation des miRNAs à différentes étapes notamment au niveau de leur biogenèse. Si METTL3 est sous exprimée, leur biogenèse diminue. Inversement, si METTL3 est surexprimée, leur biogenèse est augmentée (Alarcón et al., 2015b). Sur les miRNAs matures, les études récentes ont montrées que la présence de méthylations (m6A ou m5C) était capable d'inhiber la prise en charge des miRNAs dans le complexe RISC et leur adressage au niveau de leur cible (Konno et al., 2019; Cheray et al., 2020; Briand et al., 2020) et donc conduire à l'absence de répression de leurs cibles (*i.e* l'inactivation des miRNAs). Ainsi, la modification d'expression des enzymes épitranscriptomiques peut altérer la méthylation des miRNAs et permettre le silencing de miRNAs anti-tumoraux et l'activation de miRNAs pro-tumoraux par défaut de méthylation, comme illustré sur la **Figure 23**. Les enzymes épitranscriptomiques n'ayant pas uniquement pour cible les miRNAs, leur variation d'expression impacte également les différents processus dans lesquels elles sont impliquées au niveau des autres types d'ARNs. Par exemple, METTL3 est surexprimée dans les adénocarcinomes pulmonaires et son KD (knock down) réduit la traduction des ARNm et entraîne un arrêt de la croissance cellulaire, diminue leur invasivité et conduit à l'apoptose des cellules (Lin et al., 2016b).

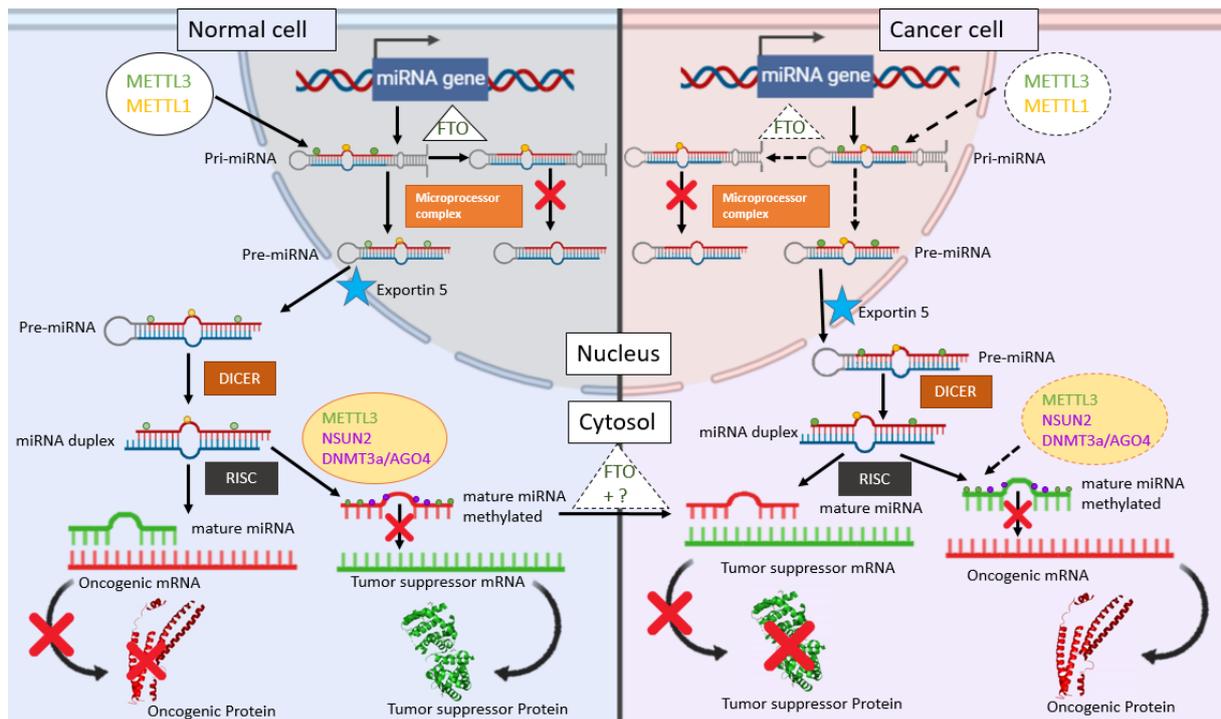


Figure 23: Comparaison de la régulation épitranscriptomique de la biogenèse et de l'activité des miRNAs entre une cellule tumorale et non tumorale

Dans les cellules cancéreuses, la différence d'expression des acteurs épitranscriptomiques peut modifier l'efficacité de biogenèse des miRNAs, tout comme leur régulation post-transcriptionnelle. Les miRNAs oncogènes sont retrouvés surexprimés et déméthylés au détriment des miRNAs anti-tumoraux qui sont méthylés et donc inactifs. Ainsi, les ARNm codants pour des protéines antitumorales sont réprimés et ceux codants pour des protéines oncogéniques sont traduits : la balance s'inverse en comparaison avec une cellule normale. Les pointillés signifient un changement d'expression des protéines, qui peut être soit augmentée soit diminuée selon le cancer. La modification d'expression des déméthylases comme FTO peut également modifier l'expression et la méthylation des miRNAs et participer aux processus de tumorigenèse. Adapté à partir de (Duforestel et al., 2021).

3.2. Marqueurs prédictifs de l'évolution d'un cancer ou d'une réponse à un traitement

L'un des principaux enjeux de la médecine moderne est de pouvoir dépister de manière précoce les cancers pour pouvoir anticiper leur progression et les prendre en charge rapidement. Plus un cancer est pris en charge tôt et plus les chances de guérisons sont grandes (Crosby *et al.*, 2020). C'est pourquoi, l'identification de biomarqueurs prédictifs des cancers mais également de la réponse aux traitements est devenu crucial. Ces biomarqueurs doivent pouvoir être analysables facilement à partir d'examen cliniques les moins invasifs possible. A l'heure actuelle, de nombreux examens moléculaires sont réalisés une fois que le cancer est développé. Ces analyses de marqueurs moléculaires sont faites à partir de biopsie de la tumeur si cela est possible, et permettront ensuite de déterminer le choix du traitement. Ce

type de biopsies étant invasif, notamment pour certains cancers comme les GBM où il est difficile d'obtenir un fragment de la tumeur. Les recherches se tournent de plus en plus vers l'identification de nouveaux biomarqueurs plus facilement analysables, retrouvés dans les urines, la salive ou le sang par exemple. Dans le sang, on retrouve de l'ADN, sous forme de fragments dégradés, les ARNs et notamment les miRNAs ou encore des vésicules extracellulaires, sécrétées par les cellules et enrichies en miRNAs. Les patients atteints de cancers ont un niveau d'ADN circulant librement dans le sang (cfcDNA) plus élevé que des personnes saines. Ceci s'explique par la prolifération plus rapide de ces cellules, qui entraîne une plus forte libération de cfcDNA liée à leur apoptose ou nécrose, mais aussi par des mécanismes actifs de sécrétion cellulaire, en raison d'instabilité génomique (Sozzi *et al.*, 2003; Bronkhorst *et al.*, 2019). L'une des premières études de détection de gènes mutés dans le cfcDNA a été réalisée par Sorenson et ses collaborateurs en 1994 où ils ont mis en évidence la mutation de *K-ras* comme marqueur présumé hautement spécifique de tumeurs précoces ou de multiples tumeurs malignes (Sorenson *et al.*, 1994). Ces résultats avant-gardistes apportent une preuve de concept de la possibilité d'utiliser des biopsies liquides pour réaliser des dépistages de cancers, du suivi de la pathologie et de l'efficacité des traitements utilisés. Ainsi, cette nouvelle voie de dépistage par biopsie liquide est très étudiée. Une étude de séquençage NGS (next-generation sequencing) de 60 tissus tumoraux et 31 plasmas issus de 17 patientes atteintes de cancer du sein métastatique, a montré une correspondance de 76% entre les mutations retrouvées dans les tissus et dans le cfcDNA contenu dans le plasma de ces patientes, ce qui démontre l'enrichissement de cfcDNA d'origine tumoral dans le plasma. La conclusion de cette étude est que le plasma peut être utilisé prospectivement comme alternative aux biopsies métastatiques, et donc un réel potentiel des biopsies liquides pour le dépistage des cancers (Rothé *et al.*, 2014).

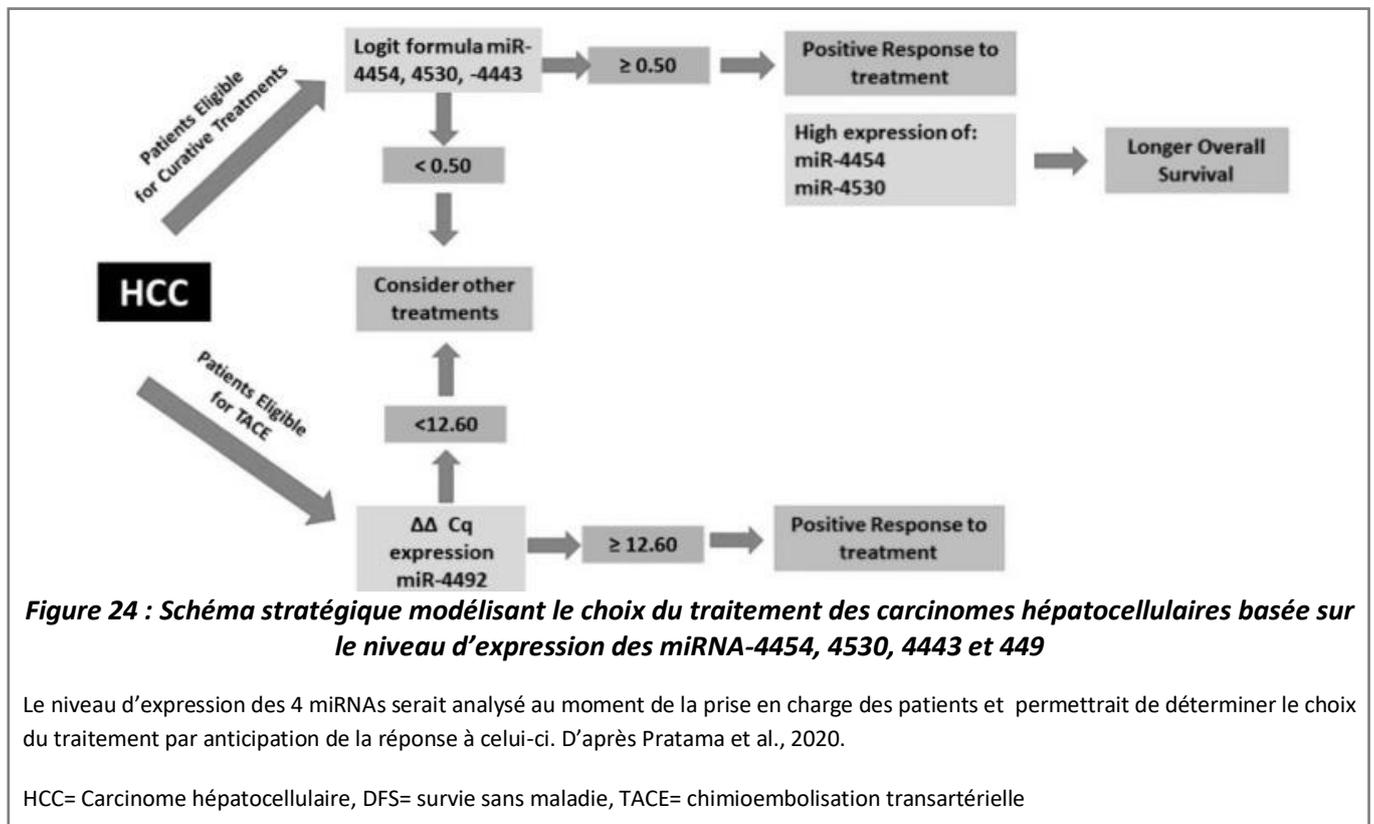
Les marques épigénétiques sont propres à chaque type cellulaire. Les tumeurs possèdent donc à la fois les marques du tissu dont elles proviennent mais également de nouvelles marques acquises durant le processus tumoral. Le cfcDNA provenant de cellules tumorales possède donc des modifications épigénétiques liées au type de tissu dont il provient, mais également des marques de méthylation spécifique des tumeurs. L'étude du cfcDNA et des marques épigénétiques qu'il contient permettrait donc de dépister des cancers et de connaître l'origine de ceux-ci, avant même qu'ils ne se déclarent (Guo *et al.*, 2017). La

détection de méthylation dans le cfcdNA est possible par les techniques classiques d'analyse de la méthylation de l'ADN comme le séquençage bisulfite qui peut être utilisé pour séquencer les profils de méthylation du génome entier, ou, plus applicable à du dépistage clinique : de la qMSRE (Methylation Sensitive Restriction Enzyme couplée à de la qPCR : quantitative Polymerase Chain Reaction) qui est utilisable si le marqueur est déjà identifié, avec des concentrations relativement faibles d'ADN.

Les miRNAs peuvent également constituer une nouvelle catégorie de biomarqueurs circulants prometteurs, de par leurs fonctions pro ou anti-tumorale et leur expression tissus spécifique. Leur niveau d'expression pouvant varier selon le type de pathologies, celle-ci peut également être analysée dans le plasma des patients (Bai *et al.*, 2017). La détection de perte ou gain d'expression de miRNAs dans certains cancers constitue déjà des marqueurs de bon ou mauvais pronostic. C'est par exemple le cas dans l'étude de Bai et ses collaborateurs qui se sont intéressés aux signatures des miRNAs plasmatiques et tissulaires dans le pronostic et le développement de cancers du poumon. Ils ont identifiés que les patients qui présentent une augmentation d'expression du miRNA-19a plasmatique après opération ont un risque plus important de développer une métastase que ceux qui ont une quantité plasmatique du miRNA-19a plus faible.

Une autre étude clinique de 2020 démontre l'utilité du suivie de l'expression de miRNA circulants dans le sérum de patients atteints de carcinomes hépatocellulaires dans la prédiction de réponse aux traitements : la surexpression des miRNA-4454 et 4530 et la sous expression du miRNA-4443 sont prédictifs d'une réponse complète au traitement de résection de la tumeur suivie de radiothérapie. La surexpression des miRNA-4454 et 4530 est également associée à une durée de vie plus longue. Dans la même étude, la sur-expression du miRNA-4492 avant traitement par chimioembolisation transartérielle est un marqueur prédictif de réponse complète au traitement. Les autres cas de figure d'expression de ces miRNAs avant traitement sont associés avec une réponse partielle ou une faible réponse au traitement (Pratama *et al.*, 2020). Ainsi, cette étude met en évidence qu'initialement, tous les patients ne sont pas aptes à répondre à un même traitement, c'est pourquoi il est nécessaire et urgent de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques personnalisées, comme Pratma et ses

collaborateurs le propose à la fin de leur étude, basées sur le niveau d'expression des miRNAs identifiés (**Figure 24**).



Récemment, Konno et son équipe ont mis en évidence la possibilité d'analyser l'adénosine méthylation des miRNAs plasmatiques et que ce niveau de méthylation, ici, du miRNA-17-5p, pouvait être un marqueur précoce dans le dépistage des cancers gastro-intestinaux, marqueur plus efficace que ceux actuellement utilisés. Cette étude démontre à la fois l'importance du niveau d'expression des miRNAs mais également leur niveau de méthylation dans leur usage comme biomarqueurs dans les cancers (Konno *et al.*, 2019). De même, dans la revue de Papadimitriou et la **Figure 22**, il est maintenant connu que le niveau d'expression de certains miRNAs dans les cancers est associé avec un mauvais pronostic.

Dans ce sens, les travaux de Cheray et ses collaborateurs en 2020 démontrent que le niveau d'expression et de m5C du miRNA-181a-5p joue comme facteur pronostic pour les patients atteint de GBM. En effet, le miRNA-181a-5p est décrit comme suppresseur de tumeur dans cette étude et, sous sa forme méthylée, cette fonction de suppresseur de tumeur est inhibée. L'analyse de 48 biopsies de patients atteints de GBM ont permis de les classer selon

deux groupes en fonction de leur niveau d'expression du miRNA-181a-5p et le niveau de méthylation de celui-ci. Le groupe présentant le pronostic le plus favorable (i.e la durée de vie la plus longue) correspond à celui qui a une forte expression du miRNA-181a-5p non méthylé et donc fonctionnel. L'autre groupe qui l'exprime sous forme méthylée ou faiblement sous forme déméthylée, présente un mauvais pronostic de survie (le miRNA est inactif dans le premier cas de figure et certainement trop faiblement exprimé dans le deuxième cas pour remplir son rôle anti-tumoral à 100%) (Cheray *et al.*, 2020).

Ainsi, l'identification de biomarqueurs circulants reposant sur le niveau de méthylation des cfcdNA, d'expression et/ou de méthylation des miRNAs circulants, constituent de nouvelles pistes prometteuses pour le dépistage précoce des cancers, l'orientation des stratégies thérapeutiques mais également la prédiction de réponse aux traitements, du suivie de l'évolution des cancers et de la survie des patients. Les modifications épigénétiques étant temporalisées, il est également envisageable de suivre le niveau de méthylation de ces biomarqueurs au cours du temps pour adapter les traitements dans le temps et de mettre en place de nouvelles thérapies personnalisées et temporalisées.

3.3. Cibles thérapeutiques et épidrogues

Les épidrogues sont des molécules qui ciblent et inhibent différents acteurs épigénétiques. Elles sont capables de « reprogrammer » l'épigénome des cellules et de réinduire l'expression de gènes anti-tumoraux. Ces épidrogues doivent être utilisées en combinaison avec des drogues cytotoxiques ou cytostatiques et permettent de restaurer leur action via les nouveaux gènes exprimés. L'hypothèse étant la suivante : l'inhibition des acteurs épigénétiques permettrait d'inhiber la reprogrammation épigénétique cancéreuse et l'expression d'oncogènes et des voies de signalisations associées. Ainsi, inhiber les acteurs épigénétiques reviendrait à inhiber la progression du développement des cancers et de ré-exprimer des gènes suppresseurs de tumeurs qui sont inhibés épigénétiquement.

Les thérapies dirigées contre des acteurs épigénétiques ou épitranscriptomiques sont appelées épidrogues (dérivé de l'anglais « epidrugs »). Tout un panel d'épidrogues ciblant les DNMTs, les enzymes TETs, HDACs, HDMTs ou acteurs épigénétiques comme les BETs ont été développés dans ce sens. Certaines de ces molécules sont approuvées par l'agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé (ANSM) ou la FDA (U.S Food and Drug

Administration). La première génération d'épidrogues a été développée sous forme d'analogues de cytosines. La decitabine, un déoxiribonucléotide, est incorporé au niveau de l'ADN. A haute dose, la decitabine inhibe la synthèse de l'ADN et a un effet cytotoxique. A plus faible dose, la decitabine entraîne une diminution de la méthylation de l'ADN en inhibant les DNMTs. L'azacytidine est un ribonucléotide qui est intégré dans les ARNs à 80/90% et provoque un assemblage anormal des ribosomes et inhibe la synthèse protéique. Dans 10 à 20% des cas, l'azacytidine est transformée en 5-aza-2'-deoxycytidine par une ribonucleotide reductase et est incorporé dans l'ADN. Ceci entraîne l'inhibition des DNMT. Le but de ces DNMTi était de restaurer le profil de méthylation de cellules non tumorales pour permettre la réexpression des gènes anti-tumoraux dans les cellules cancéreuses. Cependant, ce type de drogues manque de spécificité et inhibe l'ensemble des méthyltransférases de l'ADN, qui ont une grande similarité de substrat (Ma and Ge, 2021). Ce manque de spécificité dans cette génération d'épidrogues a entraîné des résultats décevants avec un faible taux de réponse et de nombreux effets négatifs provoqué par l'hypométhylation du génome provoquant la réexpression de gènes protecteurs de tumeurs mais également d'oncogènes. Par exemple dans une étude de phase III de traitement de syndromes myélodysplasiques par la decitabine, sur 170 patients, seuls 17% présentent un taux de réponse global élevé et 13% ont une amélioration hématologique, ce qui indique que la majorité des patients n'ont pas répondu au traitement (Kantarjian *et al.*, 2006). Utilisé dans des leucémies aigües myéloïdes, la durée de vie des patients est augmentée de seulement 2.7 mois en comparaison avec le traitement standard par Cytarabine et de nombreux effets secondaires sont observés chez les patients (fièvre, anémie, pneumonie) (European Medicines Agency EMA/344257/2016 EMEA/H/C/002221). Le problème étant le manque de spécificité de ces inhibiteurs pour leur cible moléculaire mais aussi pour les cellules tumorales en particulier, ce qui peut entraîner des modifications de profil épigénétique d'autres types cellulaires. L'identification de biomarqueurs associés à une bonne réponse provoquée par ce type de traitement semble difficile car l'expression de nombreux gènes sont modifiés par ces DNMTi. Malgré tout, ces inhibiteurs ont été approuvés dans ces pathologies à défaut de mieux. Ils apportent une preuve de concept que cibler les acteurs responsables du remodelage de la chromatine permet la ré-expression de gènes suppresseurs de tumeurs bien que les générations actuelles ne permettent pas de cibler spécifiquement les gènes ré-exprimés.

D'autres inhibiteurs sont très étudiés, comme les inhibiteurs d'HDACs et de BRD4, car ces protéines sont surexprimées dans de nombreux cancers comme les cancers intestinaux, hémopathies malignes, cancers du sein, lymphomes pour les HDACs, cancers du sein, des ovaires, GBM ou leucémie aigüe myéloïde pour BRD4.

Les inhibiteurs d'HDACs montrent une grande efficacité en combinaison avec les traitements de chimiothérapies et permettent de réduire la toxicité de ces traitements (réduction des doses utilisées pour une meilleure réponse) ainsi qu'inhiber certaines résistances en empêchant la reprogrammation épigénétique cancéreuse. Il existe différents inhibiteurs d'HDACs, certains capables de cibler l'ensemble des HDACs appelés pan-HDACs (sauf les sirtuines) et d'autres plus spécifiques. La combinaison de ces inhibiteurs avec des inhibiteurs du protéasome, de tyrosines kinases, d'agents alkylants, de radiothérapie ou d'immunothérapies a montré des effets antitumoraux synergiques dans de nombreux cancers, dans des essais précliniques et cliniques (Hontecillas-Prieto et al., 2020).

Le premier inhibiteur de protéines de la famille des BETs est le JQ1. Le JQ1 entre en compétition avec les histones acétylées au niveau du site de reconnaissance des protéines BETs. L'interaction JQ1-BETs empêche l'interaction avec la chromatine et entraîne la séquestration des BETs. Parmi l'ensemble des protéines à bromodomaines, le JQ1 possède une affinité plus importante pour BRD4, qui est impliqué dans de nombreux cancers. L'inhibition de BRD4 dans différents modèles de cancer du sein, de médulloblastome, cancer du poumon ou de leucémie aigüe myéloïde, a démontré un effet anti-tumoral avec une inhibition de la prolifération cellulaire, la réduction de l'expression d'oncogènes comme *MYC* ou *E2F1*, et l'induction de la différenciation cellulaire (Bandopadhyay et al., 2014). D'autres inhibiteurs ont par la suite été développés, basés sur la formule du JQ1, pour permettre un usage clinique, car le JQ1 possède une faible biodistribution et pharmacocinétique (Shorstova et al., 2021). L'OTX015 est un inhibiteur des protéines de la famille des BETs qui a été optimisé pour être utilisé en clinique. Plusieurs essais cliniques de phase II ont été menés dans différents types de cancers (cancers de la prostate résistants avec castration, GBM, cancer du sein triple négatifs), pour définir et optimiser les doses de traitement et les doses maximums tolérées, mais deux études sur trois ont été terminées à cause d'une efficacité limitée de l'OTX015 (Nguyen et al., 2020). Comme la plupart des épigénétiques, *in vitro*, des effets prometteurs ont pourtant été observés, comme dans le traitement de l'ostéoporose où l'inhibition de BRD4 permet de supprimer la différenciation cellulaire des ostéoclastes et

d'augmenter l'ostéoblastogenèse *in vitro* ainsi que l'activité de minéralisation des ostéoblastes (Baud'huin et al., 2017). Mais également en combinaison avec d'autres traitements, comme par exemple dans le cancer du sein triple négatif avec le Palbociclib (Ge et al., 2020).

La littérature s'accorde sur le fait que les épidrogues représentent des thérapies prometteuses capables de restaurer la réponse à des traitements ou de re-sensibiliser les cellules à la mort, mais que les recherches actuelles doivent s'orienter sur des marqueurs prédictifs de réponse à ce types de thérapies pour maximiser les chances de réponses des patients et améliorer la spécificité de ces molécules (Cossío *et al.*, 2020). Celles-ci montrent également des effets plus importants en combinaison avec d'autres traitements que seules.

Les nouvelles générations d'épidrogues développées sont plus spécifiques : se basant sur l'étude précise des mécanismes de méthylation de l'ADN gène-spécifique, c'est-à-dire sur les complexes impliqués dans le recrutement des DNMTs au niveau de sites spécifiques associés à des gènes d'intérêts (anti-tumoraux) afin de développer des épidrogues dirigées contre ces complexes particuliers et inhiber la méthylation de ces gènes pour permettre leur réexpression. Certaines épidrogues en cours de développement sont basées sur l'étude des partenaires d'interaction des acteurs épigénétiques et leurs partenaires d'interactions, à la différence des générations précédentes qui inhibent l'activité catalytique mais de manière non spécifique, sans savoir quel complexe est responsable de la méthylation de quel gène. Cette nouvelle génération d'épidrogues sont appelées EXD (Epigenetic player/protein-X-disruptor) (Cartron *et al.*, 2020). L'idée derrière ces EXD est d'inhiber les complexes de méthylation spécifiquement retrouvés dans les cellules cancéreuses, impliquant des facteurs de transcriptions qui guident méthyltransférase sur de nouvelles cibles. Ceci permettrait d'inhiber uniquement les méthylations aberrantes retrouvées dans les cellules cancéreuses. Certaines de ces inhibitions sélectives sont capables de restaurer la réponse à un traitement dans des contextes de résistance comme par exemple via l'inhibition du complexe DNMT1/CFP1 permet d'augmenter la sensibilité de cellules de GBM aux effets du témozolomide, l'agent de chimiothérapie utilisé dans ce contexte (Cheray et al., 2014). Des résultats similaires ont été obtenus en inhibant le complexe DNMT1/ISGF3 γ dans ce même modèle (Cheray et al., 2016). L'inhibition du complexe STAT3-DNMT1 dans des cellules de

cancer du sein triple négatif entraîne l'arrêt de la prolifération des cellules et la réexpression de gènes anti-tumoraux comme VHL et PDLIM4 (Kang et al., 2015).

L'idée portée par ces nouvelles épiprodrogues serait d'identifier des complexes spécifiques formés uniquement ou favorablement dans les cellules tumorales, ainsi, ces inhibiteurs n'auraient pas d'effets dans des cellules non tumorales. Ils inhiberaient la formation des complexes responsables, soit de la méthylation des gènes anti-tumoraux, soit des complexes de déméthylation de l'ADN/acétylation des histones impliqués dans la transcription des oncogènes, ou bien, au niveau épitranscriptomique, en inhibant les complexes responsables de la méthylation de miRNAs anti-tumoraux. Ainsi, afin de limiter la non réponse des patients aux traitements, leur éligibilité à ces traitements serait déterminé par la détection de biomarqueurs circulants préalablement identifiés.

Une autre catégorie d'épiprodrogue est basée sur l'administration de miRNAs anti-tumoraux synthétiques. En effet, comme la dérégulation de l'expression et de la méthylation des miRNAs dans les cancers est associée avec la progression tumorale et la résistance aux traitements, l'introduction de miRNAs sous exprimés dans ces cellules ou des miRNAs antagonistes de miRNAs pro-tumoraux, peut conduire à la re-sensibilisation des cellules au traitement initial (Garofalo and Croce, 2013). Cependant, l'utilisation des miRNAs en clinique est encore compliquée, avec plusieurs limites comme des doses administrables relativement faible en raison d'une activation du système immunitaire, doses auxquelles les effets thérapeutiques ne sont pas ou très peu observables. Les miRNAs thérapeutiques manquent également de stabilité et leur administration ciblée à la tumeur est encore difficile, sans parler des effets off-targets qui restent à être optimiser (Bartoszewski and Sikorski, 2019; Caffrey *et al.*, 2011). C'est pourquoi Briand et ses collaborateurs se sont intéressés à l'administration d'une forme méthylée du miRNA-200b-3p, et donc inactivée, comme pro-droque dans des cellules de GBM. En effet, leur étude se base sur le fait que les cellules de GBM sont capables de déméthyliser le miRNA et de le rendre actif grâce à l'expression de la déméthylase FTO et l'absence de mutation d'IDH1 qui, sous sa forme mutée, diminue la concentration d' α KG qui est nécessaire à la déméthylation médiée par FTO. Le miRNA-200b-3p ainsi déméthylé conduit à l'inhibition de l'ARNm codant pour une protéine anti-apoptotique (XIAP) et à restaurer la mort de ces cellules. Cette forme méthylée du miRNA-200b-3p n'est pas modifiée dans les autres types cellulaires. Ici, la mutation IDH1 peut être utilisée comme marqueur négatif de

l'éligibilité au traitement par le miRNA-200b-3p méthylé (Briand *et al.*, 2020). La présence de modifications telles que la méthylation permet également d'augmenter la stabilité du miRNA et le protéger des dégradations.

Après avoir décrit le rôle des reprogrammations épigénétiques et épitranscriptomiques dans les cancers, leur potentiel en tant que nouveaux biomarqueurs et cibles thérapeutiques, nous allons caractériser plus en détails les cancers du sein, qui est le sujet d'étude principal de cette thèse. Le chapitre suivant détaillera principalement le sous type de cancer du sein hormono-dépendant, ses traitements et les stratégies utilisées en cas d'échec thérapeutique.

4. Les cancers du sein

4.1. Généralités

Le cancer du sein représente la première forme de cancer chez la femme avec 29,2% de l'ensemble des cancers en 2018 dans l'Union Européenne, soit environ 400 000 nouveaux par an (Dafni *et al.*, 2019). Il représente également la première cause de mortalité féminine par cancer, soit 16,2% des décès cette même année en Europe. Malgré cela, le taux de mortalité par cancer du sein est en diminution depuis plusieurs années, du fait des avancées thérapeutiques et des pratiques de dépistage.

Comme pour la plupart des cancers, des facteurs de risques ont été identifiés et sont recensés sur le site de l'INCA (INCA, n.d.):

- Ceux liés à l'âge : dans 80% des cas de cancers du sein, ceux-ci apparaissent après 50 ans.
- Ceux liés au mode de vie : comme l'alimentation, la consommation d'alcool et de tabac, le manque d'activité physique et le surpoids peuvent augmenter les risques de développer un cancer du sein.
- Le sexe : 99% des cancers du sein touchent les femmes.

Des prédispositions génétiques ont également été identifiées. Celles-ci peuvent être transmises, et sont principalement retrouvées dans les cancers familiaux, comme les mutations dans les gènes *BRCA1* et *2* (Breast Cancer 1 et 2) qui sont impliqués dans la réparation des dommages à l'ADN et la recombinaison homologue (*BRCA2*). Cependant, ce type de mutation n'est retrouvée que dans 0.2% de la population en moyenne avec des

variations jusqu'à 2.5% dans certaines ethnies (Janavičius, 2010). D'autres mutations constitutionnelles augmentent le risque de cancers du sein comme les mutations *ATM*, *PALB2*, *TP53*, *CHEK2*, *PTEN*, *CDH1*, *STK11*. Cependant, même si ces mutations prédisposent aux cancers du sein, elles ne sont souvent pas suffisantes pour provoquer la pathologie. C'est l'accumulation d'autres mutations ou l'exposition à des facteurs environnementaux qui peuvent entraîner le développement du cancer (Rudolph et al., 2016; Duforestel et al., 2019).

Classiquement, les cancers du sein sont classés selon trois catégories. Cette classification est basée sur l'expression des récepteurs aux hormones (œstrogènes et/ou progestérone) et l'expression de la protéine HER2 (human epidermal growth factor receptor 2). Ces différentes catégories sont : les cancers du sein dit triple négatifs qui n'expriment aucun de ces 3 récepteurs et constituent la forme la plus agressive de cancers du sein. Les cancers du sein dit HER2 positifs qui surexpriment la protéine HER2 et leur prolifération est dépendante de cette voie de signalisation. Dans cette catégorie, les récepteurs hormonaux (RH) peuvent être soit exprimés ou non. La dernière catégorie correspond aux cancers du sein dit hormonaux dépendants. Ces tumeurs expriment les récepteurs aux hormones œstrogènes et/ou progestérone et sont dépendants de ces voies de signalisation. Ce sous-type de cancer du sein représente la forme majoritaire de cancer du sein (**Tableau 3**) avec environ 43 290 nouveaux cas par an en France en 2018 d'après les données de l'INCA et Mesa-Eguiagaray *et al* (INCA, 2022; Mesa-Eguiagaray et al., 2020).

Sous-type	RH+/HER2-	RH-/HER2-	RH+/HER2+ RH-/HER2+
Prévalence	74%	11%	15%

Tableau 3 : Prévalence des sous types moléculaires des cancers du sein dans la population d'Ecosse entre 2009 et 2016, d'après Mesa-Eguiagaray et al., 2020

4.2. Prise en charge des cancers du sein RH+/HER2- localisés

Il existe différents traitements des cancers du sein hormonaux dépendants. Ils sont choisis en fonction de l'extension de la maladie au diagnostic.

La chirurgie est réalisée soit sous la forme d'une tumorectomie qui consiste au retrait de la masse ou d'une mastectomie qui correspond à l'ablation de l'ensemble de la glande mammaire. Cette chirurgie peut s'accompagner également de traitements complémentaires comme la chimiothérapie ou une hormonothérapie adjuvante pour prévenir d'une éventuelle rechute. Il est également possible de réaliser une radiothérapie après la chirurgie au niveau de la glande mammaire restante ou des aires ganglionnaire. L'hormonothérapie est l'un des traitements spécifique des cancers du sein hormonaux dépendant. Cette approche thérapeutique consiste à inhiber les différentes voies de production ou de réponse des cellules aux œstrogènes et à la progestérone. Ces traitements vont dépendre du statut ménopausique de la patiente. Si la patiente n'est pas ménopausée, il lui sera prescrit des modulateurs sélectifs des récepteurs aux œstrogènes comme le tamoxifène et ou des analogues de l'hormone LHRH (lutéinostimuline) qui vont hyper-stimuler l'hypophyse qui ne va plus répondre et stopper la sécrétion de LH (hormone lutéinisante), la stimulation ovarienne et *in fine*, la production d'œstrogènes. Ceci induit une ménopause précoce à visée thérapeutique chez la patiente. Pour les femmes ménopausées, des inhibiteurs de l'aromatase seront prescrits comme le létrozole. L'aromatase est une enzyme qui permet la conversion périphérique des hormones androgènes en œstrogènes, son inhibition permet la diminution du niveau d'œstrogènes (ARC, 2021).

4.3. Cancer du sein métastatique RH+/HER2-

4.3.1. Généralités

Les métastases correspondent à un ensemble de cellules cancéreuses qui se sont détachées de la tumeur primitive et qui ont migré par les vaisseaux lymphatiques ou sanguins à distance de l'organe initial. Dans les cancers du sein, les localisations métastatiques les plus fréquentes sont les poumons, le foie, les os ou le cerveau (Institut national du cancer, n.d.). Celles-ci peuvent avoir des marqueurs différents de la tumeur initiale. Ceci est provoqué par l'accumulation de mutations supplémentaires. Le pronostique des cancers métastatiques est souvent sombre avec l'absence de projet curatif. Les métastases sont plus agressives et invasives que les tumeurs primaires et appariassent principalement à la suite d'échecs thérapeutiques, ce qui complique leur traitement.

La maladie métastatique peut survenir dès le diagnostic (cancer métastatique *de novo*) ou dans le cadre d'une rechute d'un cancer préalablement traité à un stade localisé. On estime à 20% le nombre de patientes développant des métastases chaque année (ARC, 2020).

4.3.2. Arsenal thérapeutique

Le choix du traitement dans le contexte métastatique dépend de l'histoire de la maladie de la patiente et de son état général. Le traitement anti hormonal est souvent le traitement de première intention sauf en cas de crise viscérale où la chimiothérapie est préférée. Si la patiente est ménopausée, le traitement sera un inhibiteur de l'aromatase ou du fulvestrant, molécule qui entraîne la dégradation des récepteurs aux œstrogènes $Er\alpha$, et sera poursuivi jusqu'à progression. Si la patiente n'est pas ménopausée, une ménopause est souvent réalisée par voie chimique ou chirurgicale et ensuite, la patiente sera traitée comme une patiente ménopausée.

Si la patiente a développé une maladie métastatique en cours d'hormonothérapie adjuvante, le choix du nouveau traitement anti hormonal exclura celui qui était en cours au moment de la rechute (Cancer.Net, 2021).

Depuis quelques années, des thérapies ciblées ont été développées en association avec l'hormonothérapie. Celles-ci sont basées sur l'existence de mutations/surexpression de gènes dans la tumeur, qui peuvent faire l'objet d'un ciblage thérapeutique. En effet, il a été retrouvé chez les patientes une activation de la voie PI3K/Akt/mTOR avec des mutations dans le gène *PIK3CA* retrouvées chez ~40% des patientes (Ellis and Perou, 2013). Ces mutations gain de fonction dans la sous-unité catalytique de PI3K entraînent une activation constitutive de celle-ci. Son inhibition permet de restaurer l'apoptose des cellules dans les cancers du sein RH+/HER2- *PIK3CA* muté, notamment en association avec une privation d'œstrogènes (Sanchez et al., 2011). D'autres inhibiteurs de cette voie de signalisation ont été développés comme l'everolimus, un inhibiteur de mTOR approuvé par la FDA en 2012 en combinaison avec un inhibiteur d'aromatase. Dans un essai clinique randomisé de phase II, la combinaison tamoxifen/everolimus permet d'augmenter la durée de survie sans progression de 4,1 mois en comparaison avec un traitement tamoxifen seul (8,6 mois de durée de vie sans progression contre 4,5 mois) avec une diminution du risque de décès de 55% (Bachelot et al., 2012).

La classe thérapeutique la plus récente est celle des inhibiteurs du complexe CyclinD-CDK4/6 (cyclin dépendant kinase) Ce complexe est impliqué dans la progression du cycle cellulaire et la transition G1-S avec la phosphorylation (et l'inactivation) de la protéine RB (protéine du rétinoblastome) qui permet la libération du facteur de transcription E2F, la transcription des cyclines E et CDK2 qui phosphorylent de nouveau la protéine RB et permettent la synthèse de l'ADN et donc la progression dans le cycle cellulaire (**Figure 25**).

Le niveau d'expression de la Cyclin D est augmenté dans les cancers du sein RH+ notamment par amplification du gène codant pour la Cycline D. La voie de signalisation associée au récepteur aux œstrogènes entraîne une augmentation de la transcription des ARNm codants pour la cycline D1 et donc la surexpression de la cycline. Celle-ci est surexprimée d'environ 50% dans les cancers du sein RH+/HER2- et participe aux mécanismes de résistances à l'hormonothérapie, ce qui en fait une cible thérapeutique (Stendahl et al., 2004; Eeckhoutte et al., 2006).

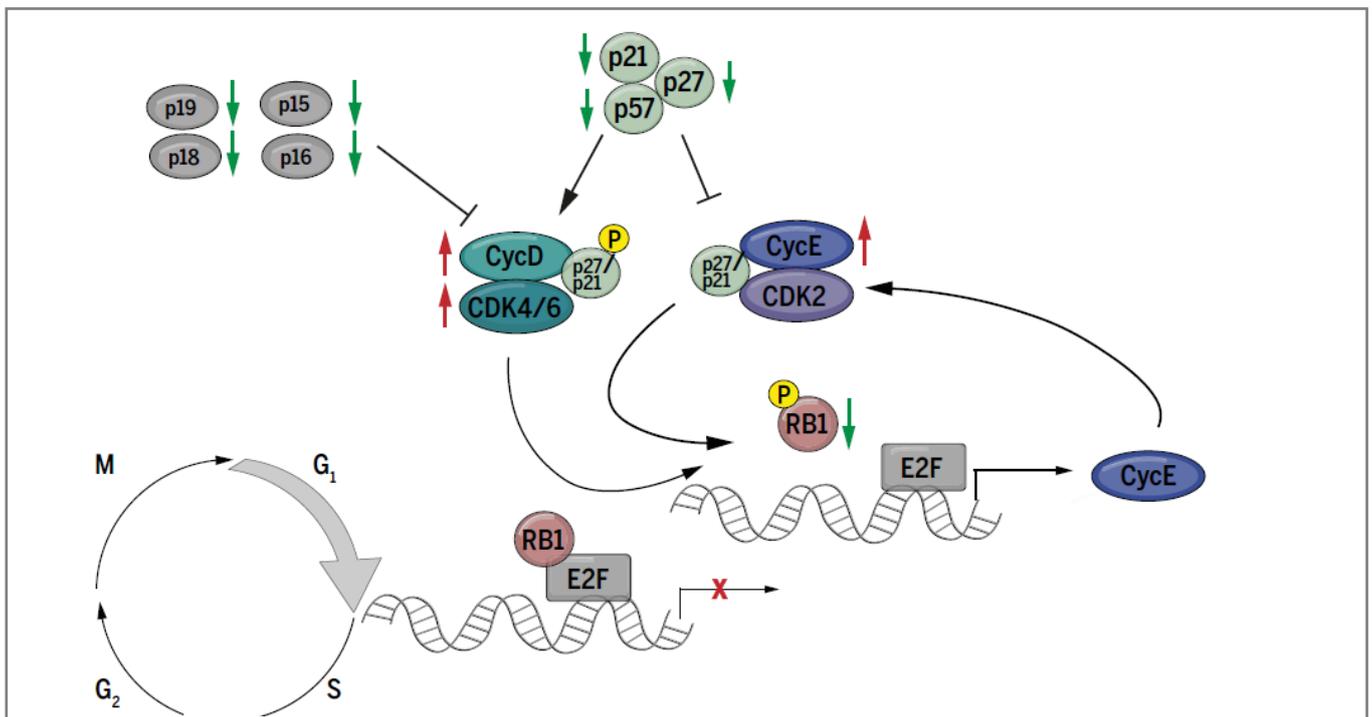


Figure 25 : Mécanismes moléculaires de la transition entre les phases G1/S du cycle cellulaire

Durant la phase G1, la cycline D (CycD) et CDK4/6, la cycline E (cycE) et CDK2 vont phosphoryler la protéine du rétinoblastome RB1. Le facteur de transcription E2F est activé et permet l'entrée en phase S via la transcription de différents gènes cibles. Les membres de la famille INK (p16^{INK4A}, p15^{INK4B}, p57^{KIP2}) inhibent le complexe cycline D-CDK4/6. Les protéines KIP/CIP (p21^{CIP1}, p27^{KIP1}, et p57^{KIP2}) inhibent le complexe cycline E-CDK2. p27^{KIP1} et p21^{CIP1} servent de « facteurs d'assemblages » du complexe cycline D-CDK4/6, ce qui permet leur séquestration et l'activation du complexe cycline E-CDK2. Les protéines fréquemment sous-exprimées dans les cancers sont indiquées avec des flèches vertes tandis que celles fréquemment surexprimées sont indiquées avec des flèches rouges. D'après Fassl et al., 2022.

Il existe actuellement 3 inhibiteurs de CDK4/6 (iCDK4/6) prescrits dans les cancers du sein: le palbociclib, l'abémaciclib et le ribociclib. Le palbociclib est le premier inhibiteur à avoir été développé et il a permis l'augmentation de la médiane de survie sans progression des patientes traitées palbociclib+letrozole (24.8 mois contre 14.5 mois avec du letrozole seul). Des résultats similaires ont été observés pour le ribociclib et l'abémaciclib. L'abémaciclib a été testé en combinaison avec du fulvestrant et a permis d'augmenter la durée médiane de survie sans progression de 7.1 mois en comparaison à un traitement fulvestrant seul (16,4 mois vs 9,3 mois) pour des patientes résistantes à une hormonothérapie. Le palbociclib et le ribociclib ont une spécificité plus grande pour le complexe Cyclin D-CDK4/6 que l'abémaciclib, qui est également capable d'inhiber d'autres kinases (effets « off target », **Tableau 4**) ce qui peut expliquer la différence de réponse observée dans les études cliniques. En effet, le palbociclib et le ribociclib sont basés sur une formule chimique similaire optimisée pour être spécifique des complexes Cycline D-CDK4/6 tandis que l'abémaciclib possède deux atomes de fluore capables de se fixer à la poche de liaison à l'ATP des CDKs et donc une sélectivité moins grande (George et al., 2021).

Name of compound	IC ₅₀	Other known targets	Stage of clinical development
Palbociclib (PD-0332991)	D1-CDK4, 11 nM; D2-CDK6, 15 nM; D3-CDK4, 9 nM		FDA-approved for HR ⁺ /HER2 ⁻ advanced breast cancer in combination with endocrine therapy; phase 2/3 trials for several other tumor types
Ribociclib (LEE011)	D1-CDK4, 10 nM; D3-CDK6, 39 nM		FDA-approved for HR ⁺ /HER2 ⁻ advanced breast cancer in combination with endocrine therapy; phase 2/3 trials for several other tumor types
Abemaciclib (LY2835219)	D1-CDK4, 0.6 to 2 nM; D3-CDK6, 8 nM	Cyclin T1-CDK9, PIM1, HIPK2, CDKL5, CAMK2A, CAMK2D, CAMK2G, GSK3α/β, and (at higher doses) cyclin E/A-CDK2 and cyclin B-CDK1	FDA-approved for early (adjuvant) and advanced HR ⁺ /HER2 ⁻ breast cancer in combination with endocrine therapy; FDA-approved as monotherapy in advanced HR ⁺ /HER2 ⁻ breast cancer; phase 2/3 trials for several other tumor types

Tableau 4 : Liste des iCDK4/6 autorisés dans le traitement des cancers du sein RH+/HER2-.

4.3.3. Stratégie de traitement des cancers du sein RH+/HER2-métastatique (Gennari *et al.*, 2021)

Bien qu'il n'existe pas de règles préétablies concernant le choix du traitement et que celui-ci dépend de l'histoire de chaque patiente, des algorithmes de traitement ont été développés pour guider la prise en charge.

Deux situations sont rencontrés : des patientes qui ont une résistance primaire aux thérapies endocrines, caractérisée par une rechute de la maladie dans les 2 ans de traitement

avec de l'hormonothérapie adjuvante, ou, des patientes qui vont avoir une progression après 6 mois d'hormonothérapie en première ligne de traitement dans le cas de premier diagnostic de cancer métastatique (MBC). La résistance secondaire est définie comme toutes les autres situations cliniques (ABC6, 2021).

La première ligne de traitement préconisée le plus souvent est une combinaison d'un inhibiteur de CDK4/6 et d'une hormonothérapie. Il n'y a pas de recommandation spécifique quant au choix de l'inhibiteur de CDK4/6 qui semblent avoir une efficacité similaire. Cependant si une patiente développe une toxicité à l'un de ces inhibiteurs, il est possible de le remplacer par un des deux autres. La chimiothérapie est utilisée en traitement de première ligne si la progression de la maladie est rapide et menace la survie de la patiente à court terme, phénomène connu sous le nom de crise viscérale. Elle peut être associée à un traitement de relai par inhibiteur de CDK4/6-hormonothérapie à l'issue de la chimiothérapie. Malgré une efficacité importante, la progression sous traitement est quasiment inéluctable. Dans ce contexte, il est alors envisagé de dépister les différentes mutations somatiques tel que *PIK3CA* ou constitutionnelles telles que *BRCA1/2*, *PALB2* pour mettre en place des traitements de seconde ligne après l'arrêt du traitement par iCDK4/6. Parmi les options thérapeutiques, on peut citer l'association fulvestrant + alpelisib, (anti PI3K) ou exemestane (anti-aromatase)-everolimus (inhibiteur de mTOR). La chimiothérapie est aussi parfois utilisée (**Figure 26**).

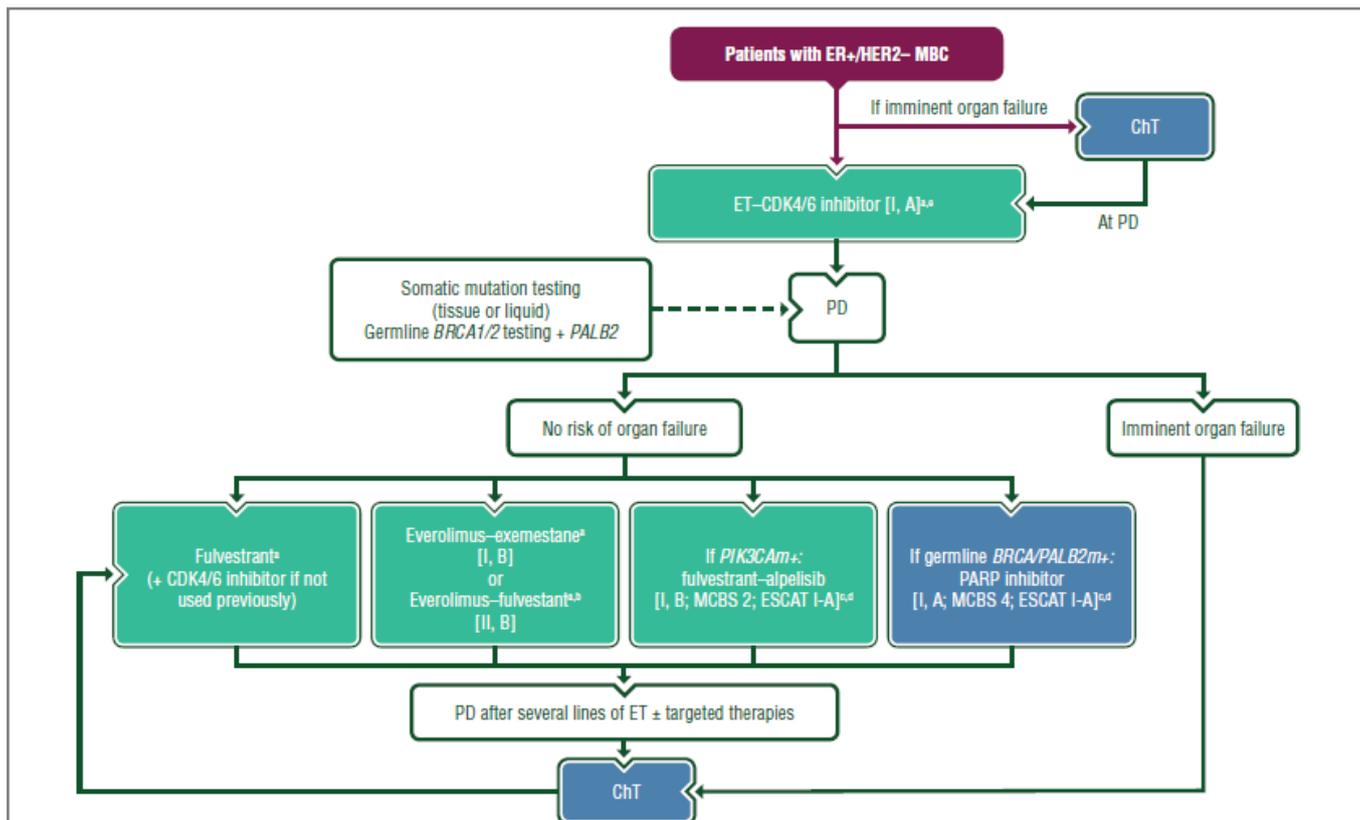


Figure 26 : Algorithme de traitement des cancers du sein RH+/HER2- métastatiques

Violet : catégories générales ou stratifications ; turquoise : combinaison de traitements ou traitements systémiques ; blanc : autres aspects de la gestion ; bleu : thérapie anticancéreuse systémique.

Ai : aromatasé inhibiteur ; CDK4/6 cyclin-dependant kinase 4 et 6 ; ChT : Chimiothérapie ; EMA : European Medicines Agency ; ER : oestrogène récepteur ; ESCAT, ESMO : échelle de prédiction de cibles moléculaires ; ESR1 : oestrogène récepteur 1 ; ET : endocrine thérapie ; FDA : Food and Drug Administration ; HER2 : human epidermal growth factor receptor 2 ; m : mutation ; MBC : cancer du sein métastatique, MCBS : échelle de l'ampleur des avantages cliniques réalisées par l'ESMO ; OFS : Suppression de la fonction ovarienne ; PALB2 : partner and localiser of BRCA2 ; PARP : poly(ADP-ribose) polymérase ; PD : maladie progressive ; PIK3CA : phosphatidylinositol-4,5-biphosphate-3-kinase catalytic subunit alpha.

^a OFS si la patiente est pré-ménopausée. ^b A préférer si la patiente possède une mutation *ESR1* [ESCAT score : II-A]. ^c Calcul des scores de thérapie par ESMO-MCBS v1.1 (consulter la publication originale pour plus d'informations). ^d Scores ESCAT pour les altération génomiques. ^e Si la rechute <12 mois après l'arrêt de l'adjuvant AI : fulvestrant-CDK4/6 inhibiteurs. Si la rechute est >12 mois après l'arrêt de l'adjuvant AI : AI-CDK4/6 inhibiteur. (Gennari et al., 2021)

4.4. Mécanisme résistance aux iCDK4/6 et à l'hormonothérapie

Avant la mise en place des traitements iCDK4/6, certaines patientes ont été traitées avec de l'hormonothérapie et ont développé une résistance à ces traitements, conduisant à la progression du cancer vers le stade métastatique. De même, au cours du traitement iCDK4/6-hormonothérapie, un phénomène de résistance peut apparaître. C'est pourquoi il est important de comprendre quels sont les mécanismes propres à chaque type de thérapie

(iCDK4/6 et hormonothérapie) pour développer de nouvelles combinaisons de traitements permettant de les contourner.

Les mécanismes de résistances à l'hormonothérapie connus sont : des dérégulations dans les voies de signalisation des récepteurs hormonaux (œstrogènes et progestérone), avec l'expression d'isoforme tronqué du récepteur ER α , l'amplification et la surexpression des gènes codants pour des récepteurs tyrosine kinases, ainsi que des dérèglements du cycle cellulaire et l'autophagie.

Dans 10% des cas, la résistance aux traitements d'hormonothérapie est due à une perte du récepteur ER α provoqué par la mutation *ESR1*. Cette mutation est très peu présente chez les patientes n'ayant jamais reçu de traitement (3% des patientes) tandis que sa fréquence augmente chez les patientes atteintes de MBC prétraités avec des thérapies anti aromatase (11%) et jusqu'à 25% pour des patientes prétraitées avec des anti- ER α (Robinson et al., 2013; Toy et al., 2013).

Un deuxième mécanisme de résistance à l'hormonothérapie correspond à l'hyper-activation des récepteurs tyrosine kinases, soit par surexpression, soit par amplification de leurs gènes. Ces récepteurs (FGFR1, HER2, HER3, EGFR, IGF1R) activent les voies de signalisations PI3K/AKT/mTOR et RAF/MEK/ERK. Ces hyper-activations entraînent la prolifération des cellules de manière indépendante du récepteur ER α . La mutation du gène *PIK3CA* est retrouvée dans 40% des cancers du sein (Arthur et al., 2014). Au total, la voie de signalisation de PI3K est dérégulée dans 70% des cancers du sein via des mutations dans d'autres gènes de la voie de signalisation comme AKT1, AKT2 ou PDK1. Des protéines inhibitrices de cette voie de signalisation comme PTEN et INPP4B sont également retrouvées mutées (Fu et al., 2013). La phosphorylation d'AKT va entraîner l'activation des protéines mTORC1 et mTORC2 et modifier le métabolisme des cellules et la synthèse protéique (Lauring et al., 2013).

L'inhibition de l'autophagie dans les modèles de cellules résistantes aux thérapies endocrines permet de restaurer la sensibilité à ces thérapies (Maycotte and Thorburn, 2014). En effet, l'autophagie est augmenté dans les tumeurs en raison du stress engendré, notamment dans les régions hypoxiques, par le traitement et l'altération du métabolisme et de la faible disponibilité en nutriments (White, 2012).

Des dérégulations des points de contrôles du cycle cellulaire ont également été décrites comme contribuant à la résistance aux thérapies endocrines. En effet, la surexpression

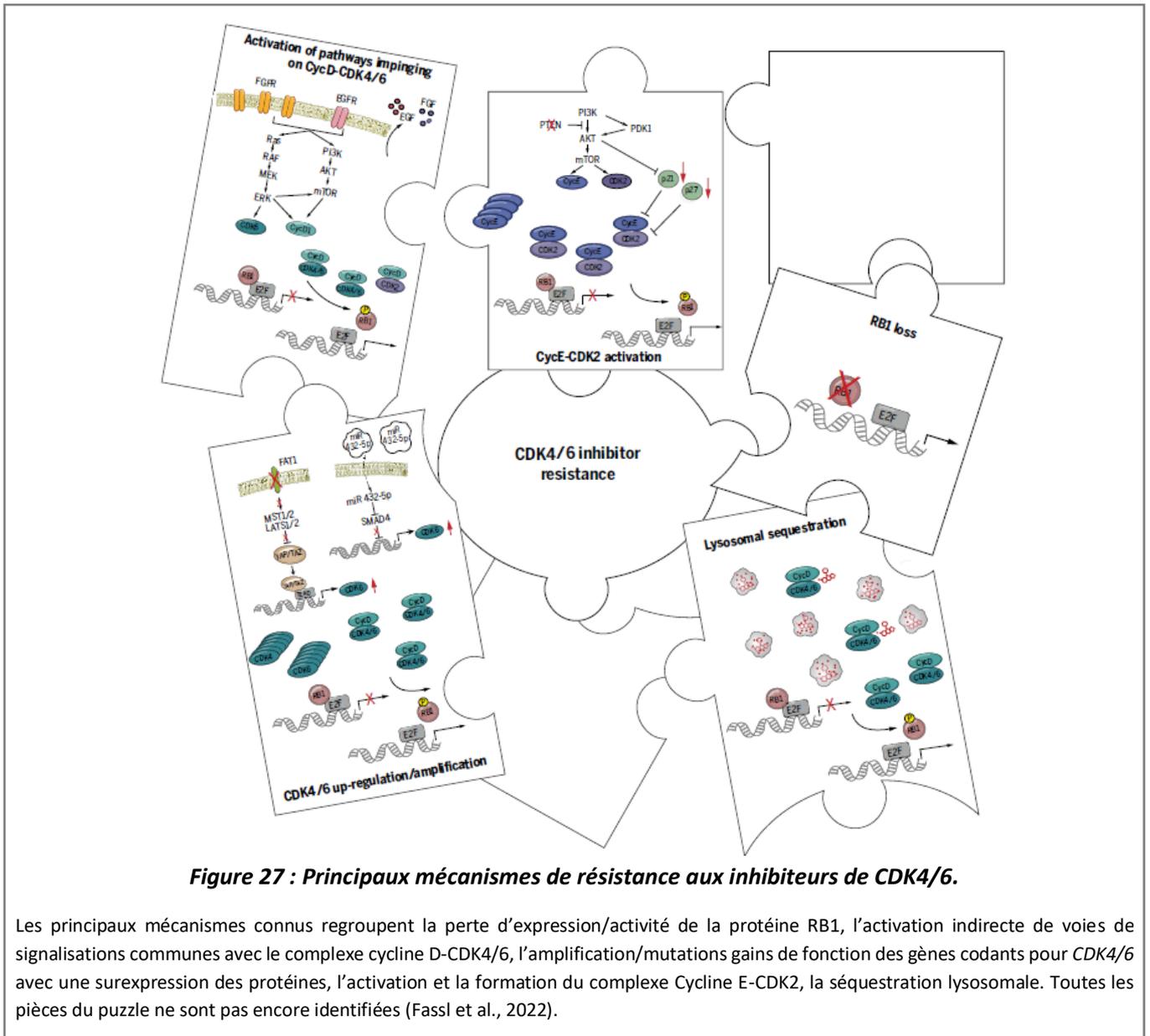
d'acteurs du cycle cellulaire comme c-Myc, les cyclines E1 et D1 et CDK4 ont été observé. C-Myc contribue à la prolifération indépendante des récepteurs aux œstrogènes, tandis que les cyclines E1 et D1 et CDK4 vont contribuer à la phosphorylation de la protéine RB et la progression dans le cycle cellulaire. La diminution de l'expression des protéines p21 et p27 (inhibiteurs du cycle cellulaire) a également été observée dans les phénomènes de résistances au tamoxifène (Nair and Vadlamudi, 2008; Finn et al., 2020).

Certains mécanismes de résistances aux iCDK4/6 sont communs aux mécanismes décrits pour les résistances aux hormonothérapies. L'un des mécanismes de résistance aux iCDK4/6 le plus décrit est la mutation du gène codant pour RB1 entraînant une perte de fonction de la protéine. Elle peut être acquise durant le traitement, ou prédisposer à une résistance avant tout traitement (Li et al., 2018). Ces mutations peuvent être détectées dans l'ADN circulant librement dans le sang des patientes et dans les tumeurs de ces patientes (Condorelli et al., 2018; Wander et al., 2020). Cependant, ce type de mutations n'est retrouvé que chez 5 à 10% des patientes. L'amplification du gène codant pour *CDK6* ainsi que la surexpression de la protéine associée a été retrouvée dans des cas de résistance à l'abémaciclib et au palbociclib (Yang et al., 2017; Formisano et al., 2019). Un mécanisme similaire a été observé avec *CDK4* dans des modèles de glioblastome ou de sarcome (Olanich et al., 2015) mais son implication dans la résistance aux iCDK4/6 dans les cancers du sein reste à déterminer, car la variation de son expression ne semble pas impacter la réponse aux inhibiteurs (Bollard et al., 2017). D'autres anomalies génétiques entraînant une activation des voies de signalisations des cyclines D confèrent également une résistance aux inhibiteurs de CDK4/6, comme l'amplification du gène *FGFR1/2* ou des mutations activatrices dans celui-ci (Formisano et al., 2019). La formation de complexes non canoniques cycline D1-CDK2 permettent également la résistance aux iCDK4/6 et lever l'arrêt du cycle cellulaire provoqué par le palbociclib, tout comme l'expression de la cycline E qui permet d'outrepasser le rôle du complexe cycline-D-CDK4/6 (Herrera-Abreu et al., 2016). L'activité du complexe Cycline E-CDK2 est régulée par les protéines KIP/CIP. Leur sous-expression est donc un facteur de résistance, tout comme la perte d'expression de PTEN qui entraîne l'activation de la voie de signalisation AKT, l'export de p27^{KIP1} dans le cytoplasme et la diminution de l'expression de p27^{CIP1} provoquant une augmentation de l'activité kinase de CDK2 (Wang et al., 2007; Costa et al., 2020). Le rôle du complexe Cycline E-CDK2 a été confirmé dans la résistance au palbociclib

+ fulvestrant ou letrozole dans les cancers du sein métastatiques (Turner et al., 2019). Un dernier mécanisme observé dans les cancers du sein triple négatifs est la séquestration des iCDK4/6 dans les lysosomes, ce qui réduit la quantité d'inhibiteurs disponibles dans le noyau (Fassl et al., 2020). L'ensemble des principaux mécanismes de résistance décrits précédemment sont résumés sur la **Figure 27**. Par ailleurs, l'inhibition du complexe Cycline D-CDK4/6 provoque une reprogrammation métabolique entraînant une augmentation du nombre de mitochondries, de lysosomes, une stimulation de la voie mTOR et une augmentation des réactions de phosphorylations oxydatives (Fassl et al., 2022).

Il a également été montré qu'un transfert de résistance aux cellules avoisinantes est possible via la production d'exosomes (microvésicules de 30 à 150 nM transportant des miRNAs) contenant le mir-432-5p qui inhibe la voie de signalisation TGF- β /SMAD4 et entraîne la surexpression de CDK6 (Cornell et al., 2019).

Des mécanismes épigénétiques peuvent être impliqués dans la résistance aux iCDK4/6, via des mutations dans des gènes codants pour des acteurs épigénétiques, ou des effets indirectes liés à l'inhibition du complexe. Par exemple, la mutation de *KMT2C* (une histone méthyltransférase) retrouvée chez 10% des patientes qui ont progressé sous hormonothérapie, pouvant prédisposer à un remodelage de la chromatine différent en réponse aux inhibiteurs de CDK4/6. La perte de *KMT2C* entraîne la prolifération des cellules de manière indépendantes au récepteur aux œstrogènes (Gala et al., 2018). Une étude d'ATAC-seq sur des lignées de cellules traitées par l'abémaciclib montre un remodelage de la chromatine avec des modifications importantes dans les régions activées et inhibées à la suite du traitement, notamment au niveau des cibles du facteur de transcription E2F. Ce remodelage de la chromatine serait médié par le facteur de transcription AP-1 et le gain d'H3K27ac, permettant la formation de nouveaux enhanceurs, entraînant la résistance à l'apoptose et l'immunogénicité des cellules tumorales. Cependant cette étude n'a pas cherché à mettre en évidence les régions remodelées dans un modèle de cellules résistantes, mais uniquement celles au début du traitement (Watt et al., 2021). Les mécanismes épigénétiques impliqués dans la résistance aux iCDK4/6 demeurent très peu connus, ce qui renforce l'intérêt de les étudier pour permettre d'approfondir les connaissances globales sur les mécanismes de résistances et augmenter l'arsenal thérapeutiques.



OBJECTIFS

Les objectifs de ma thèse se divisent en deux parties avec une problématique commune : identifier des biomarqueurs prédictifs de vulnérabilités thérapeutiques permettant de prévenir l'acquisition de la résistance au palbociclib ou de re-sensibiliser les cellules devenues résistantes à cet inhibiteur de CDK4/6.

Dans la première partie de ma thèse, je me suis intéressé aux mécanismes impliqués dans la reprogrammation épigénétique conduisant à l'acquisition de la résistance afin d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques soit en inhibant ces mécanismes épigénétiques via des épidrogues, soit par inhibition des protéines nouvellement surexprimées à l'issue de cette reprogrammation épigénétique cancéreuse. De plus, les modifications épigénétiques étant réversibles, leur variation au cours du temps et leur analyse dans le cfDNA permettrait un suivi personnalisé en temps réel de la réponse au traitement et une adaptation potentielle de celui-ci (le cas échéant).

Dans le deuxième projet, je me suis intéressé aux mécanismes épitranscriptomiques, notamment à l'identification des partenaires impliqués dans les complexes responsables de l'adénosine méthylation des miRNAs. J'ai étudié les modifications de cet interactome dans le contexte de résistance au palbociclib et l'impact de ce changement d'interactome dans la méthylation des miRNAs. Cette étude a pour but d'identifier de nouveaux biomarqueurs circulants basés sur le niveau de méthylation des miRNAs, associés à de nouvelles vulnérabilités thérapeutiques. En effet, dans le cas d'une modification de l'interactome de METTL3, de nouveaux miRNAs cibles vont être méthylés tandis que d'autres ne le seront plus. Les nouveaux miRNAs méthylés ne pourront plus inhiber leurs ARNm cibles, et de nouvelles protéines potentiellement impliquées dans la résistance seront surexprimées. Le suivi de la méthylation des miRNAs présent dans les exosomes circulants dans le sang des patientes au cours du traitement permettrait un suivi personnalisé et en temps réel de la réponse au traitement et une adaptation de celui-ci, comme pour l'étude précédente. Le but de cette étude et de celle précédente est également d'étendre l'arsenal des possibilités de combithérapies existantes grâce à la prise en compte de ces nouveaux biomarqueurs.

Ces deux études ont pour but d'améliorer la prise en charge des patientes atteintes de cancers du sein RH+/HER2- métastatique en leur proposant une prise en charge adaptée dans le temps en fonction des biomarqueurs circulants et ainsi anticiper l'apparition des mécanismes de

résistance au cours du temps. Ces études ouvrent la voie à des thérapies personnalisées, en temps réel et adaptatives. Cette approche permettrait de délivrer le bon traitement au bon moment. C'est pourquoi, l'émergence des tests compagnons qui permettent de catégoriser les patients par rapports à certains marqueurs établis, prédisposant à une réponse à un traitement plutôt qu'à un autre est une piste à développer.

MATERIEL ET METHODES

Culture cellulaire

La lignée cellulaire de cancer du sein RH+ HER2- MCF7 utilisée pour les différentes études et la génération du modèle de résistance au palbociclib provient d'ATCC : the Global Bioresource Center (ATCC, #HTB22, US). Les cellules MCF7 ont été cultivées dans du milieu Duplecco's modified Eagle's (DMEM, Gibco™ 11960044) supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal (SVF, Eurobio CVFCVF00-01), 1% de glutamine (Gibco™, A2916801), 1% pénicilline/streptomycine (Gibco™, 15140122). Les cellules sont cultivées dans un incubateur humide à 37°C et 5% CO₂.

Génération du modèle de cellules résistantes au palbociclib

Par la suite, les cellules résistantes au palbociclib seront nommées MCF7-PalboR et les cellules initiale, non traitées MCF7-PalboS.

Les cellules MCF7 ont été traitées avec 1µM de palbociclib (MedChemExpress) dilué dans du DMSO (Sigma-Aldrich, D2650) 5% avec un changement de milieu 2 fois par semaines (lundi, mercredi et vendredi) jusqu'à l'observation d'une résistance caractérisée par une vitesse de prolifération identique aux cellules non traitées au palbociclib et une I_{c50} supérieure aux cellules initiales (ici 5.7 fois supérieure : MCF7-PalboR= 4.286 µM, MCF7-PalboS=752 nM). Par la suite, les cellules ont été maintenues en culture avec le même schéma de traitement pour continuer la pression de sélection.

Test de prolifération et calcul du temps de doublement

Le temps de doublement des cellules, c'est-à-dire, le temps nécessaire pour compléter un cycle cellulaire complet et obtenir le doublement des cellules, a été calculé grâce au site Doubling Time Calculator (Roth, 2006 <http://www.doubling-time.com/compute.php>). Les cellules ont étéensemencées à JO à une concentration de 10⁵ cellules (comptage par Scepter™ 2.0 Cell Counter, Merck-Millipore, France). A J1 les cellules ont été incubées avec les différents inhibiteurs : Vorinostat (inhibiteur d'HDACs, CAS N°: 149647-78-9); Decitabine (inhibiteur de DNMTs, CAS N°: 2353-33-5), Bizine (inhibiteur de LSD1, CAS N°: 1591932-50-1), JQ1 1µM (inhibiteur de BRD4, CAS N°: 1268524-70-4). 24h/48 et 72h après incubation, les cellules ont été récoltées puis comptées par cytométrie en flux (BD Accuri™ C6 plus Flow Cytometer).

Viabilité cellulaire

La viabilité cellulaire est mesurée à l'aide du test 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium bromide (MTT, VWR Chemicals, France). Les cellules MCF7 ont étéensemencées à une densité de 500 cellules par puits dans 100µL de milieu complet à J0. Les traitements ont été ajoutés à J1 et sont dilués dans du milieu DMEM complet contenant 1% de SVF. Après incubation pendant 72h, 10µL de MTT (10µg/mL) ont été ajoutés dans chaque puits et incubé pendant 3h dans l'incubateur humide à 37°C, 5% CO₂. Les puits sont ensuite vidés et le milieu a été remplacé par 200µL de DMSO. La révélation est faite par mesure de densité optique à 570nm par spectrophotométrie (VICTOR, Perkin-Elmer, France).

Culture d'organoïdes et traitement au palbociclib

La préparation de la culture d'organoïdes a été réalisée à partir des protocoles décrits par Lohard *et al* et Sachs *et al* (Sachs et al., 2018; Lohard et al., 2020). Les tissus de cancers du sein provenant de patientes ayant subi une intervention chirurgicale à l'Institut de Cancérologie de l'Ouest, René Gauducheau, Nantes, France et ayant donné leur consentement (ptocolé THEREX) ont été dissocié mécaniquement dans une boîte de pétri 100mm puis transféré dans un tube falcon contenant du milieu AdDF+ (Adavance DMEM/F-12 + antibiotiques, Gibco #12634028) et de la collagénase à 2mg/mL. Les broyats de tumeurs ont été incubés pendant 2h à 37°C, 5% CO₂ sur roue avec de la collagénase. La collagénase a ensuite été inhibée par ajout de 1mL de SVF. Les cellules ont été centrifugées pendant 5 min à 400g et le culot a été repris dans 1mL de milieu AdDF+. Les cellules ont été transférées sur un filtre de 70µm puis laver 3 fois avec le milieu. Le dissocia est centrifugé pendant 5 minutes à 400g puis le culot a été repris dans 1mL de milieu AdDF+++ (AdDF + 1X glutamax + 10mM HEPES + antibiotiques). Après comptage, les cellules sont centrifugées 30 secondes à 450g puis repris dans 500µL de milieu BC + 5% BME (gibco #21010046) et 200 000 cellules/puits ont été déposées dans plaques 24 puits ultra-low attachment traitées avec de la membrane basale adhérente (Culturex Pathclear Reduced Growth Factor BME, Biotechne #3433-010). Le milieu de culture est renouvelé tous les quatre jours. Les organoïdes ont été maintenus en culture pendant 7 à 14 jours avant le traitement au plabociclib 10µM pendant 3jours.

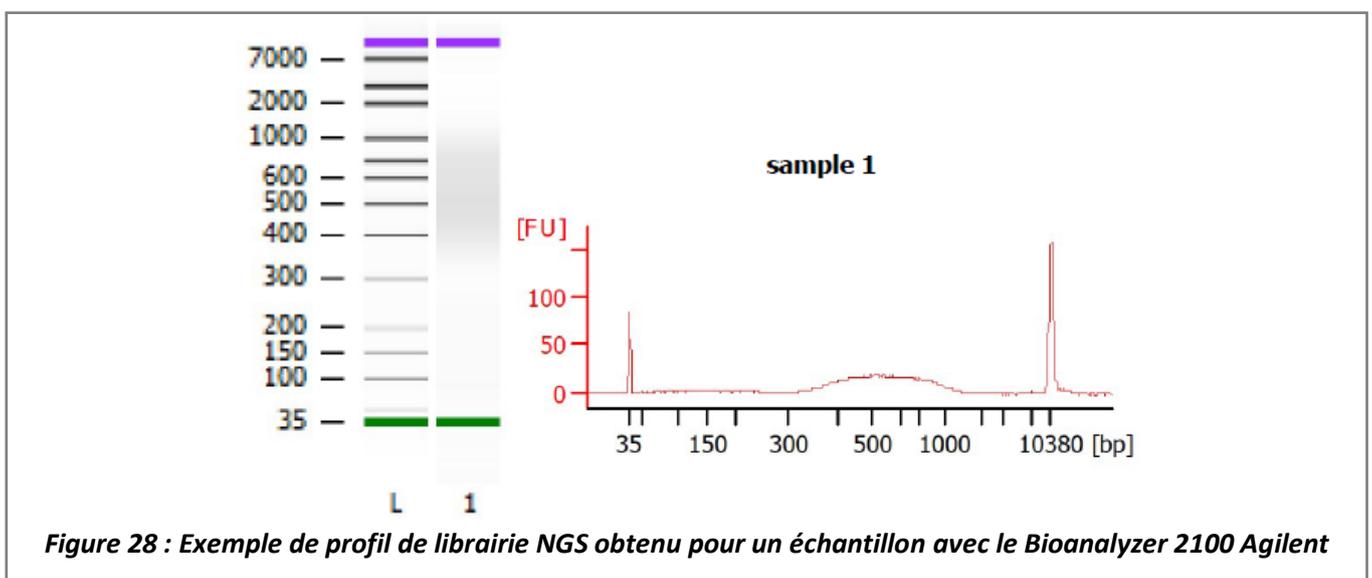
Marquage d'immunofluorescence

Les marquages d'immunofluorescence ont été réalisés comme ceux décrits par (Wilson et al., 2021). Les organoïdes ont été fixés dans 4% de paraformaldéhyde pendant 30 minutes puis perméabilisés avec 0.3% de Triton X100 pendant 30 minutes. Les organoïdes ont été bloqués dans 5% de sérum de chèvre avant le marquage avec l'anticorps BRD4 (santa cruz #sc518021, 1 :25) et un anticorps secondaire anti-souris IgG2b-488 (1 :500 Life Technologies A21141). L'ADN a été marqué par un colorant Hoechst. Les organoïdes ont été inclus dans de l'agarose à bas point de fusion et la fluorescence a été observée grâce au microscope confocale Lightsheet Z1 Zeiss.

Immunoprécipitation de Chromatine (ChIP)

Les cellules (2×10^7) sont fixées avec du paraformaldéhyde 1% pendant 10 minutes à température ambiante (RT). La réaction est inhibée par l'ajout de glycine 0.25M (concentration finale) pendant 2 minutes à RT. Les cellules sont ensuite lavées deux fois avec du PBS froid. Les cellules sont ensuite grattées dans 500µL de PBS froid contenant un cocktail d'inhibiteurs de protéases 1X (Roche) et centrifugées pendant 5 minutes à 800g à 4°C. Le culot est ensuite repris dans le tampon de lyse LB1 (50 mM Hepes pH7.5, 140 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10% glycérol, 0,5% NP-40 et 0,25% Triton X-100) pendant 10 minutes à 4°C. Après centrifugation (5 minutes, 4°C, 2000g), le culot est repris dans du 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. Après une nouvelle centrifugation comme précédemment, le culot est repris dans du 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) puis mis à sonication pendant trois cycles de 7 minutes (30 secondes ON/30 secondes OFF, Bioruptor® Plus (Diagenode Cat # B01020001)). Après sonication, du Triton-X-100 est ajouté à une concentration finale de 1%. Le mélange est ensuite centrifugé à 20 000g pendant 10 minutes à 4°C. La chromatine ainsi obtenue est incubée à 4°C toute la nuit sous rotation avec des billes magnétiques couplées à 5µg d'anticorps BRD4 Diagenode C15410337. Le lendemain, les billes sont lavées 6 fois dans 1mL de tampon RiPA (#89901, ThermoFisher, France) sur glace et 2 fois avec du Tris-HCl 10mM pH8. L'élution a été réalisée avec 100µL de tampon d'élution (50 mM Tris-HCl pH 8, 10 mM EDTA, 1% SDS, 50 µg/mL protéinase K) pendant une nuit à 65°C sous agitation. La chromatine éluée est ensuite incubée avec de la

RNAse A (50µG/mL) pendant 30 minutes à 37°C. Le surnageant est ensuite séparé des billes grâce à un portoir magnétique et l'ADN est ensuite purifiée à l'aide des billes NucleoMag NGS (Macherey-Nagel). La préparation des librairies est ensuite réalisée à l'aide du kit NEBNext®Ultra™II DNA Library Prep Kit for Illumina® (NEB) conformément aux instructions du fournisseur. Les librairies NGS ainsi obtenue ont été validées par lecture sur puce ADN (Agilent High Sensitivity DNA kit) de l'instrument 2100 Bioanalyzer (Agilent, **Figure 28**). Un triplicat biologique indépendants (différences de passages entre les échantillons) a été réalisé pour chaque condition.



Analyse ChIP-seq

Les librairies du ChIP-seq BRD4 ont été séquencées avec l'appareil Illumina NovaSeq 6000 par la plateforme GenoBird (Nantes, France). La qualité des fichiers Fastq a été analysée grâce à FastQX v0.11.5 (Andrews, 2010) disponible à l'adresse suivante : <https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>. Les fragments d'ADN séquencés (reads) ont été séparés des séquences des adaptateurs puis filtrés par l'outil Trim Galore v0.6.6 (Krueger, 2015) disponible en ligne : https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/trim_galore/. Les reads sont ensuite alignés avec bowtie 2v2.3.1 sur le génome de référence hg38 (Langmead and Salzberg, 2012). L'identification des pics de BRD4 a été réalisée à l'aide de l'outil MACS2 v2.2.6 avec les paramètres par défaut (Zhang *et al.*, 2008). Les pics BRD4 ont été associés au site d'initiation

de transcription (TSS) le plus proche. Ces pics ont été fusionnés en un ensemble de pics standardisés entre les différents réplicats et conditions avec bedtools v2.26.0 (Quinlan and Hall, 2010). Des seuils de 2,5 et 10^{-10} ont été utilisés respectivement pour discriminer le fold-change et la p-value ajustée entre les conditions. L'analyse de super-enhanceurs a été réalisée à partir de l'algorithme ROSE. Les pics les plus proches sont fusionnés et le signal ChIP BRD4 est évalué sur ces régions plus larges, permettant de distinguer les SE des enhanceurs classiques.

Extraction d'ARN et séquençage (3'RNA-seq)

Les échantillons proviennent d'une cinétique de cellules MCF7 traitées pendant différents temps avec $1\mu\text{M}$ de Palbocicib en quadruplicats biologique indépendants. Les culots cellulaires ont été conservés à -80°C dans du tampon de lyse RLT (Qiagen) immédiatement après collection de ceux-ci. L'extraction d'ARNs a été réalisée à l'aide du QIAcube et du protocole Qiagen RNeasy Cells and tissue (Qiagen #74116). Les échantillons ont été dosés à l'aide du kit RNA High Sensitivity et de l'appareil Qubit (Qiagen). Les bibliothèques de séquençage 3' d'ARN ont été préparées à partir de 500ng d'ARN et séquencées par l'appareil Illumina NovaSeq 6000 par la plateforme GenoBird (Nantes, France) (Charpentier *et al.*, 2021).

Analyse des résultats de 3'RNA-seq

Après séquençage, les reads sont alignés à un génome de référence (hg38) et le nombre de chaque reads correspondants à un gène est quantifié, pour l'ensemble des gènes du génome. L'analyse différentielle entre les conditions a été réalisée à l'aide de R v3.6.3 et du package DESeq2 v1.24.0 (Love *et al.*, 2014). Les graphiques ont été générés grâce aux packages ggplot2 v3.3.4 (wickham, 2016) et ggrepel v0.9.1 (Slowikowski *et al.*, 2021). La p-value a été ajusté selon la méthode de Benjamini-Hochberg. Pour discriminer les différences d'expression entre les différentes conditions, nous avons fixé un seuil de fold-change à 2.5 et ajusté la p-value à 0,05.

Purification du plasma à partir d'échantillons sanguins de patients

A partir d'échantillons sanguins de 10mL prélevé dans des tubes EDTA K+, 4 à 5mL de plasma est isolé par deux séries de centrifugation (10 minutes, 4°C 1900g puis 10 minutes, 4°C 16 000G). Les échantillons sont ensuite identifiés et stockés à -80°C jusqu'à utilisation.

Purification des miRNA contenu dans les exosomes sanguins

1mL de plasma précédemment purifié est utilisé pour isoler les miRNA à l'aide du kit ExomiRNeasy Midi kit (#77144, Qiagen) et des instructions du fournisseur.

Extraction d'ADN et de cfcDNA

Les extractions ont été réalisées à partir de culot cellulaire (ADN) ou de plasma de patients (cfcDNA) à l'aide de l'automate QIAcube, des kits QIAmp DNA Mini QIAcube (Qiagen, # 51326) et QIAmp Circulating Nucleic Acid (Qiagen, #55114).

Extractions protéiques (pour Western Blot/ELISA)

Les cellules issues des différentes conditions sont décollées par digestion avec de la Trypsine-EDTA (Gibco 25300054) pendant 5 minutes à 37°C puis la réaction est inhibée en ajoutant du milieu DMEM complet. Les cellules sont transférées dans un tube Falcon de 15mL puis centrifugées pendant 5 minutes à 100g. Le culot cellulaire est lavé dans 1mL de PBS puis transféré dans un tube Eppendorf de 1,5mL et centrifugé 5 minutes à 100g. Le culot cellulaire est ensuite incubé avec un volume de tampon RIPA équivalent au volume du culot pendant 1h sur glace. Le lysat est ensuite soumis à sonication pendant 20 minutes puis centrifugé pendant 10 minutes à 16 000g à 4°C. Le surnageant est récupéré et la concentration en protéines est déterminée par dosage BCA (Uptima BC Assay reagent, Interchim).

Extraction d'ARNs

Les ARNs totaux ont été extraits à partir de culots cellulaires à l'aide kit RNeasy Mini QIAcube et de l'automate QIAcube (Qiagen #1038703) conformément au protocole du fournisseur.

Extraction de miRNAs

Les culots cellulaires obtenus de la même manière que pour l'extraction protéique sont repris dans 700µL de QiAzol (Qiagen) avant d'être conservé à -80°C jusqu'à extraction. La suite a été réalisée conformément aux instructions du fournisseur et à l'aide du QIAcube et du kit miRNeasy Mini (Qiagen). Les échantillons ont été dosés à l'aide du kit microRNA assay kit et du Qubit (Qiagen).

ELISA

Les ELISA ont été réalisés à partir des kits suivants et des recommandations des fournisseurs : kit ELISA BRD4 (MyBiosource, #MBS945281), kit ELISA MAP4K4 (MyBiosource, #MBS917832), kit ELISA TET2 (MyBiosource, #MBS166992) et (MyBiosource, #MBS4500903), kit m6A/miRNA (EpigeneTek, P-9005-96) Les extraits protéiques proviennent d'extractions au RIPA (même protocole d'extraction que pour le western blot) et les miRNAs ont été extraits de la même manière que décrit précédemment.

Western Blot

50 µG d'échantillons protéiques de chaque condition ont été déposés sur des gels de polyacrylamide (Mini-PROTEAN TGX Stain-Free Precast Gels, Biorad) puis séparé par électrophorèse dans du tampon de migration (cat#1610772, biorad). Les protéines sont ensuite transférées sur une membrane de PVDF (Trans-blot Turbo Mini 0.2µM PVDF Transfer Packs, Biorad) par transfert liquide toute la nuit (overnight) à 4°C sous 10V (cat#1610771, Biorad). Le lendemain, la membrane est bloquée pendant 1h à RT dans du PBS 0,1% Tween-20 (PBST 0,1%) et 5% lait. Le marquage des protéines a été réalisé par incubation avec des anticorps primaires (voir conditions d'incubation selon l'anticorps utilisé dans le **Tableau 5**). Après trois lavages au PBST 0,1%, la membrane a été incubée pendant 1h à 37°C dans du PBST 0,1%, 1% lait avec des anticorps secondaires spécifiques conjugués à la peroxidase, dilués au 1 :5000 (anti-souris AB_2338525 ou anti-lapin AB_2337936 ; Jackson Laboratory). Les membranes ont été révélées avec du réactif de chimiluminescence ECL (Enhanced ChemiLuminescence) (Clarity Western ECL, Biorad) et l'imageur Chemidoc MP (Biorad). Le témoin de charge utilisé pour la quantification était soit de la β -actine, soit de la β -tubuline.

Cible	Référence anticorps	Espèce	Dilution	Température d'incubation	Durée d'incubation
BRD4	Santa Cruz, sc48772	Lapin	1 :200	4°C	Overnight
METTL3	Abcam, ab195352	Lapin	1 :500	37°C	2h
METTL14	Ozyme, HPA038002	Lapin	1 :1000	37°C	2h
EIF4G1	ThermoFisher, H0000181-M10	Souris	1 :500	4°C	Overnight
HNRNPM	ThermoFisher, MA538577	Souris	1 :1000	4°C	Overnight
HNRNPU	ThermoFisher, MA124632	Souris	1 :1000	4°C	Overnight
β -tubuline	Santa Cruz, sc-23949	Souris	1 :50	4°C	Overnight
β -actine	ThermoFisher Scientific, ACTN05	Souris	1 :1000	37°C	1h

Tableau 5 : Liste des anticorps utilisés pour les Western Blot

qMSRE

Les digestions ont été réalisées à partir de d'ADN de cellules (100 ng) ou de cfcDNA (10 ng) avec 40U d'enzyme de restriction Hpy166II (NEB, #R0616S, France) à 37°C pendant 2h dans un volume de 50 μ L. Les échantillons contrôles ont été traités dans les mêmes conditions mais sans ajout d'enzyme (pour pouvoir calculer le pourcentage de méthylation) 5 μ L des échantillons digérés et non digérés ont été utilisés pour réaliser les qPCR. Les qPCR ont été réalisées à partir du kit QuantiFast SYBR Gree PCR (Qiagen, #204057) et l'appareil Rotor-Gene Q (Qiagen). Les primers

utilisés sont : qMSRE-BRD4-S : agtcagacttctagcagtagta et qMSRE-BRD4-AS : ctgcagggagaggtcttg créés spécifiquement (Sigma). Le niveau de méthylation est calculée grâce aux Ct issus de la qPCR des échantillons digérés et non digérés et de la formule $100 \times 2^{-\Delta Ct}$.

Transfection de siRNA et miRNA

Les cellules (2×10^5) ont étéensemencées dans des plaques 6 puits et ont été incubées pendant 24h à 37°C dans un incubateur à 37°C et 5% de CO₂. 60 pmol de siRNA, 5 ou 30 pmol de miRNA ont été préparés avec le kit de transfection HiPerfect (Qiagen) et ajoutés dans le milieu de culture et les cellules ont été incubées pendant 7h à 37°C et 5% CO₂. Sans retirer le surnageant, 1mL de milieu DMEM contenant le double de SVF/pénicilline/streptomycine/glutamine a été ajouté et les cellules ont été incubées pendant 24h. Le milieu est ensuite renouvelé avec du milieu DMEM complet et les cellules ont été incubées pendant 48h avant d'être récupérées pour les différentes expériences. Voir le

Cible	Fournisseur	Référence
siRNA-BRD4	ThermoFisher	#AM160708
siRNA-TET2	Santa Cruz	#sc-88934
siRNA-A	Santa Cruz	#sc-37007
siRNA-METTL3	Santa Cruz	#sc-92172
siRNA-RPS3	Santa Cruz	#sc-96950
miRNA-143-3p méthylé et non méthylé	Qiagen	MSY0000435
miRNA-1910-3p méthylé et non méthylé	Qiagen	MSY0026917

Tableau 6 : Liste des siRNA et miRNA utilisés pour les transfections

Tableau 6 pour la liste des siRNA et miRNAs utilisés.

Préparation des échantillons pour spectrométrie de masse (Co-IP METTL3)

Les cellules ont étéensemencées dans des boîtes de pétri de 100mm et ont été utilisées à 75% de confluence. Les boîtes sont lavées deux fois avec du PBS 1X puis incubées avec 500µL de tampon de lyse (20mM TrisHCl pH 7,4, 150mM de NaCl, 1mM EDTA, 1% Triton-X100 + cocktail d'inhibiteur de protéases (Roche)) pendant 5 minutes sur Glace. Les boîtes ont ensuite été grattées et centrifugées dans un tube falcon 15mL pendant 15 minutes à 14 000g à 4°C. Le surnageant est récupéré et la concentration en protéines est déterminée par dosage BCA (Uptima BC Assay reagent, Interchim). Le surnageant a été aliquoté puis conservé à -80°C jusqu'à utilisation. Une étape de pré-nettoyage des échantillons est réalisée dans un premier temps pour éliminer le potentiel bruit de fond (crapome) lors de l'IP. 20µL de billes magnétiques (DeanaBeads) par conditions sont placées dans un tube Eppendorf de 1,5mL contenant 1mL de tampon de lyse et lavées deux fois avec celui-ci. 500µg de protéines*nombre d'immunprécipitations sont placées dans le tube contenant les billes et le volume finale est complété à 1mL avec du tampon de lyse. Les échantillons sont incubés sur un agitateur rotatif pendant 1h à 4°C. Après séparation magnétique, le lysat est divisé en nombre d'IP à réaliser (soit 500µg de protéines par IP) et incubé overnight à 4°C sur l'agitateur rotatif avec 1µg d'anticorps (METTL3 Abcam ab195352 lapin, IgG lapin Cell signalling Cs-2729). Le lendemain, 20µL de billes par IP sont équilibrées avec du tampon de lyse comme précédemment et les échantillons sont mis à incubé avec les billes sur l'agitateur rotatif (4°C, 2h). Après incubation, les billes (qui ont fixé les anticorps et les protéines IP) sont lavées deux fois avec du tampon de lyse puis une fois avec le même tampon sans Triton-X100 et transférées dans un nouveau tube de 1,5mL low binding. Un dernier lavage avec le tampon de lyse sans Triton-X100 est réalisé. Les billes sont reprises dans 100µL de NH₄HCO₃ à 50mM pH=8. Les IP ont été validées par Western Blot et stockés à -80°C avant d'être envoyés à séquencer dans l'équipe de Catherine Guette (ICO Angers, Equipe 12 CRCI²NA UMR1307).

Spectrométrie de masse

La digestion a été réalisée à partir de 86µL de billes auxquelles a été ajouté 9µL de DTT 0.1M (réf. 09830-500G, Sigma Aldrich) pendant 15 minutes à 50°C sous agitation à 750rpm à l'abri de la lumière. 5µL de MMTS 200mM ont été rajoutés aux échantillons (incubation 10

minutes, 37°C, 750 rpm). 5µL de trypsine TPCK (réf. 4352157, Sciex) à 1µg/µL a été rajouté (incubation 18h, 37°C, agitateur rotatif). Les peptides ont ensuite été purifiés à l'aide d'un set pack C18 (réf. 186000383, Waters) puis les solvants sont évaporés à l'aide d'un speed vac (ThermoFisher). Le culot sec de peptides est repris dans de l'acide formique 0.1% (réf. 84865.260, VWR) et dosé avec le kit microBCA (réf. 10249133, Fisher Scientific). Les échantillons sont ensuite préparés à une concentration de 100ng/µL dans de l'acide formique 0.1%. 200ng d'échantillons sont injectés sur la colonne C18 (réf. 1867781Aurora 25cm, Bruker) nano LC Bruker nano Elute couplées au spectromètre de masse Tims Pro2 Bruker. Un gradient de deux solutions sont appliquées au niveau de la colonne nano Elute : 98% H2O-2% ACN (Acétonitrile réf. 83640.290, VWR)-0,1% acide formique et la deuxième : 80% ACN-20% H2O-0,1% acide formique.

Analyse des résultats de spectrométrie de masse

Après le séquençage par spectrométrie de masse, une liste excel est générée, comportant le nom des protéines identifiées, leur numéro d'accès UniProt, l'espèce et le nombre de peptides séquencés. Pour faciliter l'analyse des données, nous avons mis en place un outil bioinformatique permettant de nettoyer les listes et de récupérer le nom des protéines et le nombre de peptides séquencés associé uniquement. Ensuite, l'outil va comparer la liste des protéines immunoprécipitées dans l'IP d'intérêt à la liste des protéines retrouvées dans l'IP IgG (contrôle négatif) pour extraire uniquement les protéines présentes dans la liste d'IP avec la protéine d'intérêt et le nombre de peptides correspondants. A cette liste, l'outil va ajouter toutes les protéines communes aux deux IP (d'intérêt et IgG) qui rempliront la condition suivante : $\text{nombre de peptides (IP intérêt)} - \text{nombre de peptides (IP IgG)} > 0$. Ainsi, toutes les protéines IP de manière non spécifiques sont retirées de la liste avec le postulat que celles communes aux deux conditions qui sont conservées dans la liste nettoyée sont enrichies dans l'IP d'intérêt. Ensuite, une analyse comparative est réalisée entre les triplicats de chacune des conditions et seules les protéines communes sont conservées et le nombre de peptides est moyenné entre les trois expériences. Une analyse différentielle est ensuite réalisée entre les deux conditions (MCF7-PalboS et MCF7-PalboR) avec le package R DESeq2 comme utilisé pour les analyses de RNA-seq. Grâce à ce package, les résultats sont récupérés sous forme de tableau avec le log2 Fold Change et la p-value ajustée (calculée à partir du test de Wald). Les seuils suivant ont été déterminés

pour discriminer les protéines entre les conditions : p-value ajustée=0,05 et un $\log_2=2,5$ pour être le plus discriminant possible. Ainsi on obtient un classement des protéines « sur-immunoprécipitées » et « sous-immunoprécipitées » dans la condition MCF7-PalboR par rapport à la condition MCF7-PalboS. Le volcano plot est généré dans un premier temps grâce au package R ggplot puis par le package ggploty pour pouvoir interagir directement avec chaque points.

Les résultats ainsi obtenu ont pu être comparé avec diverses banques de données pour juger de leur significativité. Il faut cependant garder à l'esprit que les banques de données ont été générées à partir d'autres types cellulaires et dans des contextes différents de ceux étudiés, elles sont donc indicatives. Une analyse avec la banque de données BioGRID (<https://thebiogrid.org/>) permet de récupérer uniquement les interactants connus de la protéine d'intérêt. Même chose avec la banque de donnée STRING (<https://string-db.org/>). La comparaison des résultats avec ces deux banques de données permet de confirmer des partenaires déjà connus, et donc de valider les immunoprécipitations, sans pour autant invalider les nouveaux partenaires non identifiés dans ces banques de données.

Immunoprécipitation des miRNAs méthylés et analyse du niveau de méthylation

Après extraction avec le Qiacub comme décrit plus haut, 5 μ G de miRNA ont été utilisé pour chaque RIP (immunoprécipitation d'ARNs) Les RIPs ont été réalisé grâce à des Dynabeads (#10007D, ThermoFisher Scientific) couplées à la protéine G avec des modifications du protocole conformément à ce qui a été décrit par Berulava et Briand (Berulava et al., 2015; Briand et al., 2020). 5 μ G d'anticorps anti m6A ont été utilisés pour les immunoprécipitations et 5 μ G d'IgG ont été utilisés comme contrôle négatif (AB208577, Abcam ; ab18443, Abcam). Dans chaque échantillons, 1pM de mir-38 de *c.elegans* méthylé (m6A, MSY0000009, Qiagen) a été rajouté comme spike-in (témoin positif pour valider les RIPs). Les miRNAs immunoprécipités ont été rétrotranscrit à l'aide du kit miRCURY LNA RT (#339340, Qiagen) conformément aux instructions du fournisseur. L'ADNc obtenu a été analysé par qPCR avec le kit miRCURY LNA SYBR Green PCR (#339346, Qiagen) en suivant les indications du fournisseur. Le taux d'enrichissement a été calculé à l'aide des Ct obtenus après RT-qPCR des échantillons inputs (avant RIP), RIP-m6A et RIP-IgG et de la formule $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

RT-qPCR

Les RT-qPCRs ont été réalisées à partir des extractions d'ARNs réalisés à l'aide du QIAcube (voir plus haut) et du kit Quantitect Reverse Transcription Kit (#205313, Qiagen) et du kit Quantifast SYBR Green PCR (#204057, Qiagen). Les primers spécifiques proviennent du catalogue Quantitect Primer Assays (#249900, Qiagen). L'appareil utilisé est le Rotor-Gene Q, thermocycleur en temps réel de Qiagen. Le gène de référence utilisé pour la quantification est RPLPO, et le calcul a été réalisé à l'aide des Ct des échantillons après RT-qPCR la formule $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

Analyses statistiques

Sauf contre-indications dans les différents articles, les résultats sont représentatifs de la moyenne \pm l'écart-type sont calculées à partir de trois expériences indépendantes (quatre pour le CHIP-seq BRD4). La moyenne et l'écart type ont été calculés à l'aide du t-test de Student. La significativité de la corrélation entre deux paramètres a été calculée par un test de Pearson. Une p-value < 0.05 a été utilisée comme critère de significativité.

Patients et échantillons

Le plasma a été collecté auprès de patientes atteintes de cancers du sein RH+/HER2-métastatique à l'institut de cancérologie de l'ouest (ICO, <http://www.ico-cancer.fr>). Elles ont toutes donné leur consentement éclairé et signé. Tous les échantillons collectés et les informations cliniques associées ont été enregistrés dans une base de données (EPICURE-Sein CPP: CPPIDF1-2018-ND40-cat.1) validée par le ministère français de la recherche. Les échantillons biologiques ont été stockés au « Centre de Ressources Biologiques-Tumorothèque » (ICO, Saint-Herblain, F44800, France).

RESULTATS ET DISCUSSION

Chapitre 1 : Etude des voies de signalisations induites par BRD4 pour l'identification de nouvelles options thérapeutiques permettant d'inhiber la résistance au palbociclib dans le cancer du sein.

1. Préambule

Les cancers du sein hromonodépendants représentent la forme majoritaire de cancers du sein chez la femme. Malgré un arsenal thérapeutique largement développé, il subsiste des patientes pour lesquelles ces traitements ne sont pas adaptés. Celles-ci développent des métastases et de multiples résistances aux traitements, ce qui limite grandement leur espérance de vie. Le développement d'inhibiteurs des kinases dépendantes des cyclines 4 et 6 (ICDK4/6), comme le palbociclib, a cependant permis une nette augmentation de la durée de vie des patientes dans ce cas. Malheureusement, ces effets sont limités par l'existence de mécanismes de résistance innée et/ou acquise à ces inhibiteurs chez la majorité des patientes.

Comme détaillé précédemment, dans la littérature, un certains nombres d'acteurs ont été décrits comme impliqués dans la résistance aux iCDK4/6. Leur implication a souvent un lien directe avec l'inhibition du complexe de par la mise en place de « voies relais » permettant d'outrepasser le rôle du complexe inhibé. Cependant, toutes ses modifications de voies de signalisations nécessitent l'expression de nouveaux gènes, et donc, l'action des mécanismes épigénétiques. Ces acteurs majeurs du remodelage de la chromatine restent cependant très peu étudiés dans ce contexte. Notre étude a pour but de mettre en évidence certains de ces mécanismes impliqués dans la résistance aux iCDK4/6, tout en proposant une stratégie thérapeutique alternative permettant d'inhiber celle-ci et permettre de prolonger la réponse des patientes au traitement.

Pour ce faire, nous avons généré un modèle de cellules résistantes (MCF7) au palbociclib puis nous avons testé leur sensibilité à différents inhibiteurs d'acteurs épigénétiques. Notre screening a permis de mettre en évidence l'implication de la protéine BRD4 dans ce phénomène de résistance. BRD4 est une protéine a bromodomaine capable d'interagir au niveau de super-enhancers et d'activé la transcription de nombreux gènes. Elle est décrite comme acteur majeure de nombreux cancers. En combinant des analyses de 3'RNA-seq et de CHIP-seq-BRD4, nous avons souhaité identifier les gènes surexprimés par BRD4 dans notre modèle d'étude. En comparant ces données à des listes de molécules de thérapies ciblées déjà

autorisées sur le marché, nous avons voulu mettre en évidence de nouvelles cibles thérapeutiques en validant leur surexpression dans notre modèle et le regain de sensibilité au palbociclib en inhibant ces cibles. L'idée derrière cette étude est d'identifier des biomarqueurs prédictifs de vulnérabilités thérapeutiques permettant d'adapter le traitement au cours du temps et de créer de nouvelles combothérapies dynamiques pour minimiser au maximum l'apparition du phénomène de résistance.

2. Article soumis (voir annexe)

Deciphering the BRD4 pathway provides therapeutic options to overcome the Palbociclib resistance in breast cancer.

Florestan COURANT^{1,4}, Yuna LANDAIS^{1,2}, Gwénola BOUGRAS-CARTRON^{1,3,4}, Vincent GUEN^{1,4}, Elen GOUJON^{1,2}, Adrien BRETON^{1,3,4}, Julie ROUL^{1,3,4}, Philippe P JUIN^{1,3,4}, Aurélien SERANDOUR^{1,2}, Jean-Sébastien FRENEL^{1,3,4}, Pierre François CARTRON^{1,3,4*}

¹ CRCI2NA, INSERM, Université de Nantes, Nantes, France.

² Ecole Centrale Nantes, Nantes, France

³ Institut de Cancérologie de l'Ouest, Saint-Herblain, France.

⁴ SIRIC ILIAD, 44000 Nantes, France.

*Correspondance: pierre-francois.cartron@inserm.fr, CRCI2NA, INSERM 1307, CNRS 6075, Institut de Cancérologie de l'Ouest, Boulevard du Pr Jacques Monod, Saint Herblain, 44805, France.

Running title: Targeted therapy based on epimark detection

Keywords: epigenetics, targeted therapy, epimark, super-enhancer, personalized medicine, breast cancer.

ABSTRACT

Rationale: By targeting the cell-cycle machinery, the use of cyclin-dependent kinase 4 and 6 (CDK4/6) inhibitors such as Palbociclib, has remarkably improved the outcome of patients with HR+/HER2 advanced breast cancer. However, this outcome is still limited by the existence of intrinsic or acquired resistance mechanisms in a significant number of patients. Our study attempts to identify some of these resistance mechanisms while seeking to propose alternative therapeutic strategies likely to enhance the efficacy of CDK4/6 inhibitors and ultimately improve patient survival.

Methods: A cell culture model was firstly established to evaluate molecular mechanisms associated with the acquired Palbociclib-resistance phenomenon via integrative RNA-seq and CHIP-seq analyses. Organoids- and blood samples- derived from breast cancer patients were secondly employed to validate the cellular observations and extend the Palbociclib resistance observation to other CDK4/6 inhibitors.

Results: Using a Palbociclib-resistant MCF7 cell model and Palbociclib-treated breast cancer patient-derived organoids we show that Palbociclib induces hypomethylation-mediated BRD4 overexpression and that therapeutic targeting of BRD4 (JQ1 and OTX015) limits the Palbociclib resistance. Integration of BRD4 ChIPseq and RNAseq data identified MAP4K4 or MAPK12 along the BRD4 pathway as two others therapeutic vulnerabilities those targeting by the DMX-5804 and Doramapimod molecules increases the effectiveness of Palbociclib. Finally, longitudinal plasma samples treated with CDK4/6 inhibitors allowed us to show that *BRD4* hypomethylation occurs in 10/31 breast cancer patients treated with Palbociclib, and that BRD4 methylation status can be dynamic during the CDK4/6 inhibitors exposure.

Conclusions: Our work identifies the methylation level of *BRD4* as a blood biomarker that can help to identify the right time for the right patient to be treated with the therapies combining Palbociclib/CDK4/6 inhibitors with inhibitors of BRD4 or MAP4K4 or MAPK12 in a dynamic manner in order to prolong the efficacy of the Palbociclib/CDK4/6 inhibitors treatment.

INTRODUCTION

Endocrine therapy-based treatments are the cornerstone of therapy for HR+/HER2-metastatic breast cancer patients. Several approaches have been developed including direct targeting of ER with the use of selective ER modulators (SERMs) or selective ER degraders (SERDs), or blocking estrogen synthesis, by the use of aromatase inhibitors (AIs) in postmenopausal patients or ovarian function suppression (OFS) in premenopausal patients[1]. In the metastatic setting, resistance eventually occur and combination therapy has been developed to overcome this resistance as mTOR inhibitors (Everolimus) or PIK3CA inhibitors (Alpelisib)[2]. The most significant advance in the management of HR+/HER2-metastatic breast cancer over the last few years has been the introduction of a new class of agent, the CDK4/6 inhibitors, in combination with an endocrine therapy. Three agents (Palbociclib, Ribociclib and Abemaciclib) have been approved and incorporated into clinical practice in combination with ET both in first and second line settings, providing a significant overall survival benefit over placebo. CDK4/6 inhibitor is now approved in early breast cancer in the adjuvant setting. However, a subset of patients exhibit primary resistance and acquired resistance develops in almost all patients after a median exposure of 24–28 months as frontline therapy used [3] [4] [5].

Several studies were conducted in order to detect the presence of acquired resistance to targeted therapies. Those focused on CDK4/6 inhibitors hinted on several biomarkers associated with the acquired resistance to these inhibitors. Herrera-Abreu *et al.* (2016) found that cells acquiring resistance to CDK4/6 inhibitors due to *CCNE1* amplification [6]. *CCNE1* encoding for cyclin E1 and cyclin E1 interacting with CDK2, this work suggests that CDK2 inhibitor could abrogate the acquisition of resistance to CDK4/6 inhibitors. Yang *et al.* (2017) reported that the acquired CDK6 amplification promotes breast cancer resistance to CDK4/6 inhibitors [7]. Condrorelli *et al.* (2018) reported that the acquired resistance to CDK4/6 inhibitor was associated with the emergence of somatic RB1 mutations [8]. Li *et al.* (2018) report that the loss of FAT1 promotes resistance to CDK4/6 Inhibitors via the Hippo pathway [9]. Jansen *et al.* (2019) highlight a role for the PI3K-PDK1 signaling pathway in mediating acquired resistance to CDK4/6 inhibitors [10]. Formisano *et al.* (2019) showed that the aberrant FGFR signaling mediates resistance to CDK4/6 inhibitors in ER+ breast cancer [11]. The work of Del Re *et al.* (2019) indicated that, in plasma-derived exosomes, the increase in

TK1 and CDK9 mRNA copies/ml is associated with clinical resistance [12]. The work of McCartney *et al.* (2020) and Cabel *et al.* (2020) also incriminated TK1 as a signature of acquired resistance to Palbociclib [13][14].

Based on these works, several therapeutic strategies were proposed to prevent or abrogate the acquired resistance to CDK4/6 inhibitors. Thus, literature reported that the pharmacological inhibition of CDK2, PDK1 and PI3K in combination with CDK4/6 inhibitors can be used to restore the sensitive of cells to CDK4/6 inhibitors [15][10].

To expand the investigations on the combinatorial approaches aiming to restore the sensitivity of cells to CDK4/6 inhibitors, we here studied the effect of a panel of epigenetic drugs (epidrugs) since the use of these types of drugs is envisioned to overcome therapy resistance in cancer [16][17]. Based on this approach, we observed that breast cancer cells presenting a resistance to Palbociclib showed an increased sensitivity to JQ1, an epidrug targeting BET proteins such as BRD4. Our results associated the gain of JQ1 sensitivity with the BRD4 overexpression in a context of hypomethylation of *BRD4* gene. Thus, the methylation status of *BRD4* gene appears as a signature to combine JQ1 and Palbociclib in order to limit the loss of sensitivity to the Palbociclib therapy.

Materials and methods

A detailed description of the reagents, materials, equipment and software used in this article are provided in **Supplementary Table T3**.

Cell culture and treatment

The human breast cancer cell line MCF7 was obtained from ATCC (ATCC, #HTB22, US) and was cultured in DMEM medium (ThermoFisher Scientific, #11960044, France) supplemented with 10 % fetal bovine serum (Eurobio, #CVFCVF00-01, France), 1 % penicillin/streptomycin (ThermoFisher Scientific, #15140122, France) and 1 % glutamine (ThermoFisher Scientific, #A2916801, France) in a humidified incubator at 37 °C with 5 % CO₂. Chemotherapeutic agents (MedChemExpress, France) were dissolved in PBS/5% dimethylsulfoxide solution (DMSO; Sigma-Aldrich, France). PBS/5% dimethylsulfoxide solution was used as control treatment.

Proliferation assay and doubling time.

Doubling time (i.e. the period of time required for a quantity to double in size) was calculated by using the Doubling Time Online Calculator website (Roth V. 2006, <http://www.doubling-time.com/compute.php>) and counting the proliferation of 10^3 cells over 120 hours. Cell number was determined, every 24h over 120h, using a Scepter™ 2.0 Cell Counter (Merck-Millipore, France).

Cell viability assay

Cell viability was measured using the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay. Briefly, MCF7 cells were seeded overnight into 96-well plates at a density of 500 cells/well in 0.100 mL of complete medium. Chemotherapeutic agents were then added for 72 h. After incubation, 10 μ L of MTT (10 μ 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 μ L/well of DMSO was added to measure the optical density at 570 nm using a spectrophotometer (VICTOR, Perkin-Elmer, France).

Organoids culture

Patient derived organoid cultures were performed essentially as described in Lohard *et al.* (2020)[18] using breast cancer tissues from patients that underwent surgical tumor resection in the Institut de Cancerologie de l'Ouest, Rene Gauducheau, Nantes, France, after informed consent (THEREX protocol) and employing the protocol described by Sachs *et al.* (2018)[19]. Briefly, isolated cells were plated in adherent basement membrane extract drops (Cultrex Pathclear Reduced Growth Factor BME, Biotechne), and overlaid with optimized breast cancer organoid culture medium. Medium was changed every 4 days and organoids were maintained in culture from 7-14 days before Palbociclib treatment (10 μ M) for 3 days. Immunofluorescence staining of organoids was performed as described by Wilson *et al.* (2021)[20]. Briefly, organoids fixed in 4% paraformaldehyde for 30 min were permeabilized with 0.3% Triton X-100 for 30 min, and blocked with 5% goat serum before staining. The following antibodies were used: anti-BRD4 antibody (1:25) and anti-mouse IgG2b 488 (1:500;

Life Technologies A21141). Hoechst was used to stain DNA. Organoids were embedded in low-melting point agarose and analyzed using a Lightsheet Z1 Zeiss microscope.

Chromatin immunoprecipitation

Cells (2×10^7) were crosslinked with 1% formaldehyde/PBS for 10 min at RT, quenched with 0,25 M glycine for 2 min at RT and washed twice with ice-cold PBS. Cells were scraped in 0,5 mL ice-cold PBS containing 1X Complete Protease Inhibitor Cocktail (Roche) and centrifuged at 4°C at 800 g for 5 min. Cell pellet were then lysed for 10 minutes at 4°C with 10 mL of LB1 buffer (50 mM Hepes pH 7.5, 140 mM NaCl, 1 mM EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid), 10% glycerol, 0.5% NP-40 and 0.25% Triton X-100). After 5 min of centrifugation at 2000 g, the pellet was then dissolved in 10 mL of LB2 buffer (10 mM Tris pH 8.0, 200 mM NaCl, 1 mM EDTA and 0.5 mM EGTA) for 5 minutes at 4°C. Finally, the lysate was cleared by centrifugation at 2000 g for 5 min at 4°C. The pellet obtained was suspended in LB3 buffer (10 mM Tris pH 8.0, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.5 mM EGTA, 0.1 % Na-deoxycholate and 0.5 % N-lauroylsarcosine) and sonicated for 3 cycles of 7 minutes (30 seconds ON / 30 seconds OFF) (Bioruptor Plus sonication device, Diagenode, Belgium). After adding Triton X-100 at 1 % final, the mixture was clarified by centrifugation at 20,000 g for 10 minutes at 4°C. Chromatin from 2×10^7 cells was incubated with antibody bound magnetic beads (4 µg anti-BRD4, #C15410337, Diagenode, France) at 4°C overnight with rotation. The next day, beads were washed 6 times in 1 mL of RIPA buffer on ice and two times with Tris-HCl 10 mM pH 8. Chromatin was eluted from beads by incubating in 100 µL Elution Buffer (50 mM Tris-HCl pH 8, 10 mM EDTA, 1 % SDS, 50 µg/mL Proteinase K) overnight at 65°C under agitation. Finally chromatin was incubated with 50 µg/mL RNase A for 30 min at 37°C. After separating the supernatant from beads, chromatin has been cleaned up using NucleoMag NGS beads (Macherey-Nagel #744970, France) and library preparation was performed using NEB Next Ultra II DNA Library Prep Kit for Illumina (NEB #E7645S, France) and NEB Next Multiplex Oligos (NEB #E7600S, France) for dual indexing. Libraries were pooled and sequenced by Illumina NovaSeq 6000.

RNA extraction and RNA-seq analysis

RNA extractions were performed using RNeasy kit (Qiagen, # 74116, France) according to the manufacturer's instructions. The 3'-RNA-seq libraries were produced from 500ng of RNA and

sequenced by the Illumina NovaSeq 6000 by the GenoBird platform (Nantes, France) (DOI: <https://doi.org/10.21203/rs.3.pex-1336/v1>). Differential gene expression analysis was done using R v3.6.3 and the R package DESeq2 v1.24.0 (<https://doi.org/10.1186/s13059-014-0550-8>). Finally, the R packages ggplot2 v3.3.4 (Wickham, H., 2016. ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis, Springer-Verlag New York. Available at: <https://ggplot2.tidyverse.org>) and ggrepel v0.9.1 (Slowikowski K., 2021. ggrepel: Automatically Position Non-Overlapping Text Labels with 'ggplot2'. Available at: <https://cran.r-project.org/package=ggrepel>) were used to make the volcano plots. P-values were corrected using the Benjamini-Hochberg method to account for the numerous tests conducted. To determine the genes with significant differential expression, we used the thresholds 2.5 fold-change and 0.05 adjusted p-value. RNA-seq data are available on European Nucleotide Archive (accession number: XXX).

ChIP-seq analysis

The BRD4 ChIP-seq libraries were sequenced by the Illumina NovaSeq 6000 by the GenoBird platform (Nantes, France). Fastq files were quality checked thanks to FastQC v0.11.5 (Andrews S. (2010). FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. Available online at: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>). The reads were adapter-trimmed and quality-filtered using 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. available online at https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/trim_galore/). Reads were aligned with bowtie2 v2.3.1[21] to the reference genome hg38. Finally, the identification of BRD4 peaks was done using MACS2 v2.2.6 (<https://doi.org/10.1186/gb-2008-9-9-r137>) with default parameters. The BRD4 peaks were merged into a common set of peaks standardized between replicates and conditions with bedtools v2.26.0 (<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq033>). Thresholds 2.5 and 10^{-10} were used respectively for fold-change and adjusted p-value. ChIP-seq data are available on European Nucleotide Archive (accession number: XXX).

Immunoblot analysis

Cells ($6 \cdot 10^6$) were resuspended in RIPA lysis buffer (#89901, ThermoFisher, France) and sonicated with Bioruptor apparatus from Diagenode (sonicated for 3 cycles of 7 minutes (30

seconds ON / 30 seconds OFF). Protein concentration was measured using bicinchoninic acid (BC Assay protein quantitation kit, Interchim, #3082, France). Fifty micrograms of proteins were loaded in 4–12% Mini-PROTEAN TGX Precast protein Gels (Bio-Rad, France), and transferred to PVDF membrane. Membranes were blocked in 3% milk for 1h, incubated with the primary antibody overnight at 4°C, washed, and incubated with the appropriate horseradish-conjugated secondary antibody for 1h at 37°C. An enhanced chemiluminescent (ECL) kit and the Molecular Imager® ChemiDoc™ system (Bio-Rad, France) were used to visualize the signal. The antibodies used are defined in Supplementary Table T3.

DNA and cfc DNA extraction

A QIAcube automate, QIAmp DNA Mini QiaCube and QIAmp Circulating Nucleic Acid kits (Qiagen, # 51326 and # 55114, France) were used to isolate DNA from tumor and plasma, respectively.

qMSRE Assay

Digestions were performed with the Hpy166II restriction enzyme (NEB, #R0616S, France). Typically, 10-100ng of genomic DNA were digested with 40 U of enzymes at 37°C for 2h in 50 µl of reaction. Control samples were treated in the same way but without addition of the enzyme. 5 µl of digested and undigested mixtures were used for qPCR using QuantiFast SYBR Green PCR Kit (Qiagen, #204057, France) and Rotor-Gene Q (Qiagen, France). The primers used in these qPCRs are defined in Supplementary Table T3. Methylation level was next calculated using Ct values from qPCRs performed with digested and undigested DNA and the $100 \times 2^{-\Delta Ct}$ formula.

ELISA

All ELISA kits (MyBiosource, #MBS945281, #MBS917832, #MBS166992 and #MBS4500903, US) were used in accordance with the recommendations of the manufacturers.

siRNA transfection

siRNA-BRD4 (ThermoFisher, #AM16708, France) and siRNA-TET2 (Sant Cruz, #sc-88934, France) were transfected in cells. siRNA-A (Santa Cruz, #sc-37007, France) i.e. a scrambled sequence devoid of specific degradation of any cellular message was used as control. In a six wells culture plate, $2 \cdot 10^5$ cells were incubated for 24h at 37°C in CO₂ incubator. Then, 60pmol of siRNA were incubated on cells for 7h at 37°C in a CO₂ incubator. Without removing the siRNA mixture, we next added 1 ml of normal growth medium containing 2 times the normal serum and antibiotics concentration, for 24h. Then, cells were expensed for 48h in normal culture medium. Thus, analyses were realized about 72h after the siRNA incubation.

Statistical analysis and results

Except when indicated, data are representative of the mean and standard deviation calculated from three independent experiments. Significance of the differences in means \pm standard deviations was calculated using the Student-t test. The significance of correlation between two parameters was calculated using Pearson's test. $p < 0.05$ was used as a criterion for statistical significance.

Patients data

Plasma was collected from patients treated at the "Institut de Cancérologie de l'Ouest" (ICO, <http://www.ico-cancer.fr>). All patients recruited gave signed, informed consent. All the samples collected and the associated clinical information were registered in the database (EPICURE-Sein CPP: CPPIDF1–2018-ND40-cat.1) validated by the French research ministry. Biological resources were stored at the "Centre de Ressources Biologiques-Tumorotheque (CRB)" (Institut de Cancérologie de l'Ouest, Saint-Herblain, F44800, France)[22].

RESULTS

Identification of BRD4 as a therapeutic vulnerability in Palbociclib-resistant cells

To determine whether pharmacologically tractable epigenetic changes contribute to Palbociclib resistance, we first generated Palbociclib-resistant MCF7 cells by culturing MCF7 cells in presence of 1 μ M of Palbociclib three times per week during 4 consecutive weeks (**Figure 1A**). The IC₅₀ of the Palbociclib-exposed MCF7 cells was six times higher than the one of parental MCF7 cells (4.286 μ M and 0.752 μ M respectively) (**Figure 1B**). Thus, Palbociclib-

exposed MCF7 cells were named Palbociclib-resistant MCF7 cells (MCF7-PalboR), while parental MCF7 cells were named Palbociclib-sensitive MCF7 cells (MCF7-PalboS). Notably, transcriptomic characterization of the MCF7-PalboR cells exhibited molecular signatures associated with Palbociclib resistance by previous studies. At transcriptional level, our data indicated that MCF7-PalboR cells were characterized by the overexpression *CCNE1*^{mRNA} as suggested by several articles [6]-[23]-[24], the partial presence of the RBsig defined by Malorni *et al.* (2016)[25], the overexpression of *CDK9*^{mRNA} in exosome/extracellular vesicles but not by the overexpression of *TK1*^{mRNA} in exosome/extracellular vesicles such as described by Del Re *et al.* (2019)[12] (**Supplementary figure S1**).

To determine whether epidrugs could be used to reverse the resistance to Palbociclib, we analyzed the impact of four epidrugs on the doubling time of MCF7-PalboR namely Vorinostat (HDACs inhibitor, CAS N°: 149647-78-9); Decitabine (DNMTi, CAS N°: 2353-33-5), Bizine (LSD1 inhibitor, CAS N°: 1591932-50-1), JQ1 (BRD4 inhibitor, CAS N°: 1268524-70-4).

Our study indicated that JQ1 was the most efficient epidrug to increase the doubling time of MCF7-PalboR cells (**Figure 1C**). To explain this gain of JQ1 sensitivity at molecular level, we hypothesized that MCF7-PalboR cells could overexpress BRD4 since this protein is the selective target of JQ1 [26]. Western blot (**Figure 1D and Supplementary Figure S2**) and ELISA (**Supplementary Figure S3**) analyses indicated that BRD4 was overexpressed in MCF7-PalboR in comparison with MCF7-PalboS. Our data also associated this overexpression with the *BRD4* hypomethylation (**Figure 1E**). Supplementary investigations indicated that the *BRD4* hypomethylation was associated with the increase of TET2 recruitment on *BRD4* and the decrease of DNMT1 recruitment on *BRD4* (**Supplementary Figure 4A**). The fact that the siRNA-mediated down-expression of TET2 increased the *BRD4* methylation and repressed the BRD4 expression in MCF7-PalboR cells also supported the idea that TET2 plays a crucial role on the hypomethylation-mediated BRD4 overexpression in these cells (**Supplementary Figure 4B**).

To determine whether the Palbociclib-induced hypomethylation-mediated overexpression of BRD4 is specific to MCF7 cells or not, these two parameters were analyzed in parallel from organoids of primary cancer cells derived from two distinct breast cancer patients. After a three days treatment with Palbociclib, we observed that some organoids derived from patient#2 showed overexpression BRD4 and harbored a hypomethylation of *BRD4* gene (**Figure 1F**).

To confirm that BRD4 overexpression could be exploited as a therapeutic vulnerability of MCF7-PalboR cells by means other than JQ-1 treatment, we compared the effect of OTX015 (Birabresib or MK-8628 CAS N°: 202590-98-5) a BRD4 inhibitor used in breast cancer clinic trial (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT02698176 and NCT02259114), on MCF7-PalboS and MCF7PalboR cells. Our data indicate that the Palbociclib+OTX015 combotherapy was more effective on MCF7-PalboR than on MCF7PalboS (IC50: 8.82 nM and 341.46 nM respectively) **(Figure 1G)**.

Altogether these results support the idea that BRD4 could be used as a therapeutic target to overcome the Palbociclib resistance that this vulnerability can be detected via the study of BRD4 methylation status.

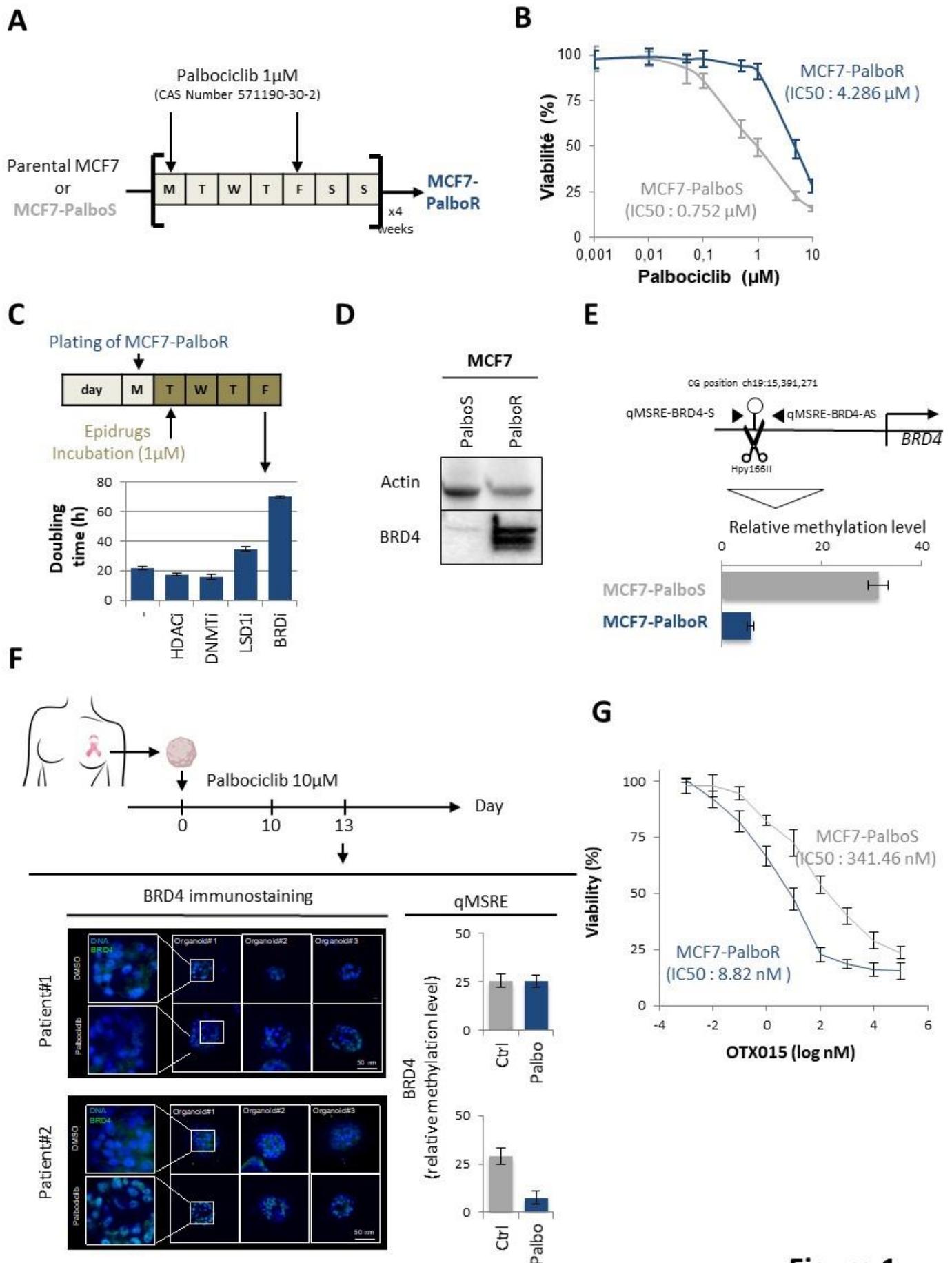


Figure 1

Figure 1. Identification of BRD4 as a therapeutic vulnerability during the Palbociclib resistance.

A. Schematic representation of the Palbociclib treatment of MCF7 cells in order to make them resistant to this molecule.

B. Dose-response curve used to calculate the IC₅₀ of Palbociclib.

C. Impact of an epigenetic drug panel on the doubling time of MCF7-PalboR cells. Here, doubling time was calculated following cell counting (Scepter™ 2.0 Cell Counter) 72h after incubation of 1mM HDACi/Vorinostat, DNMTi/Decitabine LSD1i/Phenelzine Sulfate and BRDi/JQ1.

D. Western blot illustrating the overexpression of BRD4 within MCF7-PalboR cells compared to MCF7-PalboS cells. Actin is used here as an internal loading control.

E. The level of BRD4 methylation is here analyzed by qMSRE using a restriction enzyme and primers allowing analysis of the GC at ch19:15,391,271.

F. Impact of Palbociclib on BRD4 expression and methylation level within organoids derived from two distinct breast cancer patients. Organoids treated with DMSO or Palbociclib (10 μM, 3 days) were stained for BRD4. The methylation level is analyzed by qMSRE following DNA extraction from the organoids.

G. Dose-response curve used to calculate the IC₅₀ of OTX015 from MCF7-PalboS and MCF7- PalboR cells.

Identification of two new therapeutic vulnerabilities from BRD4 pathway deciphering

BRD4 being considered as a dominant positive transcriptional regulator [27], we sought to identify genes directly up-regulated by BRD4 in MCF7-PalboR. For this purpose, we combined the RNAseq and BRD4-ChIPseq approaches.

RNAseq experiments showed that 640 genes were differentially expressed between MCF7-PalboS and MCF7-PalboR cells: 278 transcripts were up-expressed in MCF7-PalboR (**Figure 2A**). BRD4-ChIPseq experiments shown that 50 genes were differentially co-immunoprecipitated with BRD4 between MCF7-PalboS and MCF7-PalboR cells: 37 genes were « over-ChIPed » in MCF7-PalboR (**Figure 2B**). Finally, 26 genes were commonly « over-ChIPed » with BRD4 and overexpressed in MCF7-PalboR cells (**Figure 2C and Supplementary Table T1**). Interestingly, the use of the Enrichr website and MsigDB Hallmark resource indicated that the BRD4 targets [28] were associated with “the estrogen responses early and late “and the “KRas signaling up” (**Figure 2C**), while the use of GONet indicated the presence of 4 kinases including MAPK12 and MAP4K4 (**Figure 2C and Supplementary Figure S5**). Interestingly, the interplay of these genes with a list of targeted therapies used in clinical or preclinical trials (according to clinicaltrials.gov and preclinicaltrials.eu) predicted the existence of 2 target/targeted therapy pairs: MAP4K4/DMX-5804 and MAPK12/Doramapimod. In other terms, this finding suggests the existence of 2 potential therapeutic vulnerabilities in MCF7-Palbo-R cells mediated by the BRD4 overexpression.

To investigate this point, we sought to validate the fact that BRD4 regulated the MAPK12 and MAP4K4 expression. For this purpose, the MAPK12 and MAP4K4 expression were analyzed in MCF7-PalboR cells treated with siRNA directed against BRD4. In addition to confirm that the acquisition of Palbo-resistance was associated with the BRD4 overexpression, ELISA assay indicated that siRNA directed against BRD4 decreased the MAPK12 and MAP4K4 expression (**Figure 2D**). Finally, we analyzed the impact on MCF7- PalboS/R cells of therapies combining Palbociclib with DMX-5804 (a MAP4K4 inhibitor) or Doramapimod (a MAPK12 inhibitor). Thus, MCF7-PalboS and -PalboR cells were therefore treated with Palbociclib alone or in combination with DMX-5804 and Doramapimod. The DMX-5804 and Doramapimod doses (5nM) were chosen to induce less than 5% PBMC death (**Supplementary Figure S6**). Interestingly, we noted that the combination of Palbociclib+DMX-5804 and Palbociclib+Doramapimod reduced the viability of MCF7-PalboR cells while the individual use

of these molecules has no effect (**Figure 2E**). We also observed that the Palbociclib+DMX-5804 and Palbociclib+Doramapimod combotherapies had no greater effect on MCF7-PalboS cell viability than Palbociclib alone (**Supplementary Figure S7**).

All these results indicated that the deciphering of the BRD4 pathway identifies DMX-5804 and Doramapimod as news therapeutic options to overcome the Palbociclib resistance.

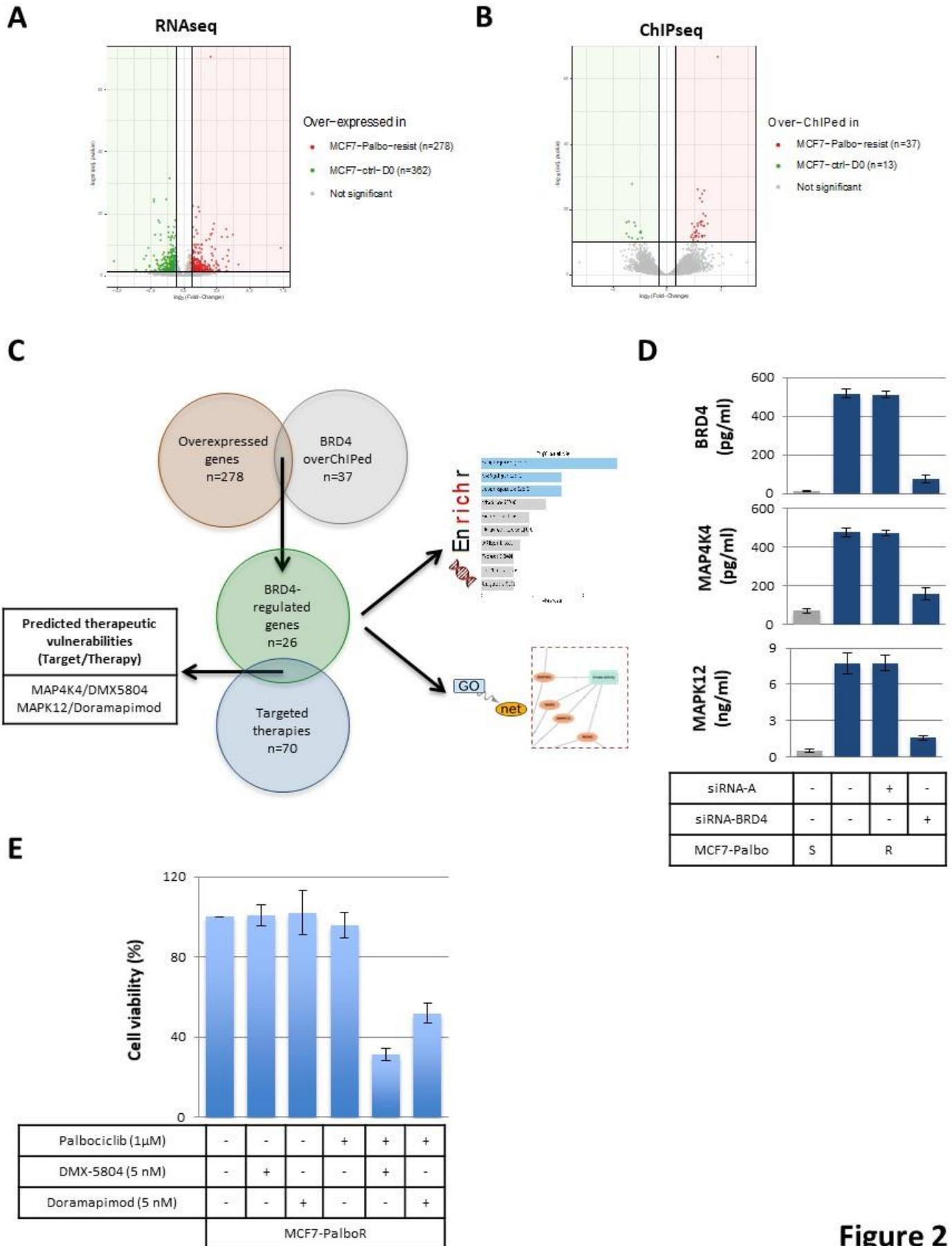


Figure 2

Figure 2. Identification of two new therapeutic vulnerabilities from BRD4 pathway deciphering.

A. Volcano plot representing differentially expressed transcripts between MCF7-PalboS and MCF7-PalboR cells. The log₂ FC indicates the mean expression level for each transcript. Each dot represents one transcript. Grey dots represent no significant differentially expressed transcripts between MCF7-PalboS and MCF7-PalboR cells. Green dots represent transcripts overexpressed in MCF7-PalboS cells compared to MCF7-PalboR cells and red dots represent transcripts over-expressed in MCF7-PalboR cells compared to MCF7-PalboS cells.

B. Volcano plot representing genes differentially co-immunoprecipitated with BRD4 between MCF7-PalboS and MCF7-PalboR cells. Each dot represents one gene. Grey dots represent genes whose differential presence in BRD4-ChIP products is not significant. Green dots represent genes sub-expressed in BRD4-ChIP products in MCF7-PalboR cells versus MCF7-PalboS cells and red dots represent genes over-expressed in BRD4-ChIP products in MCF7-PalboR cells versus MCF7-PalboS cells.

C. Schematic representation of the integration of RNAseq and BRD4-ChIPseq data to predictively identify genes encoding for potential therapeutic vulnerabilities. This schematic also includes the results of Enrichr and GONET analyses performed on the 26 genes identified as differentially regulated by BRD4 in our cells.

D. Analysis of the impact of siRNA-mediated downexpression of BRD4 on the MAP4K4 and MAPK12 expression. The graphs represent the results of ELISA analyses performed 72h after siRNA transfection. siRNA-A is a non-targeting 20-25 nt siRNA designed as a negative control (Santa Cruz, France).

E. Graph representing the impact of Palbociclib, DMX-5804 and Doramapimod (alone or in combination) on MCF7-PalboR cells. The percentage of cell viability was calculated here from MTT assays performed 72h after the incubation of the indicated molecules.

Analysis of *BRD4* methylation level in breast cancer patients treated with Palbociclib

We extended our study by analyzing the *BRD4* methylation level in cell-free circulating DNA (cfc*BRD4*^{methylation}) of patients treated with frontline CDK4/6 inhibitors + endocrine therapy for HR+/HER2- metastatic breast cancer since *BRD4* hypomethylation was also observed in MCF7 cells treated with Abemaciclib and Ribociclib (**Supplementary Figure S8**).

A first analysis performed from blood samples of 31 breast cancer patients treated with CDK4/6 inhibitors (**Supplementary Table T2**) showed that the tumor progression was accompanied in 32% (10/31) of cases by the *BRD4* gene hypomethylation i.e. a 2-fold decrease in the cfc*BRD4*^{methylation} level between the start of the CDK4/6 inhibitor treatment and our second time point of investigation (**Figure 3A**).

We also performed a second analysis based on the use of longitudinal blood samples of two breast cancer patients treated with Palbociclib. Based on conventional imaging, we observed tumor progression occurred for Patient#A 254 days after initiation of the Palbociclib treatment. During this period of time, we showed a decrease of cfc*BRD4*^{methylation} during Palbociclib therapy (**Figure 3B**). In other terms, we here observed a hypomethylation of *BRD4* during Palbociclib therapy. Patient#B received Palbociclib during 693 days before tumor progression. During this period of time, the cfc*BRD4*^{methylation} oscillated with periods of hypomethylation (methylation level lower than the initial level at T0) and hypermethylation (methylation level higher than the initial level at T0) (**Figure 3C**). Interestingly, the *BRD4* methylation level in buffy coat cells of patients #A and #B was stable during Palbociclib treatment. This result suggests that the *BRD4* methylation changes observed in cfcDNA are not influenced by buffy coat cell DNA.

In conclusion of these two analyses, it appears that *BRD4* hypomethylation may be a fairly frequent signature (about 1/3) at the time of progression of patients treated with Palbociclib. This may suggest that one third of Palbociclib-treated patients may receive Palbociclib+OTX015 or Palbociclib+DMX-5804 or Palbociclib-Doramapimod combination therapy to overcome the Palbociclib resistance. However, longitudinal analysis in patient#B indicates that the decrease in *BRD4* methylation level may not be linear. This imposes the need to perform longitudinal sampling between the time of Palbociclib administration and the time of tumor progression and thus to adopt dynamically the administration of

Palbociclib+OTX015 or Plabociclib+DMX-5804 or Palbociclib-Doramapimod combination therapies.

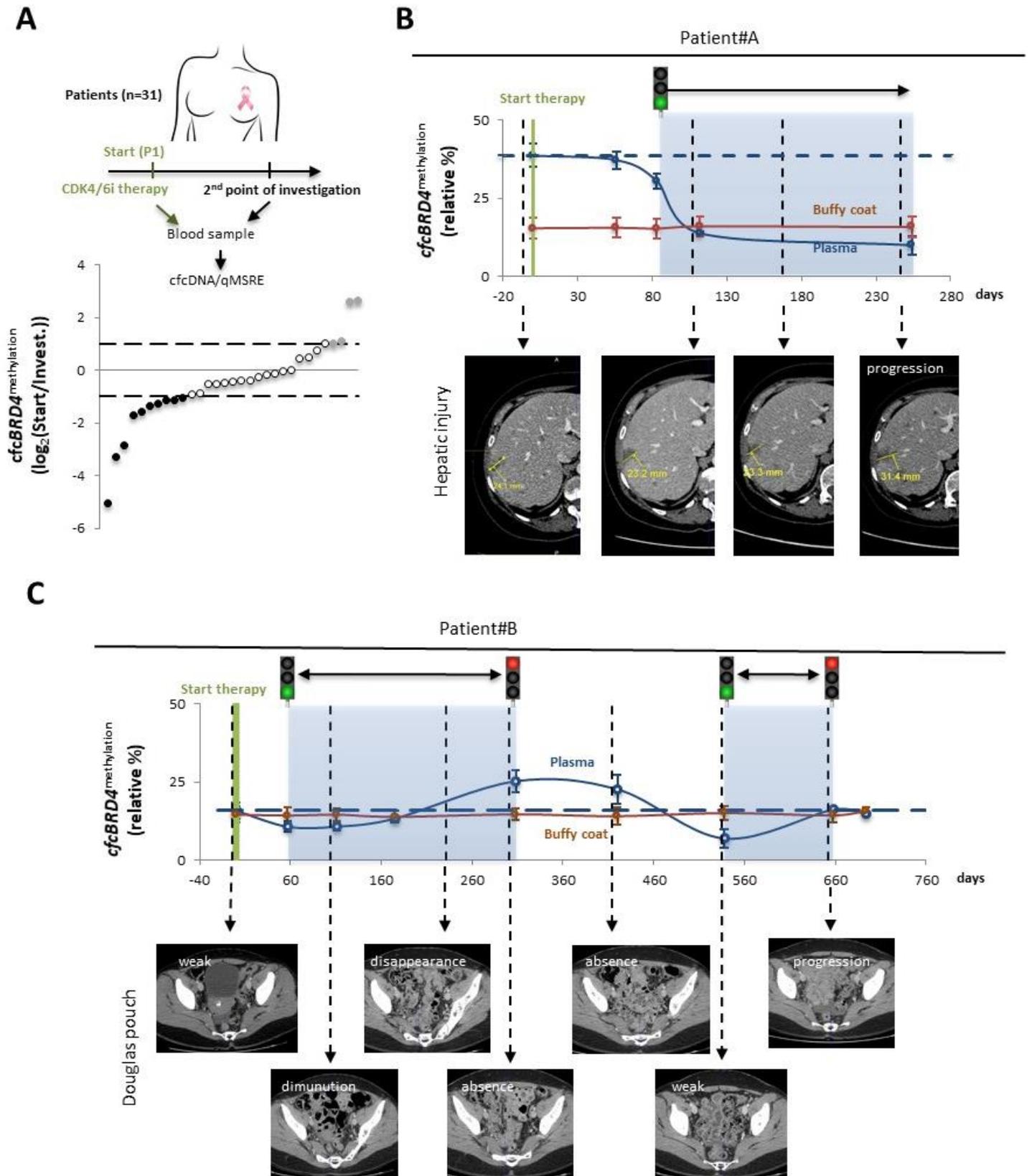


Figure 3

Figure 3. Analysis of *BRD4* methylation level in breast cancer patients treated with CDK4/6 inhibitor therapy

A. Graph illustrating the analysis of the evolution of *BRD4* methylation level between the beginning of the CDK4/6 inhibitor treatment and the second point of investigation. Each point represents a patient (n=31). Black points represent patients in whom the *BRD4* methylation level decreased by at least a factor of 2. The grey dots represent patients in whom the *BRD4* methylation level increased by at least a factor of 2. The white dots represent patients with *BRD4* methylation levels between these 2 values.

B and C. Analysis of *BRD4* methylation levels from longitudinal blood samples collected from a breast cancer patient between the start of Palbociclib treatment and the diagnosis of progression. Each point represents a sampling date. *BRD4* methylation level is calculated by qMSRE performing from cfcDNA (plasma, blue) and buffy coat cells issue to longitudinal blood samples (brown). The blue dashed line represents the initial level of *BRD4* methylation in cfcDNA/plasma. Medical imaging is used here to follow tumor progression via evaluation of hepatic injury (B) or Douglas pouch (C). Traffic lights and blue boxes delimit the putative periods of combotherapies.

DISCUSSION

Recent advances in the understanding of the molecular mechanisms that drive the acquired resistance to the CDK4/6 inhibitors such as Palbociclib have provided meaningful progress. Indeed, as reported previously, several combination therapies have been and are currently under study to overcome the acquired resistance to the CDK4/6 inhibitors [29]. Still, much more has to be done in order to improve present therapeutic approaches in a context of personalized medicine in order to administrate the right combination therapy at the right patient at the right time. The present work was performed in this context and it establishes that that the use of a selective BRD4 inhibitor can reduce the proliferation of breast cells with acquired resistance to Palbociclib. Furthermore, our work provides proof of concept that the BRD4 methylation level in cfc-DNA could be used as a biomarker to identify an appropriate and personalized time window for the use of Palbociclib+OTX015, Palbociclib+DMX-5804 or Palbociclib+Doramapimod combination therapies.

Several works already support the interest of combining inhibitors targeting CDK4/6 and BRDs proteins. Thus, Burgoyne *et al.* (2020) developed a molecule, SRX3177, having the ability to inhibit the CDK4/6 and BRDs proteins (in reality, SRX3177 has a triple action against CDK4/6, BET and PIK proteins) [30]. Ge *et al.* (2020) reported a synergic effect of JQ1 (a BRD4 inhibitor) and Palbociclib in the triple-negative breast cancer since Palbociclib combined with JQ1 induced significant cell-cycle arrest and a moderate apoptosis [31]. Our study complements these data by showing that BRDi could be used to restore the sensitivity of Palbociclib-resistant cells.

In addition, our data also identified DMX-5804, a MAP4K4 inhibitor (CAS N°:2306178-56-1) and Doramapimod (CAS N°: 285983-48-4), a MAPK12 inhibitor as two molecules susceptible to combine with Palbociclib to overcome the Palbociclib resistance. Initially developed to target MAP4K4 and promote cardio-protection following heart attacks, MAP4K4 inhibitors (such as DMX-5804) emerges since several years as a target in cancer [32] [33]. Indeed, Prolo *et al.* (2019) reported that the inhibition and CRISP-Cas9 invalidation of MAP4K4 limit glioblastoma invasion [34]. Similarly, Liu *et al.* (2011) reports that the shRNA invalidation of MAP4K4 inhibits the hepatocellular carcinoma growth [35]. As our data that support the idea to combine MAP4K4 inhibitor with Palbociclib, a project from the Jesse Brown VA medical

Center (Chicago, US) also envisions to combine MAP4K4 inhibition and immunotherapy in pancreatic cancer (<https://grantome.com/grant/NIH/I01-BX004903-01A1>). The use of MAPK12 inhibitors seems beginning to emerge in oncology since their first indication are against rheumatoid arthritis (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT02214888) or Crohn's disease (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT02209792). Recently, Ma et al (2021) report that the use of Doramapimod limits the increased proliferation of GBM [36], and Shi *et al.* (2021) report that the use of Doramapimod limits the proliferation and invasion of non-small cell lung cancer [37].

The identification of MAP4K4 and MAPK12 as therapeutic targets to restore the sensitivity of Palbociclib resistant cells stems from our work investigating the differential targets of BRD4 between Palbo-sensitive and -resistant cells. Indeed, the integration of differential RNAseq and differential BRD4 ChIPseq data revealed 26 genes overexpressed and binding BRD4 in Palbo-R cells compared to Palbo-S cells. Among these 26 genes is MAP4K4. The fact that the use of MAP4K4 and MAPK12 inhibitors is comparable to that of BRDi suggests that the use of MAP4K4i and MAPK12i could be an alternative to BRDi for which the literature describes acquired resistance phenomena in the treatment of breast cancer [38] [39]. Moreover, Ge et al (2020) have characterized the acquired resistance to Palbo/JQ1 combination treatment at a single cell level by showing heterogeneous mechanisms including activation of G1-S and senescence pathways in triple-negative breast cancer [31].

In addition to the concept of using MAP4K4 or MAPK12 inhibitors as alternatives to BRDi in order to limit the acquisition of resistance to BRDi/Palbociclib combination, the interpretation of our data brings another alternative solution. Indeed, the demonstration of *BRD4* methylation as a biomarker for the use of BRDi, MAP4K4i or MAPK12 could allow to combine them with Palbociclib in a dynamic way: administration in case of *BRD4* hypomethylation and stop of administration in case of hypermethylation. In other words, the clinical translation of our results could allow the development of dynamic combination therapy schedule in which Palbociclib would be administered continuously and BRDi, MAP4K4i and MAPK12i would be administered discontinuously or intermittently according to *BRD4* methylation status. Of course the implementation of combination therapy requires many precautions and not all therapies can be combined because of too important side effects. In this respect, the website

(<https://gdsc-combinations.depmap.sanger.ac.uk>) and the work of Jaaks et al (2022) list several combination therapies of interest for the treatment of breast cancer [40]. In addition to proposing different combination therapies, our work suggests that their administration be dynamic in the sense that one molecule (Palbociclib) would be administered continuously and the second (OTX015, DMX-5804 and Doramapimod) would be administered discontinuously or intermittently. Thus, through this point, our work raises the question of the challenge of optimizing the scheduling of combination therapy in order to maximize the effect while limiting the appearance of side effects and resistance phenomena such as discussed by Lopez and Banerji (2017) [41].

Interestingly, the study of *BRD4* methylation level in 2 patients showed the existence of different evolutionary profiles. In the first patient, we observed a rather pronounced and rapid hypomethylation of *BRD4* suggesting that this patient could have been early eligible for Palbociclib+BRDi/MAP4K4i/MAPK12i combination therapy in which BRDi, MAP4K4 or MAPK12i could have been administered in alternation so as not to induce resistance to the considered combination therapy. In the second patient, the oscillation of the *BRD4* methylation level suggests that this patient could have been placed on a dynamic Palbociclib+BRDi or MAP4K4i or MAPK12i combination therapy which would have been administered during the *BRD4* hypomethylation phases only (the patient being treated with Palbociclib only during the hypermethylation phases). A complementary study carried out in a patient treated with hormone therapy shows that the *BRD4* methylation level does not vary during this therapy (**Supplementary Figure S9**). Without being able to generalize on this case, it seems nevertheless that the impact of a given therapy on the *BRD4* methylation level is not automatic. In any case, our work reinforces the idea of the need for a paradigm shift in which the combination therapy administration to overcome the acquisition of Palbociclib resistance would be done in real time according to the detection of biomarkers in the blood that signal the presence of vulnerability/therapeutic options (such as the modification of *BRD4* methylation).

In conclusion, our work has allowed to increase the knowledge on the *BRD4* pathway via the interplay of RNAseq and *BRD4* ChIPseq data, while identifying new therapeutic options likely to overcome the resistance to CDK4/6 inhibitors such as Palbociclib while proposing to

improve the detection of CDK4/6inhibitor-resistant patients (via the identification of a non: *cfcBRD4*^{methylation}) and their therapeutic management via the proposal of innovative combotherapies both in the molecules they combine and in their mode of administration (dynamic echoing to the *BRD4* methylation status).

Abbreviations

CDK: Cyclin-Dependent Kinase; cfcDNA: cell-free circulating DNA; MCF7-PalboS: MCF7 cells sensitive to Palbociclib; MCF7-PalboR: MCF7 cells resistente to Palbociclib; ChIP: Chromatin immunoprecipitation.

Acknowledgements

FC was supported by fellowships from “EpiSAVMEN/REGION PAYS DE LA LOIRE” research program. This paper was prepared in the context of the SIRIC ILIAD program supported by the French National Cancer Institute national (INCa), the Ministry of Health and the Institute for Health and Medical Research (Inserm) (SIRIC ILIAD, INCa-DGOS Inserm-12558). We thank Dr. B Ory (CRCI2NA) for critical reading of the manuscript.

This work was supported by grants (EpiSAVMEN) from REGION PAYS DE LA LOIRE and SIRIC ILIAD (INCa-DGOS Inserm-12558).

Authors' contributions:

PFC designed experiments and coordinated the project.

FC, YL, GCB, EG, AB, VG and JR and PFC performed all experiments. All authors interpreted and discussed the data.

PFC wrote the manuscript.

All authors have reviewed and approved the manuscript.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

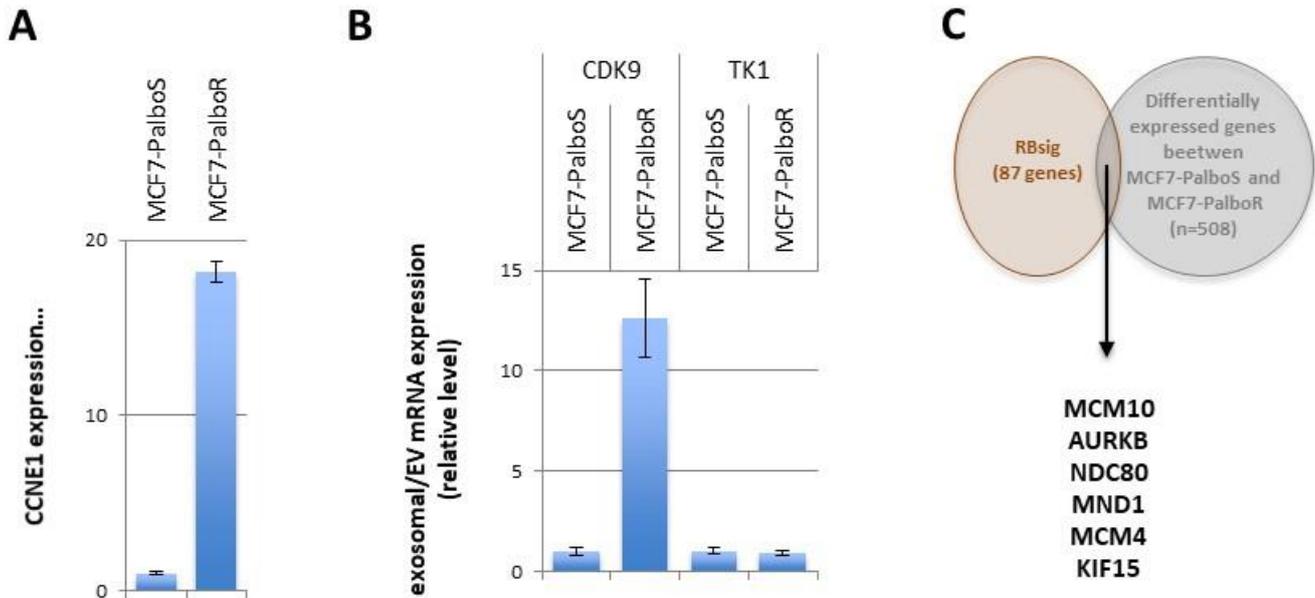
References

1. Brandão M, Maurer C, Ziegelmann PK, et al. Endocrine therapy-based treatments in hormone receptor-positive/HER2-negative advanced breast cancer: systematic review and network meta-analysis. *ESMO Open*. 2020; 5: e000842.
2. Zhu K, Wu Y, He P, et al. PI3K/AKT/mTOR-Targeted Therapy for Breast Cancer. *Cells* [Internet]. 2022 [cited 22 August 2022]; 11: 2508. Available at: <https://www.mdpi.com/2073-4409/11/16/2508>
3. Finn RS, Martin M, Rugo HS, et al. Palbociclib and Letrozole in Advanced Breast Cancer. *N Engl J Med*. 2016; 375: 1925–36.
4. Hortobagyi GN, Stemmer SM, Burris HA, et al. Ribociclib as First-Line Therapy for HR-Positive, Advanced Breast Cancer. *N Engl J Med*. 2016; 375: 1738–48.
5. Johnston S, Martin M, Di Leo A, et al. MONARCH 3 final PFS: a randomized study of abemaciclib as initial therapy for advanced breast cancer. *NPJ Breast Cancer*. 2019; 5: 5.
6. Herrera-Abreu MT, Palafox M, Asghar U, et al. Early Adaptation and Acquired Resistance to CDK4/6 Inhibition in Estrogen Receptor-Positive Breast Cancer. *Cancer Res*. 2016; 76: 2301–13.
7. Yang C, Li Z, Bhatt T, et al. Acquired CDK6 amplification promotes breast cancer resistance to CDK4/6 inhibitors and loss of ER signaling and dependence. *Oncogene*. 2017; 36: 2255–64.
8. Condorelli R, Spring L, O’Shaughnessy J, et al. Polyclonal RB1 mutations and acquired resistance to CDK 4/6 inhibitors in patients with metastatic breast cancer. *Ann Oncol*. 2018; 29: 640–5.
9. Li H-C, Chen Y-F, Feng W, et al. Loss of the Opa interacting protein 5 inhibits breast cancer proliferation through miR-139-5p/NOTCH1 pathway. *Gene*. 2017; 603: 1–8.
10. Jansen VM, Bhola NE, Bauer JA, et al. Correction: Kinome-Wide RNA Interference Screen Reveals a Role for PDK1 in Acquired Resistance to CDK4/6 Inhibition in ER-Positive Breast Cancer. *Cancer Res*. 2019; 79: 874.
11. Formisano L, Lu Y, Servetto A, et al. Aberrant FGFR signaling mediates resistance to CDK4/6 inhibitors in ER+ breast cancer. *Nat Commun*. 2019; 10: 1373.
12. Del Re M, Bertolini I, Crucitta S, et al. Overexpression of TK1 and CDK9 in plasma-derived exosomes is associated with clinical resistance to CDK4/6 inhibitors in metastatic breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat*. 2019; 178: 57–62.

13. McCartney A, Bonechi M, De Luca F, et al. Plasma Thymidine Kinase Activity as a Biomarker in Patients with Luminal Metastatic Breast Cancer Treated with Palbociclib within the TReND Trial. *Clin Cancer Res.* 2020; 26: 2131–9.
14. Cabel L, Rosenblum D, Lerebours F, et al. Plasma thymidine kinase 1 activity and outcome of ER+ HER2- metastatic breast cancer patients treated with palbociclib and endocrine therapy. *Breast Cancer Res.* 2020; 22: 98.
15. Herrera-Abreu MT, Palafox M, Asghar U, et al. Early Adaptation and Acquired Resistance to CDK4/6 Inhibition in Estrogen Receptor-Positive Breast Cancer. *Cancer Res.* 2016; 76: 2301–13.
16. Quagliano A, Gopalakrishnapillai A, Barwe SP. Understanding the Mechanisms by Which Epigenetic Modifiers Avert Therapy Resistance in Cancer. *Front Oncol.* 2020; 10: 992.
17. Strauss J, Figg WD. Using Epigenetic Therapy to Overcome Chemotherapy Resistance. *Anticancer Res.* 2016; 36: 1–4.
18. Lohard S, Bourgeois N, Maillet L, et al. STING-dependent paracrine shapes apoptotic priming of breast tumors in response to anti-mitotic treatment. *Nat Commun.* 2020; 11: 259.
19. Sachs N, de Ligt J, Kopper O, et al. A Living Biobank of Breast Cancer Organoids Captures Disease Heterogeneity. *Cell.* 2018; 172: 373-386.e10.
20. Wilson MM, Callens C, Le Gallo M, et al. An EMT-primary cilium-GLIS2 signaling axis regulates mammaryogenesis and claudin-low breast tumorigenesis. *Sci Adv.* 2021; 7: eabf6063.
21. Langmead B, Salzberg SL. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat Methods.* 2012; 9: 357–9.
22. Heymann D, Kerdraon O, Verrièle V, et al. Centre de Ressources Biologiques-Tumorothèque: Bioresources and Associated Clinical Data Dedicated to Translational Research in Oncology at the Institut de Cancérologie de l’Ouest, France. *Open Journal of Bioresources* [Internet]. 2020 [cited 2 September 2021]; 7: 5. Available at: <http://openbioresources.metajnl.com/articles/10.5334/ojb.62/>
23. Dowsett M, Kilburn L, Rimawi MF, et al. Biomarkers of Response and Resistance to Palbociclib Plus Letrozole in Patients With ER+/HER2- Breast Cancer. *Clin Cancer Res.* 2022; 28: 163–74.
24. Turner NC, Liu Y, Zhu Z, et al. Cyclin E1 Expression and Palbociclib Efficacy in Previously Treated Hormone Receptor-Positive Metastatic Breast Cancer. *J Clin Oncol.* 2019; 37: 1169–78.

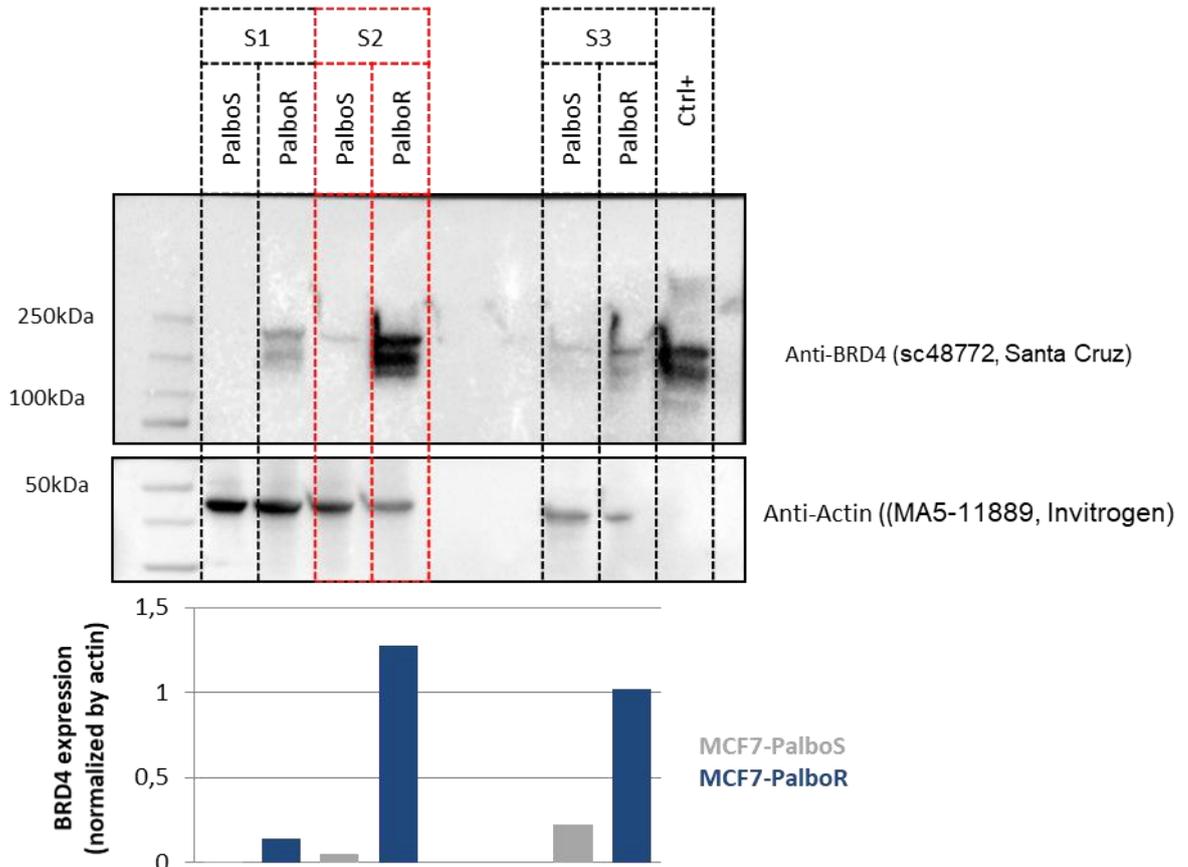
25. Malorni L, Piazza S, Ciani Y, et al. A gene expression signature of retinoblastoma loss-of-function is a predictive biomarker of resistance to palbociclib in breast cancer cell lines and is prognostic in patients with ER positive early breast cancer. *Oncotarget*. 2016; 7: 68012–22.
26. Filippakopoulos P, Qi J, Picaud S, et al. Selective inhibition of BET bromodomains. *Nature*. 2010; 468: 1067–73.
27. Donati B, Lorenzini E, Ciarrocchi A. BRD4 and Cancer: going beyond transcriptional regulation. *Mol Cancer*. 2018; 17: 164.
28. Xie Z, Bailey A, Kuleshov MV, et al. Gene Set Knowledge Discovery with Enrichr. *Curr Protoc*. 2021; 1: e90.
29. Rampioni Vinciguerra GL, Sonogo M, Segatto I, et al. CDK4/6 Inhibitors in Combination Therapies: Better in Company Than Alone: A Mini Review. *Front Oncol*. 2022; 12: 891580.
30. Burgoyne AM, Vann KR, Joshi S, et al. A triple action CDK4/6-PI3K-BET inhibitor with augmented cancer cell cytotoxicity. *Cell Discov*. 2020; 6: 49.
31. Ge JY, Shu S, Kwon M, et al. Acquired resistance to combined BET and CDK4/6 inhibition in triple-negative breast cancer. *Nat Commun*. 2020; 11: 2350.
32. Fiedler LR, Chapman K, Xie M, et al. MAP4K4 Inhibition Promotes Survival of Human Stem Cell-Derived Cardiomyocytes and Reduces Infarct Size In Vivo. *Cell Stem Cell*. 2019; 24: 579-591.e12.
33. Gao X, Gao C, Liu G, Hu J. MAP4K4: an emerging therapeutic target in cancer. *Cell Biosci*. 2016; 6: 56.
34. Prolo LM, Li A, Owen SF, et al. Targeted genomic CRISPR-Cas9 screen identifies MAP4K4 as essential for glioblastoma invasion. *Sci Rep*. 2019; 9: 14020.
35. Liu A-W, Cai J, Zhao X-L, et al. ShRNA-targeted MAP4K4 inhibits hepatocellular carcinoma growth. *Clin Cancer Res*. 2011; 17: 710–20.
36. Ma J, Gao Z, Liu X. DDX46 accelerates the proliferation of glioblastoma by activating the MAPK-p38 signaling. *J BUON*. 2021; 26: 2084–9.
37. Shi X, Han X, Cao Y, Li C, Cao Y. ZCCHC14 regulates proliferation and invasion of non-small cell lung cancer through the MAPK-P38 signalling pathway. *J Cell Mol Med*. 2021; 25: 1406–14.
38. Shu S, Lin CY, He HH, et al. Response and resistance to BET bromodomain inhibitors in triple-negative breast cancer. *Nature*. 2016; 529: 413–7.

39. Shu S, Wu H-J, Ge JY, et al. Synthetic Lethal and Resistance Interactions with BET Bromodomain Inhibitors in Triple-Negative Breast Cancer. *Mol Cell*. 2020; 78: 1096- 1113.e8.
40. Jaaks P, Coker EA, Vis DJ, et al. Effective drug combinations in breast, colon and pancreatic cancer cells. *Nature*. 2022; 603: 166–73.
41. Lopez JS, Banerji U. Combine and conquer: challenges for targeted therapy combinations in early phase trials. *Nat Rev Clin Oncol*. 2017; 14: 57–66.

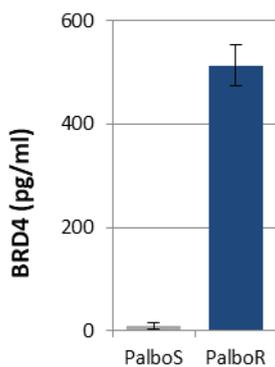


Supplementary Figure S1. Characterization of MCF7-PalboS and MCF7-PalboR cell.

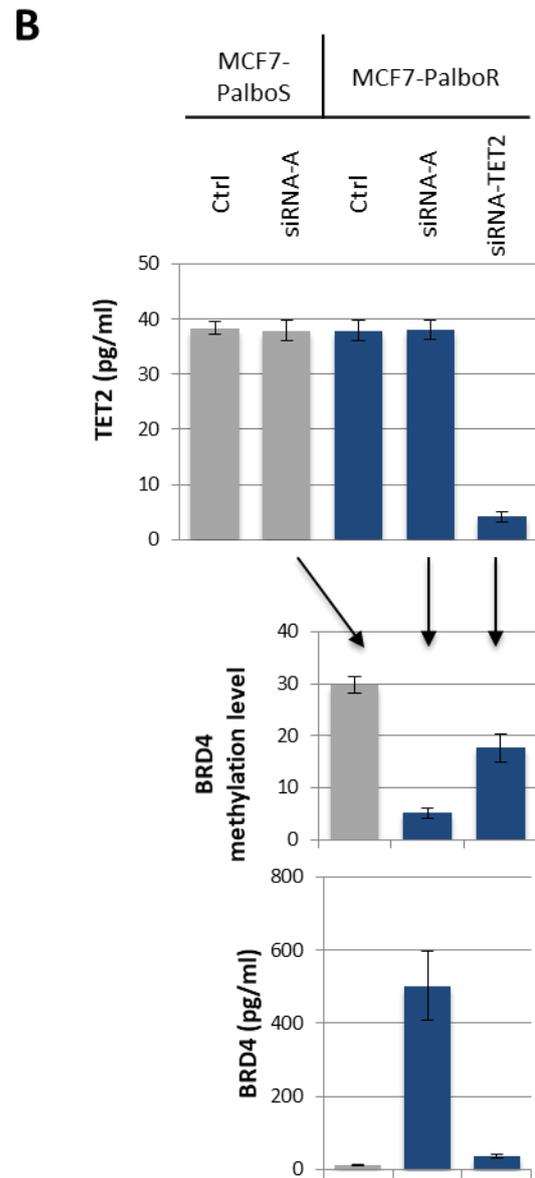
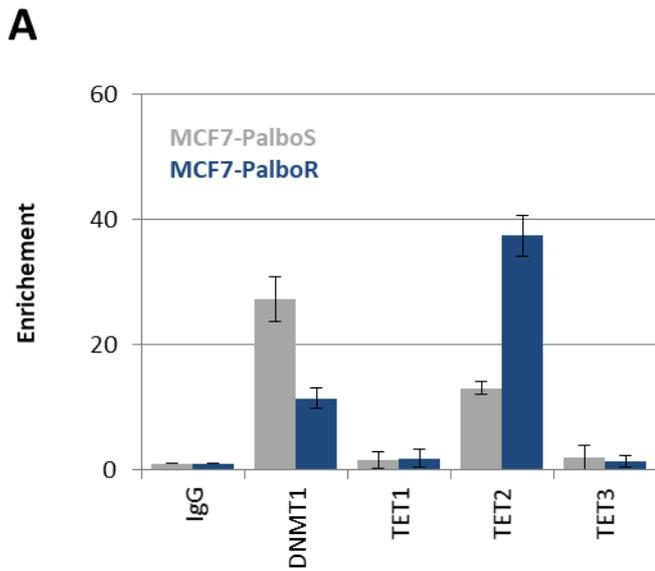
- A.** Graph showing the overexpression of cyclin E1 transcript (CCNE1^{mRNA}) in MCF7-PalboR cells compared to MCF7-PalboS cells. RT-qPCR were performed as described above.
- B.** Graph reporting the expression of CDK9 (CDK9^{mRNA}) and TK1 (TK1^{mRNA}) transcripts in exosomes/extracellular vesicles (EV) of MCF7-PalboR cells (CDK9^{mRNA}) compared to exosomes/extracellular vesicles of MCF7-PalboS cells. RT-qPCR were performed as described above.
- C.** Venn diagram illustrating the fact that 6 of the 87 SBsig genes are differentially expressed between MCF7-PalboS cells and MCF7-PalboR cells.



Supplementary Figure S2. Western blot analysis showing that BRD4 is overexpressed in MCF7-PalboR cells in comparison with MCF7-PalboS cells. After transfert step, membrane was cut into piece previous to be incubated with anti-BRD4 and anti-Actin. Picture in red panel are used in figure of our article. Biologic triplate is here referred S1, S2 and S3.



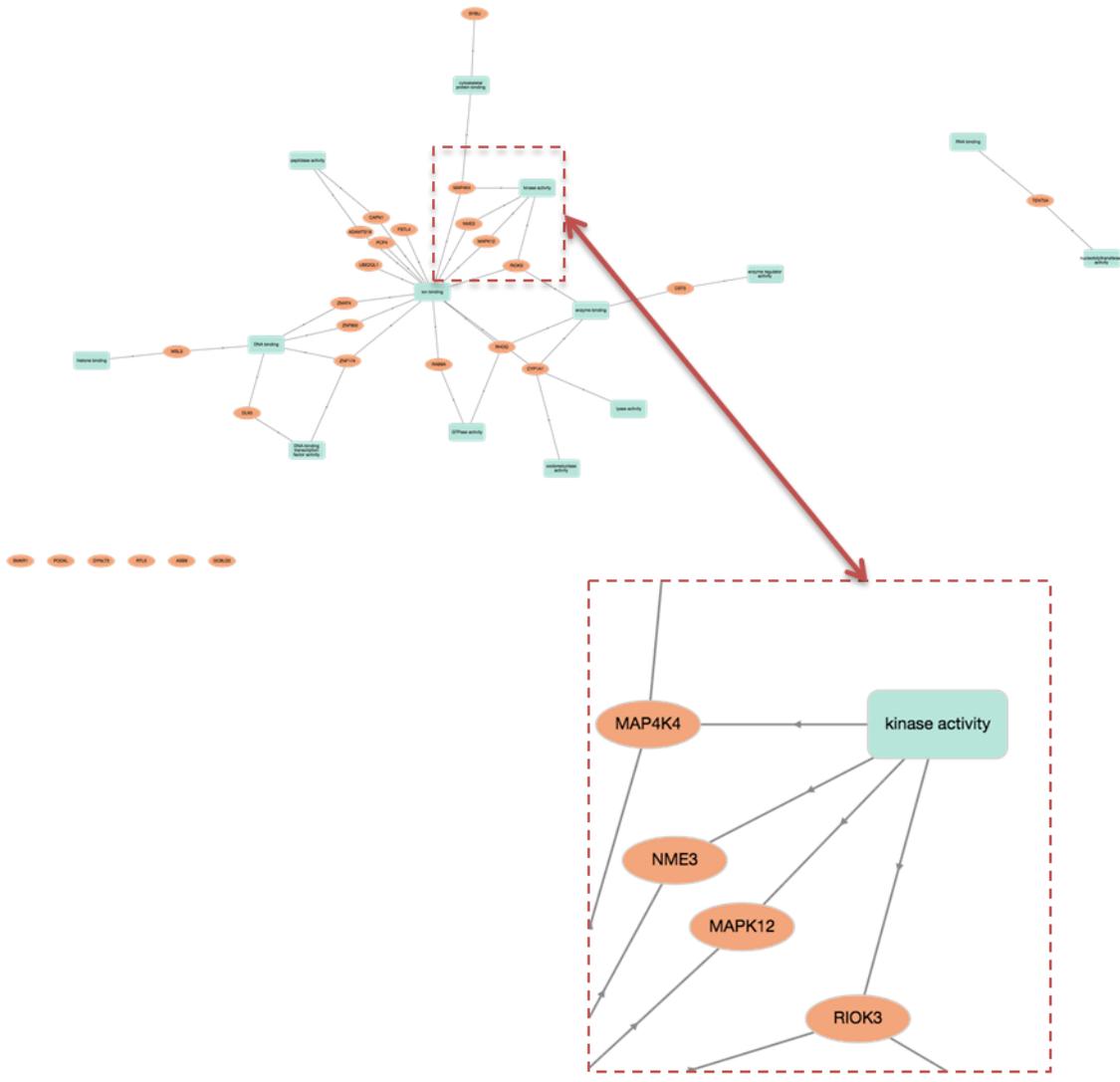
Supplementary Figure S3. ELISA analysis showing that BRD4 is overexpressed in MCF7-PalboR cells in comparison with MCF7-PalboS cells.



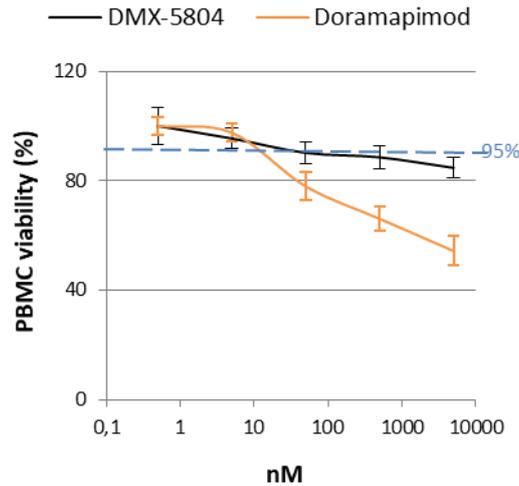
Supplementary Figure S4. Identification of TET2 as a player in *BRD4* hypomethylation within MCF7-PalboR cells.

A. Plot representing the enrichment of DNMT1, TET1, TET2 and TET3 proteins on the *BRD4* gene following CHIP experiments within MCF7-PalboS and MCF7-PalboR cells.

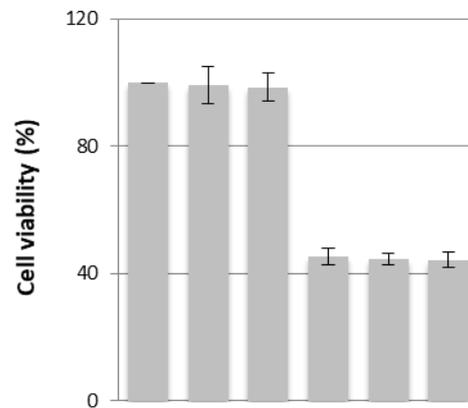
B. Impact of TET2 expression repression by siRNA on TET2 expression (ELISA) and on BRD4 methylation level (qMSRE) and expression (ELISA).



Supplementary Figure S5. Molecular function associated with the 26 genes commonly « over-ChIPed » with BRD4 and overexpressed in MCF7-PalboR cells according to GONet (<https://tools.dice-database.org/GONet/>)

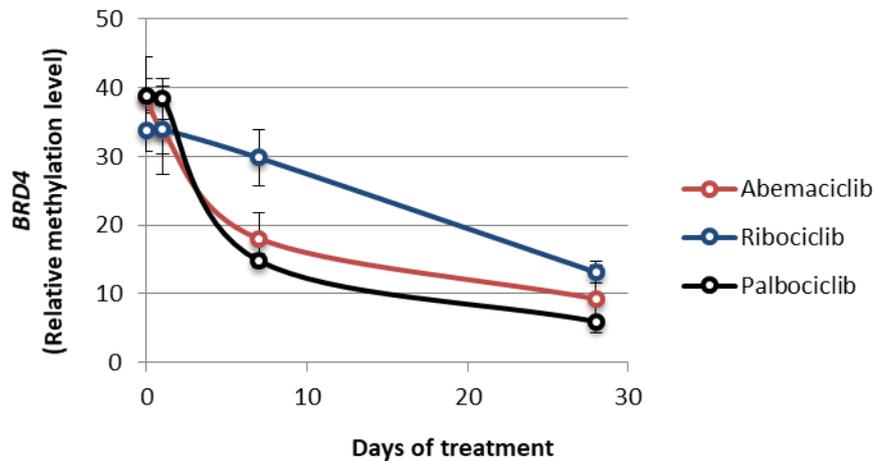


Supplementary Figure S6. Curves representing the effect of DMX-5804 and Doramapimod on the viability of PBMC from blood of healthy person. PBMC were incubated for 72h with indicated doses of DMX-5804 and Doramapimod. To choose the doses retained, we chose to use doses inducing 5% death of PBMC.

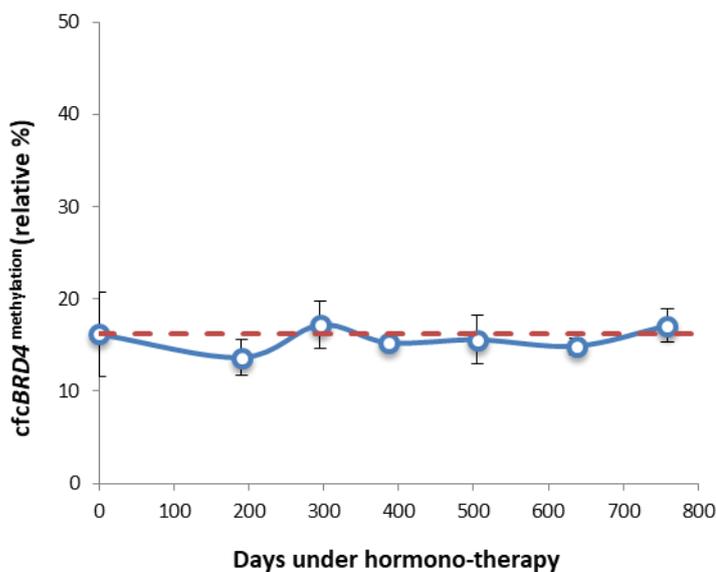


Palbociclib (1μM)	-	-	-	+	+	+
DMX-5804 (5 nM)	-	+	-	-	+	-
Doramapimod (5 nM)	-	-	+	-	-	+
MCF7-PalboS						

Supplementary Figure S7. Graph representing the impact of Palbociclib, DMX-5804 and Doramapimod (alone or in combination) on MCF7-PalboS cells. The percentage of cell viability was calculated here from MTT assays performed 72h after the incubation of the indicated molecules.



Supplementary Figure S8. Graph illustrating the evolution of *BRD4* methylation level during 4 weeks of MCF7 treatment with Abemaciclib or Ribociclib (1 μ M) according similar protocol than the one used for Palbociclib.



Supplementary Figure S9. Curve (blue) illustrating the evolution of *BRD4* methylation level during the 759 days of hormono-therapy received by a breast cancer patient. Each point represents a sampling date. *BRD4* methylation level is calculated by qMSRE performing from cfcDNA. The red dashed line represents the initial level of *BRD4* methylation in cfcDNA. No change of cfcBRD4^{methylation} was observed during the hormono-therapy of this breast cancer patient.

Patient#	Age (years)	CDK4/6i	Days ^{Start/Invest.}
1	38	P	973
2	75	P	223
3	50	A	808
4	72	P	799
5	54	R	205
6	72	A	794
7	67	A	798
8	76	P	563
9	42	A	364
10	66	A	321
11	51	A	30
12	48	A	5
13	46	P	21
14	75	P	381
15	60	P	397
16	50	P	25
17	61	A	1125
18	66	P	214
19	66	A	807
20	78	R	845
21	53	R	30
22	65	R	174
23	57	R	114
24	75	P	623
25	73	R	40
26	60	R	609
27	76	R	416
28	50	A	161
29	22	A	332
30	53	R	256
31	37	R	35

P: Palbociclib ; R: Ribociclib and A: Abemaciclib

Supplementary Table T2. Characterization (Age, CDK4/6 inhibitor used in treatment (CDK4/6i), and days number between the start of the CDK4/6 inhibitor treatment and our second time point of investigation (days^{Start/Invest}) breast cancer patients including in our study (n=31).

REAGENT or RESOURCE	SOURCE	IDENTIFIER
Therapeutic molecules		
Decitabine	MedChemExpress	HY-A0004
JQ1	MedChemExpress	HY-13030
OTX015	MedChemExpress	HY-15743
LSD1	MedChemExpress	HY-121095
Vorinostat	MedChemExpress	HY-10221
Doramapimod	MedChemExpress	HY-10320
DMX-5804	MedChemExpress	HY-111754
Palbociclib	MedChemExpress	HY-50767
Antibodies		
Anti-BRD4 (western blot)	Santa Cruz	sc48772
Anti-BRD4 (ChIP)	Diagenode	C15410337
Anti-DNMT1	Active Motif	39204
Anti-TET1	Active Motif	61443
Anti-TET2	Cell Signaling	18950
Anti-TET3	Active Motif	61395
Anti-Actin (western blot)	invitrogen	MA5-11889
Primers		
qMSRE-BRD4-S : agtcagacttctagcagtagta	Sigma	custom synthesis
qMSRE-BRD4-AS : ctgcagggagaggtcttg	Sigma	custom synthesis
CCNE1 (QuantiTect primer)	Qiagen	QT00041986
TK1 (QuantiTect primer)	Qiagen	QT00083874
CDK9 (QuantiTect primer)	Qiagen	QT00208523
RPLP0 QuantiTect primer)	Qiagen	QT00075012
siRNA		
siRNA-BRD4	ThermoFisher Scientific	AM16708
siRNA-TET2	Santa Cruz	sc-88934
siRNA-A	Santa Cruz	sc-37007
Cell lines and reagents		
MCF7	ATCC	HTB22
DMEM	ThermoFisher Scientific	11960044
SVF	Eurobio scientific	CVFCVF00-01
Glutamine	ThermoFisher Scientific	A2916801
Penicillin/streptomycin	ThermoFisher Scientific	15140122
Trypsin-EDTA	ThermoFisher Scientific	25300054
Reagents		
dimethylsulfoxide solution (DMSO)	Sigma	D2650
3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)	VWR	M2128
Hpy166II	NEB	R0616S
RIPA buffer	ThermoFisher	89901
Equipment and materials		
Cell Counter	Merck-Millipore	Scepter™ 2.0
spectrophotometer	Perkin Elmer	Victor X3 20301634
sonication device	Diagenode	Bioruptor Plus
Molecular Imager® ChemiDoc™ system	BioRad	731BR01995
QIacube automate	Qiagen	47082
Rotor-Gene Q	Qiagen	R0513212
CO ₂ incubator	Panasonic	MCO-19AIC
PSM	BIOMEDIS	ESCO-2014-89449
Software and algorithms		
ImageJ	Schindelin et al. 2012	https://imagej.nih.gov/ij/download.html
Microsoft Excel	Microsoft	N/A
Doubling Time Online Calculator website	http://www.doubling-time.com/compute.php	N/A

Supplementary Table T3. Additional key resource Table

4. Discussion

Dans le but d'améliorer la prise en charge des patientes aillant développé une résistance aux iCDK4/6 mais également les patientes qui viennent d'être diagnostiquées avec un cancer du sein RH+/HER2- et qui débuteraient ce traitement, nous avons voulu développer de nouvelles stratégies de médecine personnalisée. En effet, l'idée serait de compléter la thérapie iCDK4/6 avec d'autres thérapies, comme c'est déjà le cas actuellement avec des combinaisons d'hormonothérapies, des inhibiteurs de PI3K (alpelisib, pictilisib) ou mTOR (vistusertib, everolimus) par exemple (Rampioni Vinciguerra *et al.*, 2022). Notre approche se base sur l'utilisation d'épidrogues qui représentent une classe d'inhibiteurs de plus en plus prometteuse dans le traitement des cancers et la levée de la résistance aux thérapies (Issa *et al.*, 2017; Quagliano *et al.*, 2020). Par leur dérèglement, les acteurs épigénétiques vont contribuer à l'expression de nouvelles protéines impliquées dans la résistance aux traitements, tout comme ces mêmes acteurs vont contribuer à l'inhibition de l'expression des protéines qui pourraient contribuer à une bonne réponse au traitement. Ainsi, l'inhibition des acteurs épigénétiques impliqués dans cette mise en place de la résistance permet de continuer à sensibiliser les cellules au traitement initial. D'autres parts, caractériser les protéines nouvellement exprimées par ces acteurs peut également permettre la mise en place de nouvelles thérapies ciblées. Ainsi, le but ne serait pas d'inhiber ces mécanismes épigénétiques directement, car les épidroques possèdent des spectres larges, et peuvent réactiver l'expression d'oncogènes et de gènes anti-tumoraux, mais les produits de ces reprogrammations. Ceci représente une deuxième façon de re-sensibiliser les cellules au traitement initial. L'idée d'une combo-thérapie CDK4/6-BRDs est déjà étudiée depuis plusieurs années notamment dans les cancers du sein métastatiques : l'étude de Stratikopoulos et collaborateurs avait montré que l'inhibition des protéines BET et PI3K dans différents cancers, dont les cancers du sein métastatique, permettait d'inhiber totalement la voie de signalisation associée à PI3K et de lever la résistance aux inhibiteurs de PI3K (Stratikopoulos *et al.*, 2015). Les résultats de notre étude vont dans le sens d'une combo-thérapie palbociclib- BRD4i dans l'inhibition de la résistance au palbociclib. En effet, nous avons montré que les cellules MCF7-PalboR sont plus sensibles aux inhibiteurs de BRD4 et qu'elles surexpriment cette protéine. De plus, la déméthylation du promoteur de BRD4, qui est associée à sa surexpression dans notre modèle, passe par une déméthylation active médiée par TET2. Bien que nous n'ayons

pas cherché à caractériser plus précisément comment TET2 est recrutée au niveau du promoteur de BRD4, cela semble néanmoins indiquer que la surexpression de BRD4 est nécessaire à la mise en place de la résistance. L'observation d'un phénomène similaire dans des organoïdes dérivés de patientes (1 patiente sur 2) va dans ce sens. Son rôle est tel que son inhibition permet d'augmenter considérablement le temps de doublement des cellules. Des résultats similaires avaient été obtenus dans le cas d'une combo-thérapie palbociclib-BRD4i dans le cancer du sein triple négatif (Ge *et al.*, 2020).

Les analyses de 3'RNA-seq et de CHIP-seq-BRD4 ont permis de révéler les voies de signalisations surexprimées par BRD4 dans notre modèle. Parmi celles-ci, sont retrouvées des voies de réponses précoces et tardives aux œstrogènes (Jagannathan and Robinson-Rechavi, 2011) et la voie de signalisation KRas. La voie de signalisation KRas est étroitement reliée avec l'expression de la cycline D1 et des CDK4/6. En effet, il est fréquemment retrouvé une surexpression de la cycline D1 dans les cancers du sein comportant une mutation KRas, ainsi que dans les cancers du poumon non à petites cellules KRas muté (Figure 29) (Galiè, 2019; Goh and Lim, 2020). Dans les cancers du sein RH+/HER2-, il est connu qu'un des mécanismes de résistance aux iCDK4/6 passe par la surexpression et l'amplification des gènes codants par CDK4/6 et la cycline D1 (McCartney *et al.*, 2019). Il est donc possible que BRD4 joue un rôle dans la surexpression de ce complexe dans les cellules résistantes au palbociclib en sur-activant la voie de signalisation KRas (**Figure 29**). Nous verrons par la suite l'implication de KRas dans la résistance aux iCDK4/6 via notre seconde étude.

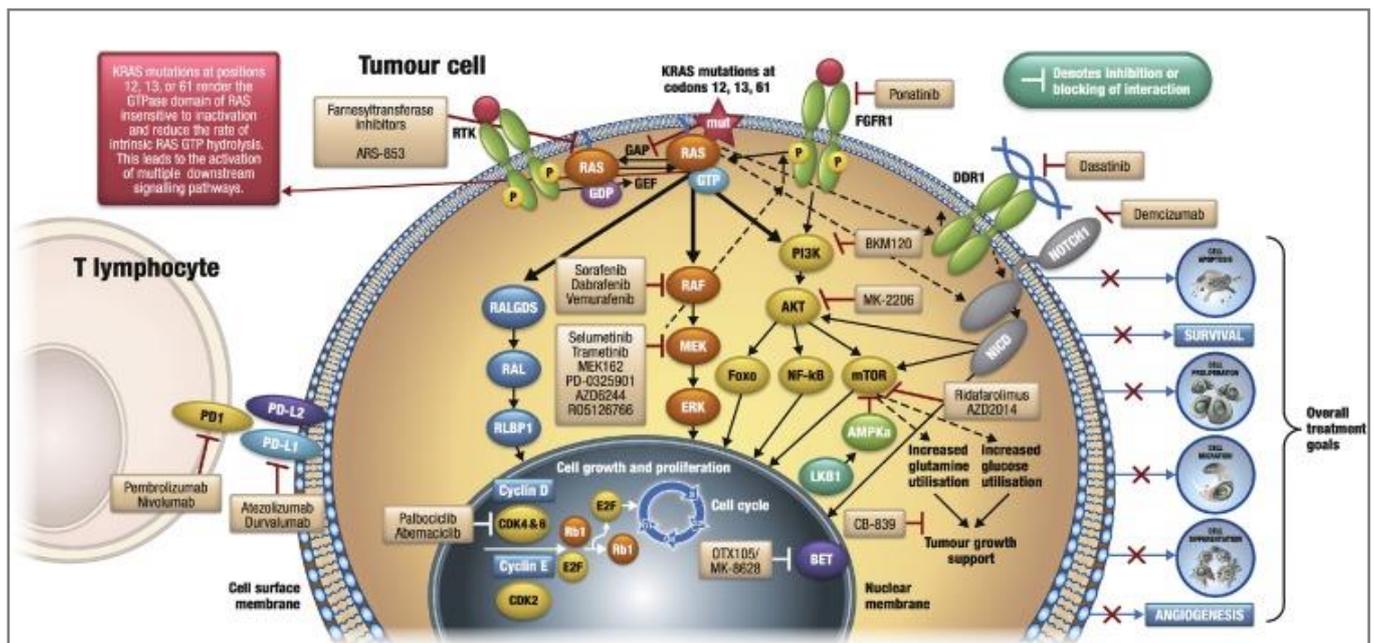


Figure 29 : illustration de la voie de signalisation KRas dans le cancer du poumon non à petites cellules et des thérapies ciblées pour ces acteurs

AMPK : AMP-activated protein kinase ; BET : Bromodomains and extra-terminal domain ; CDK : Cyclin dependant kinase ; DDR1: discoidin domain receptor 1; ERK: extracellular signal-regulated kinase; FGFR1: fibroblast growth factor receptor; FOXO: forkhead box O3; GAP GRPase activating protein; GEF: guanine nucleotide exchange factor; MEK: MAPK/ERK kinase; mTOR: mammalian target of rapamycin; mut: mutation; NICD: Notch intracellular domain; NF: nuclea factor; PD1: programmed death-1 receptor-1; PDL1/2: ligand of programmed death-1 receptor-1/2; PI3K: phosphatidylinositol-4,-5bisphosphate; RAF, rapidly growing fibrosarcoma; RALGDS: RAL guanine nucleotide dissociation simulator; RAS: rat sarcoma virus; Rb: retinoblastoma; RTK: receptor tyrosine kinase. D'après Ferrer et al., 2018.

Toujours dans notre recherche de combothérapie, nous avons recoupé les 26 gènes surexprimés par BRD4 à des listes de protéines pour lesquelles il existe déjà des thérapies ciblées, soit en essai clinique, soit déjà validées. Cette analyse nous a permis d'identifier deux protéines surexprimées par BRD4 pour lesquelles des inhibiteurs existent : MAP4K4 et MAPK12. Ces protéines appartiennent à la famille des MAP kinases (mitogen activated protein kinases) qui représentent une grande famille de protéines activées en cascades et impliquées dans la prolifération cellulaire. Les voies de signalisations KRas et MAP kinases sont étroitement reliées et d'après nos résultats, BRD4 semble jouer un rôle dans leur surexpression dans notre modèle, favorisant la progression des cellules dans le cycle cellulaire. MAP4K4 est impliquée dans la motilité des cellules et est impliquée dans les phénomènes d'invasivité des cellules cancéreuses. Elle joue également un rôle dans le métabolisme du glucose, dans l'apoptose, la régulation de la prolifération et de senseur matriciel (Tripolitsioti *et al.*, 2017). MAPK12 ou aussi appelée p38 γ est également activée par la voie de signalisation

KRas dans la formation des métastases, la transition mésenchymateuse, la tumorigenèse, la formation de cellules souches cancéreuses et le métabolisme anaérobie du glucose. MAPK12 est retrouvée dans les cancers du sein métastatiques et associé à l'agressivité de la tumeur (Xu *et al.*, 2021). Le rôle de BRD4 dans la surexpression de ces deux MAP kinase a été validé par nos expériences de transfection de siRNA-BRD4 qui montrent que lorsque BRD4 est inhibé, l'expression de MAP4K4 et MAPK12 est diminuée en comparaison avec les cellules MCF7-PalboR transfectées avec le siRNA-A (contrôle). En revanche, dans les cellules MCF7-PalboS, le niveau d'expression de BRD4 étant relativement faible en comparaison avec les cellules MCF7-PalboR, les deux MAP kinases sont également peu exprimées, ce qui sous-entend que ces voies de signalisation sont peu impliquées dans les mécanismes de prolifération des cellules non traitées au palbociclib. Le traitement des cellules MCF7-PalboS et PalboR avec du palbociclib seul, en combo-thérapie avec le doramapimod (MAPK12i) ou le DMX-5804 (MAP4K4i) confirme encore une fois cette observation. En effet, seul, le palbociclib induit une diminution de 50% de la viabilité des cellules sensible. La combinaison Palbociclib+MAP4K4i ou MAPK12i n'impacte pas davantage la viabilité des cellules, ce qui laisse penser une absence d'efficacité des inhibiteurs en raison de la faible expression des protéines cibles dans ces cellules. En revanche, dans les cellules résistantes, le palbociclib seul n'affecte pas la viabilité des cellules, ce qui est normal puisqu'elles ont une IC50 4 à 5 fois supérieur à la dose utilisée. Cependant, l'ajout de l'un ou l'autre des MAP kinases inhibiteur entraîne une diminution ~50 à 70% de la viabilité des cellules. De manière intéressante, ces inhibiteurs n'ont pas d'effets en absence de palbociclib. Une hypothèse qui permettrait d'expliquer ce phénomène est que le palbociclib est nécessaire à la surexpression de BRD4 et que sans palbociclib, BRD4 n'étant pas surexprimé, les gènes régulés par celui-ci dans le modèle ne le sont plus non plus. Ce constat renforce l'idée d'une combinaison de traitements palbociclib-BRD4 ou palbociclib MAP kinase inhibiteurs. Ces résultats vont dans le sens de ceux de Liu et collaborateurs qui ont montré un phénomène similaire sur des cancers multiples de l'ovaire, résistants au palbociclib : le traitement avec l'AZD5153, un inhibiteur de BRD4, entraîne un effet synergique avec le palbociclib permettant l'arrêt du cycle cellulaire et l'inhibition des voies de signalisations MAPK/PI3K-AKT (Liu *et al.*, 2022).

Pour aller plus loin dans notre étude, nous nous sommes demandé s'il était possible d'analyser le niveau de méthylation du gène de *BRD4* dans le cfcdNA des patientes. Pour cela nous avons extrait le cfcdNA à partir de plasma de patientes au début de leur traitement au

palbociclib puis soit au cours du traitement ou à terme de celui-ci, et avons analysé le niveau de méthylation de BRD4 par qMSRE. Sur 33 patientes, nous avons observé que 11 d'entre elles avaient un niveau de méthylation de BRD4 au moment du deuxième prélèvement inférieur au niveau de méthylation initial (au début du traitement). Ces résultats suggèrent que les patientes surexpriment BRD4 au moment à ce moment précis. Nous avons par la suite analysé plus en détails l'évolution du profil de méthylation de *BRD4* au cours du temps dans le cfcDNA de deux patientes qui ont présenté une progression tumorale au cours du traitement au palbociclib. De manière intéressante, pour l'une des deux patientes (patiente #A), l'hypométhylation de *BRD4* apparaît rapidement après le début du traitement et est maintenu jusqu'à la rechute. Pour la deuxième patiente (patiente #B), celle-ci présente un niveau de méthylation équivalent entre le début du traitement et la rechute. Cependant, le profil de méthylation de *BRD4* varie au cours du traitement, avec une alternance de phase d'hypométhylation et d'hyperméthylation. Ces résultats, bien qu'ils n'aient été réalisés que sur deux patientes, semblent indiquer que la réponse au traitement est propre à chaque patientes et que celle-ci peut varier au cours du temps.

Concernant la mise en place d'une combo-thérapie iCDK4/6-BRDi ou MAPKi, celle-ci pourrait-être possible lors de la détection de l'hypométhylation de *BRD4* dans le cfcDNA puisque la variation de méthylation détectée semble être liée avec le profil de méthylation de la tumeur (puisque le niveau de méthylation de BRD4 ne varie pas au cours du traitement dans les cellules sanguines, buffy coat). Bien entendu, pour confirmer cela il faudrait analyser le niveau de méthylation de *BRD4* dans des biopsies de patientes et le comparer au cfcDNA de ces mêmes patientes, mais d'après d'autres études réalisées dans un contexte similaires, le cfcDNA retrouvé dans le sang des patientes était majoritairement enrichie en ADN tumoral (Rothé *et al.*, 2014). Ainsi, la combo-thérapie proposée permettrait d'adapter le traitement des patientes au cours du temps et d'attribuer le bon traitement à la patiente éligible à celui-ci, c'est-à-dire, à la patiente pour laquelle *BRD4* serait hypométhylé dans le cfcDNA. En fonction de l'évolution du profil de méthylation de *BRD4*, le traitement pourrait être arrêté quand celui-ci serait hyperméthylé, i.e que BRD4 serait sous exprimé. De plus, l'idée d'une combo-thérapie dynamique, alternant les BRDi et les MAPKi permettrait de limiter les phénomènes d'acquisition de résistance, notamment aux BRDi comme il a pu être décrit dans la littérature (Ge *et al.*, 2020). Cependant, l'idée d'associer les BRDi et MAPKi n'est pas envisageable, car l'inhibition de BRD4 diminue l'expression des MAPKi, il n'y aurait pas d'effets

cumulatifs de ces inhibiteurs. En revanche, il pourrait-être envisagé de tester *in vitro* l'effet d'une combinaison palbociclib-Doramapimod-DMX-5804 puisque les deux MAP kinases sont toutes les deux des produits d'expression de BRD4 mais sont indépendantes l'une de l'autre. Un effet cumulatif des deux molécules pourrait être observé, et donc renforcer le potentiel de la combo-thérapie proposée.

En perspective de cette étude et avant de porter ces résultats en clinique, il serait intéressant de : i) confirmer ces analyse sur un autre modèle cellulaire comme la lignée T47D, également utilisé couramment avec les MCF7 comme modèle d'étude du cancer du sein RH+/HER2-, ii) de réaliser d'autres analyse du niveau de méthylation de *BRD4* sur les points intermédiaires des 31 autres patientes pour déterminer si des tendances en ressortent ou si chaque patientes possède son propre profil de méthylation, iii) analyser en parallèle le niveau de méthylation entre le cfcDNA et des biopsies de métastases ainsi que le niveau d'expression de BRD4, MAP4K4 et MAPK12 pour confirmer leur surexpression associé à la déméthylation de *BRD4* et l'éligibilité des patientes au traitement à l'instant t.

Un résultat annexe dont je n'ai pas discuté auparavant concerne la transition mésenchymateuse (EMT) qui correspond à la transition entre des cellules épithéliales vers des cellules mésenchymateuse capables de se déplacer et caractéristiques des métastases. J'ai analysé différents marqueurs d'EMT (TCF8/ZEB1, E-cadherine, β -catherine, ZO-1, N-cadherine, Vimentine, Snail, Claudine 1) entre les cellules MCF7-PalboS et PalboR pour savoir si le palbociclib induisait ce type de transition (également en lien avec le rôle de la MAPK12). Cependant, aucune différence n'a été observée entre les deux conditions, celles-ci expriment des marqueurs de cellules épithéliales. Ceci va dans le sens des travaux de Qin et ses collaborateurs qui ont montré que le palbociclib inhibait l'EMT dans d'autres lignées du cancer du sein comme les T47D, mais les travaux de Chang et ses collaborateurs montrent une augmentation de l'EMT dans les cellules MCF7-PalboR (Qin *et al.*, 2015; Chang *et al.*, 2020). Nos travaux n'excluent pas qu'une transformation mésenchymateuse transitoire ait pu se produire au cours de l'acquisition de la résistance, mais cela n'a pas été étudié.

Chapitre 2 : Le décodage de l'interactome de METTL3 permet d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques et biomarqueurs permettant l'inhibition de l'acquisition de la résistance au palbociclib dans le cancer du sein RH+/HER2-

1. Préambule

Toujours dans la même optique d'identifier de nouveaux biomarqueurs et vulnérabilités thérapeutiques pouvant permettre d'inhiber la résistance au palbociclib, nous nous sommes intéressés aux mécanismes épitranscriptomiques, et plus particulièrement à la méthylation des miRNAs et leur implication dans le phénomène de résistance. Comme expliqué dans l'introduction, le rôle des miRNAs dans les cancers est de plus en plus étudié. Leur niveau d'expression et de méthylation peut être prédictif de cancers ou même de facteur pronostiques de survie (Konno *et al.*, 2019; Cheray *et al.*, 2020). La méthylation des miRNAs mature conduit à leur inactivation, ils ne peuvent plus réprimer leurs cibles (Konno *et al.*, 2019; Briand *et al.*, 2020; Cheray *et al.*, 2020). Cela conduit à la ré-expression de protéines qui étaient initialement réprimées dans les cellules non cancéreuses, et contribue à la tumorigenèse. Comme pour les mécanismes épigénétiques, il est légitime de penser que ces mécanismes épitranscriptomiques peuvent être dérégulés et impliqués dans la mise en place de la résistance au palbociclib.

Nous nous sommes intéressés à la méthyltransférase like 3 (METTL3) qui est responsable de l'adénosine méthylation des ARNs codants et non codants. Bien que différents partenaires de cette protéine aient été caractérisés, très peu de choses sont connues concernant son mode de recrutement sur ces cibles et son rôle de ces variations dans la tumorigenèse ou l'acquisition de résistances à des thérapies. Pour remédier à cela, nous avons mis en place différentes expériences d'IP de METTL3 couplées à de la spectrométrie de masse (IP-MS). Ces expériences nous ont permis d'identifier 44 protéines préférentiellement co-immunoprécipitées (Co-IP) avec METTL3 dans la condition MCF7-PalboS, contre 17 protéines dans la condition MCF7-PalboR. Ces résultats semblent confirmer un différentiel de partenaires entre les deux conditions et donc l'hypothèse selon laquelle un différentiel d'interactome apparaîtrait au cours de l'acquisition de la résistance au palbociclib. En allant plus loin dans les analyses bioinformatiques, nous avons cherché à identifier les protéines dites RNA Binding Protein (RBP), c'est-à-dire, les protéines capables de lier les ARNs. Nous sommes partie de l'hypothèse que METTL3 pouvait être recrutée sur ces cibles via un

phénomène similaire au recrutement des DNMTs sur l'ADN, médié par des DNA Binding Protein (DBP). Parmi les protéines Co-IP avec METTL3, nous avons identifié 6 RBP dans la condition MCF7-PalboS contre une seule dans la condition résistante : RPS3. Nous avons ainsi pu décrire l'un des premiers mécanismes de méthylation des miRNAs guidées par des protéines de liaison aux ARNs et identifier un potentiel biomarqueur de résistance au palbociclib et trois nouvelles cibles potentielles pour mettre en place une combothérapies avec le palbociclib, comme l'objectif de l'étude précédente.

2. Article (en cours de rédaction)

METTL3 interactome deciphering identifies a biomarker and therapeutic options to overcome the Palbociclib resistance in breast cancer cells

Florestan COURANT^{1,4}, Cathérine GUETTE^{1,2,3}, Klara EDERN^{1,4}, Quentin ARBERET^{1,4}, Gwénola BOUGRAS-CARTRON^{1,2,4}, Philippe P JUIN^{1,2,4}, Jean-Sébastien FRENEL^{1,2,4}, Pierre François CARTRON^{1,2,4*}

¹ CRCI2NA, INSERM, Université de Nantes, Nantes, France.

² Institut de Cancérologie de l'Ouest, Saint-Herblain, France.

³ CRCI2NA, INSERM, Université d'Angers, Angers, France.

⁴ SIRIC ILIAD, 44000 Nantes, France.

* Correspondance: pierre-francois.cartron@inserm.fr, CRCI2NA, INSERM 1307, CNRS 6075, Institut de Cancérologie de l'Ouest, Boulevard du Pr Jacques Monod, Saint Herblain, 44805, France.

Running title: METTL3 interactome

Keywords: METTL3, epitranscriptomics, targeted therapy, personalized medicine, breast cancer.

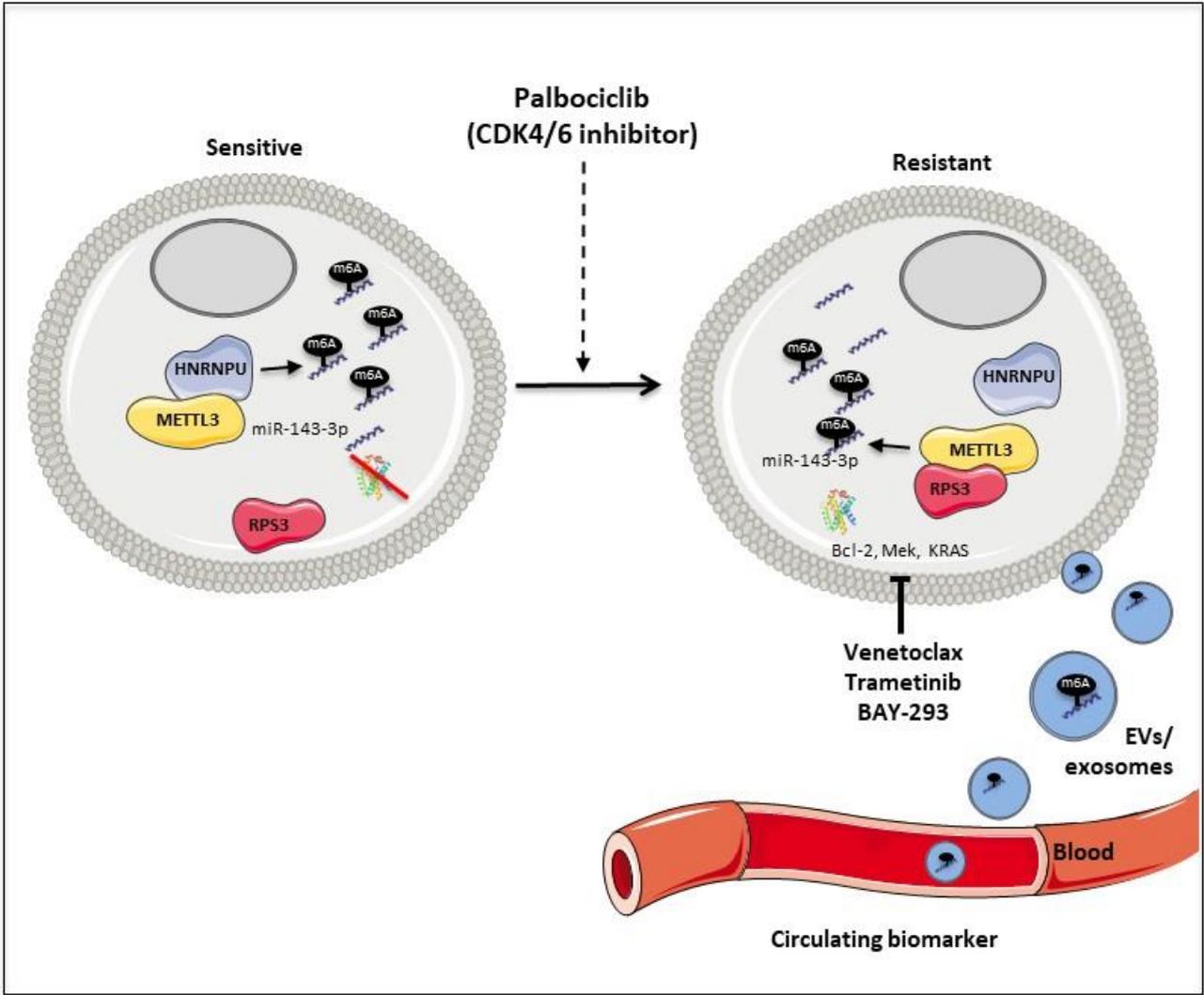
ABSTRACT

Although METTL3 is considered as the major methyltransferase catalyzing adenosine methylation of coding and non-coding RNAs, little is known about the METTL3 interactome and the role that variations in it might play during tumorigenesis or therapeutic resistance. To remedy this, we analyzed and deciphered the differential interactome of METTL3 in the Palbociclib-resistant MCF7 cell model.

Co-Immunoprecipitation/mass spectrometry analysis indicates that 44 proteins were uniquely or preferentially co-immunoprecipitated in MCF7-PalboS cells, and 17 in MCF7-PalboR cells. Among these proteins, only one RNA-binding protein, RPS3, was uniquely co-immunoprecipitated in MCF7-PalboR cells suggesting that a METTL3/RPS3-including complex characterizes the MCF7-PalboR cells.

Based on the idea that the RPS3 protein provides methylation selectivity to METTL3 for miRNAs having the RPS3 nucleotide binding sequence, a first bioinformatics analysis via our DAMiRPred bioinformatics tool predicted the existence of 3 miRNAs likely to be methylated by a METTL3/RPS3-including complex. A second bioinformatics analysis via our miR4TO therapeutic option prediction tool then identified adenosine methylation modifications of miR-143-3p as the source of two potential therapeutic options: Venetoclax, BAY-293/BI1702963. In cellulo experiments validated these hypotheses and showed that MCF7-PalboR cells have increased sensitivities to Palbociclib+Venetoclax, Palbociclib+Bay-293, and Palbociclib+Trametinib combination therapies.

In conclusion, our work opens three innovative therapeutic options for the design of combotherapies overcoming Palbociclib resistance while deepening the fundamental knowledge of the METTL3 interactome and proposing the existence of a mechanism of sequence-selective methylation of miRNAs.



Letters

N6-methyladenosine (m6A) is one the most study post-transcriptional internal epitranscriptomic modification of RNAs and aberrant adenosine methylation profiles of various ARNs are associated with variety of biological and pathological processes ¹⁻². With the development of sequencing techniques, literature defines the DRACH sequence (where A denotes the methylatable adenosine, D denotes A, G or U, R denotes A and G, and H denotes A, C or U) as the consensus motif of adenosine methylation in RNAs ³⁻⁴⁻⁵.

At molecular level, the RNA methyltransferase complex consisting of an enzymatic subunit METTL3, a substrate recognition subunit METTL14 and a regulatory subunit WTAP, catalyzes the RNAs adenosine methylation reactions⁶⁻⁷. Although major, the description of this complex is not sufficient to explain how METTL3 can catalyze the adenosine methylation of a large classes of RNAs, including mRNAs, lncRNAs, rRNAs, tRNAs and miRNAs and or explain how METTL3 catalyzes the adenosine methylation of certain RNAs and not other ².

In this context, a few numbers of publications support the existence of region or sequence selective methylation mechanisms catalyzed by the METTL3 protein. Patil et al. (2016) show the adenosine methylation of XIST^{mRNA} is mediated RNA-binding motif protein 15 (RBM15) and its paralog RBM15B, which bind the m6A-methylation complex and recruit it to specific sites in RNAs ⁸. This results in the methylation of adenosine nucleotides in adjacent m6A consensus motifs. Yue et al. (2018) report that the METTL3/METTL14/WTAP/VIRMA/HAKAI/ZC3H13 complex preferential methylates adenosines localized in 3'UTR and near stop codon and alternative polyadenylation sites of mRNAs⁹. By reporting the presence of SMAD2/3 in co-immunoprecipitation products of METTL3 and METTL14 (and vice versa), Bertero et al. (2018) suggests that SMAD2/3 could address the N6-methyltransferase complex on a subset of transcripts with sequences responsive to the TFBD of SMAD2/3 in order to methylate them ¹⁰. More recently, the work of Covelo-Molares et al. (2021) reports the existence of potential interactions with other transcription factors including SALL1&2, STAT5B or ZEB211. Thus, by homology to the phenomenon of transcription factor-directed DNA methylation existing for DNMTs and DNA methylation ¹²⁻¹³⁻¹⁴, it would seem that adenosine methylation of RNAs can be, in part, regulated by a phenomenon that we here called transcription factor-directed RNA methylation.

In our laboratory, we wondered if such mechanisms could exist for miRNAs or if the knowledge of the METTL3's interactome could allow the identification of new mechanisms of sequence/region selective methylation of miRNAs. By transposing this basic biology question to the clinical context of chemoresistance of tumor cells, we then hypothesized that anti-chemoresistance therapeutic options could be identified via the targeting of proteins overexpressed as a result of hypermethylation of certain miRNAs induced by the modulation of the METTL3 interactome within chemo-resistant cells.

For this purpose, we focused our study on the analysis of the differential immunoprecipitated interactome of METTL3 in the context of the CDK4/6 inhibitor-induced chemoresistance of breast cancer cells. More particularly, we worked with MCF7 cells sensitive and resistant to Palbociclib (CAS N°: 571190-30-2) referred here as MCF7-PalboS and MCF7-PalboR ¹⁵ (**Supplementary Figure S1**). Using standard co-IP/Mass spectrometry method, we identified proteins in the METTL3 co-IP products derived from MCF7-PalboS and METTL3 co-IP products derived from MCF7-PalboR (**Supplementary Figure S2**). To analyze these data, we have developed under Shiny (R package) and using Python scripts an application named DAmiRPred (Differential Analysis and miR Prediction) available online at <https://XXXX>. By using the following parameters (condition#1: "output_PalboR", condition#2: supplementary file 2 "output_PalboR", Filtering of data: "RNA Binding Protein from Frontiers", and a threshold of 3), DAmiRPred indicated that among the 65 proteins co-immunoprecipitated with METTL3, 23 were already known to be part of the METTL3 interactome in agreement with the METTL3 interactome defined by BioGrid or String DB (**Supplementary Figure S3**). Consequently, our IP/MS analysis identified 42 news METTL3 interactors, among which RPS3 a RNA-binding proteins according to the RBPDB database: (**Supplementary Figure S3 and Supplementary Table T1**).

The differentially co-immunoprecipitated proteins analysis with METTL3 showed that 44 proteins were observed to be uniquely or preferentially co-immunoprecipitated in MCF7-PalboS cells, and 17 were uniquely or preferentially co-immunoprecipitated in MCF7-PalboR cells (**Figure 1A and Supplementary Table T2**). More particularly, our data indicated a preferential co-IP between METTL3 and 6 RBPs (DDX5, DDX17, DDX3X, EIF4G1, HNRNPM and HNRNPU) in MCF7-PalboS cells and between METTL3 and with only one in MCF7-PalboR cells: RBP (RPS3) (**Figure 1A and Supplementary Table T2**). Note that the METTL14 protein (a well-

documented METTL3 interactor) is co-immunoprecipitated with METTL3 in a similar manner in MCF7-PalboS and MCF7-PalboR cells (**Figure 1A and Supplementary Table T2**).

Based on the fact that RPS3 was the unique protein “over-coimmunoprecipitated” with METTL3 in MCF7-PalboR cells, we next hypothesized that METTL3/RPS3 could be involved in the adenosine methylation of miRNAs opening therapeutic option overcoming the Palbociclib resistance. To predict the putatively adenosine-methylated miRNAs by METTL3/RPS3 following their recruitment by RPS3, we used the manual search mode of the "miR binding prediction" function of our DAmiRPred tool using the CUGUAC motif since it is defined as being recognized by the RPS3 protein ¹⁶. With the threshold value of 80% sequence homology, DAmiRPred identifies, from the miRNA sequences deposited in the miRBase database, 89 miRNAs (**Figure 1B**).

The analysis of these 89 miRNAs by the "prediction of methylations for a miRNA list" function of our MemiRPred tool (accessible at <https://XXXX>) shows that 10 of these 89 miRNAs have already been described as adenosine methylated in the literature: miR-103a-3p, miR-10a-5p, miR-199b-5p, let-7g-5p, miR-143-3p, miR-363-3p, miR-378a-3p, miR-541-3p, miR-1914-5p and miR-4778-5p (**Figure 1B**) ¹⁷. We then focused our work on adenosine-methylated miRNAs only. Thus, MemiRPred provided a list of 3 miRNAs devoid of predicted cytosine and guanosine methylation: miR-143-3p, miR-541-3p and miR-4778-5p. The analysis of these 3 miRNAs by our miR4TO tool (available at <https://XXXX>) predicts the potential existence of 2 triads “miRNA/target protein/therapeutic option”: miR-143-3p/Bcl-2/Venetoclax, miR-143-3p/KRAS/BI1702963 (**Figure 1B**).

To validate the veracity of these 2 triads, we first analyzed whether that Bcl-2 and KRAS were overexpressed in MCF7-PalboR cells in comparison with MCF7-PalboS cells. ELISA indicated that it was the case (**Figure 1C**). The involvement of the METTL3-mediated adenosine methylation of miR-143-3p on these overexpressions was supported by the fact that the METTL3 inhibition by UZH1a decreased the adenosine methylation level of miR-143-3p and the Bcl-2 and KRAS expression in dose-dependent manner (**Figure 1C**). We also confirmed that the adenosine methylated form of miR-143-3p loss its ability to repress the Bcl-2 and KRAS expression since the transfection of MCF7 cells with the adenosine methylated form of mimic-miR-143-3p unchanged the Bcl-2 and KRAS expression, while the transfection with unmethylated form of miR-143-3p decreased the Bcl-2 and KRAS expression in dose dependent manner (**Supplementary Figure S4**).

We secondly searched to validate the idea that METTL3 and RPS3 were involved in the adenosine methylation of miR-143-3p in MCF7-PalboR cells. For this purpose, MCF7-PalboR cells were transiently treated with siRNA directed against METTL3 and RPS3 and the adenosine methylation level of miR-143-3p was analyzed. As control, we used miR-1910-3p (gaggcagaagcaggaugaca) i.e. a miRNA described as adenosine methylated by Berulava et al. (2015) ¹⁷ but devoid of the RPS3 motif (CUGAC) ¹⁶. RT-qPCR indicated that siRNA-METTL3 decreased METTL3^{mRNA} expression without affecting the expression of miR-143-3p, miR-1910-3p and RPS3^{mRNA} and that siRNA-RPS3 decreased RPS3^{mRNA} expression without affecting the expression of miR-143-3, miR-1910-3p and METTL3^{mRNA} (**Supplementary Figure S5**). MemiRIP experiments indicated that siRNA-RPS3 decreased the adenosine methylation level of miR-143-3p without affecting the one of miR-1910-3p, while siRNA-METTL3 decreased both adenosine methylation level of miR-143-3p and miR-1910-3p (**Figure 1D**). Thus, these results suggest that RPS3 is required, in MCF7-PalboR cells, for the adenosine methylation of miR-143-3p and not for the one of miR-1910-3p. In addition, we also noted that siRNA-RPS3 decreased the methylation level of two other miRNAs (miR-541-3p and miR-4778-5p) having the RPS3 motif (threshold>80%), described as adenosine methylated by literature and devoid of putative other methylation types. These data suggest that METTL3/RPS3 is involved in the adenosine methylation level of several miRNA (and not only miR-143-3p).

We thirdly analyzed whether MCF7-PalboR cells had a higher sensitivity than MCF7-PalboS cells to Venetoclax (CAS N°: 1257044-40-8) and BAY-293 (CAS N°: 2244904-70-7) i.e. to molecules targeting Bcl-2 and KRAS, respectively. BAY-293 was here used as non-clinical for of pan-KRAS inhibitor such as BI1702963 (Boehringer-Ingelheim/Amgen). Calculation of the IC50 showed that this was the case since the IC50 of these molecules changes from 0.091μM and 11.741μM to 0.014μM and 2.859μM between MCF7-PalboS and MCF7-PalboR cells, respectively (**Figures 1E and 1F**). These analyses were completed by considering Trametinib (CAS N°: 871700-17-3), a MEK inhibitor, i.e. a molecule inhibiting an actor of the KRAS pathway. The fact that Trametinib was already used in breast cancer clinical trials also motivated our choice (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT01964924 and NCT02900664). Interestingly, we observed that MCF7-PalboR cells were approximately 25 times more sensitive than PalboS cells to Trametinib (**Figure 1G**).

Based on these experiments, we conclude that the METTL3/RPS3-mediated adenosine methylation of miR-143-3p up-regulates the Bcl-2 and KRAS expression that generate a gain in sensitivity of MCF7-PalboR cells to Venetoclax, BAY-293 and Trametinib.

We finally asked whether the gain of adenosine methylation of miR-143-3p could be an observable molecular signature in patients treated with Palbociclib and more generally with CDK4/6 inhibitors since Abemaciclib (CAS N°: 1231929-97-7) and Ribociclib (CAS N°: 1211441-98-3) also induced a gain of adenosine methylation of cellular and exosomal/EV miR-143-3p and not in MCF7-Tamoxifen resistant cells (**Supplementary Figure S7**). For this purpose, we analyzed the adenosine methylation level of exosomal or extracellular vesicles miR-143-3p (exomiR-143-3p) in 12 breast cancer patients for whom we have a blood sample before and during their CDK4/6 inhibitor therapy (**Supplementary Table T4**). Our data indicated that a significant gain of adenosine methylation of exomiR-143-3p was observed in 33% (4/12) of breast cancer patients treated with CDK4/6 inhibitors (**Figure 1H**).

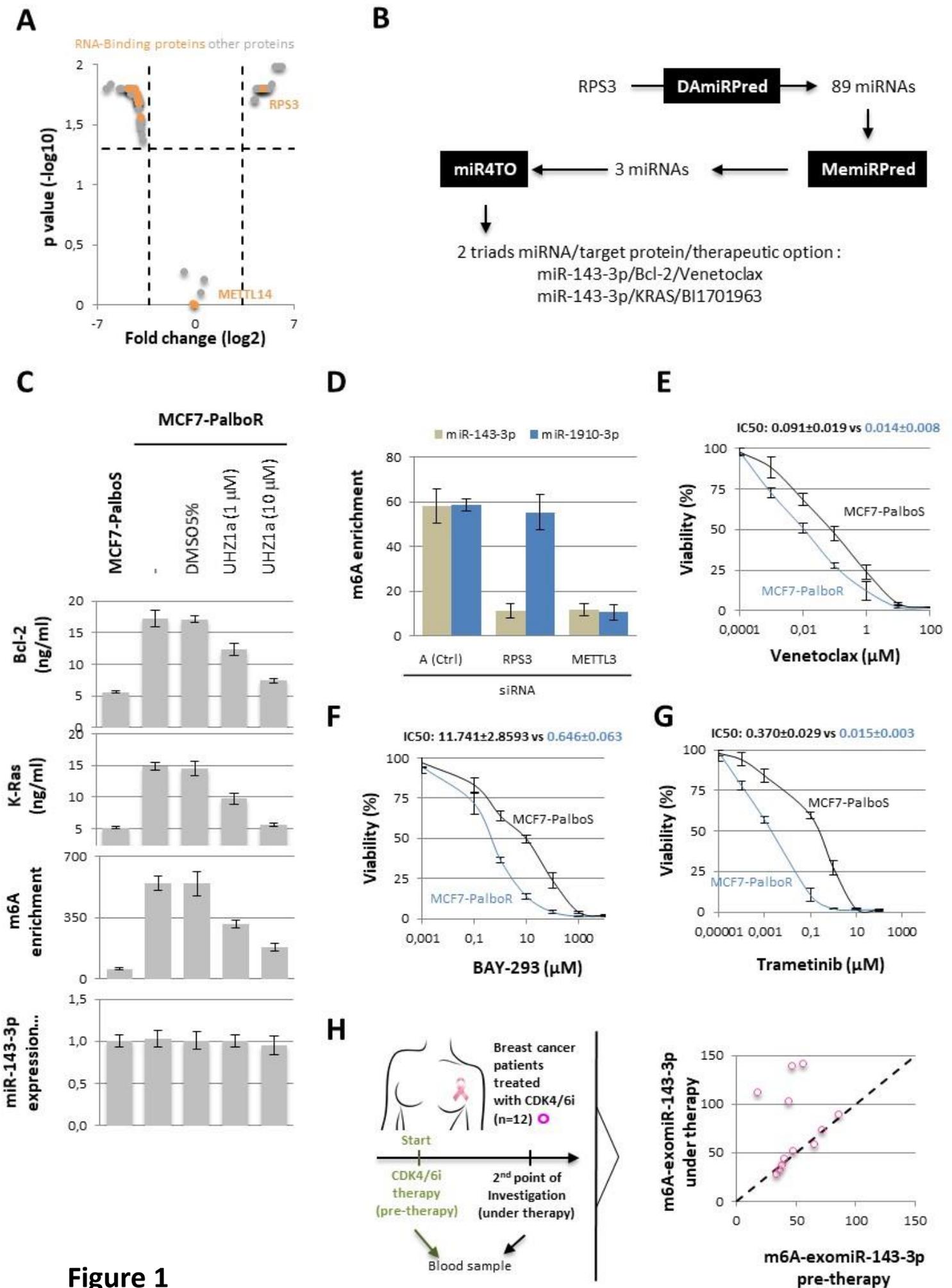


Figure 1

Figure 1. METTL3 interactome deciphering identifies a biomarker and therapeutic options to overcome the Palbociclib resistance in breast cancer cells

A. Volcano plot representing proteins differentially co-immunoprecipitated with METTL3 between MCF7-PalboS and MCF7-PalboR cells. Each dot represents one protein. Orange dots represent proteins defined as RNA-binding proteins and grey dots represent all other proteins.

B. Schematic representation of the workflow used to predict miRNAs likely to be both adenosine methylated by METTL3/RPS3 and to cause overexpression of targeted therapy proteins.

C. Analysis of the impact of UZH1a, a METTL3 inhibitor on the Bcl-2 and KRAS expression and on the adenosine methylation and expression level of miR-143-3p. The graphs represent the results of ELISA, MemiRIP and RT-qPCR analyses performed 72h after the indicated cell treatment. DMSO5% was used as negative control.

D. Analysis of the impact of siRNA-mediated downexpression of RPS3 and METTL3 on the adenosine methylation enrichment of miR-143-3p. Graph represents the results of memiRIP analyses performed 72h after siRNA transfection. siRNA-A is a non-targeting 20-25 nt siRNA designed as a negative control (Santa Cruz, France). miR-1910-3p was used as control untargeted by RPS3.

E. Dose-response curve used to calculate the IC50 of Venetoclax.

F. Dose-response curve used to calculate the IC50 of BAY-293.

G. Dose-response curve used to calculate the IC50 of Trametinib.

H. Graph illustrating the analysis of the evolution of adenosine methylation level of exosomal/EV miR-143-3p in 12 breast cancer patients. Each dot represents a patient (n=12). For each patient, MemiRIP was performed to estimate the adenosine methylation level of exosomal/EV miR-143-3p before the beginning (pre-therapy) and during (under therapy) of CDK4/6 inhibitor treatment.

In conclusion and from a clinical point of view, our data suggest that the level of adenosine methylation of exosomal/EV miR-143-3p could be used as a biomarker identifying a subgroup of patients with breast cancer and treated with CDK4/6 inhibitor likely to be treated with Palbociclib+Venetoclax, Palbociclib+BI1701963-BAY-293 or Palbociclib/Trametinib combotherapies in order to overcome the efficacy of the CDK4/6 inhibitors treatments that they are currently receiving. Of course, the results obtained through the study of 12 breast cancer patients treated with CDK4/6 inhibitors need to be reinforced by an analysis of a larger number of patients. Despite this limitation, our results are consistent with the idea that exosomal/EV miRNAs can be used as predictive/prognostic biomarkers for the management of breast cancer therapies such as Schwarzenbach and Gahan ¹⁸. In addition to completing the recently published list of predictive biomarkers of CDK4/6 inhibitors resistance ¹⁹, our work opens a new window by using the evolution of the level of adenosine methylation of miR-143-3p as a biomarker that can guide the clinician towards prescribing combotherapies that can overcome the resistance to CDK4/6 inhibitors. It should also be noted that the absence of an increase in the level of adenosine methylation of miR-143-3p in MCF-7-Tamoxifen resistant cells tends to support the idea that this biomarker is associated with the acquisition of resistance to CDK4/6i.

From a fundamental point of view, our data suggest that the methylating action of METTL3 can be regulated via its interactome. As such, our IP/MS data confirms some METTL3 interactors and also highlights the existence of 42 new METTL3 interactors compared to the STRING-DB and BioGRID databases. Whether it is in the confirmation or the highlighting of new METTL3 interactors, several explanations can support our results: the use of the MCF7-PalboS/PalboR model may be the source of METTL3 interactor detection specific to this model; the absence of cross-linker in our IP protocol may induce the loss of METTL3 interactors; antibody may also be the source of the lack of METTL3 interactor detection as the interaction is through an amino acid region blocking the access of the antibody to its epitope in METTL3.

In addition to increasing fundamental knowledge about the METTL3 interactome, our data also increase fundamental knowledge about the regulation of METTL3 functionality by supporting the idea that the adenosine methylation of specific miRNA results from the formation of a complex articulated around METTL3 and a protein having the ability to bind a specific/preferential given nucleotide sequence. In our study, the RPS3 protein represents this

type of proteins. To our knowledge, our paper is the first to define the existence of a sequence-selective methylation mechanism for miRNAs. Indeed, the works of Betero et al. (2018) and Covelo-Molares et al. (2021) had already mentioned the existence of a similar mechanism by mRNAs via the demonstration of interaction between METTL3 and the transcription factors Smad2/3 on the one hand and SALL1&2, STAT5B or ZEB2 on the other hand ¹⁰⁻¹¹. More generally, our work reinforces the parallel between the miRNA and DNA methylation via the existence of molecular mechanisms of sequence-selective methylation that can be described as transcription factor-directed or RNA Binding Protein-directed methylation, depending on the nature of the proteins interacting with DNA or miRNAs.

Material and methods.

Immunoprecipitation

After 2 cold PBS 1X washes (10ml), three 100mm dish culture at confluence 75% ($2 \cdot 10^9$ cells) were incubated with 500 μ l of lysis buffer (20mM TrisHCl pH 7.4, 150mM de NaCl, 1mM EDTA, 1% Triton + Protease cocktail inhibitor) for 5 minutes on ice. Then, cells were scrapped and centrifuged in 1.5ml Eppendorf tube (4°C, 15 min, 14 000g). After a transfer in a new tube, supernatant is used for protein dosage (#23225, Pierce BCA Protein Assay Kit, ThermoScientific, France). At this step supernatant can be stored at -80°C. Then, we performed of pre-clean step. For that, 20 μ L of magnetic beads (#10004D, DynaBeads, ThermoScientific, France) were twice washed with 1 ml of lysis tube in a 1.5ml Eppendorf tube. After the last wash, 500 μ g of lysate were added to magnetic beads previous an incubation of 2h at 4°C on a revolver tube mixer (Labnet international, France). After magnetic separation, the lysate is then collected to be incubated (overnight, 4°C, revolver tube mixer) with the antibody. Then, lysate-antibody mixture was incubated (2h, 4°C, revolver tube mixer) with 20 μ l of washed magnetic beads (as previously described). Four washes were next performed (two with lysis buffer and two lysis buffer devoid of triton). Finally, beads were resuspended in 100 μ L of Buffer NH_4HCO_3 at 50mM pH=8 and stocked for future use.

RNA Extractions

miRNA extractions were performed using miRNeasy mini kit (#217004, Qiagen, France) and QIAcube according to the manufacturer's instructions (Qiagen, France).

RT-qPCR analysis

RNA extract is performed using RNeasy Mini QIAcube Kit and QIAcube (#1038703, Qiagen, France). RT-qPCRs are performed using QuantiTect Reverse Transcription Kit (#205313, Qiagen, France), QuantiFast SYBR Green PCR Kit (#204057, Qiagen, France), QuantiTect Primer Assays (#249900, Qiagen, France) and Rotor-Gene Q as real-time thermocycler (Qiagen, France). Reference gene RPLP0 was used, with the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ relative quantification method.

For miRNA expression analysis, miRNA was reverse transcribed using a miRCURY LNA RT Kit (#339340, Qiagen, France) and analyzed by qPCR with the miRCURY LNA SYBR Green PCR Kit (#339346, Qiagen, France) using the specific miRCURY LNA miRNA PCR Assay (#339306, Qiagen, France) according to the manufacturer's instructions. Rotor-Gene Q was used as real-time thermocycler (Qiagen, France). Reference miRNA SNORD44 was used, with the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ relative quantification method.

Methylation level of miRNAs

For RNA immunoprecipitation (RIP), two rounds using 5 μ g of anti-m6A (ab208577, Abcam, France), antibodies and 5 μ g of small RNA were performed. The reaction was carried out using a Dynabeads protein G IP kit with some modifications (#10007D, ThermoFisher Scientific, France) such as described by Berulava et al (2015)¹⁷ and Briand et al. (2021)²⁰. As a control, IP was performed using IgG (#ab18443, Abcam, France) instead of anti-m6A antibody. miRNAs obtained from RIP were reverse transcribed using miRCURY LNA RT Kit (#339340, Qiagen, France) and analyzed by qPCR with the miRCURY LNA SYBR Green PCR Kit (#339346, Qiagen, France) such as described above. Fold enrichment was next calculated using Ct value obtained from qRT-PCR performed with input miR, IP-IgG, and IP-m6A, and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ formula.

Cell culture and treatment

The human breast cancer cell line MCF7 was obtained from ATCC (ATCC, #HTB22, US) and was cultured in DMEM medium (#21696035, ThermoFisher Scientific, France) supplemented with 10 % fetal bovine serum (#CVFCVF00-01, Eurobio, France), 1 % penicillin/streptomycin (#15140122, ThermoFisher Scientific, France) and 1 % glutamine (#A2916801, ThermoFisher Scientific, France) in a humidified incubator at 37 °C with 5 % CO₂. Chemotherapeutic agents (MedChemExpress, France) were dissolved in PBS/5% dimethylsulfoxide solution (DMSO; Sigma-Aldrich, France). PBS/5% dimethylsulfoxide solution was used as control treatment.

siRNA transfection

siRNA-METTL3 (#sc-92172, Santa Cruz, France) and siRNA-RPS3 (#sc-96950, Santa Cruz, France) were transfected in cells. siRNA-A (#sc-37007, Santa Cruz, France) i.e. a scrambled sequence devoid of specific degradation of any cellular message was used as control. In a six wells culture plate, $2 \cdot 10^5$ cells were incubated for 24h at 37°C in CO₂ incubator. Then, 60pmol of siRNA were incubated on cells for 7h at 37°C in a CO₂ incubator. Without removing the siRNA mixture, we next added 1 ml of normal growth medium containing 2 times the normal serum and antibiotics concentration, for 24h. Then, cells were expanded for 48h in normal culture medium. Thus, analyses were realized about 72h after the siRNA incubation.

Isolating exosomal miRNA from blood

From the blood sample collected in K+ EDTA tubes, 4–5 ml of plasma was isolated via two centrifugations (10 min/1900 g/4 °C and 10 min/16,000 g/4 °C) of 10 ml whole blood. 1 ml of plasma was processed for the isolation of miRNA using the ExomiRNeasy Midi kit (#77144, Qiagen, France) according to the manufacturer's instructions.

Patients data

Plasma was collected from patients treated at the “Institut de Cancérologie de l’Ouest” (ICO, <http://www.ico-cancer.fr>). All patients recruited gave signed, informed consent. All the samples collected and the associated clinical information were registered in the database (EPICURE-Sein CPP: CPPIDF1–2018-ND40-cat.1) validated by the French research ministry. Biological resources were stored at the “Centre de Ressources Biologiques-Tumorotheque (CRB)” (Institut de Cancérologie de l’Ouest, Saint-Herblain, F44800, France)²¹.

Statistical analysis and results

Except when indicated, data are representative of the mean and standard deviation calculated from three independent experiments. Significance of the differences in means \pm standard deviations was calculated using the Student-t test. The significance of correlation between two parameters was calculated using Pearson's test. $p < 0.05$ was used as a criterion for statistical significance.

References

1. Hu, B.-B. et al. N6-methyladenosine (m6A) RNA modification in gastrointestinal tract cancers: roles, mechanisms, and applications. *Mol Cancer* 18, 178 (2019).
2. Liu, S. et al. METTL3 plays multiple functions in biological processes. *Am J Cancer Res* 10, 1631–1646 (2020).
3. Csepány, T., Lin, A., Baldick, C. J. & Beemon, K. Sequence specificity of mRNA N6-adenosine methyltransferase. *J Biol Chem* 265, 20117–20122 (1990).
4. Harper, J. E., Miceli, S. M., Roberts, R. J. & Manley, J. L. Sequence specificity of the human mRNA N6-adenosine methylase in vitro. *Nucleic Acids Res* 18, 5735–5741 (1990).
5. Dominissini, D. et al. Topology of the human and mouse m6A RNA methylomes revealed by m6A-seq. *Nature* 485, 201–206 (2012).
6. Liu, J. et al. A METTL3-METTL14 complex mediates mammalian nuclear RNA N6-adenosine methylation. *Nat. Chem. Biol.* 10, 93–95 (2014).
7. Wang, X. et al. Structural basis of N(6)-adenosine methylation by the METTL3-METTL14 complex. *Nature* 534, 575–578 (2016).
8. Patil, D. P. et al. m(6)A RNA methylation promotes XIST-mediated transcriptional repression. *Nature* 537, 369–373 (2016).
9. Yue, Y. et al. VIRMA mediates preferential m6A mRNA methylation in 3'UTR and near stop codon and associates with alternative polyadenylation. *Cell Discov* 4, 10 (2018).
10. Bertero, A. et al. The SMAD2/3 interactome reveals that TGF β controls m6A mRNA methylation in pluripotency. *Nature* 555, 256–259 (2018).
11. Covelo-Molares, H. et al. The comprehensive interactomes of human adenosine RNA methyltransferases and demethylases reveal distinct functional and regulatory features. *Nucleic Acids Res* 49, 10895–10910 (2021).
12. Hervouet, E., Vallette, F. M. & Cartron, P.-F. Dnmt3/transcription factor interactions as crucial players in targeted DNA methylation. *Epigenetics* 4, 487–499 (2009).
13. Hervouet, E., Vallette, F. M. & Cartron, P.-F. Dnmt1/Transcription factor interactions: an alternative mechanism of DNA methylation inheritance. *Genes Cancer* 1, 434–443 (2010).

14. Cartron, P.-F., Pacaud, Romain & Salbert, Gilles. Specific or not specific recruitment of DNMTs for DNA methylation, an epigenetic dilemma. *Revue Francophone des Laboratoires* 473, (2015).
15. Frenel, J.-S. et al. Abstract P4-04-09: The acquired resistance of mammary cancer cells to CDK4/6 inhibitors drives a DNA methylation reprogramming of genes encoding for BCL2 family members that confers a phenotype of high apopto-sensitivity induced by a BH3-mimetic drug. in Poster Session Abstracts P4-04-09-P4-04-09 (American Association for Cancer Research, 2020). doi:10.1158/1538-7445.SABCS19-P4-04-09.
16. Gutiérrez-Cárdenas, J. & Wang, Z. Prediction of binding miRNAs involved with immune genes to the SARS-CoV-2 by using sequence features extraction and One-class SVM. *Inform Med Unlocked* 30, 100958 (2022).
17. Berulava, T., Rahmann, S., Rademacher, K., Klein-Hitpass, L. & Horsthemke, B. N6-adenosine methylation in MiRNAs. *PLoS ONE* 10, e0118438 (2015).
18. Schwarzenbach, H. & Gahan, P. B. Predictive value of exosomes and their cargo in drug response/resistance of breast cancer patients. *Cancer Drug Resist* 3, 63–82 (2020).
19. Asghar, U. S., Kanani, R., Roylance, R. & Mitnacht, S. Systematic Review of Molecular Biomarkers Predictive of Resistance to CDK4/6 Inhibition in Metastatic Breast Cancer. *JCO Precis Oncol* 6, e2100002 (2022).
20. Briand, J. et al. N6-Adenosine Methylation of miRNA-200b-3p Influences Its Functionality and Is a Theranostic Tool. *Mol Ther Nucleic Acids* 22, 72–83 (2020).
21. Heymann, D. et al. Centre de Ressources Biologiques-Tumorothèque: Bioresources and Associated Clinical Data Dedicated to Translational Research in Oncology at the Institut de Cancérologie de l'Ouest, France. *Open Journal of Bioresources* 7, 5 (2020).

Declarations

Ethics approval and consent to participate

Not applicable

Consent for publication

Not applicable

Availability of data and materials

The datasets obtained and analyzed in the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Funding

This work was supported by grants (EpiSAVMEN) from REGION PAYS DE LA LOIRE and SIRIC ILIAD (INCa-DGOS Inserm-12558).

Authors' contributions:

PFC designed experiments and coordinated the project.

FC, CG, KE, QA, GBC, and PFC performed all experiments.

All authors interpreted and discussed the data.

PFC wrote the manuscript.

All authors have reviewed and approved the manuscript.

Acknowledgements

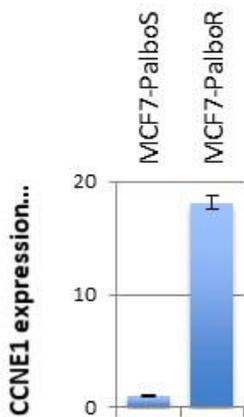
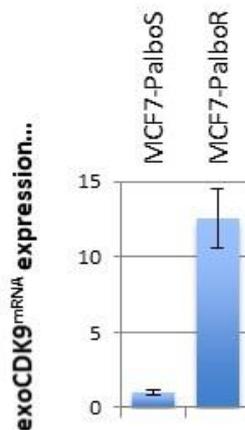
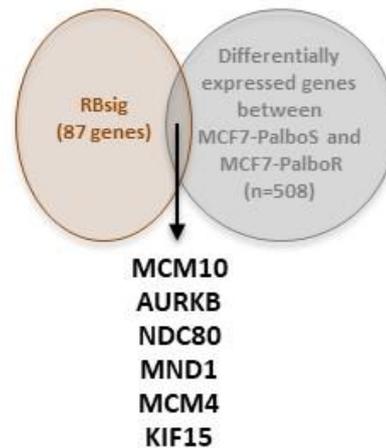
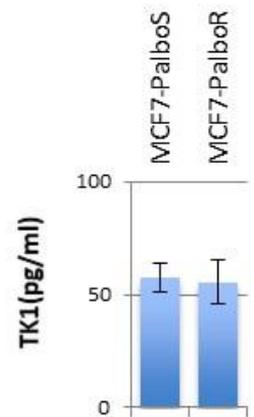
FC was supported by fellowships from “EpiSAVMEN/REGION PAYS DE LA LOIRE” research program. This paper was prepared in the context of the SIRIC ILIAD program supported by the French National Cancer Institute national (INCa), the Ministry of Health and the Institute for Health and Medical Research (Inserm) (SIRIC ILIAD, INCa-DGOS Inserm-12558).

A

	References	In our study	
		Observation	Method
IC50 value	-	IC50=4.286 μ M and IC50=0.752 μ M	MTT ¹⁻²
CCNE1 ^{mRNA} overexpression	Turner, N. C. <i>et al. J Clin Oncol</i> 37, 1169–1178 (2019)	yes	RNA-seq ² and RT-qPCR (Fig. S1B)
Exosomal CDK9 ^{mRNA}	Del Re, M. <i>et al. Breast Cancer Res Treat</i> 178, 57–62 (2019)	yes	RT-qPCR (Fig. S1C)
RBsig	Malorni, L. <i>et al. Oncotarget</i> 7, 68012–68022 (2016)	Partial (6/87)	RNA-seq ²
TK1 activity/expression	McCartney, A. <i>et al. Clin Cancer Res</i> 26, 2131–2139 (2020).	non	ELISA

1: Frenel, J.-S. *et al.* Abstract P4-04-09: The acquired resistance of mammary cancer cells to CDK4/6 inhibitors drives a DNA methylation reprogramming of genes encoding for BCL2 family members that confers a phenotype of high apopto-sensitivity induced by a BH3-mimetic drug. in *Poster Session Abstracts P4-04-09-P4-04-09* (American Association for Cancer Research, 2020). doi:10.1158/1538-7445.SABCS19-P4-04-09.

2 : Courant, F. *et al.* Deciphering the BRD4 pathway provides therapeutic options to overcome the Palbociclib resistance in breast cancer. In preparation.

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

Supplementary Figure S1. Characterization of MCF7-PalboS and MCF7-PalboR cell.

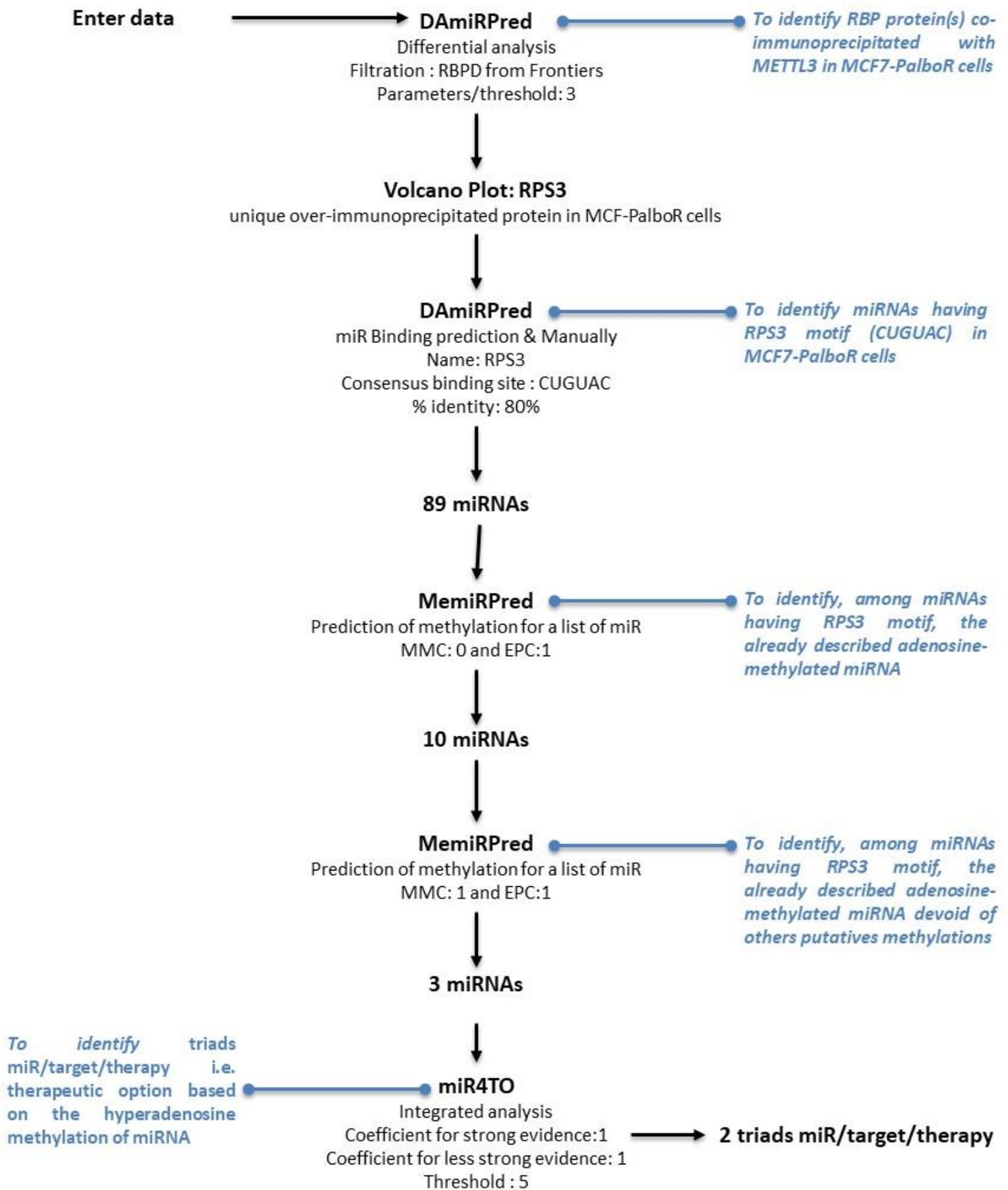
A. Table summarizing the presence/absence of resistance signature to CDK4/6 inhibitors.

B. Graph showing the overexpression of cyclin E1 transcript (CCNE1^{mRNA}) in MCF7-PalboR cells compared to MCF7-PalboS cells. RT-qPCR were performed as described above.

C. Graph showing the overexpression of CDK9 transcript in exosome/extracellular vesicles of MCF7-PalboR cells (CDK9^{mRNA}) compared to exosome/extracellular vesicles of MCF7-PalboS cells. RT-qPCR were performed as described above.

D. Venn diagram illustrating the fact that 6 of the 87 SBsig genes are differentially expressed between MCF7-PalboS cells and MCF7-PalboR cells.

E. Graph showing the unchange of TK1 expression between MCF7-PalboS and MCF7-PalboS cells. TK1 expression was estimated using ELISA ().



Supplementary Figure S2. Overview of bioinformatic tools and parameters used in our *in silico* analysis. The goal of each step is listed in blue.



Python script to retrieve direct METTL3 interactors from human proteins and API-STRING data

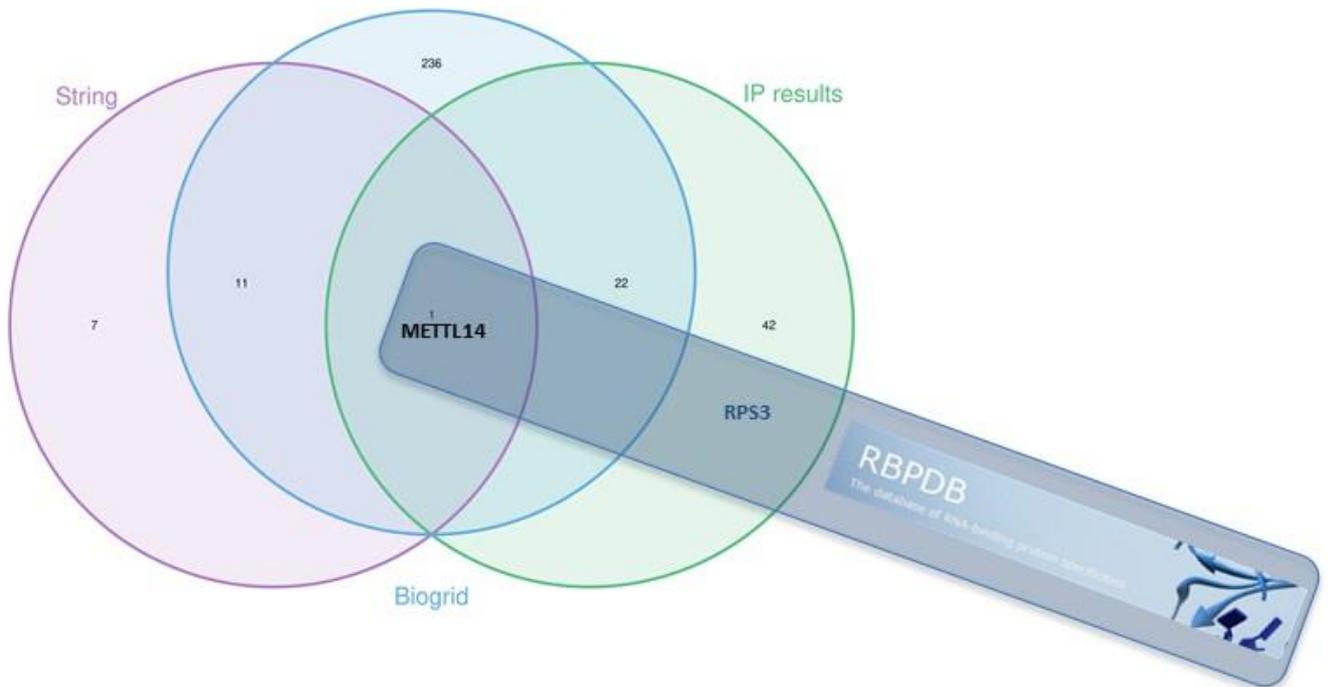


Python script to retrieve direct METTL3 interactors from human proteins

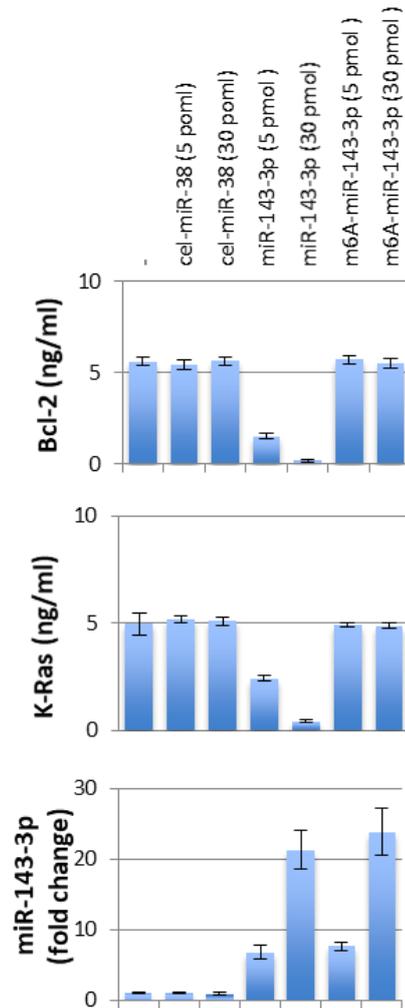


Mass Spectrometry results

Python script to clean data (IP-METTL3 vs IP-IgG)

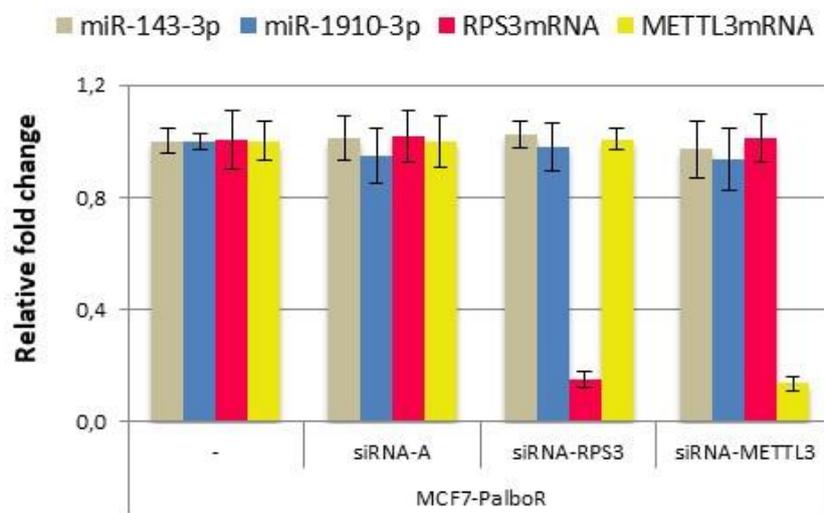


Supplementary Figure S3. Venn diagram illustrating the identification of 42 new METTL3 interactors and the presence of RPS3 on these 42 new METTL3 interactors according to DAmiRPred.



Supplementary Figure S4. Graph illustrating the effect of unmethylated and adenosine-methylated transfection of miR-143-3p on the Bcl-2 and KRAS expression.

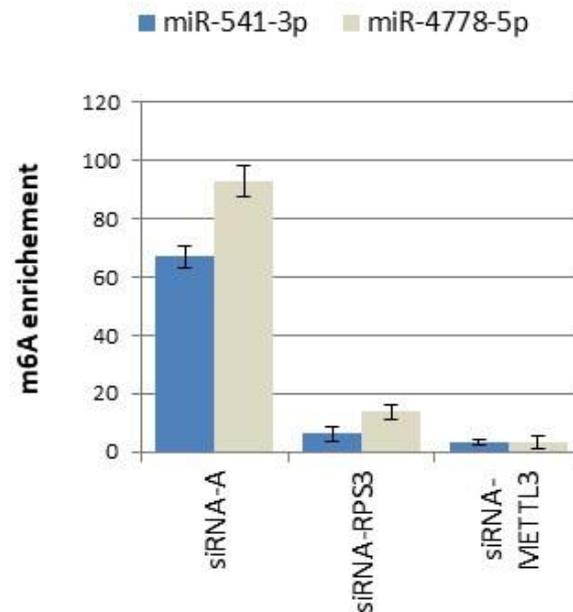
RT-qPCR analyses report that miR-143-3p increased following transfection of unmethylated and adenosine-methylated mimic miR-143-3p into MCF7-PalboS cells. Transfection of 5 pmol of miR-143-3p in both its both form generates the same increase in expression of this miRNA. This finding also prevails for transfections performed with 30 pmol. But, only the transfection of unmethylated forms of mimic miR-143-3p promotes the down-expression of Bcl-2 and KRAS (ELISA).



Supplementary Figure S5. Graph illustrating the impact of siRNA-A (control), siRNA-RPS3 and siRNA-METTL3 on the expression level of miR-143-3p and miR-1910-3p and of the RPS3 and METTL3 transcripts. As expected, siRNA-RPS3 represses only RPS3 expression and siRNA-METTL3 represses only METTL3 expression.

A

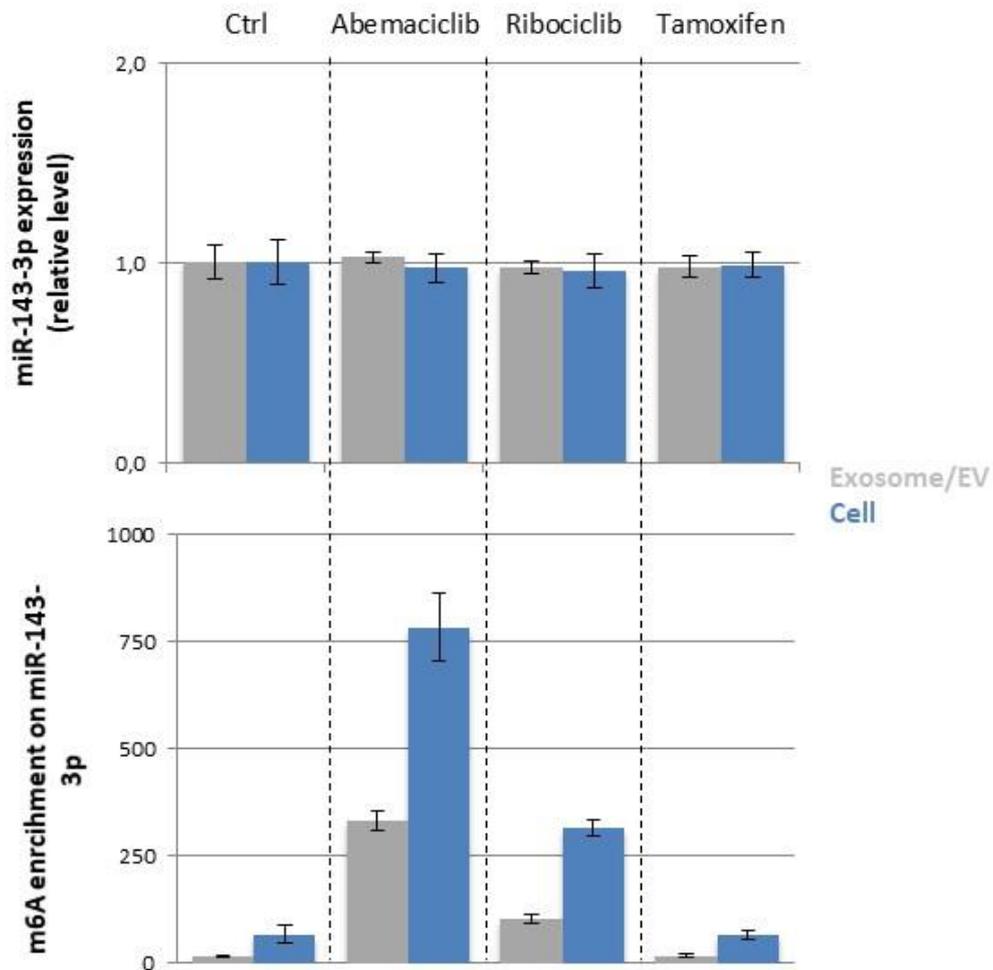
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
hsa-miR-541-3p	U	G	G	U	G	G	G	C	A	C	A	G	A	A	U	C	U	G	G	A	C	U
RPS3 motif (83.3%)																C	U	G	U	A	C	
hsa-miR-4778-5p	A	A	U	U	C	U	G	U	A	A	A	G	G	A	A	G	A	A	G	A	G	G
RPS3 motif (83.3%)					C	U	G	U	A	C												

B

Supplementary Figure S6. Impact of siRNA-mediated downexpression of RPS3 and METTL3 on the adenosine methylation of miRNAs having the RPS3 motif (threshold > 80%), described as adenosine methylated by literature and devoid of putative other methylation types (**Supplementary File F7**).

A. Localization of RPS3 motif in miRNA.

B. Graph represents the results of memiRIP analyses performed 72h after siRNA transfection. siRNA-A is a non-targeting 20-25 nt siRNA designed as a negative control (Santa Cruz, France).



Supplementary Figure S7. Graph illustrating the fact that MCF7 cells treated with Abemaciclib (1 μ M) and Ribociclib (1 μ M) (6 weeks, twice treatment by week) also harbored a enrichment of adenosine methylation of exosomal/EV (grey) and cellular (blue) miR-143-3p, while the expression level of miR-143-3p unchanged. MemiRIP and RT-qPCR were used to estimate the m6A enrichment and expression level of miR-143-3p such as previous described. MCF-7-Tamoxifen resistant cells were obtained from Merck (#SCC101, MCF-7/TAMR-1 Human Breast Cancer Cell Line)

List of new METTL3 interactors (n=65)			
ABCE1	GMPS	PFKM	TUBB
ACTG1	HNRNPM	PFKP	TUBB4B
ACTN4	HNRNPU	PKM	TUFM
AHNAK	HSP90AA1	PPP2R1A	VPS35
ATP5A1	HSP90AB1	PRKDC	XPO1
CBR1	HSPA1A	PSMC3	
COPB1	HSPA4	PSMD11	
COPG1	HSPA5	RAB7A	
DDX17	HSPA8	RARS	
DDX3X	HSPB1	RPL10	
DDX5	HYOU1	RPL6	
DYNC1H1	ILF3	RPS16	
EEF2	IPO5	RPS3	
EIF4A1	IQGAP1	RPS4X	
EIF4G1	LRPPRC	RUVBL2	
EPRS	MCM3	SF3B3	
ERCC6L	METTL14	SLC25A10	
FASN	MYH9	TCP1	
FLNA	PABPC1	TMED8	
GDI2	PDIA3	TUBA1B	

Supplementary Table T1. List of new proteins co-immunoprecipitated with METTL3 in MCF7-PalboS and MCF7-PalboR cells. The new METTL3 interactors (i.e. those not described by BioGrid and String-DB) are in blue. Among these proteins, we note the presence of RPS3.

List of proteins co-immunoprecipitated with METTL3 in			
MCF7-PalboS and PalboR cells	MCF7-PalboS cells		MCF7-PalboR cells
METTL14	ABCE1	IQGAP1	ACTG1
HSPA5	ACTN4	LRPPRC	ATP5A1
PABPC1	AHNAK	MCM3	EEF2
TUBB	CBR1	MYH9	EIF4A1
	COPB1	PDIA3	ERCC6L
	COPG1	PFKM	FASN
	DDX17	PFKP	HSP90AA1
	DDX3X	PPP2R1A	HSP90AB1
	DDX5	PRKDC	HSPA1A
	DYNC1H1	PSMC3	HSPA8
	EIF4G1	PSMD11	PKM
	EPRS	RAB7A	RPL10
	FLNA	RARS	RPL6
	GDI2	RUVBL2	RPS3
	GMPS	SF3B3	RPS16
	HNRNPM	SLC25A10	RPS4X
	HNRNPU	TCP1	TMED8
	HSPA4	TUBA1B	
	HSPB1	TUBB4B	
	HYOU1	TUFM	
	ILF3	VPS35	
	IPO5	XPO1	

Supplementary Table T2. List of proteins co-immunoprecipitated with METTL3 in MCF7-PalboS and MCF7-PalboR cells. RNA-binding proteins are in orange.

Patient	CDK4/6 inhibitors
1	Abemaciclib
2	Ribociclib
3	Palbociclib
4	Palbociclib
5	Palbociclib
6	Palbociclib
7	Ribociclib
8	Abemaciclib
9	Palbociclib
10	Ribociclib
11	Ribociclib
12	Abemaciclib

Supplementary Table T3. CDK4/6 inhibitor therapy of breast cancer patients included in our study. Patients with a gain of adenosine methylation of exomiR-143-3p are in bold.

REAGENT or RESOURCE	SOURCE	IDENTIFIER
Therapeutic molecules		
Venetoclax (CAS N°: 1257044-40-8)	MedChemExpress	HY-15531
BAY-293 (CAS N°: 2244904-70-7)	MedChemExpress	HY-114398
Palbociclib (CAS N°: 571190-30-2)	MedChemExpress	HY-50767
Abemaciclib (CAS N°: 1231929-97-7)	MedChemExpress	HY-16297A
Ribociclib (CAS N°: 1211441-98-3)	MedChemExpress	HY-15777
Trametinib (CAS N°: 871700-17-3)	MedChemExpress	HY-10999
Antibodies		
anti-m6A	Abcam	Ab208577
anti-METTL3	Abcam	Ab195352
Anti-IgG	Cell Signaling	2729
Primers		
miR-143-3p	Qiagen	YP00205992
miR-1910-3p	Qiagen	YP02110313
miR-541-3p	Qiagen	YP00204276
miR-4778-5p	Qiagen	YP02119877
RPLPO	Qiagen	QT00075012
METTL3	Qiagen	QT00036540
RPS3	Qiagen	SBH0188418
CCNE1	Qiagen	QT00041986
CDK9	Qiagen	QT00208523
Mimics		
Methylated and unmethylated miR-143-3p	Qiagen	MSY0000435
Methylated and unmethylated cel-miR-38	Qiagen	MSY0000009
siRNA		
siRNA-RPS	Santa Cruz	sc-96950
siRNA-METTL3	Santa Cruz	sc-92172
siRNA-A	Santa Cruz	sc-37007
Cell lines and reagents		
MCF7	ATCC	HTB22
MCF7-TAMR1	Merck	SCC101
DMEM	ThermoFisher Scientific	21696035
SVF	Eurobio scientific	CVFCVF00-01
Glutamine	ThermoFisher Scientific	A2916801
Penicillin/streptomycin	ThermoFisher Scientific	15140122
Trypsin-EDTA	ThermoFisher Scientific	25300054
Reagents		
dimethylsulfoxide solution (DMSO)	Sigma	D2650
3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)	VWR	M2128
RIPA buffer	ThermoFisher	89901
Equipment and materials		
Cell Counter	Merck-Millipore	Scepter™ 2.0
spectrophotometer	Perkin Elmer	Victor X3 20301634
QIAcube automate	Qiagen	47082
Rotor-Gene Q	Qiagen	R0513212
CO ₂ incubator	Panasonic	MCO-19AIC
PSM	BIOMEDIS	ESCO-2014-89449
Software and algorithms		
Microsoft Excel	Microsoft	N/A

Additional Table T1. Additional key resource Table

3. Discussion

Le complexe N6-méthyltransférase a été décrit comme étant composé de METTL3, METTL14 et WTAP. METTL3 constitue la sous unité catalytique de ce complexe mais n'est pas capable de reconnaître ses cibles seules. METTL14 est la sous unité capable de reconnaître le substrat, tandis que WTAP régule l'activité catalytique de METTL3 (Liu *et al.*, 2014). Cependant, ce complexe à lui seul n'est pas capable de méthyle l'ensemble des différentes catégories d'ARNs. Quelques mécanismes de recrutement de METTL3 sur des séquences spécifiques ont été décrits comme par exemple via RBM15/15B qui recrute le complexe sur l'ARN XIST, VIRMA-HAKAI-ZC3H13 qui permet le recrutement au niveau des régions 3'UTR proche du codon stop et des sites alternatifs de polyadénylation des ARNm (Patil *et al.*, 2016; Yue *et al.*, 2018). D'autres protéines de la classe des facteurs de transcriptions comme SMAD2/3, SALL1/2, STAT5B et ZEB2 sont également capable d'interagir avec METTL3 et de recruter le complexe au niveau de ces cibles (Bertero *et al.*, 2018; Covelo-Molares *et al.*, 2021). Ces mécanismes semblent être similaires aux mécanismes de recrutements des DNMTs. Ainsi, nous avons émis l'hypothèse que si le mode de recrutement de METTL3 sur ces différentes cibles est possible grâce à des protéines « guides », alors, si une dérégulation de celles-ci ou une modification des partenaires apparaît dans un contexte particulier comme la tumorigenèse ou les phénomènes de résistance aux traitements, cela pourrait entraîner un différentiel de méthylation et des modifications d'expression de protéines. C'est pourquoi nous nous sommes intéressés plus particulièrement aux potentiels « guides » de METTL3 au niveau des miRNAs. Les miRNAs sont directement impliqués dans l'activation ou l'inhibition de la traduction des ARNm de par leur fonction. Il est admis que la m6A des miRNAs entraîne leur inhibition. Ils ne sont donc plus capables de réprimer leurs cibles, ce qui entraîne la traduction des ARNm. Inversement, s'ils sont déméthylés, alors ils sont capables d'inhiber la traduction.

Pour investiguer les partenaires d'interaction de METTL3, nous avons réalisé des immunoprécipitations contre METTL3 couplé avec du séquençage par spectrométrie de masse. Nous avons ainsi mis en évidence un total de 65 protéines Co-IP avec METTL3 dans nos conditions. Sur ces 65 protéines, 23 sont déjà identifiées comme interagissant avec METTL3 dans les banques de données BioGrid ou String DB. Sur ces 65 protéines, 44

sont Co-IP uniquement dans les cellules MCF7-PalboS, 4 sont communément Co-IP dans les deux conditions et 17 uniquement dans la condition MCF7-PalboR. En appliquant un filtre pour sélectionner uniquement les RBPs, sont retrouvées 7 protéines dans les MCF7-PalboS, 2 communément Co-IP et 1 dans la condition MCF7-PalboR. Les RBS communément Co-IP sont METTL14 qui a une très forte interaction avec METTL3, et PABPC1 (Polyadénylate-binding protein 1). PABPC1 est impliqué dans le splicing des pre-ARNm et leur stabilité en se fixant sur la queue poly(A) (Grosset *et al.*, 2000). PABPC1 est également capable de se lier aux ARNm contenant de la m6A et joue un rôle stabilisateur (Zhu *et al.*, 2020). PABPC1 ne fait pas partie des protéines décrites comme interagissant avec METTL3 mais sa fonction et sa localisation sur les ARNm est similaire aux protéines VIRMA/HAKAI/ZC3H13, ce qui laisse penser que METTL3 pourrait être également recruté par PABPC1 pour assurer la stabilité des ARNm. PABPC1 serait impliqué dans le recrutement de METTL3 pour méthyler certains ARNm plutôt que dans la reconnaissance des ARNm m6A (ce qui ne serait pas incompatible avec sa co-localisation sur les ARNm m6A). On pourrait imaginer que PABPC1 reconnaît ses ARNm cibles, recruterai le complexe de méthylation et permettrait de renforcer son interaction avec ses cibles pour les stabiliser. Ceci n'est qu'une hypothèse et nécessiterai plus de recherche sur le sujet.

Parmi les RBP Co-IP dans les cellules MCF7-PalboS, sont retrouvés plusieurs membres de la famille des HNRNP (Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins) et de la famille des DEAD-box Helicases (DDX) : HNRNPM, HNRNPU, DDX5, DDX3X, DDX17. Les deux autres protéines sont EIF4G1 et ILF3. Certains membres des familles HNRNP et DDX sont connus pour interagir avec les miRNA comme HNRNPC, HNNRPA2B1, DDX3. De manière intéressante, ces protéines ne sont pas Co-IP dans la condition MCF7-PalboR. Seulement une RBP est Co-IP avec METTL3 : RPS3 (Ribosomal Protein S3). Ce constat va dans le sens de notre hypothèse : un switch de partenaires se produirait durant le phénomène de résistance au palbociclib, conduisant à un différentiel de méthylation (miRNAs et autres ARNs) qui pourrait participer au phénomène d'acquisition de la résistance. De manière intéressante, ce switch ne serait pas dû à une perte d'expression des protéines. En effet, l'analyse par western blot de l'expression de HNRNPM, HNRNPU, et EIF4G1 montre l'absence de variations d'expression entre les deux conditions (**Figure 30**).

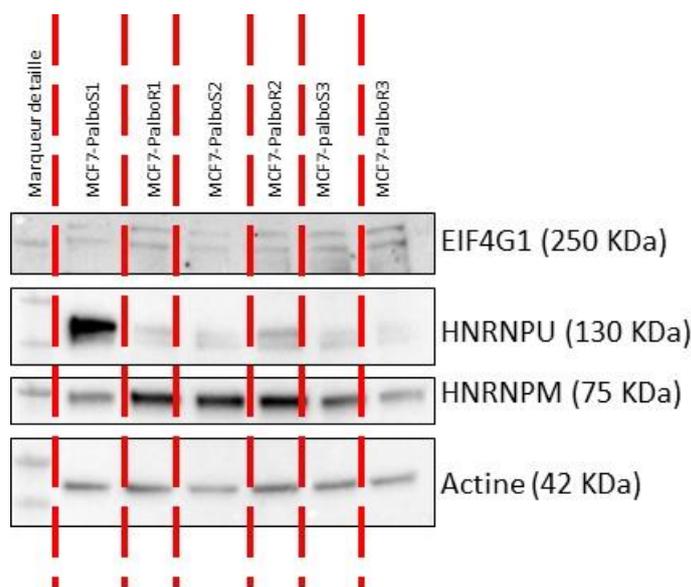


Figure 30 : Western Blot des protéines EIF4G1, HNRNPU, HNRNPM comparées à l'actine

Les dépôts sont réalisés en alternance des échantillons MCF7-palboS et MCF7-PalboR en triplicat avec les échantillons inputs qui ont servis aux IP.

Afin de valider le rôle de RPS3 comme potentiel acteur du recrutement de METTL3 au niveau de miRNAs dans les cellules résistantes au palbociclib, nous avons, dans un premier temps, réalisé un analyse bioinformatique basée sur la séquence de fixation de RPS3 sur le miRNA hsa-let7c-3p (CUGUAC). Nous avons considéré cette séquence comme la séquence canonique de fixation de RPS3 aux miRNAs et l'avons recherché parmi la liste des miRNAs identifiés comme étant adénosine méthylés par Berulava (Berulava *et al.*, 2015). Par la suite, nous avons exclus les miRNAs comportant la séquence de méthylation connue de METTL3 (DRACH) pour garder uniquement les miRNAs possédants la séquence attribuée à RPS3. Cette analyse *in silico* a permis d'identifier 94 miRNAs (sur 2654 analysés) comportant la séquence de fixation de RPS3 (avec au plus un mésappariement). 83 miRNAs de la banque de donnée analysée comportent les deux séquences (CUGUAC et DRACH), soit un total de 177 miRNAs possédant la séquence de fixation de RPS3. Parmi les 94 miRNA ne possédant que la séquence de RPS3, 7 sont décrit comme méthylés par Berulava.

Au laboratoire, nous avons développé un outil de prédiction bioinformatique (miR4TO) permettant d'associer les miRNAs à leurs cibles connus et à d'éventuelles thérapies ciblées

contre les protéines réprimées par les miRNAs. Ainsi, si un miRNA est méthylé, sa cible est en principe surexprimée et la thérapie ciblée identifiée devrait pallier à l'inhibition du miRNA.

L'utilisation de cet outil (miR4TO) nous a permis d'identifier un miRNA parmi les 7 pour lequel des thérapies ciblées sont développées contre les protéines qu'il réprime : le miRNA-143-3p. Celui-ci est capable de réprimer la traduction des ARNm de BCL2 et KRas. BCL2 est une protéine anti-apoptotique communément exprimé dans les cancers du sein RH+ de hauts grades (Olopade *et al.*, 1997; Lucantoni *et al.*, 2021). Quant à KRas, son rôle a été décrit dans l'étude précédente. Afin de valider notre prédiction bioinformatique, nous avons évalué l'expression de ces protéines dans notre modèle par ELISA. Les résultats semblent confirmer cette prédiction puisque l'on observe une surexpression des protéines dans nos cellules résistantes, expression qui diminue lors du traitement avec un inhibiteur de METTL3 (UZH1a) associée à la diminution du niveau de méthylation du miRNA-143-3p (forme active). La transfection d'une forme méthylée du miRNA-143-3p et l'absence de variation d'expression des protéines confirme bien que sous sa forme adénosine méthylé, le miRNA n'est pas capable d'inhiber ses cibles. Ces résultats confirment le rôle du miRNA-143-3p et sa capacité à se faire méthyler par METTL3 indépendamment de l'absence de la séquence DRACH.

Pour déterminer si le complexe METTL3/RPS3 est bien responsable de la méthylation du miRNA-143-3p, nous avons procédé à des transfections de siRNA dirigés contre METTL3 ou RPS3 et analysé le niveau de méthylation du miRNA-143-3p ainsi que deux autres miRNAs retrouvés comme adénosine méthylés, possédants la séquence consensus de RPS3 mais pas la séquence DRACH (miRNA-541-3p et miRNA-4778-5p). Nous avons également analysés le niveau de méthylation du miRNA-190-3p, qui possède uniquement la séquence DRACH. Ces expériences montrent que l'inhibition de RPS3 entraîne la perte de méthylation des miRNA-143-3p/541-3p/4778-5p, sans modifier le niveau d'expression du miRNA-143-3p. En revanche, l'inhibition de METTL3 entraîne la perte de méthylation de l'ensemble des miRNAs analysés. Ceci confirme l'hypothèse selon laquelle RPS3 est capable de recruter METTL3 pour méthyler ses miRNAs cibles. Pour finir sur cet aspect moléculaire, la comparaison de tests de viabilité entre nos deux conditions en présence des deux molécules de thérapies ciblées prédites par l'outil miR4TO ont permis de valider celles-ci. Les cellules MCF7-PalboR sont plus sensibles aux inhibiteurs de BCL2 et KRas, protéines surexprimées dans ces cellules. Nous avons également confirmé le gain de sensibilité des cellules MCF7-PalboR pour un autre inhibiteur de la voie de signalisation Mek/KRas : le trametinib, inhibiteur déjà utilisé dans des essais cliniques pour le

traitement de cancers du sein (Seo et al., 2020). La combothérapie palbociclib + trametinib a déjà été testée dans des études précliniques dans le traitement de cancers colorectaux KRas mutés et a montré des effets synergiques intéressants dans le traitement de la pathologie (Lee et al., 2016).

Ainsi, 83 miRNAs possédant les deux séquences de méthylation (DRACH CUGUAC) et 94 qui ne possèdent que la séquence CUGUAC peuvent être potentiellement régulés par ce complexe. Bien que 7 miRNAs possédant la séquence de reconnaissance par RPS3 ont été identifiés comme méthylés, il est possible de penser que selon le contexte, ou en réponse à un autre traitement, d'autres miRNA parmi les 177 possédant le motif RPS3 pourraient être différenciellement méthylés par ce complexe, pouvant ouvrir la voie à de nouveaux biomarqueurs/ stratégie thérapeutiques. D'autres analyses complémentaires de séquençage de miRNA Co-IP avec METTL3 sont en cours d'analyse. Ceux-ci devraient fournir une liste des miRNAs principalement méthylés dans chacune des conditions, et donc le potentiel changement de cible de METTL3 médié par son nouvel interactome. De manière intéressante, on peut voir que l'interactome de METTL3 dans la condition MCF7-PalboR est enrichie en protéines ribosomales. A priori, cela pourrait correspondre à du bruit de fond car les protéines ribosomales sont connues pour être contaminantes dans ce genre d'expériences. Cependant, nos résultats semblent démontrer le contraire dans ce cas précis, d'autant plus que ces protéines enrichies dans la condition résistante ne sont pas retrouvées dans les conditions MCF7-PalboS. METTL3 étant capable d'interagir avec les boucles de traductions et les ribosomes, cela semble renforcer nos observations (Lin *et al.*, 2016a). Notre étude questionne le rôle extra-ribosomales que peuvent avoir certaines protéines de cette famille, comme RPS3 qui est un des composants de la sous unité 40s des ribosomes. Elle a également un rôle d'endonucléase et est impliquée dans la réparation de l'ADN lors de cassures induites par UV (Gao and Hardwidge, 2011).

Pour faire un parallèle avec notre étude précédente, nous avons cherché à analyser le niveau de méthylation du miRNA-143-3p dans les exosomes sanguins des patientes au début du traitement avec un iCDK4/6 (palbociclib, ribociclib, abémaciclib) et au cours du traitement pour comparer le niveau de méthylation initial et final. Ces résultats sur 12 patientes ont

montré une augmentation du niveau de méthylation du miRNA-143-3p pour 4 patientes (1/3). Nous avons décidé d'inclure des patientes ayant reçu l'un des trois iCDK4/6 car nous avons également observé une augmentation du niveau de méthylation du miRNA-143-3p dans des cellules traitées avec ces inhibiteurs pendant 6 semaines. En comparaison, des cellules résistantes au tamoxifène n'ont pas de gain de méthylation du miRNA-143-3p, ce qui suggère un mécanisme de réponse propre aux iCDK4/6. Parmi les 4 patientes ayant un gain de méthylation du miRNA-143-3p, deux ont été traitées avec du palbociclib et deux avec du ribociclib. Ces résultats montrent un intérêt dans l'analyse de la méthylation du miRNA-143-3p présent dans les exosomes / vésicules extracellulaires circulants dans le sang des patientes comme biomarqueur prédictif de réponse aux combothérapies iCDK4/6-venetoclax, iCDK4/6-trametinib, iCDK4/6-BI1701963-BAY-293. L'analyse d'une cohorte de patiente plus importante traitée avec les trois iCDK4/6, avec un suivi à long terme et des points de contrôles réguliers, allant du début du traitement jusqu'à une rechute confirmée, permettrait d'affiner la classification des patientes éligibles à ces thérapies. Cela permettrait peut-être également de dégager une tendance/temporalité à partir de laquelle apparaît ce biomarqueur en fonction de l'iCDK4/6.

Nos travaux ont permis de démontrer l'implication des mécanismes épitranscriptomiques dans l'acquisition de la résistance au palbociclib. Les modifications d'interaction des méthyltransférases, notamment METTL3 au cours du traitement, entraîne une modification du recrutement de celle-ci et un changement de cibles : cela entraîne la méthylation de miRNAs anti-tumoraux et l'expression de protéines anti-apoptotiques et oncogéniques dans notre modèle. Cette étude a également démontré un mécanisme de recrutement de METTL3 cible-spécifique, médié par des RNA Binding Protein au niveau de miRNAs. Ce phénomène permet d'expliquer comment sont régulées les méthylations des miRNAs et expliquer le switch qui apparaît durant les phénomènes de résistances aux thérapies, voir même dans les tumorigenèses, puisque de nombreux miRNAs anti-tumoraux sont retrouvés méthylés et donc inactivés tandis que les miRNAs pro-tumoraux sont déméthylés. Ceci montrerait un mécanisme actif et sélectif de ce processus et pourrait permettre le développement d'inhibiteurs spécifiques des complexes impliqués dans ces méthylations pro-tumorales (complexes qui ne seraient pas formés dans les cellules saines, ce qui limiterait les effets secondaires des épigénétiques).

L'identification du miRNA-143-3p comme potentiel biomarqueur prédictif de vulnérabilité thérapeutique pourrait permettre d'améliorer le panel thérapeutique des patientes résistantes au palbociclib (et aux autres iCDK4/6) en proposant des combothérapies palbociclib et un des trois inhibiteurs identifiés (venetoclax, trametinib, BAY-293).

Cette étude ouvre de nouvelles perspectives dans le traitement des cancers et renforce la nécessité d'étudier plus en détail l'interactome des différentes méthyltransférases, comme DNMT3A ou METTL1 par exemple. Le déchiffrement des mécanismes de recrutement de ces acteurs permettrait d'approfondir les connaissances et la compréhension du développement des cancers et des mécanismes de résistances associés aux traitements. L'étude de la méthylation des miRNAs peut donc s'avérer très utile dans la prédiction de réponses à de nouvelles thérapies, comme nous avons pu le voir dans cette étude.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Les travaux menés durant cette thèse ont permis de démontrer l'intérêt de l'étude des mécanismes épigénétiques et épitranscriptomiques pour la compréhension des phénomènes de résistance à des traitements. Bien que celle-ci soit exclusivement portée sur les cancers du sein RH+/HER2- et à la résistance au palbociclib (et plus largement aux inhibiteurs de CDK4/6), le schéma de réflexion peut être appliqué à n'importe quel traitement, voir même de manière générale, à n'importe quelle maladie puisque les mécanismes étudiés sont très sensibles à toutes variations. Ainsi cette nouvelle vision des processus de résistances aux traitements consiste à ne plus se focaliser uniquement sur les cibles moléculaires des inhibiteurs utilisés, mais sur toutes les adaptations qui vont être mises en place par les cellules pour y répondre. Ceci comprend les reprogrammations épigénétiques et épitranscriptomiques permettant l'expression de nouvelles protéines et la mise en place de voies de signalisations intermédiaires.

Ainsi, comme nous avons pu le constater, ces mécanismes temporalisés permettent de suivre l'évolution du statut de résistance au cours du temps et de déterminer des phases de sensibilité à des traitements et des phases de non réponse. Cet aspect temporalisé est important pour la bonne prise en charge des patients et la détermination du bon traitement. Actuellement, trop de traitements sont donnés de manière protocolaire sans pouvoir juger correctement de la réponse du patient. L'identification de biomarqueurs prédictifs de réponse à un traitement correspond à un enjeu majeur de santé publique, qui limiterait le nombre de rechutes due à une absence de réponse au traitement initial.

Nos travaux ont permis d'identifier deux biomarqueurs induits par le traitement et associé aux mécanismes de résistance au palbociclib : la déméthylation du promoteur de *BRD4* et l'augmentation de l'adénosine méthylation du miRNA-143-3p causée par la modification de l'interactome de METTL3. Ces mécanismes conduisent à la surexpression de 5 protéines : BRD4, MAP4K4, MAPK12, KRas et BCL2 dont l'inhibition permet de restaurer une sensibilité au Palbociclib des cellules résistantes *in vitro*. Le suivie du niveau de méthylation de *BRD4* et/ou du miRNA-143-3p dans le sang des patientes permettrait de déterminer des fenêtres d'éligibilité à ces traitements puisque nos résultats ont montré que leur niveau de méthylation varie au cours du traitement au palbociclib et aux autres inhibiteurs de CDK4/6. Cependant, d'autres études complémentaires doivent être envisagées avant d'investiguer plus en détails la possibilité clinique de ce genre de combothérapie, comme la validation des

différents marqueurs circulants dans des biopsies de métastases et la surexpression des protéines cibles dans ces mêmes prélèvements, car il existe toujours un risque que les marqueurs sanguins étudiés proviennent d'autres types cellulaires. Des études sur un panel plus important de patientes devront être réalisées pour confirmer les tendances observées et déterminer l'éligibilité des patientes aux traitements. Dans ces études, il serait envisageable d'inclure différentes combinaisons de patients/traitements. Par exemple des patients avec le même type de cancer mais un traitement différent (autre iCDK4/6 par exemple, ou hormonothérapie seule), des patients avec un autre type de cancer sous traitement avec du palbociclib et d'autres sans pour déterminer si les biomarqueurs identifiés sont i) propre au type de cancer ii) propre au palbociclib iii) propre au cancer et au traitement. Si le niveau de méthylation des biomarqueurs varie uniquement dans les patientes atteintes de cancers du sein RH+/HER2- traitées au palbociclib, alors leur robustesse sera confirmée.

Pour aller plus loin, un nouvel algorithme de traitement pourrait être proposé. Pour cela, il faudrait analyser la présence de différents biomarqueurs associés à la résistance aux iCDK4/6 comme la surexpression des ARNm de CCND1, CDK9, TK1 ou d'autres marqueurs comme ceux décrits par (Malorni et al., 2016) ainsi que le niveau de méthylation de BRD4 et du miRNA-143-3p. Cette tentative de classification des patientes est en cours au laboratoire, afin d'associer des marqueurs de résistances connus à nos marqueurs prédictifs de réponse aux combothérapies que nous avons identifié.

De manière intéressante, nos études ont mis en évidence deux mécanismes différents qui contribuent à l'activation de la même voie de signalisation : Mek/KRas, d'une part par le biais de BRD4 qui surexprime des membres de la famille des MAP kinases et de la voie de signalisation de KRas, et par la modification de l'interactome de METTL3 qui entraîne la méthylation du miRNA-143-3p et la surexpression de KRas directement. L'implication de ces voies de signalisations dans la résistance aux iCDK4/6 a déjà été décrite dans la littérature (Fassl et al., 2022), mais le déchiffrement des acteurs responsables de cette surexpression n'a jamais été étudié auparavant. La question sous-jacente est : est-ce que les deux phénomènes observés dans nos études agissent de manière synergique dans la contribution au développement de la résistance, ou sont-ils associés à deux mécanismes distincts mais convergents ? Pour répondre à cette question, des analyses « single cell » pourraient être

envisagées pour savoir si nos deux marqueurs sont corrélés ou non au sein d'une même cellule et juger de l'hétérogénéité tumorale.

Bien entendu, d'autres axes de recherche nécessitent d'être étudiés pour approfondir les connaissances sur les mécanismes de résistances au palbociclib, comme l'étude du microenvironnement, des réponses immunitaires ou encore le rôle de l'autophagie et des transitions mésenchymateuses. Pour répondre à la question de la transition mésenchymateuse, bien qu'elle soit absente dans notre modèle de cellules résistantes, il est possible que celle-ci se soit produite de manière transitoire durant l'acquisition de la résistance. La ré-analyse de nos résultats de RNA-seq pourrait révéler des séquences propres de ce genre de transitions. De même, nous nous sommes intéressé aux RNA Binding Protein immunoprécipitée avec METTL3, nous pourrions d'une part caractériser les interactions avec les RBP immunoprécipitées dans la condition MCF7-PalboS de la même manière que nous avons caractérisé celle de METTL3/RPS3, mais également comprendre le rôle des autres partenaires immunoprécipités dans les différentes conditions, qui appartiennent à différentes catégories de protéines et qui pourraient jouer un rôle dans l'activation ou la répression de l'activité du complexe, dans la méthylation des miRNAs mais aussi des autres catégories d'ARNs. De plus, il pourrait être intéressant de mettre au point des conditions d'immunoprécipitations sur des échantillons crosslinkés pour caractériser des interactions plus faibles, tout en confirmant celles identifiées dans notre étude.

Les inhibiteurs du cycle cellulaire (iCDK4/6) restent pour le moment la meilleure solution thérapeutique pour les patientes atteintes de cancer du sein RH+/HER2-métastatique, mais également dans d'autres cancers pour lesquels ils sont de plus en plus prometteurs (cellules squameuses de la tête et du cou, carcinome du nasopharynx, cancers gastro-intestinaux) (Yang *et al.*, 2020). Le déchiffrement des mécanismes de résistance associés au traitement par ces inhibiteurs est donc prometteur pour le développement de molécules permettant d'outrepasser ce phénomène et prolonger la durée de vie des patients, jusqu'à leur rémission dans le meilleur des cas.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ABC6, 2021. ABC6 - ABC Global Alliance [WWW Document]. abc. URL <http://www.abc-lisbon.org/en/general%2dinformation/cooperations/abc6/1-725-1-> (accessed 8.19.22).

Abrajano, J.J., Qureshi, I.A., Gokhan, S., Molero, A.E., Zheng, D., Bergman, A., Mehler, M.F., 2010. Corepressor for element-1-silencing transcription factor preferentially mediates gene networks underlying neural stem cell fate decisions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 16685–16690. <https://doi.org/10.1073/pnas.0906917107>

Alarcón, C.R., Goodarzi, H., Lee, H., Liu, X., Tavazoie, S., Tavazoie, S.F., 2015a. HNRNPA2B1 Is a Mediator of m(6)A-Dependent Nuclear RNA Processing Events. *Cell* 162, 1299–1308. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.08.011>

Alarcón, C.R., Lee, H., Goodarzi, H., Halberg, N., Tavazoie, S.F., 2015b. N6-methyladenosine marks primary microRNAs for processing. *Nature* 519, 482–485. <https://doi.org/10.1038/nature14281>

Ali, H.A., Li, Y., Bilal, A.H.M., Qin, T., Yuan, Z., Zhao, W., 2022. A Comprehensive Review of BET Protein Biochemistry, Physiology, and Pathological Roles. *Frontiers in Pharmacology* 13.

Ando, M., Saito, Y., Xu, G., Bui, N.Q., Medetgul-Ernar, K., Pu, M., Fisch, K., Ren, S., Sakai, A., Fukusumi, T., Liu, C., Haft, S., Pang, J., Mark, A., Gaykalova, D.A., Guo, T., Favorov, A.V., Yegnasubramanian, S., Fertig, E.J., Ha, P., Tamayo, P., Yamasoba, T., Ideker, T., Messer, K., Califano, J.A., 2019. Chromatin dysregulation and DNA methylation at transcription start sites associated with transcriptional repression in cancers. *Nat Commun* 10, 2188. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-09937-w>

Andrews, S., 2010. Babraham Bioinformatics - FastQC A Quality Control tool for High Throughput Sequence Data [WWW Document]. URL <https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/> (accessed 8.1.22).

Annunziato, A.T., 2008. DNA Packaging: Nucleosomes and Chromatin | Learn Science at Scitable [WWW Document]. URL <http://www.nature.com/scitable/topicpage/dna-packaging-nucleosomes-and-chromatin-310> (accessed 5.29.22).

Araujo, F.D., Croteau, S., Slack, A.D., Milutinovic, S., Bigey, P., Price, G.B., Zannis-Hajopoulos, M., Szyf, M., 2001. The DNMT1 Target Recognition Domain Resides in the N Terminus *. *Journal of Biological Chemistry* 276, 6930–6936. <https://doi.org/10.1074/jbc.M009037200>

ARC, 2021. Cancers du sein: les traitements | Fondation ARC pour la recherche sur le cancer [WWW Document]. URL <https://www.fondation-arc.org/cancer/cancer-sein/traitement-cancer> (accessed 7.22.22).

ARC, 2020. Cancers du sein hormonodépendants: une nouvelle option pour réduire le risque de récurrence | Fondation ARC pour la recherche sur le cancer [WWW Document]. URL <https://www.fondation-arc.org/actualites/2020/cancers-du-sein-hormonodependants-une-nouvelle-option-pour-reduire-le-risque-de-recidive> (accessed 7.22.22).

Arthur, L.M., Turnbull, A.K., Renshaw, L., Keys, J., Thomas, J.S., Wilson, T.R., Lackner, M.R., Sims, A.H., Dixon, J.M., 2014. Changes in PIK3CA mutation status are not associated with recurrence, metastatic disease or progression in endocrine-treated breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 147, 211–219. <https://doi.org/10.1007/s10549-014-3080-x>

- Athanasiadou, R., Sousa, D. de, Myant, K., Merusi, C., Stancheva, I., Bird, A., 2010. Targeting of De Novo DNA Methylation Throughout the Oct-4 Gene Regulatory Region in Differentiating Embryonic Stem Cells. *PLOS ONE* 5, e9937. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009937>
- Babenko, V.N., Chadaeva, I.V., Orlov, Y.L., 2017. Genomic landscape of CpG rich elements in human. *BMC Evolutionary Biology* 17, 19. <https://doi.org/10.1186/s12862-016-0864-0>
- Bachelot, T., Bourgier, C., Cropet, C., Ray-Coquard, I., Ferrero, J.-M., Freyer, G., Abadie-Lacourtoisie, S., Eymard, J.-C., Debled, M., Spaëth, D., Legouffe, E., Allouache, D., El Kouri, C., Pujade-Lauraine, E., 2012. Randomized phase II trial of everolimus in combination with tamoxifen in patients with hormone receptor-positive, human epidermal growth factor receptor 2-negative metastatic breast cancer with prior exposure to aromatase inhibitors: a GINECO study. *J Clin Oncol* 30, 2718–2724. <https://doi.org/10.1200/JCO.2011.39.0708>
- Bai, L., Yang, G., Qin, Z., Lyu, J., Wang, Y., Feng, J., Liu, M., Gong, T., Li, X., Li, Z., Li, J., Qin, J., Yang, W., Ding, C., 2021. Proteome-Wide Profiling of Readers for DNA Modification. *Advanced Science* 8, 2101426. <https://doi.org/10.1002/advs.202101426>
- Bai, Y., Lin, H., Fang, Z., Luo, Q., Fang, Y., Su, Y., Hu, Q., Duan, H., Chen, F., Zhang, Z.-Y., 2017. Plasma microRNA-19a as a potential biomarker for esophageal squamous cell carcinoma diagnosis and prognosis. *Biomarkers in Medicine* 11, 431–441. <https://doi.org/10.2217/bmm-2016-0286>
- Bandopadhyay, P., Bergthold, G., Nguyen, B., Schubert, S., Gholamin, S., Tang, Y., Bolin, S., Schumacher, S.E., Zeid, R., Masoud, S., Yu, F., Vue, N., Gibson, W.J., Paoletta, B.R., Mitra, S.S., Cheshier, S.H., Qi, J., Liu, K.-W., Wechsler-Reya, R., Weiss, W.A., Swartling, F.J., Kieran, M.W., Bradner, J.E., Beroukhi, R., Cho, Y.-J., 2014. BET bromodomain inhibition of MYC-amplified medulloblastoma. *Clin Cancer Res* 20, 912–925. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-13-2281>
- Bannister, A.J., Kouzarides, T., 2011. Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Res* 21, 381–395. <https://doi.org/10.1038/cr.2011.22>
- Bannister, A.J., Schneider, R., Kouzarides, T., 2002. Histone Methylation: Dynamic or Static? *Cell* 109, 801–806. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00798-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00798-5)
- Bao, X., Guo, X., Yin, M., Tariq, M., Lai, Y., Kanwal, S., Zhou, J., Li, Na, Lv, Y., Pulido-Quetglas, C., Wang, X., Ji, L., Khan, M.J., Zhu, X., Luo, Z., Shao, C., Lim, D.-H., Liu, X., Li, Nan, Wang, W., He, M., Liu, Y.-L., Ward, C., Wang, T., Zhang, G., Wang, D., Yang, J., Chen, Y., Zhang, C., Jauch, R., Yang, Y.-G., Wang, Y., Qin, B., Anko, M.-L., Hutchins, A.P., Sun, H., Wang, H., Fu, X.-D., Zhang, B., Esteban, M.A., 2018. Capturing the interactome of newly transcribed RNA. *Nat Methods* 15, 213–220. <https://doi.org/10.1038/nmeth.4595>
- Barrios, Á.P., Gómez, A.V., Sáez, J.E., Ciossani, G., Toffolo, E., Battaglioli, E., Mattevi, A., Andrés, M.E., 2014. Differential properties of transcriptional complexes formed by the CoREST family. *Mol Cell Biol* 34, 2760–2770. <https://doi.org/10.1128/MCB.00083-14>
- Bartolomei, M.S., Ferguson-Smith, A.C., 2011. Mammalian genomic imprinting. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3, a002592. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a002592>

- Bartoszewski, R., Sikorski, A.F., 2019. Editorial focus: understanding off-target effects as the key to successful RNAi therapy. *Cellular & Molecular Biology Letters* 24, 69. <https://doi.org/10.1186/s11658-019-0196-3>
- Battle, S.L., Hawkins, R.D., 2020. Chapter 2 - The epigenetics of pluripotent stem cells: Epigenome dynamics in in vitro and in vivo mammalian embryonic stem cell systems, in: Meshorer, E., Testa, G. (Eds.), *Stem Cell Epigenetics, Translational Epigenetics*. Academic Press, pp. 25–74. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814085-7.00002-7>
- Baubec, T., Colombo, D.F., Wirbelauer, C., Schmidt, J., Burger, L., Krebs, A.R., Akalin, A., Schübeler, D., 2015. Genomic profiling of DNA methyltransferases reveals a role for DNMT3B in genic methylation. *Nature* 520, 243–247. <https://doi.org/10.1038/nature14176>
- Baud'huin, M., Lamoureux, F., Jacques, C., Rodriguez Calleja, L., Quillard, T., Charrier, C., Amiaud, J., Berreur, M., Brounais-LeRoyer, B., Owen, R., Reilly, G.C., Bradner, J.E., Heymann, D., Ory, B., 2017. Inhibition of BET proteins and epigenetic signaling as a potential treatment for osteoporosis. *Bone* 94, 10–21. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2016.09.020>
- Berndsen, C.E., Denu, J.M., 2008. Catalysis and Substrate Selection by Histone/Protein Lysine Acetyltransferases. *Curr Opin Struct Biol* 18, 682–689. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2008.11.004>
- Bertero, A., Brown, S., Madrigal, P., Osnato, A., Ortmann, D., Yiangou, L., Kadiwala, J., Hubner, N.C., de los Mozos, I.R., Sadee, C., Lenaerts, A.-S., Nakanoh, S., Grandy, R., Farnell, E., Ule, J., Stunnenberg, H.G., Mendjan, S., Vallier, L., 2018. The SMAD2/3 interactome reveals that TGFβ controls m6A mRNA methylation in pluripotency. *Nature* 555, 256–259. <https://doi.org/10.1038/nature25784>
- Berulava, T., Rahmann, S., Rademacher, K., Klein-Hitpass, L., Horsthemke, B., 2015. N6-Adenosine Methylation in MiRNAs. *PLOS ONE* 10, e0118438. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0118438>
- Bird, A.P., 1980. DNA methylation and the frequency of CpG in animal DNA. *Nucleic Acids Res* 8, 1499–1504.
- Bjerke, L., Mackay, A., Nandhabalan, M., Burford, A., Jury, A., Popov, S., Bax, D.A., Carvalho, D., Taylor, K.R., Vinci, M., Bajrami, I., McGonnell, I.M., Lord, C.J., Reis, R.M., Hargrave, D., Ashworth, A., Workman, P., Jones, C., 2013. Histone H3.3 mutations drive pediatric glioblastoma through upregulation of MYCN. *Cancer Discov* 3, 512–519. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-12-0426>
- Bollard, J., Miguela, V., Ruiz de Galarreta, M., Venkatesh, A., Bian, C.B., Roberto, M.P., Tovar, V., Sia, D., Molina-Sánchez, P., Nguyen, C.B., Nakagawa, S., Llovet, J.M., Hoshida, Y., Lujambio, A., 2017. Palbociclib (PD-0332991), a selective CDK4/6 inhibitor, restricts tumour growth in preclinical models of hepatocellular carcinoma. *Gut* 66, 1286–1296. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2016-312268>
- Bostick, M., Kim, J.K., Estève, P.-O., Clark, A., Pradhan, S., Jacobsen, S.E., 2007. UHRF1 plays a role in maintaining DNA methylation in mammalian cells. *Science* 317, 1760–1764. <https://doi.org/10.1126/science.1147939>
- Bourc'his, D., Bestor, T.H., 2004. Meiotic catastrophe and retrotransposon reactivation in male germ cells lacking Dnmt3L. *Nature* 431, 96–99. <https://doi.org/10.1038/nature02886>

- 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 Theranostic Tool. *Molecular Therapy - Nucleic Acids* 22, 72–83. <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2020.08.010>
- Bronkhorst, A.J., Ungerer, V., Holdenrieder, S., 2019. The emerging role of cell-free DNA as a molecular marker for cancer management. *Biomolecular Detection and Quantification* 17, 100087. <https://doi.org/10.1016/j.bdq.2019.100087>
- Bruce, A.W., Donaldson, I.J., Wood, I.C., Yerbury, S.A., Sadowski, M.I., Chapman, M., Göttgens, B., Buckley, N.J., 2004. Genome-wide analysis of repressor element 1 silencing transcription factor/neuron-restrictive silencing factor (REST/NRSF) target genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 10458–10463. <https://doi.org/10.1073/pnas.0401827101>
- Bujnicki, J.M., Feder, M., Radlinska, M., Blumenthal, R.M., 2002. Structure prediction and phylogenetic analysis of a functionally diverse family of proteins homologous to the MT-A70 subunit of the human mRNA:m(6)A methyltransferase. *J Mol Evol* 55, 431–444. <https://doi.org/10.1007/s00239-002-2339-8>
- Byszewska, M., Śmietański, M., Purta, E., Bujnicki, J.M., 2015. RNA methyltransferases involved in 5' cap biosynthesis. *RNA Biol* 11, 1597–1607. <https://doi.org/10.1080/15476286.2015.1004955>
- Caffrey, D.R., Zhao, J., Song, Z., Schaffer, M.E., Haney, S.A., Subramanian, R.R., Seymour, A.B., Hughes, J.D., 2011. siRNA off-target effects can be reduced at concentrations that match their individual potency. *PLoS One* 6, e21503. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0021503>
- 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. Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 15524–15529. <https://doi.org/10.1073/pnas.242606799>
- Cancer.Net, 2021. Breast Cancer - Metastatic - Types of Treatment [WWW Document]. Cancer.Net. URL <https://www.cancer.net/cancer-types/breast-cancer-metastatic/types-treatment> (accessed 7.22.22).
- Cantara, W.A., Crain, P.F., Rozenski, J., McCloskey, J.A., Harris, K.A., Zhang, X., Vendeix, F.A.P., Fabris, D., Agris, P.F., 2011. The RNA Modification Database, RNAMDB: 2011 update. *Nucleic Acids Res* 39, D195-201. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq1028>
- Cartlidge, R.A., Knebel, A., Pegg, M., Alexandrov, A., Phizicky, E.M., Cohen, P., 2005. The tRNA methylase METTL1 is phosphorylated and inactivated by PKB and RSK in vitro and in cells. *EMBO J* 24, 1696–1705. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600648>
- Cartron, P.-F., Cheray, M., Bretaudeau, L., 2020. Epigenetic protein complexes: the adequate candidates for the use of a new generation of epidrugs in personalized and precision medicine in cancer. *Epigenomics* 12, 171–177. <https://doi.org/10.2217/epi-2019-0169>

- Chang, M., Park, S., An, B.H., 2020. Resensitization of palbociclib-resistant MCF-7 cells by inhibiting TGF- β -induced epithelial-mesenchymal transition. *JCO* 38, e13061–e13061. https://doi.org/10.1200/JCO.2020.38.15_suppl.e13061
- Charpentier, E., Cornec, 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>
- Chen, T., Hevi, S., Gay, F., Tsujimoto, N., He, T., Zhang, B., Ueda, Y., Li, E., 2007. Complete inactivation of DNMT1 leads to mitotic catastrophe in human cancer cells. *Nat Genet* 39, 391–396. <https://doi.org/10.1038/ng1982>
- 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. *Mol. Cancer* 19, 36. <https://doi.org/10.1186/s12943-020-01155-z>
- Cheray, M., Nadaradjane, A., Bonnet, P., Routier, S., Vallette, F.M., Cartron, P.-F., 2014. Specific inhibition of DNMT1/CFP1 reduces cancer phenotypes and enhances chemotherapy effectiveness. *Epigenomics* 6, 267–275. <https://doi.org/10.2217/epi.14.18>
- Cheray, M., Pacaud, R., Nadaradjane, A., Oliver, L., Vallette, F.M., Cartron, P.-F., 2016. Specific Inhibition of DNMT3A/ISGF3 γ Interaction Increases the Temozolomide Efficiency to Reduce Tumor Growth. *Theranostics* 6, 1988–1999. <https://doi.org/10.7150/thno.9150>
- Clancy, M.J., Shambaugh, M.E., Timpote, C.S., Bokar, J.A., 2002. Induction of sporulation in *Saccharomyces cerevisiae* leads to the formation of N6-methyladenosine in mRNA: a potential mechanism for the activity of the IME4 gene. *Nucleic Acids Res* 30, 4509–4518. <https://doi.org/10.1093/nar/gkf573>
- Condorelli, R., Spring, L., O'Shaughnessy, J., Lacroix, L., Bailleux, C., Scott, V., Dubois, J., Nagy, R.J., Lanman, R.B., Iafrate, A.J., Andre, F., Bardia, A., 2018. Polyclonal RB1 mutations and acquired resistance to CDK 4/6 inhibitors in patients with metastatic breast cancer. *Annals of Oncology* 29, 640–645. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdx784>
- Cornell, L., Wander, S.A., Visal, T., Wagle, N., Shapiro, G.I., 2019. MicroRNA-Mediated Suppression of the TGF- β Pathway Confers Transmissible and Reversible CDK4/6 Inhibitor Resistance. *Cell Reports* 26, 2667-2680.e7. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.02.023>
- Coronel-Hernández, J., Pérez-Yépez, E.A., Delgado-Waldo, I., Contreras-Romero, C., Jacobo-Herrera, N., Cantú-De León, D., Pérez-Plasencia, C., 2021. Aberrant Metabolism as Inductor of Epigenetic Changes in Breast Cancer: Therapeutic Opportunities. *Frontiers in Oncology* 11.
- Cortázar, D., Kunz, C., Selfridge, J., Lettieri, T., Saito, Y., MacDougall, E., Wirz, A., Schuermann, D., Jacobs, A.L., Siegrist, F., Steinacher, R., Jiricny, J., Bird, A., Schär, P., 2011. Embryonic lethal phenotype reveals a function of TDG in maintaining epigenetic stability. *Nature* 470, 419–423. <https://doi.org/10.1038/nature09672>

- Cossío, F.P., Esteller, M., Berdasco, M., 2020. Towards a more precise therapy in cancer: Exploring epigenetic complexity. *Current Opinion in Chemical Biology, Chemical Genetics and Epigenetics • Molecular Imaging* 57, 41–49. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2020.04.008>
- Costa, C., Wang, Y., Ly, A., Hosono, Y., Murchie, E., Walmsley, C.S., Huynh, T., Healy, C., Peterson, R., Yanase, S., Jakubik, C.T., Henderson, L.E., Damon, L.J., Timonina, D., Sanidas, I., Pinto, C.J., Mino-Kenudson, M., Stone, J.R., Dyson, N.J., Ellisen, L.W., Bardia, A., Ebi, H., Benes, C.H., Engelman, J.A., Juric, D., 2020. PTEN Loss Mediates Clinical Cross-Resistance to CDK4/6 and PI3K α Inhibitors in Breast Cancer. *Cancer Discovery* 10, 72–85. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-18-0830>
- Couture, J.-F., Collazo, E., Ortiz-Tello, P.A., Brunzelle, J.S., Trievel, R.C., 2007. Specificity and mechanism of JMJD2A, a trimethyllysine-specific histone demethylase. *Nat Struct Mol Biol* 14, 689–695. <https://doi.org/10.1038/nsmb1273>
- Covelo-Molares, H., Obrdlik, A., Poštulková, I., Dohnálková, M., Gregorová, P., Ganji, R., Potěšil, D., Gawrylski, L., Varjosalo, M., Vaňáčková, Š., 2021. The comprehensive interactomes of human adenosine RNA methyltransferases and demethylases reveal distinct functional and regulatory features. *Nucleic Acids Research* 49, 10895–10910. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab900>
- Crider, K., Yang, T., Berry, R., Bailey, L., 2012. Folate and DNA Methylation: A Review of Molecular Mechanisms and the Evidence for Folate's Role. *Advances in nutrition (Bethesda, Md.)* 3, 21–38. <https://doi.org/10.3945/an.111.000992>
- Crosby, D., Lyons, N., Greenwood, E., Harrison, S., Hiom, S., Moffat, J., Quallo, T., Samuel, E., Walker, I., 2020. A roadmap for the early detection and diagnosis of cancer. *The Lancet Oncology* 21, 1397–1399. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(20\)30593-3](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(20)30593-3)
- Dafni, U., Tsourti, Z., Alatsathianos, I., 2019. Breast Cancer Statistics in the European Union: Incidence and Survival across European Countries. *BRC* 14, 344–353. <https://doi.org/10.1159/000503219>
- Daskalos, A., Nikolaidis, G., Xinarianos, G., Savvari, P., Cassidy, A., Zakopoulou, R., Kotsinas, A., Gorgoulis, V., Field, J.K., Liloglou, T., 2009. Hypomethylation of retrotransposable elements correlates with genomic instability in non-small cell lung cancer. *International Journal of Cancer* 124, 81–87. <https://doi.org/10.1002/ijc.23849>
- Delihias, N., 2015. Discovery and characterization of the first non-coding RNA that regulates gene expression, micF RNA: A historical perspective. *World J Biol Chem* 6, 272–280. <https://doi.org/10.4331/wjbc.v6.i4.272>
- Desrosiers, R., Friderici, K., Rottman, F., 1974. Identification of methylated nucleosides in messenger RNA from Novikoff hepatoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 71, 3971–3975. <https://doi.org/10.1073/pnas.71.10.3971>
- Devaiah, B.N., Lewis, B.A., Cherman, N., Hewitt, M.C., Albrecht, B.K., Robey, P.G., Ozato, K., Sims, R.J., Singer, D.S., 2012. BRD4 is an atypical kinase that phosphorylates Serine2 of the RNA Polymerase II carboxy-terminal domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109, 6927–6932. <https://doi.org/10.1073/pnas.1120422109>

- Dey, A., Ellenberg, J., Farina, A., Coleman, A.E., Maruyama, T., Sciortino, S., Lippincott-Schwartz, J., Ozato, K., 2000. A Bromodomain Protein, MCAP, Associates with Mitotic Chromosomes and Affects G2-to-M Transition. *Mol Cell Biol* 20, 6537–6549.
- Dhalluin, C., Carlson, J.E., Zeng, L., He, C., Aggarwal, A.K., Zhou, M.M., 1999. Structure and ligand of a histone acetyltransferase bromodomain. *Nature* 399, 491–496. <https://doi.org/10.1038/20974>
- Dhasarathy, A., Wade, P.A., 2008. The MBD protein family – reading an epigenetic mark? *Mutat Res* 647, 39–43. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2008.07.007>
- 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. *Front Genet* 10, 885. <https://doi.org/10.3389/fgene.2019.00885>
- Dupont, C., Armand, D.R., Brenner, C.A., 2009. Epigenetics: Definition, Mechanisms and Clinical Perspective. *Semin Reprod Med* 27, 351–357. <https://doi.org/10.1055/s-0029-1237423>
- Eeckhoutte, J., Carroll, J.S., Geistlinger, T.R., Torres-Arzayus, M.I., Brown, M., 2006. A cell-type-specific transcriptional network required for estrogen regulation of cyclin D1 and cell cycle progression in breast cancer. *Genes Dev* 20, 2513–2526. <https://doi.org/10.1101/gad.1446006>
- Ellis, M.J., Perou, C.M., 2013. The Genomic Landscape of Breast Cancer as a Therapeutic Roadmap. *Cancer Discov* 3, 27–34. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-12-0462>
- Epsztejn-Litman, S., Feldman, N., Abu-Remaileh, M., Shufaro, Y., Gerson, A., Ueda, J., Deplus, R., Fuks, F., Shinkai, Y., Cedar, H., Bergman, Y., 2008. De novo DNA methylation promoted by G9a prevents reprogramming of embryonically silenced genes. *Nat Struct Mol Biol* 15, 1176–1183. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1476>
- Esteller, M., Risques, R.A., Toyota, M., Capella, G., Moreno, V., Peinado, M.A., Baylin, S.B., Herman, J.G., 2001. Promoter hypermethylation of the DNA repair gene O(6)-methylguanine-DNA methyltransferase is associated with the presence of G:C to A:T transition mutations in p53 in human colorectal tumorigenesis. *Cancer Res* 61, 4689–4692.
- Falnes, P.Ø., Jakobsson, M.E., Davydova, E., Ho, A., Matecki, J., 2016. Protein lysine methylation by seven-β-strand methyltransferases. *Biochem J* 473, 1995–2009. <https://doi.org/10.1042/BCJ20160117>
- Fassl, A., Brain, C., Abu-Remaileh, M., Stukan, I., Butter, D., Stepien, P., Feit, A.S., Bergholz, J., Michowski, W., Otto, T., Sheng, Q., Loo, A., Michael, W., Tiedt, R., DeAngelis, C., Schiff, R., Jiang, B., Jovanovic, B., Nowak, K., Ericsson, M., Cameron, M., Gray, N., Dillon, D., Zhao, J.J., Sabatini, D.M., Jeselsohn, R., Brown, M., Polyak, K., Sicinski, P., 2020. Increased lysosomal biomass is responsible for the resistance of triple-negative breast cancers to CDK4/6 inhibition. *Science Advances* 6, eabb2210. <https://doi.org/10.1126/sciadv.abb2210>
- Fassl, A., Geng, Y., Sicinski, P., 2022. CDK4 and CDK6 kinases: From basic science to cancer therapy. *Science* 375, eabc1495. <https://doi.org/10.1126/science.abc1495>

Finn, R.S., Liu, Y., Zhu, Z., Martin, M., Rugo, H.S., Diéras, V., Im, S.-A., Gelmon, K.A., Harbeck, N., Lu, D.R., Gauthier, E., Huang Bartlett, C., Slamon, D.J., 2020. Biomarker Analyses of Response to Cyclin-Dependent Kinase 4/6 Inhibition and Endocrine Therapy in Women with Treatment-Naïve Metastatic Breast Cancer. *Clinical Cancer Research* 26, 110–121. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-19-0751>

Formisano, L., Lu, Y., Servetto, A., Hanker, A.B., Jansen, V.M., Bauer, J.A., Sudhan, D.R., Guerrero-Zotano, A.L., Croessmann, S., Guo, Y., Ericsson, P.G., Lee, K., Nixon, M.J., Schwarz, L.J., Sanders, M.E., Dugger, T.C., Cruz, M.R., Behdad, A., Cristofanilli, M., Bardia, A., O’Shaughnessy, J., Nagy, R.J., Lanman, R.B., Solovieff, N., He, W., Miller, M., Su, F., Shyr, Y., Mayer, I.A., Balko, J.M., Arteaga, C.L., 2019. Aberrant FGFR signaling mediates resistance to CDK4/6 inhibitors in ER+ breast cancer. *Nat Commun* 10, 1373. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-09068-2>

Frauer, C., Hoffmann, T., Bultmann, S., Casa, V., Cardoso, M.C., Antes, I., Leonhardt, H., 2011. Recognition of 5-Hydroxymethylcytosine by the Uhrf1 SRA Domain. *PLOS ONE* 6, e21306. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0021306>

Fu, X., Osborne, C.K., Schiff, R., 2013. Biology and therapeutic potential of PI3K signaling in ER+/HER2-negative breast cancer. *The Breast* 22, S12–S18. <https://doi.org/10.1016/j.breast.2013.08.001>

Fuks, F., Hurd, P.J., Deplus, R., Kouzarides, T., 2003. The DNA methyltransferases associate with HP1 and the SUV39H1 histone methyltransferase. *Nucleic Acids Research* 31, 2305–2312. <https://doi.org/10.1093/nar/gkg332>

Gala, K., Li, Q., Sinha, A., Razavi, P., Dorso, M., Sanchez-Vega, F., Chung, Y.R., Hendrickson, R., Hsieh, J.J., Berger, M., Schultz, N., Pastore, A., Abdel-Wahab, O., Chandarlapaty, S., 2018. KMT2C mediates the estrogen dependence of breast cancer through regulation of ER α enhancer function. *Oncogene* 37, 4692–4710. <https://doi.org/10.1038/s41388-018-0273-5>

Galiè, M., 2019. RAS as Supporting Actor in Breast Cancer. *Frontiers in Oncology* 9.

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. *Nat Commun* 11, 3355. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-17109-4>

Gao, X., Hardwidge, P.R., 2011. Ribosomal Protein S3: A Multifunctional Target of Attaching/Effacing Bacterial Pathogens. *Front Microbiol* 2, 137. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00137>

Garofalo, M., Croce, C.M., 2013. MicroRNAs as therapeutic targets in chemoresistance. *Drug Resist Updat* 16, 10.1016/j.drug.2013.05.001. <https://doi.org/10.1016/j.drug.2013.05.001>

Garzon, R., Liu, S., Fabbri, M., Liu, Z., Heaphy, C.E.A., Callegari, E., Schwind, S., Pang, J., Yu, J., Muthusamy, N., Havelange, V., Volinia, S., Blum, W., Rush, L.J., Perrotti, D., Andreeff, M., Bloomfield, C.D., Byrd, J.C., Chan, K., Wu, L.-C., Croce, C.M., Marcucci, G., 2009. MicroRNA-29b induces global DNA hypomethylation and tumor suppressor gene reexpression in acute myeloid leukemia by

targeting directly DNMT3A and 3B and indirectly DNMT1. *Blood* 113, 6411–6418.
<https://doi.org/10.1182/blood-2008-07-170589>

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* 300, 489–492.
<https://doi.org/10.1126/science.1083558>

Ge, J.Y., Shu, S., Kwon, M., Jovanović, B., Murphy, K., Gulvady, A., Fassel, A., Trinh, A., Kuang, Y., Heavey, G.A., Luoma, A., Paweletz, C., Thorner, A.R., Wucherpfennig, K.W., Qi, J., Brown, M., Sicinski, P., McDonald, T.O., Pellman, D., Michor, F., Polyak, K., 2020. Acquired resistance to combined BET and CDK4/6 inhibition in triple-negative breast cancer. *Nat Commun* 11, 2350.
<https://doi.org/10.1038/s41467-020-16170-3>

Gennari, A., André, F., Barrios, C.H., Cortés, J., de Azambuja, E., DeMichele, A., Dent, R., Fenlon, D., Gligorov, J., Hurvitz, S.A., Im, S.-A., Krug, D., Kunz, W.G., Loi, S., Penault-Llorca, F., Ricke, J., Robson, M., Rugo, H.S., Saura, C., Schmid, P., Singer, C.F., Spanic, T., Tolaney, S.M., Turner, N.C., Curigliano, G., Loibl, S., Paluch-Shimon, S., Harbeck, N., ESMO Guidelines Committee. Electronic address: clinicalguidelines@esmo.org, 2021. ESMO Clinical Practice Guideline for the diagnosis, staging and treatment of patients with metastatic breast cancer. *Ann Oncol* 32, 1475–1495.
<https://doi.org/10.1016/j.annonc.2021.09.019>

George, M.A., Qureshi, S., Omene, C., Toppmeyer, D.L., Ganesan, S., 2021. Clinical and Pharmacologic Differences of CDK4/6 Inhibitors in Breast Cancer. *Frontiers in Oncology* 11.

Goh, K.Y., Lim, W.-T., 2020. Cyclin D1 expression in KRAS mutant non-small cell lung cancer—old wine into new skins. *Transl Lung Cancer Res* 9, 2302–2304. <https://doi.org/10.21037/tlcr-20-639>

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^{Asp} by the DNA methyltransferase homolog Dnmt2. *Science* 311, 395–398. <https://doi.org/10.1126/science.1120976>

Grosset, C., Chen, C.Y., Xu, N., Sonenberg, N., Jacquemin-Sablon, H., Shyu, A.B., 2000. A mechanism for translationally coupled mRNA turnover: interaction between the poly(A) tail and a c-fos RNA coding determinant via a protein complex. *Cell* 103, 29–40. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)00102-1](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)00102-1)

Guccione, E., Richard, S., 2019. The regulation, functions and clinical relevance of arginine methylation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 20, 642–657. <https://doi.org/10.1038/s41580-019-0155-x>

Guo, S., Diep, D., Plongthongkum, N., Fung, H.-L., Zhang, Kang, Zhang, Kun, 2017. Identification of methylation haplotype blocks aids in deconvolution of heterogeneous tissue samples and tumor tissue-of-origin mapping from plasma DNA. *Nat Genet* 49, 635–642. <https://doi.org/10.1038/ng.3805>

Hajkova, P., Ancelin, K., Waldmann, T., Lacoste, N., Lange, U.C., Cesari, F., Lee, C., Almouzni, G., Schneider, R., Surani, M.A., 2008. Chromatin dynamics during epigenetic reprogramming in the mouse germ line. *Nature* 452, 10.1038/nature06714. <https://doi.org/10.1038/nature06714>

Han, X., Guo, J., Fan, Z., 2021. Interactions between m6A modification and miRNAs in malignant tumors. *Cell Death Dis* 12, 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41419-021-03868-5>

Hashimoto, H., Liu, Y., Upadhyay, A.K., Chang, Y., Howerton, S.B., Vertino, P.M., Zhang, X., Cheng, X., 2012. Recognition and potential mechanisms for replication and erasure of cytosine hydroxymethylation. *Nucleic Acids Res* 40, 4841–4849. <https://doi.org/10.1093/nar/gks155>

Hata, K., Okano, M., Lei, H., Li, E., 2002. Dnmt3L cooperates with the Dnmt3 family of de novo DNA methyltransferases to establish maternal imprints in mice. *Development* 129, 1983–1993. <https://doi.org/10.1242/dev.129.8.1983>

He, Y.-F., Li, B.-Z., Li, Z., Liu, P., Wang, Y., Tang, Q., Ding, J., Jia, Y., Chen, Z., Li, L., Sun, Y., Li, X., Dai, Q., Song, C.-X., Zhang, K., He, C., Xu, G.-L., 2011. Tet-mediated formation of 5-carboxylcytosine and its excision by TDG in mammalian DNA. *Science* 333, 1303–1307. <https://doi.org/10.1126/science.1210944>

Henikoff, S., Smith, M.M., 2015. Histone Variants and Epigenetics. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 7, a019364. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a019364>

Hermann, A., Schmitt, S., Jeltsch, A., 2003. The human Dnmt2 has residual DNA-(cytosine-C5) methyltransferase activity. *J Biol Chem* 278, 31717–31721. <https://doi.org/10.1074/jbc.M305448200>

Herrera-Abreu, M.T., Palafox, M., Asghar, U., Rivas, M.A., Cutts, R.J., Garcia-Murillas, I., Pearson, A., Guzman, M., Rodriguez, O., Grueso, J., Bellet, M., Cortés, J., Elliott, R., Pancholi, S., Lord, C.J., Baselga, J., Dowsett, M., Martin, L.-A., Turner, N.C., Serra, V., 2016. Early Adaptation and Acquired Resistance to CDK4/6 Inhibition in Estrogen Receptor–Positive Breast Cancer. *Cancer Research* 76, 2301–2313. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-15-0728>

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, e11333. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011333>

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, 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, 487–499. <https://doi.org/10.4161/epi.4.7.9883>

Hoareau-Aveilla, C., Meggetto, F., 2017. Crosstalk between microRNA and DNA Methylation Offers Potential Biomarkers and Targeted Therapies in ALK-Positive Lymphomas. *Cancers (Basel)* 9, 100. <https://doi.org/10.3390/cancers9080100>

Holliday, R., 1987. The Inheritance of Epigenetic Defects. *Science* 238, 163–170. <https://doi.org/10.1126/science.3310230>

Hontecillas-Prieto, L., Flores-Campos, R., Silver, A., de Álava, E., Hajji, N., García-Domínguez, D.J., 2020. Synergistic Enhancement of Cancer Therapy Using HDAC Inhibitors: Opportunity for Clinical Trials. *Frontiers in Genetics* 11.

- 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. *Genes to Cells* 7, 997–1007. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2443.2002.00584.x>
- INCA, 2022. Le cancer du sein - Les cancers les plus fréquents [WWW Document]. URL <https://www.e-cancer.fr/Professionnels-de-sante/Les-chiffres-du-cancer-en-France/Epidemiologie-des-cancers/Les-cancers-les-plus-frequents/Cancer-du-sein> (accessed 7.22.22).
- INCA, n.d. Facteurs de risque - Cancer du sein [WWW Document]. URL <https://www.e-cancer.fr/Patients-et-proches/Les-cancers/Cancer-du-sein/Facteurs-de-risque> (accessed 8.12.22).
- Institut national du cancer, n.d. Définition métastase [WWW Document]. URL <https://www.e-cancer.fr/Dictionnaire/M/metastase> (accessed 7.22.22).
- Issa, M.E., Takhsha, F.S., Chirumamilla, C.S., Perez-Novo, C., Vanden Berghe, W., Cuendet, M., 2017. Epigenetic strategies to reverse drug resistance in heterogeneous multiple myeloma. *Clinical Epigenetics* 9, 17. <https://doi.org/10.1186/s13148-017-0319-5>
- 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, 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 Biol* 14, R119. <https://doi.org/10.1186/gb-2013-14-10-r119>
- Jagannathan, V., Robinson-Rechavi, M., 2011. Meta-analysis of estrogen response in MCF-7 distinguishes early target genes involved in signaling and cell proliferation from later target genes involved in cell cycle and DNA repair. *BMC Syst Biol* 5, 138. <https://doi.org/10.1186/1752-0509-5-138>
- Janavičius, R., 2010. Founder BRCA1/2 mutations in the Europe: implications for hereditary breast-ovarian cancer prevention and control. *EPMA J* 1, 397–412. <https://doi.org/10.1007/s13167-010-0037-y>
- Jang, M.K., Mochizuki, K., Zhou, M., Jeong, H.-S., Brady, J.N., Ozato, K., 2005. The bromodomain protein Brd4 is a positive regulatory component of P-TEFb and stimulates RNA polymerase II-dependent transcription. *Mol Cell* 19, 523–534. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2005.06.027>
- Jeltsch, A., Jurkowska, R., 2016. Allosteric control of mammalian DNA methyltransferases - A new regulatory paradigm. *Nucleic Acids Research* 44, gkw723. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw723>
- 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.-L., Song, J., Pfeifer, G.P., 2016. Tet3 Reads 5-Carboxylcytosine through Its CXXC Domain and Is a Potential Guardian against Neurodegeneration. *Cell Rep* 14, 493–505. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.12.044>

- Kaiser, S., Jurkowski, T.P., Kellner, S., Schneider, D., Jeltsch, A., Helm, M., 2016. The RNA methyltransferase Dnmt2 methylates DNA in the structural context of a tRNA. *RNA Biol* 14, 1241–1251. <https://doi.org/10.1080/15476286.2016.1236170>
- Kang, H.J., Yi, Y.W., Hou, S.-J., Kim, H.J., Kong, Y., Bae, I., Brown, M.L., 2015. Disruption of STAT3-DNMT1 interaction by SH-I-14 induces re-expression of tumor suppressor genes and inhibits growth of triple-negative breast tumor. *Oncotarget* 8, 83457–83468. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.4054>
- Kanno, T., Kanno, Y., Siegel, R.M., Jang, M.K., Lenardo, M.J., Ozato, K., 2004. Selective Recognition of Acetylated Histones by Bromodomain Proteins Visualized in Living Cells. *Molecular Cell* 13, 33–43. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(03\)00482-9](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(03)00482-9)
- Kantarjian, H., Issa, J.-P.J., Rosenfeld, C.S., Bennett, J.M., Albitar, M., DiPersio, J., Klimek, V., Slack, J., de Castro, C., Ravandi, F., Helmer, R., Shen, L., Nimer, S.D., Leavitt, R., Raza, A., Saba, H., 2006. Decitabine improves patient outcomes in myelodysplastic syndromes: results of a phase III randomized study. *Cancer* 106, 1794–1803. <https://doi.org/10.1002/cncr.21792>
- Karimzadeh, M.R., Pourdavoud, P., Ehtesham, N., Qadbeigi, M., Asl, M.M., Alani, B., Mosallaei, M., Pakzad, B., 2021. Regulation of DNA methylation machinery by epi-miRNAs in human cancer: emerging new targets in cancer therapy. *Cancer Gene Ther* 28, 157–174. <https://doi.org/10.1038/s41417-020-00210-7>
- Kim, G.-D., Kelesoglu, N., Roberts, R.J., Pradhan, S., 2002. Co-operation and communication between the human maintenance and de novo DNA (cytosine-5) methyltransferases. *The EMBO Journal* 21, 4183–4195. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdf401>
- 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, 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, 122–126. <https://doi.org/10.1038/nature12052>
- 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, 3888. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-11826-1>
- Kozomara, A., Birgaoanu, M., Griffiths-Jones, S., 2019. miRBase: from microRNA sequences to function. *Nucleic Acids Research* 47, D155–D162. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1141>
- Krueger, 2015. Babraham Bioinformatics - Trim Galore! [WWW Document]. URL https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/trim_galore/ (accessed 8.1.22).
- Lalande, M., 1996. Parental imprinting and human disease. *Annu Rev Genet* 30, 173–195. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.30.1.173>

Langmead, B., Salzberg, S.L., 2012. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat Methods* 9, 357–359. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1923>

Larousse, É., n.d. Définitions : génétique - Dictionnaire de français Larousse [WWW Document]. URL <https://www.larousse.fr/dictionnaires/francais/g%C3%A9n%C3%A9tique/36556> (accessed 2.24.22).

Lauring, J., Park, B.H., Wolff, A.C., 2013. The Phosphoinositide-3-Kinase-Akt-mTOR Pathway as a Therapeutic Target in Breast Cancer. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network* 11, 670–678. <https://doi.org/10.6004/jnccn.2013.0086>

Lee, G.E., Kim, J.H., Taylor, M., Muller, M.T., 2010. DNA Methyltransferase 1-associated Protein (DMAP1) Is a Co-repressor That Stimulates DNA Methylation Globally and Locally at Sites of Double Strand Break Repair. *J Biol Chem* 285, 37630–37640. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.148536>

Lee, M.S., Helms, T.L., Feng, N., Gay, J., Chang, Q.E., Tian, F., Wu, J.Y., Toniatti, C., Heffernan, T.P., Powis, G., Kwong, L.N., Kopetz, S., 2016. Efficacy of the combination of MEK and CDK4/6 inhibitors in vitro and in vivo in KRAS mutant colorectal cancer models. *Oncotarget* 7, 39595–39608. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.9153>

LeRoy, G., Rickards, B., Flint, S.J., 2008. The double bromodomain proteins Brd2 and Brd3 couple histone acetylation to transcription. *Mol Cell* 30, 51–60. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2008.01.018>

Li, Z., Razavi, P., Li, Q., Toy, W., Liu, B., Ping, C., Hsieh, W., Sanchez-Vega, F., Brown, D.N., Paula, A.F.D.C., Morris, L., Selenica, P., Eichenberger, E., Shen, R., Schultz, N., Rosen, N., Scaltriti, M., Brogi, E., Baselga, J., Reis-Filho, J.S., Chandarlapaty, S., 2018. Loss of the FAT1 Tumor Suppressor Promotes Resistance to CDK4/6 Inhibitors via the Hippo Pathway. *Cancer Cell* 34, 893-905.e8. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2018.11.006>

Lin, S., Choe, J., Du, P., Triboulet, R., Gregory, R.I., 2016a. METTL3 promotes translation in human cancer cells. *Mol Cell* 62, 335–345. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.03.021>

Lin, S., Choe, J., Du, P., Triboulet, R., Gregory, R.I., 2016b. METTL3 promotes translation in human cancer cells. *Mol Cell* 62, 335–345. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.03.021>

Lin, S., Liu, Q., Lelyveld, V.S., Choe, J., Szostak, J.W., Gregory, R.I., 2018. Mettl1/Wdr4-mediated m7G tRNA methylome is required for normal mRNA translation and embryonic stem cell self-renewal and differentiation. *Mol Cell* 71, 244-255.e5. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.06.001>

Linder, B., Grozhik, A.V., Olarerin-George, A.O., Meydan, C., Mason, C.E., Jaffrey, S.R., 2015. Single-nucleotide resolution mapping of m6A and m6Am throughout the transcriptome. *Nat Methods* 12, 767–772. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3453>

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, 315–322. <https://doi.org/10.1038/nature08514>

- Liu, C., Huang, Y., Qin, T., You, L., Lu, F., Hu, D., Xiao, R., Qin, X., Guo, E., Yang, B., Li, Xi, Fan, J., Li, Xiong, Fu, Y., Liu, S., Wang, Z., Dou, Y., Wang, W., Li, W., Yang, X., Liu, J., Peng, W., Zhang, L., Cui, Y., Sun, C., Chen, G., 2022. AZD5153 reverses palbociclib resistance in ovarian cancer by inhibiting cell cycle-related proteins and the MAPK/PI3K-AKT pathway. *Cancer Lett* 528, 31–44. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2021.12.021>
- Liu, J., Yue, Y., Han, D., Wang, X., Fu, Y., Zhang, L., Jia, G., Yu, M., Lu, Z., Deng, X., Dai, Q., Chen, W., He, C., 2014. A METTL3-METTL14 complex mediates mammalian nuclear RNA N6-adenosine methylation. *Nat Chem Biol* 10, 93–95. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1432>
- Lohard, S., Bourgeois, N., Maillet, L., Gautier, F., Fétiveau, A., Lasla, H., Nguyen, F., Vuillier, C., Dumont, A., Moreau-Aubry, A., Frapin, M., David, L., Loussouarn, D., Kerdraon, O., Campone, M., Jézéquel, P., Juin, P.P., Barillé-Nion, S., 2020. STING-dependent paracrine shapes apoptotic priming of breast tumors in response to anti-mitotic treatment. *Nat Commun* 11, 259. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13689-y>
- Love, M.I., Huber, W., Anders, S., 2014. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology* 15, 550. <https://doi.org/10.1186/s13059-014-0550-8>
- 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, 320–334. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.03.036>
- Lu, X., Zhao, B.S., He, C., 2015. TET Family Proteins: Oxidation Activity, Interacting Molecules, and Functions in Diseases. *Chem Rev* 115, 2225–2239. <https://doi.org/10.1021/cr500470n>
- Lucantoni, F., Salvucci, M., Düssmann, H., Lindner, A.U., Lambrechts, D., Prehn, J.H.M., 2021. BCL(X)L and BCL2 increase the metabolic fitness of breast cancer cells: a single-cell imaging study. *Cell Death Differ* 28, 1512–1531. <https://doi.org/10.1038/s41418-020-00683-x>
- Luger, K., Richmond, T.J., 1998. The histone tails of the nucleosome. *Current Opinion in Genetics & Development* 8, 140–146. [https://doi.org/10.1016/S0959-437X\(98\)80134-2](https://doi.org/10.1016/S0959-437X(98)80134-2)
- Luo, M., 2018. Chemical and Biochemical Perspectives of Protein Lysine Methylation. *Chem. Rev.* 118, 6656–6705. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.8b00008>
- Luo, Y., Lu, X., Xie, H., 2014. Dynamic Alu Methylation during Normal Development, Aging, and Tumorigenesis. *Biomed Res Int* 2014, 784706. <https://doi.org/10.1155/2014/784706>
- Lyko, F., 2018. The DNA methyltransferase family: a versatile toolkit for epigenetic regulation. *Nat Rev Genet* 19, 81–92. <https://doi.org/10.1038/nrg.2017.80>
- Ma, J., Ge, Z., 2021. Comparison Between Decitabine and Azacitidine for Patients With Acute Myeloid Leukemia and Higher-Risk Myelodysplastic Syndrome: A Systematic Review and Network Meta-Analysis. *Frontiers in Pharmacology* 12.
- Maksour, S., Ooi, L., Dottori, M., 2020. More than a Corepressor: The Role of CoREST Proteins in Neurodevelopment. *eNeuro* 7. <https://doi.org/10.1523/ENEURO.0337-19.2020>

- Malorni, L., Piazza, S., Ciani, Y., Guarducci, C., Bonechi, M., Biagioni, C., Hart, C.D., Verardo, R., Leo, A.D., Migliaccio, I., 2016. A gene expression signature of retinoblastoma loss-of-function is a predictive biomarker of resistance to palbociclib in breast cancer cell lines and is prognostic in patients with ER positive early breast cancer. *Oncotarget* 7, 68012–68022. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.12010>
- Margueron, R., Reinberg, D., 2011. The Polycomb complex PRC2 and its mark in life. *Nature* 469, 343–349. <https://doi.org/10.1038/nature09784>
- Marmorstein, R., Zhou, M.-M., 2014. Writers and Readers of Histone Acetylation: Structure, Mechanism, and Inhibition. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 6, a018762. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a018762>
- Maycotte, P., Thorburn, A., 2014. Targeting autophagy in breast cancer. *World Journal of Clinical Oncology* 5, 224–240. <https://doi.org/10.5306/wjco.v5.i3.224>
- McCartney, A., Migliaccio, I., Bonechi, M., Biagioni, C., Romagnoli, D., De Luca, F., Galardi, F., Risi, E., De Santo, I., Benelli, M., Malorni, L., Di Leo, A., 2019. Mechanisms of Resistance to CDK4/6 Inhibitors: Potential Implications and Biomarkers for Clinical Practice. *Front. Oncol.* 9. <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00666>
- McGrath, J., Solter, D., 1984. Completion of mouse embryogenesis requires both the maternal and paternal genomes. *Cell* 37, 179–183. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(84\)90313-1](https://doi.org/10.1016/0092-8674(84)90313-1)
- Melamed, P., Yosefzon, Y., David, C., Tsukerman, A., Pnueli, L., 2018. Tet Enzymes, Variants, and Differential Effects on Function. *Front Cell Dev Biol* 6, 22. <https://doi.org/10.3389/fcell.2018.00022>
- Mellen, 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, 1417–1430. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.11.022>
- Mesa-Eguiagaray, I., Wild, S.H., Rosenberg, P.S., Bird, S.M., Brewster, D.H., Hall, P.S., Cameron, D.A., Morrison, D., Figueroa, J.D., 2020. Distinct temporal trends in breast cancer incidence from 1997 to 2016 by molecular subtypes: a population-based study of Scottish cancer registry data. *Br J Cancer* 123, 852–859. <https://doi.org/10.1038/s41416-020-0938-z>
- Milne, T.A., Dou, Y., Martin, M.E., Brock, H.W., Roeder, R.G., Hess, J.L., 2005. MLL associates specifically with a subset of transcriptionally active target genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 14765–14770. <https://doi.org/10.1073/pnas.0503630102>
- Mirza, S., Sharma, G., Parshad, R., Gupta, S.D., Pandya, P., Ralhan, R., 2013. Expression of DNA methyltransferases in breast cancer patients and to analyze the effect of natural compounds on DNA methyltransferases and associated proteins. *J Breast Cancer* 16, 23–31. <https://doi.org/10.4048/jbc.2013.16.1.23>
- Mochizuki, K., Nishiyama, A., Jang, M.K., Dey, A., Ghosh, A., Tamura, T., Natsume, H., Yao, H., Ozato, K., 2008. The Bromodomain Protein Brd4 Stimulates G1 Gene Transcription and Promotes Progression to S Phase*. *Journal of Biological Chemistry* 283, 9040–9048. <https://doi.org/10.1074/jbc.M707603200>

- Moore, L.D., Le, T., Fan, G., 2013. DNA Methylation and Its Basic Function. *Neuropsychopharmacol* 38, 23–38. <https://doi.org/10.1038/npp.2012.112>
- Morlando, M., Fatica, A., 2018. Alteration of Epigenetic Regulation by Long Noncoding RNAs in Cancer. *Int J Mol Sci* 19, 570. <https://doi.org/10.3390/ijms19020570>
- Musselman, C.A., Lalonde, M.-E., Côté, J., Kutateladze, T.G., 2012. Perceiving the epigenetic landscape through histone readers. *Nat Struct Mol Biol* 19, 1218–1227. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2436>
- Nair, B.C., Vadlamudi, R.K., 2008. Regulation of hormonal therapy resistance by cell cycle machinery. *Gene Ther Mol Biol* 12, 395.
- Nguyen, M.V., Loof, L., Falchook, G.S., 2020. Bromodomain and Extra-Terminal (BET) Domain Protein Inhibitors for Solid Tumor Cancers. *J Immunother Precis Oncol* 3, 16–22. https://doi.org/10.4103/JIPO.JIPO_2_20
- 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. *Nat Commun* 11, 1222. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-15006-4>
- O'Brien, J., Hayder, H., Zayed, Y., Peng, C., 2018. Overview of MicroRNA Biogenesis, Mechanisms of Actions, and Circulation. *Frontiers in Endocrinology* 9.
- 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, 247–257. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81656-6](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81656-6)
- Olanich, M.E., Sun, W., Hewitt, S.M., Abdullaev, Z., Pack, S.D., Barr, F.G., 2015. CDK4 Amplification Reduces Sensitivity to CDK4/6 Inhibition in Fusion-Positive Rhabdomyosarcoma. *Clinical Cancer Research* 21, 4947–4959. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-14-2955>
- Olopade, O.I., Adeyanju, M.O., Safa, A.R., Hagos, F., Mick, R., Thompson, C.B., Recant, W.M., 1997. Overexpression of BCL-x protein in primary breast cancer is associated with high tumor grade and nodal metastases. *Cancer J Sci Am* 3, 230–237.
- Ooi, S.K.T., Qiu, C., Bernstein, E., Li, K., Jia, D., Yang, Z., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Lin, S.-P., Allis, C.D., Cheng, X., Bestor, T.H., 2007. DNMT3L connects unmethylated lysine 4 of histone H3 to de novo methylation of DNA. *Nature* 448, 714–717. <https://doi.org/10.1038/nature05987>
- Pacaud, R., Sery, Q., Oliver, L., Vallette, F.M., Tost, J., Cartron, P.-F., 2014. DNMT3L interacts with transcription factors to target DNMT3L/DNMT3B to specific DNA sequences: Role of the DNMT3L/DNMT3B/p65-NFκB complex in the (de-)methylation of TRAF1. *Biochimie* 104, 36–49. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2014.05.005>
- 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, 1278-1290.e9. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.03.040>
- Panigrahi, A., O'Malley, B.W., 2021. Mechanisms of enhancer action: the known and the unknown. *Genome Biology* 22, 108. <https://doi.org/10.1186/s13059-021-02322-1>
- Papadimitriou, M.-A., Panoutsopoulou, K., Pilala, K.-M., Scorilas, A., Avgeris, M., 2022. Epi-miRNAs: Modern mediators of methylation status in human cancers. *WIREs RNA* n/a, e1735. <https://doi.org/10.1002/wrna.1735>
- Park, S.-Y., Kim, J.-S., 2020. A short guide to histone deacetylases including recent progress on class II enzymes. *Exp Mol Med* 52, 204–212. <https://doi.org/10.1038/s12276-020-0382-4>
- Park, Y.M., Hwang, S.J., Masuda, K., Choi, K.-M., Jeong, M.-R., Nam, D.-H., Gorospe, M., Kim, H.H., 2012. Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein C1/C2 Controls the Metastatic Potential of Glioblastoma by Regulating PDCD4. *Mol Cell Biol* 32, 4237–4244. <https://doi.org/10.1128/MCB.00443-12>
- Patil, D.P., Chen, C.-K., Pickering, B.F., Chow, A., Jackson, C., Guttman, M., Jaffrey, S.R., 2016. m(6)A RNA methylation promotes XIST-mediated transcriptional repression. *Nature* 537, 369–373. <https://doi.org/10.1038/nature19342>
- Pendina, A.A., Efimova, O.A., Krapivin, M.I., Mekina, I.D., Tikhonov, A.V., Koltsova, A.S., Petrovskaiia-Kaminskaia, A.V., Chiryaeva, O.G., Kogan, I.Y., Gzgzyan, A.M., Baranov, V.S., 2018. Genomic distribution of 5-formylcytosine and 5-carboxylcytosine in human preimplantation embryos. *Molecular Reproduction and Development* 85, 893–895. <https://doi.org/10.1002/mrd.23074>
- Perera, A., Eisen, D., Wagner, M., Laube, S.K., Künzel, A.F., Koch, S., Steinbacher, J., Schulze, E., Splith, V., Mittermeier, N., Müller, M., Biel, M., Carell, T., Michalakakis, S., 2015. TET3 Is Recruited by REST for Context-Specific Hydroxymethylation and Induction of Gene Expression. *Cell Reports* 11, 283–294. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.03.020>
- Petell, C.J., Alabdi, L., He, M., San Miguel, P., Rose, R., Gowher, H., 2016. An epigenetic switch regulates de novo DNA methylation at a subset of pluripotency gene enhancers during embryonic stem cell differentiation. *Nucleic Acids Res* 44, 7605–7617. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw426>
- Petesht, S.J., Lis, J.T., 2012. Overcoming the Nucleosome Barrier During Transcript Elongation. *Trends Genet* 28, 285–294. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2012.02.005>
- Petrossian, T.C., Clarke, S.G., 2011. Uncovering the Human Methyltransferasome. *Mol Cell Proteomics* 10, M110.000976. <https://doi.org/10.1074/mcp.M110.000976>
- Pilotto, S., Speranzini, V., Tortorici, M., Durand, D., Fish, A., Valente, S., Forneris, F., Mai, A., Sixma, T.K., Vachette, P., Mattevi, A., 2015. Interplay among nucleosomal DNA, histone tails, and corepressor CoREST underlies LSD1-mediated H3 demethylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112, 2752–2757. <https://doi.org/10.1073/pnas.1419468112>
- Plotnikova, O., Baranova, A., Skoblov, M., 2019. Comprehensive Analysis of Human microRNA–mRNA Interactome. *Frontiers in Genetics* 10.

- Pongubala, J.M.R., Murre, C., 2021. Spatial Organization of Chromatin: Transcriptional Control of Adaptive Immune Cell Development. *Frontiers in Immunology* 12.
- Pratama, M.Y., Visintin, A., Crocè, L.S., Tiribelli, C., Pascut, D., 2020. Circulatory miRNA as a Biomarker for Therapy Response and Disease-Free Survival in Hepatocellular Carcinoma. *Cancers (Basel)* 12, 2810. <https://doi.org/10.3390/cancers12102810>
- Qi, S., Mota, J., Chan, S.-H., Villarreal, J., Dai, N., Arya, S., Hromas, R.A., Rao, M.K., Corrêa Jr, I.R., Gupta, Y.K., 2022. RNA binding to human METTL3-METTL14 restricts N6-deoxyadenosine methylation of DNA in vitro. *eLife* 11, e67150. <https://doi.org/10.7554/eLife.67150>
- Qin, G., Xu, F., Qin, T., Zheng, Q., Shi, D., Xia, W., Tian, Y., Tang, Y., Wang, J., Xiao, X., Deng, W., Wang, S., 2015. Palbociclib inhibits epithelial-mesenchymal transition and metastasis in breast cancer via c-Jun/COX-2 signaling pathway. *Oncotarget* 6, 41794–41808.
- Quagliano, A., Gopalakrishnapillai, A., Barwe, S.P., 2020. Understanding the Mechanisms by Which Epigenetic Modifiers Avert Therapy Resistance in Cancer. *Front Oncol* 10, 992. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.00992>
- Quinlan, A.R., Hall, I.M., 2010. BEDTools: a flexible suite of utilities for comparing genomic features. *Bioinformatics* 26, 841–842. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq033>
- Raiber, E.-A., Beraldi, D., Ficuz, G., Burgess, H., Branco, M., Murat, P., Oxley, D., Booth, M., Reik, W., Balasubramanian, S., 2012. Genome-wide distribution of 5-formylcytosine in ES cells is associated with transcription and depends on thymine DNA glycosylase. *Genome biology* 13, R69. <https://doi.org/10.1186/gb-2012-13-8-r69>
- Raineri, S., Mellor, J., 2018. IDH1: Linking Metabolism and Epigenetics. *Front Genet* 9, 493. <https://doi.org/10.3389/fgene.2018.00493>
- Rampioni Vinciguerra, G.L., Sonogo, M., Segatto, I., Dall'Acqua, A., Vecchione, A., Baldassarre, G., Belletti, B., 2022. CDK4/6 Inhibitors in Combination Therapies: Better in Company Than Alone: A Mini Review. *Frontiers in Oncology* 12.
- Ramsahoye, B.H., Biniszkiwicz, 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. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 5237–5242. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.10.5237>
- Rani, V., Sengar, R.S., 2022. Biogenesis and mechanisms of microRNA-mediated gene regulation. *Biotechnology and Bioengineering* 119, 685–692. <https://doi.org/10.1002/bit.28029>
- Rasmussen, T.P., 2003. Embryonic stem cell differentiation: A chromatin perspective. *Reproductive Biology and Endocrinology* 1, 100. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-1-100>
- Reddy, K.B., 2015. MicroRNA (miRNA) in cancer. *Cancer Cell International* 15, 38. <https://doi.org/10.1186/s12935-015-0185-1>
- Reid, M.A., Dai, Z., Locasale, J.W., 2017. The impact of cellular metabolism on chromatin dynamics and epigenetics. *Nat Cell Biol* 19, 1298–1306. <https://doi.org/10.1038/ncb3629>

- Ren, W., Gao, L., Song, J., 2018. Structural basis of DNMT1 and DNMT3A-mediated DNA methylation. *Genes* 9, 620. <https://doi.org/10.3390/genes9120620>
- Robertson, K.D., Ait-Si-Ali, S., Yokochi, T., Wade, P.A., Jones, P.L., Wolffe, A.P., 2000. DNMT1 forms a complex with Rb, E2F1 and HDAC1 and represses transcription from E2F-responsive promoters. *Nat Genet* 25, 338–342. <https://doi.org/10.1038/77124>
- Robinson, D.R., Wu, Y.-M., Vats, P., Su, F., Lonigro, R.J., Cao, X., Kalyana-Sundaram, S., Wang, R., Ning, Y., Hodges, L., Gursky, A., Siddiqui, J., Tomlins, S.A., Roychowdhury, S., Pienta, K.J., Kim, S.Y., Roberts, J.S., Rae, J.M., Van Poznak, C.H., Hayes, D.F., Chugh, R., Kunju, L.P., Talpaz, M., Schott, A.F., Chinnaiyan, A.M., 2013. Activating ESR1 mutations in hormone-resistant metastatic breast cancer. *Nat Genet* 45, 1446–1451. <https://doi.org/10.1038/ng.2823>
- Roth, V., 2006. Doubling Time - Online computing with 2 points [WWW Document]. URL <https://www.doubling-time.com/compute.php> (accessed 7.31.22).
- Rothé, F., Laes, J.-F., Lambrechts, D., Smeets, D., Vincent, D., Maetens, M., Fumagalli, D., Michiels, S., Drisis, S., Moerman, C., Detiffe, J.-P., Larsimont, D., Awada, A., Piccart, M., Sotiriou, C., Ignatiadis, M., 2014. Plasma circulating tumor DNA as an alternative to metastatic biopsies for mutational analysis in breast cancer. *Ann Oncol* 25, 1959–1965. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdu288>
- Rowling, M.J., McMullen, M.H., Chipman, D.C., Schalinske, K.L., 2002. Hepatic Glycine N-Methyltransferase Is Up-Regulated by Excess Dietary Methionine in Rats. *The Journal of Nutrition* 132, 2545–2550. <https://doi.org/10.1093/jn/132.9.2545>
- Rudolph, A., Chang-Claude, J., Schmidt, M.K., 2016. Gene–environment interaction and risk of breast cancer. *Br J Cancer* 114, 125–133. <https://doi.org/10.1038/bjc.2015.439>
- Sachs, N., de Ligt, J., Kopper, O., Gogola, E., Bounova, G., Weeber, F., Balgobind, A.V., Wind, K., Gracanin, A., Begthel, H., Korving, J., van Boxtel, R., Duarte, A.A., Lelieveld, D., van Hoeck, A., Ernst, R.F., Blokzijl, F., Nijman, I.J., Hoogstraat, M., van de Ven, M., Egan, D.A., Zinzalla, V., Moll, J., Boj, S.F., Voest, E.E., Wessels, L., van Diest, P.J., Rottenberg, S., Vries, R.G.J., Cuppen, E., Clevers, H., 2018. A Living Biobank of Breast Cancer Organoids Captures Disease Heterogeneity. *Cell* 172, 373–386.e10. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.11.010>
- Sanchez, C.G., Ma, C.X., Crowder, R.J., Guintoli, T., Phommaly, C., Gao, F., Lin, L., Ellis, M.J., 2011. Preclinical modeling of combined phosphatidylinositol-3-kinase inhibition with endocrine therapy for estrogen receptor-positive breast cancer. *Breast Cancer Res* 13, R21. <https://doi.org/10.1186/bcr2833>
- Sanchez, R., Zhou, M.-M., 2009. The role of human bromodomains in chromatin biology and gene transcription. *Curr Opin Drug Discov Devel* 12, 659–665.
- Schermelleh, L., Haemmer, A., Spada, F., Rösing, N., Meilinger, D., Rothbauer, U., Cardoso, M.C., Leonhardt, H., 2007. Dynamics of Dnmt1 interaction with the replication machinery and its role in postreplicative maintenance of DNA methylation. *Nucleic Acids Res* 35, 4301–4312. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm432>

- Schotta, G., Ebert, A., Krauss, V., Fischer, A., Hoffmann, J., Rea, S., Jenuwein, T., Dorn, R., Reuter, G., 2002. Central role of *Drosophila* SU(VAR)3–9 in histone H3-K9 methylation and heterochromatic gene silencing. *EMBO J* 21, 1121–1131. <https://doi.org/10.1093/emboj/21.5.1121>
- Schuettengruber, B., Bourbon, H.-M., Di Croce, L., Cavalli, G., 2017. Genome Regulation by Polycomb and Trithorax: 70 Years and Counting. *Cell* 171, 34–57. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.08.002>
- Seo, T., Noguchi, E., Yoshida, M., Mori, T., Tanioka, M., Sudo, K., Shimomura, A., Yonemori, K., Fujiwara, Y., Tamura, K., 2020. Response to Dabrafenib and Trametinib of a Patient with Metaplastic Breast Carcinoma Harboring a BRAF V600E Mutation. *Case Rep Oncol Med* 2020, 2518383. <https://doi.org/10.1155/2020/2518383>
- Shah, A., Rashid, F., Awan, H.M., Hu, S., Wang, X., Chen, L., Shan, G., 2017. The DEAD-Box RNA Helicase DDX3 Interacts with m6A RNA Demethylase ALKBH5. *Stem Cells Int* 2017, 8596135. <https://doi.org/10.1155/2017/8596135>
- Sharif, J., Muto, M., Takebayashi, S., Suetake, I., Iwamatsu, A., Endo, T.A., Shinga, J., Mizutani-Koseki, Y., Toyoda, T., Okamura, K., Tajima, S., Mitsuya, K., Okano, M., Koseki, H., 2007. The SRA protein Np95 mediates epigenetic inheritance by recruiting Dnmt1 to methylated DNA. *Nature* 450, 908–912. <https://doi.org/10.1038/nature06397>
- Sharrocks, A.D., 2001. The ETS-domain transcription factor family. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 827–837. <https://doi.org/10.1038/35099076>
- Sherbert, G.V., 1970. Epigenetic processes and their relevance to the study of neoplasia. *Adv Cancer Res* 13, 97–167.
- Shi, Yujiang, Lan, F., Matson, C., Mulligan, P., Whetstine, J.R., Cole, P.A., Casero, R.A., Shi, Yang, 2004. Histone Demethylation Mediated by the Nuclear Amine Oxidase Homolog LSD1. *Cell* 119, 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. *Br J Cancer* 124, 1478–1490. <https://doi.org/10.1038/s41416-021-01321-0>
- Slowikowski, K., Schep, A., Hughes, S., Dang, T.K., Lukauskas, S., Irisson, J.-O., Kamvar, Z.N., Ryan, T., Christophe, D., Hiroaki, Y., Gramme, P., Abdol, A.M., Barrett, M., Cannoodt, R., Krassowski, M., Chirico, M., Aphalo, P., 2021. ggrepel: Automatically Position Non-Overlapping Text Labels with “ggplot2.”
- Smallwood, S.A., Kelsey, G., 2012. De novo DNA methylation: a germ cell perspective. *Trends in Genetics* 28, 33–42. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2011.09.004>
- Sorenson, G.D., Pribish, D.M., Valone, F.H., Memoli, V.A., Bzik, D.J., Yao, S.L., 1994. Soluble normal and mutated DNA sequences from single-copy genes in human blood. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 3, 67–71.
- Soshnikova, N., Duboule, D., 2009. Epigenetic regulation of vertebrate Hox genes: A dynamic equilibrium. *Epigenetics* 4, 537–540. <https://doi.org/10.4161/epi.4.8.10132>

Sozzi, G., Conte, D., Leon, M., Ciricione, R., Roz, L., Ratcliffe, C., Roz, E., Cirenei, N., Bellomi, M., Pelosi, G., Pierotti, M.A., Pastorino, U., 2003. Quantification of free circulating DNA as a diagnostic marker in lung cancer. *J Clin Oncol* 21, 3902–3908. <https://doi.org/10.1200/JCO.2003.02.006>

Speybroeck, L., Waele, D., Van de Vijver, G., 2002. Theories in Early Embryology. *Annals of The New York Academy of Sciences - ANN N Y ACAD SCI* 981, 7–49. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2002.tb04910.x>

Sproul, D., Meehan, R., 2013. Genomic insights into cancer-associated aberrant CpG island hypermethylation. *Briefings in functional genomics* 12. <https://doi.org/10.1093/bfgp/els063>

Stendahl, M., Kronblad, Å., Rydén, L., Emdin, S., Bengtsson, N.O., Landberg, G., 2004. Cyclin D1 overexpression is a negative predictive factor for tamoxifen response in postmenopausal breast cancer patients. *Br J Cancer* 90, 1942–1948. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6601831>

Stratikopoulos, E.E., Dendy, M., Szabolcs, M., Khaykin, A.J., Lefebvre, C., Zhou, M.-M., Parsons, R., 2015. Kinase and BET Inhibitors Together Clamp Inhibition of PI3K Signaling and Overcome Resistance to Therapy. *Cancer Cell* 27, 837–851. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2015.05.006>

Surani, M.A., Barton, S.C., Norris, M.L., 1984. Development of reconstituted mouse eggs suggests imprinting of the genome during gametogenesis. *Nature* 308, 548–550. <https://doi.org/10.1038/308548a0>

Svoronos, A.A., Engelman, D.M., Slack, F.J., 2016. OncomiR or Tumor Suppressor? The Duplicity of MicroRNAs in Cancer. *Cancer Res* 76, 3666–3670. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-16-0359>

Takebayashi, S., Tamura, T., Matsuoka, C., Okano, M., 2007. Major and Essential Role for the DNA Methylation Mark in Mouse Embryogenesis and Stable Association of DNMT1 with Newly Replicated Regions. *Mol Cell Biol* 27, 8243–8258. <https://doi.org/10.1128/MCB.00899-07>

Talbert, P.B., Henikoff, S., 2021. Histone variants at a glance. *J Cell Sci* 134, jcs244749. <https://doi.org/10.1242/jcs.244749>

Toy, W., Shen, Y., Won, H., Green, B., Sakr, R.A., Will, M., Li, Z., Gala, K., Fanning, S., King, T.A., Hudis, C., Chen, D., Taran, T., Hortobagyi, G., Greene, G., Berger, M., Baselga, J., Chandralapaty, S., 2013. ESR1 ligand-binding domain mutations in hormone-resistant breast cancer. *Nat Genet* 45, 1439–1445. <https://doi.org/10.1038/ng.2822>

Tripolitsioti, D., Grotzer, M.A., Baumgartner, M., 2017. The Ser/Thr Kinase MAP4K4 Controls Pro-Metastatic Cell Functions. *J Carcinog Mutagen* 08. <https://doi.org/10.4172/2157-2518.1000284>

Tschiersch, B., Hofmann, A., Krauss, V., Dorn, R., Korge, G., Reuter, G., 1994. The protein encoded by the *Drosophila* position-effect variegation suppressor gene *Su(var)3-9* combines domains of antagonistic regulators of homeotic gene complexes. *EMBO J* 13, 3822–3831.

Tuorto, F., Liebers, R., Musch, T., Schaefer, M., Hofmann, S., Kellner, S., Frye, M., Helm, M., Stoecklin, G., Lyko, F., 2012. RNA cytosine methylation by Dnmt2 and NSun2 promotes tRNA stability and protein synthesis. *Nat Struct Mol Biol* 19, 900–905. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2357>

- Turner, N.C., Liu, Y., Zhu, Z., Loi, S., Colleoni, M., Loibl, S., DeMichele, A., Harbeck, N., André, F., Bayar, M.A., Michiels, S., Zhang, Z., Giorgetti, C., Arnedos, M., Huang Bartlett, C., Cristofanilli, M., 2019. Cyclin E1 Expression and Palbociclib Efficacy in Previously Treated Hormone Receptor–Positive Metastatic Breast Cancer. *JCO* 37, 1169–1178. <https://doi.org/10.1200/JCO.18.00925>
- Tusup, M., Kundig, T., Pascolo, S., 2018. Epitranscriptomics of cancer. *World J Clin Oncol* 9, 42–55. <https://doi.org/10.5306/wjco.v9.i3.42>
- van den Beucken, T., Koch, E., Chu, K., Rupaimoole, R., Prickaerts, P., Adriaens, M., Voncken, J.W., Harris, A.L., Buffa, F.M., Haider, S., Starmans, M.H.W., Yao, C.Q., Ivan, M., Ivan, C., Pecot, C.V., Boutros, P.C., Sood, A.K., Koritzinsky, M., Wouters, B.G., 2014. Hypoxia promotes stem cell phenotypes and poor prognosis through epigenetic regulation of DICER. *Nat Commun* 5, 5203. <https://doi.org/10.1038/ncomms6203>
- Veland, N., Lu, Y., Hardikar, S., Gaddis, S., Zeng, Y., Liu, B., Estecio, M.R., Takata, Y., Lin, K., Tomida, M.W., Shen, J., Saha, D., Gowher, H., Zhao, H., Chen, T., 2019. DNMT3L facilitates DNA methylation partly by maintaining DNMT3A stability in mouse embryonic stem cells. *Nucleic Acids Research* 47, 152–167. <https://doi.org/10.1093/nar/gky947>
- Waddington, C.H., 2012. The Epigenotype. *International Journal of Epidemiology* 41, 10–13. <https://doi.org/10.1093/ije/dyr184>
- Waddington, C.H., 1968. Towards a Theoretical Biology. *Nature* 218, 525–527. <https://doi.org/10.1038/218525a0>
- Wander, S.A., Cohen, O., Gong, X., Johnson, G.N., Buendia-Buendia, J.E., Lloyd, M.R., Kim, D., Luo, F., Mao, P., Helvie, K., Kowalski, K.J., Nayar, U., Waks, A.G., Parsons, S.H., Martinez, R., Litchfield, L.M., Ye, X.S., Yu, C., Jansen, V.M., Stille, J.R., Smith, P.S., Oakley, G.J., Chu, Q.S., Batist, G., Hughes, M.E., Kremer, J.D., Garraway, L.A., Winer, E.P., Tolaney, S.M., Lin, N.U., Buchanan, S.G., Wagle, N., 2020. The Genomic Landscape of Intrinsic and Acquired Resistance to Cyclin-Dependent Kinase 4/6 Inhibitors in Patients with Hormone Receptor–Positive Metastatic Breast Cancer. *Cancer Discovery* 10, 1174–1193. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-19-1390>
- Wang, L., Wang, J., Blaser, B.W., Duchemin, A.-M., Kusewitt, D.F., Liu, T., Caligiuri, M.A., Briesewitz, R., 2007. Pharmacologic inhibition of CDK4/6: mechanistic evidence for selective activity or acquired resistance in acute myeloid leukemia. *Blood* 110, 2075–2083. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-02-071266>
- Wang, X., Feng, J., Xue, Y., Guan, Z., Zhang, D., Liu, Z., Gong, Z., Wang, Q., Huang, J., Tang, C., Zou, T., Yin, P., 2016. Structural basis of N6-adenosine methylation by the METTL3–METTL14 complex. *Nature* 534, 575–578. <https://doi.org/10.1038/nature18298>
- Watanabe, D., Suetake, I., Tada, T., Tajima, S., 2002. Stage- and cell-specific expression of Dnmt3a and Dnmt3b during embryogenesis. *Mechanisms of Development* 118, 187–190. [https://doi.org/10.1016/S0925-4773\(02\)00242-3](https://doi.org/10.1016/S0925-4773(02)00242-3)
- Watt, A.C., Cejas, P., DeCristo, M.J., Metzger-Filho, O., Lam, E.Y.N., Qiu, X., BrinJones, H., Kesten, N., Coulson, R., Font-Tello, A., Lim, K., Vadhi, R., Daniels, V.W., Montero, J., Taing, L., Meyer, C.A., Gilan,

O., Bell, C.C., Korthauer, K.D., Giambartolomei, C., Pasaniuc, B., Seo, J.-H., Freedman, M.L., Ma, C., Ellis, M.J., Krop, I., Winer, E., Letai, A., Brown, M., Dawson, M.A., Long, H.W., Zhao, J.J., Goel, S., 2021. CDK4/6 inhibition reprograms the breast cancer enhancer landscape by stimulating AP-1 transcriptional activity. *Nat Cancer* 2, 34–48. <https://doi.org/10.1038/s43018-020-00135-y>

White, E., 2012. Deconvoluting the context-dependent role for autophagy in cancer. *Nat Rev Cancer* 12, 401–410. <https://doi.org/10.1038/nrc3262>

wickham, H., 2016. *ggplot2*.

Wijesinghe, P., Bhagwat, A.S., 2012. Efficient deamination of 5-methylcytosines in DNA by human APOBEC3A, but not by AID or APOBEC3G. *Nucleic Acids Res* 40, 9206–9217. <https://doi.org/10.1093/nar/gks685>

Wilson, M.M., Callens, C., Le Gallo, M., Mironov, S., Ding, Q., Salamagnon, A., Chavarria, T.E., Viel, R., Peasah, A.D., Bhutkar, A., Martin, S., Godey, F., Tas, P., Kang, H.S., Juin, P.P., Jetten, A.M., Visvader, J.E., Weinberg, R.A., Attanasio, M., Prigent, C., Lees, J.A., Guen, V.J., 2021. An EMT-primary cilium-GLIS2 signaling axis regulates mammaryogenesis and claudin-low breast tumorigenesis. *Sci Adv* 7, eabf6063. <https://doi.org/10.1126/sciadv.abf6063>

Wong, J.M., Eirin-Lopez, J.M., 2021. Evolution of Methyltransferase-Like (METTL) Proteins in Metazoa: A Complex Gene Family Involved in Epitranscriptomic Regulation and Other Epigenetic Processes. *Molecular Biology and Evolution* 38, 5309–5327. <https://doi.org/10.1093/molbev/msab267>

Wu, H., D'Alessio, A.C., Ito, S., Xia, K., Wang, Z., Cui, K., Zhao, K., Eve Sun, Y., Zhang, Y., 2011. Dual functions of Tet1 in transcriptional regulation in mouse embryonic stem cells. *Nature* 473, 389–393. <https://doi.org/10.1038/nature09934>

Wu, M., Hayward, D., Kalin, J.H., Song, Y., Schwabe, J.W., Cole, P.A., 2018. Lysine-14 acetylation of histone H3 in chromatin confers resistance to the deacetylase and demethylase activities of an epigenetic silencing complex. *Elife* 7, e37231. <https://doi.org/10.7554/eLife.37231>

Xie, S., Wang, Z., Okano, M., Nogami, M., Li, Y., He, W.W., Okumura, K., Li, E., 1999. Cloning, expression and chromosome locations of the human DNMT3 gene family. *Gene* 236, 87–95. [https://doi.org/10.1016/s0378-1119\(99\)00252-8](https://doi.org/10.1016/s0378-1119(99)00252-8)

Xu, W., Liu, R., Dai, Y., Hong, S., Dong, H., Wang, H., 2021. The Role of p38 γ in Cancer: From review to outlook. *Int J Biol Sci* 17, 4036–4046. <https://doi.org/10.7150/ijbs.63537>

Xu, Y., Wu, F., Tan, L., Kong, L., Xiong, L., Deng, J., Barbera, A., Zheng, L., Zhang, H., Huang, S., Min, J., Nicholson, T., Chen, T., Xu, G., Shi, Y., Zhang, K., Shi, Y.G., 2011. Genome-wide Regulation of 5hmC, 5mC and Gene Expression by Tet1 Hydroxylase in Mouse Embryonic Stem Cells. *Mol Cell* 42, 451–464. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.04.005>

Yang, C., Li, Z., Bhatt, T., Dickler, M., Giri, D., Scaltriti, M., Baselga, J., Rosen, N., Chandarlapaty, S., 2017. Acquired CDK6 amplification promotes breast cancer resistance to CDK4/6 inhibitors and loss of ER signaling and dependence. *Oncogene* 36, 2255–2264. <https://doi.org/10.1038/onc.2016.379>

- Yang, J., Horton, J., Li, J., Huang, Y., Zhang, X., Blumenthal, R., Cheng, X., 2019. Structural basis for preferential binding of human TCF4 to DNA containing 5-carboxylcytosine. *Nucleic acids research* 47. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz381>
- Yang, X.-J., 2004. The diverse superfamily of lysine acetyltransferases and their roles in leukemia and other diseases. *Nucleic Acids Res* 32, 959–976. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh252>
- Yang, Y., Luo, J., Chen, X., Yang, Z., Mei, X., Ma, J., Zhang, Z., Guo, X., Yu, X., 2020. CDK4/6 inhibitors: a novel strategy for tumor radiosensitization. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* 39, 188. <https://doi.org/10.1186/s13046-020-01693-w>
- Yarychivska, O., Shahabuddin, Z., Comfort, N., Boulard, M., Bestor, T.H., 2018. BAH domains and a histone-like motif in DNA methyltransferase 1 (DNMT1) regulate de novo and maintenance methylation in vivo. *J Biol Chem* 293, 19466–19475. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.004612>
- Yue, Y., Liu, Jun, Cui, X., Cao, J., Luo, G., Zhang, Z., Cheng, T., Gao, M., Shu, X., Ma, H., Wang, F., Wang, X., Shen, B., Wang, Y., Feng, X., He, C., Liu, Jianzhao, 2018. VIRMA mediates preferential m6A mRNA methylation in 3'UTR and near stop codon and associates with alternative polyadenylation. *Cell Discov* 4, 10. <https://doi.org/10.1038/s41421-018-0019-0>
- Zendjabil, M., Favard, S., Tse, C., Abbou, O., Hainque, B., 2017. Les microRNA comme biomarqueurs : quelles perspectives ? *Comptes Rendus Biologies* 340, 114–131. <https://doi.org/10.1016/j.crv.2016.12.001>
- 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, 258–262. <https://doi.org/10.1038/nature09139>
- Zhang, P., Wu, W., Chen, Q., Chen, M., 2019. Non-Coding RNAs and their Integrated Networks. *J Integr Bioinform* 16, 20190027. <https://doi.org/10.1515/jib-2019-0027>
- Zhang, Y., Liu, T., Meyer, C.A., Eeckhoute, J., Johnson, D.S., Bernstein, B.E., Nusbaum, C., Myers, R.M., Brown, M., Li, W., Liu, X.S., 2008. Model-based Analysis of ChIP-Seq (MACS). *Genome Biology* 9, R137. <https://doi.org/10.1186/gb-2008-9-9-r137>
- Zhao, B.S., Roundtree, I.A., He, C., 2017. Post-transcriptional gene regulation by mRNA modifications. *Nat Rev Mol Cell Biol* 18, 31–42. <https://doi.org/10.1038/nrm.2016.132>
- Zhou, H., Huang, C., Xia, X.G., 2008. A tightly regulated Pol III promoter for synthesis of miRNA genes in tandem. *Biochim Biophys Acta* 1779, 773–779. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2008.03.011>
- Zhu, S., Wang, J.-Z., Chen, D., He, Y.-T., Meng, N., Chen, M., Lu, R.-X., Chen, X.-H., Zhang, X.-L., Yan, G.-R., 2020. An oncopeptide regulates m6A recognition by the m6A reader IGF2BP1 and tumorigenesis. *Nat Commun* 11, 1685. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-15403-9>

ANNEXE



- [Current issue](#)
- [Advance articles](#)
- [Volume 12, 2022](#)
- [Volume 11, 2021](#)
- [Volume 10, 2020](#)
- [Volume 9, 2019](#)
- [Archive](#)
- [Cover images](#)
- [Index & coverage](#)
- [Cover suggestion](#)
- [Special issues](#)

Article doi or title

Nanotheranostics 2022; 6(4): 436-450. [[Abstract](#)] [[Full text](#)] [[PDF](#)]

Nanotheranostics 2022; 6(4): 424-435. [[Abstract](#)] [[Full text](#)] [[PDF](#)]

[Nanotheranostics](#)

[International Journal of Biological Sciences](#)

[International Journal of Medical Sciences](#)

[Journal of Cancer](#)



Global reach, higher impact



Manuscript 78541m

MStype: Original research

Title: Deciphering the BRD4 pathway provides therapeutic options to overcome the Palbociclib resistance in breast cancer

Author: Florestan COURANT, Yuna LANDAIS, Gwénola BOUGRAS-CARTRON, Vincent GUEN, Elen GOUJON, Adrien BRETON, Julie ROUL, Philippe P JUIN, Aurélien A. SERANDOUR, Jean-Sébastien FRENEL, Pierre François CARTRON

Contact name/email: Dr. Pierre-Francois Cartron <pierre-francois.cartron@univ-nantes.fr>

Additional email or contact info: pierre-francois.cartron@inserm.fr

Suggested referees, notes to editor: [Edit](#)

[Logout](#)

List of potential reviewers

1. Dr Ceshi Chen; chenc@mail.kiz.ac.cn; Cancer Hospital and Institute of Guangzhou Medical University, Guangzhou, China.
2. DR Yi-Zhou Jiang; yizhoujiang@fudan.edu.cn ; Key Laboratory of Breast Cancer in Shanghai, Shanghai, 200032, China.
3. Jame Abraham; abrahaj5@ccf.org ; Cleveland Clinic Taussig Cancer Institute, Cleveland, OH, US
4. Dr Duncan Odom; d.odam@dkfz.de; Regulatory Genomics and Cancer Evolution (B270), Deutsches KrebsforschungszentrumIm

Manuscript file: [78541m.pdf](#) [Replace](#)

Cover letter: [78541m_cover.docx](#) [Replace](#)

Supplementary file: [suppl.pdf](#) (SupFigandTables_Courantetal.THNO.pdf)
(maximum 15)

[Add file](#) [Remove file](#)

Status:

78541m (active) Received 2022-8-31 from IP 193.52.103.22
This manuscript is under review.

Titre : Etude des mécanismes épigénétiques et épitranscriptomiques impliqués dans l'acquisition de la résistance aux inhibiteurs du cycle cellulaire (CDK4/6) dans les cancers du sein hormono-dépendants.

Mots clés : Cancer du sein, épigénétique, épitranscriptomique, Palbociclib, résistance, biomarqueurs

Résumé. Depuis plusieurs années, la prise en charge des cancers du sein luminaux repose sur l'utilisation d'inhibiteurs du cycle cellulaire ciblant les kinases CDK4/6 (CDK4/6i) comme le Palbociclib. Malgré des résultats prometteurs, on constate que la plupart des patientes développent une résistance à ces inhibiteurs. Pour surmonter, éviter ou retarder cette résistance, des combothérapies peuvent être mises en place.

Afin de proposer un rationnel au design de combothérapies innovantes, nous avons émis l'hypothèse que les reprogrammations épigénétiques et épitranscriptomiques induites par les CDK4/6i pourraient générer des vulnérabilités thérapeutiques « dynamiques/transitoires » pouvant être inhibées par des molécules de thérapies ciblées. Les travaux présentés vont dans ce sens. La surexpression de la protéine BRD4 au sein de cellules Palbociclib-résistantes et l'intégration de résultats de 3'RNAseq et de

BRD4-ChIPseq nous ont conduit à mettre en évidence l'existence de trois options de combothérapies dynamique/adaptative. De plus, nos travaux identifient le niveau de méthylation du gène *BRD4* dans le sang des patientes comme pouvant être un biomarqueur de sensibilité à ces combothérapies.

L'étude des mécanismes et signatures épitranscriptomiques a ensuite montré que ceux-ci étaient modifiés au sein de cellules Palbociclib-résistantes et l'intégration de ces résultats nous a également permis de mettre en évidence l'existence d'options de combothérapies dynamiques/adaptatives.

En conclusion, l'ensemble de ces travaux supportent l'idée d'utiliser des biomarqueurs épigénétiques et/ou épitranscriptomiques pour le design de combothérapies innovantes s'inscrivant dans un cadre de traitement personnalisé et de précision des cancers.

Title: Study of epigenetic and epitranscriptomic mechanisms involved in acquiring resistance to cell cycle inhibitors (CDK4/6) in homono-dependant breast cancers.

Keywords : Breast cancer, epigenetic, epitranscriptomic, Palbociclib, resistance, biomarkers

Abstract. For several years, the management of luminal breast cancers has been based on the use of cell cycle inhibitors targeting CDK4/6 kinases (CDK4/6i) as the Palbociclib. Despite promising results, most patients develop resistance to these inhibitors. To overcome, avoid or delay this resistance, combotherapy can be implemented.

To propose a rationale for the design of innovative combotherapy, we hypothesized that the epigenetic/epitranscriptomic reprogramming induced by CDK4/6i could generate "dynamic/transitory" therapeutic vulnerabilities that could be inhibited by targeted-therapy molecules. The work presented is in line with this idea. The overexpression of BRD4 protein in Palbociclib-resistant cells and the integration of 3'RNAseq and BRD4-ChIPseq results led us

to highlight the existence of three options of dynamic/adaptive combotherapy. Furthermore, our work identifies the methylation level of *BRD4* gene in the blood of patients as a possible biomarker of sensitivity to these combotherapy. The study of epitranscriptomic mechanisms and signatures then showed that these were modified in Palbociclib-resistant cells and the integration of these results led us to highlight the existence of dynamic/adaptive combotherapy options.

In conclusion, all of this work supports the idea that epigenetic and/or epitranscriptomic biomarkers can be used to design innovative dynamic/adaptive combotherapy in a personalized and precision cancer treatment framework.