



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>



ECOLE DOCTORALE BIOSE (BIOLOGIE-SANTE-ENVIRONNEMENT)

THESE

Présentée et soutenue publiquement pour le titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LORRAINE

Mention : « Sciences de la Vie et de la Santé »

Par Rania EL AKOUM

La phosphorylation de CARM1 empêche l'interaction entre PRMT1 et CARM1, deux « Protein Arginine MethylTransférases » impliquées dans la prolifération dans le cancer du poumon ».

Le 16 Octobre 2013

Membres du jury :

Rapporteurs :

M. Jean-Claude Mazière: PU-PH, Laboratoire de Biochimie Hopital sud Amiens

M. Jean-Noel Freund : DR, UMR U682 INSERM, Strasbourg

Examineurs :

M. Abalo CHANGO : PU, Institut Polytechnique Lasalle, Beauvais

M. Jean-Louis GUEANT: PU-PH, UMR 954 INSERM, Nancy

Mme Christelle CLEMENT-DUCHENE :

PH, UMR 954 INSERM, Nancy co-directeur de thèse

M. Bernard NAMOUR: PU-PH, UMR 954 INSERM, Nancy Directeur de thèse

UMR 954 INSERM, Laboratoire de nutrition, génétique et expositions aux risques
environnementaux, 9 avenue de la Forêt de Haye-Faculté de Médecine 54500
Vandœuvre-lès-Nancy

Remerciements

Ce travail, a été effectué au sein du Laboratoire nutrition, génétique et exposition aux risques environnementaux, U954, Inserm dirigé par Pr. Jean Louis Guéant à qui je tiens à adresser mes plus vifs remerciements pour son accueil dans son unité de recherche et son aide durant cette thèse.

Un grand merci à mon directeur de thèse Pr. Bernard Namour qui m'a apporté ses compétences scientifiques et qui a su m'accompagner tout en m'accordant une grande liberté de travail. Je n'oublierai jamais ses conseils scientifiques précieux, ses mots pour me remonter le moral pendant les périodes difficiles et surtout son humanité exceptionnelle.

Mes sincères remerciements à ma co-directrice de thèse, Dr. Christelle Clément Duchenne.

Je remercie également Dr. Jean Noel Freund, Directeur de l'unité Inserm U682 à Strasbourg, pour sa grande disponibilité, pour le temps qu'il m'a accordé. Grâce à ses réunions précieuses et son aide j'ai pu assimiler une grande partie de ma thèse.

Je présente également mes sincères remerciements aux Pr. Jean Michel Vignaud et Dr. Guillaume Gauchotte du département d'anatomie-pathologique de l'hôpital central de Nancy, pour leur grande disponibilité et pour m'avoir accueillie dans leur laboratoire et m'avoir initiée à l'Immunohistochimie.

Mes sincères remerciements au Pr. Jean Claude Mazière, professeur de biochimie à l'Hôpital Sud d'Amiens, pour avoir accepté la lourde charge de juger mes travaux

Je tiens aussi à remercier profondément Mr. Abalo Chango, enseignant chercheur à l'Institut Polytechnique LaSalle Beauvais qui a accepté de participer au jury de cette thèse en tant qu'examinateur. Je le remercie également de m'avoir raccordé l'opportunité d'effectuer des enseignements à l'Institut La Salle

A tous les techniciens de l'unité, Pierre, Florence, Déborah et Sophie, un IMMENSE MERCI.

Aux ingénieurs, Jean Marc et Céline, merci pour les discussions enrichissantes ainsi que votre disponibilité et votre sympathie tout au long de ma thèse.

*Aux **Dr. Carole Arnold** et **Shyue Fang HSU-BATTAGLIA** pour les réunions hebdomadaires et pour les conseils bénéfiques.*

*Je n'oublie pas de remercier les doctorants de l'unité, **Hélène, Soufiane, Sonia, Nicolas et Ma'atem** qui étaient toujours là pour moi.*

*Sincèrement, je remercie profondément mes amies **Rasha, Rose et Hassan** mes co-patriotes et doctorants dans l'unité en même temps que moi, pour les moments inoubliables que j'ai vécus avec eux à Nancy.*

*Un immense MERCI, à ma fidèle amie **Sarah**, qui était toujours là pour moi et qui me remontait le moral quand ça n'allait pas. Tu m'as facilité la vie loin de ma famille et de mon pays.*

*Je tiens aussi à remercier chaleureusement **Shabnam Pooya** qui était toujours à côté de moi dans les moments durs même après son départ aux Etats Unis. Je regrette ton absence.*

*Une petite pensée à **Ferechteh** pour les moments inoubliables que nous avons passés ensemble, pour sa bonne humeur, son sourire permanent, et sa tendresse maternelle.*

*Mes vifs remerciements vont à mon mari et mon ami d'adolescence **Khodor**, qui était toujours présent à tous les moments pour m'aider, me soutenir et m'encourager. Je le remercie pour sa compréhension, son écoute, et sa bonne humeur permanente.*

*Enfin, je voudrais dédier ce travail à, **mes parents, mes sœurs et ma belle famille**. Une spéciale dédicace va surtout à **mon père** à qui je suis complètement reconnaissante; et à ma mère qui m'a soutenue tout au long de ma thèse, sans eux je ne serais jamais arrivée à ce niveau en espérant qu'ils resteront toujours fiers de moi.*

SOMMAIRE :

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX.....	4
ABREVIATIONS.....	6
CONTEXTE BIBLIOGRAPHIQUE.....	8
Pré-introduction : pourquoi explorer CARM1 et PRMT1 dans le cancer du poumon ?.....	9
A- L'arbre respiratoire.....	13
1- Organisation générale	13
2- Epithélium alvéolaire.....	13
2-1- Pneumocyte de type I.....	14
2-2- Pneumocyte de type II.....	14
2-3- Le système surfactant du poumon.....	15
B- Cancer du poumon : selon OMS.....	17
1- Définition	17
2- Epidémiologie.....	17
3- Etiologie.....	19
4- Pronostic.....	20
5- Classification des tumeurs de poumon.....	20
5-1- L'adénocarcinome bronchique.....	21
6- Diagnostic.....	22
7- Traitement	23
C- Les modifications épigénétiques	24
1- Structure de la chromatine.....	24
2- Généralités	25
3- Les modifications post-traductionnelles des queues des histones.....	27
3-1- L'acétylation des histones	29
3-2- La méthylation des histones	29
3-3- La méthylation des lysines	30
3-4- La méthylation des arginines.....	30

4- Rôle principaux des PRMTs.....	33
4-1- PRMT1.....	33
4-2- CARM1 (PRMT4).....	34
4-2-1- Quelques généralités	34
4-2-2- CARM1 est un co-activateur transcriptionnel	35
4-2-3- Cibles de CARM1.....	36
4-2-4- Activité enzymatique de CARM1.....	36
4-2-5- Un double rôle pour CARM1 dans la prolifération et la différenciation	36
4-2-6- CARM1 et pluripotence	37
4-2-7- CARM1 et poumon.....	37
4-2-8- CARM1 et P53.....	37
4-3 Cross talk entre CARM1 et PRMT1 et acétylation des histones.....	38
5- Donneurs de méthyle, méthylation d'ADN et métabolisme des mono-carbones.....	39
5-1- La méthylation d'ADN.....	40
5-2- Les DNA méthyltransférases	42
5-2-1- DNMT1.....	42
5-2-2- DNMT3.....	43
5-3 Comment la méthylation de l'ADN inhibe la transcription ?.....	44
5-4 Méthylation de l'ADN et cancérogenèse.....	46
5-5 Méthylation de l'ADN et cancer du poumon.....	48
5-6 Déméthylation de l'ADN.....	48
5-7 Cross talk entre les modifications des histones et la méthylation de l'ADN.....	50
6- Facteurs du risque du cancer du poumon et modifications épigénétiques.....	51
D- Gènes de pluripotence	56
1- Les cellules souches pluripotentes.....	56
2- Formation de l'embryon.....	59
3- Gènes de pluripotence.....	60
2-1- SOX2 (Sex determining Region Y-Box2).....	60
2-1- NANOG et OCT-4.....	62

OBJECTIFS.....	64
ETUDES EXPERIMENTALES.....	65
<u>Partie I</u> : L'invalidation de CARM1 ou PRMT1 induit une réduction de la prolifération des lignées cellulaires de cancer du poumon A549 et H1299.....	66
<u>Partie II</u>: La phosphorylation de CARM1 humain sur la sérine 228 inhibe son interaction avec PRMT1.....	75
CONCLUSION/ DISCUSSION/ PERSPECTIVES.....	84
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	93
FICHES TECHNIQUES.....	114
LISTE DES COMMUNICATIONS ET DES PUBLICATIONS.....	164
RESUME/SUMMARY.....	166

Liste des figures et des tableaux :

Contexte bibliographique :

<u>Figure 1:</u> Représentation de l'arbre respiratoire.....	13
<u>Figure 2:</u> Alvéole pulmonaire.....	15
<u>Figure 3:</u> Synthèse du surfactant.....	16
<u>Figure 4:</u> Barrière air-sang alvéolaire.....	17
<u>Figure 5:</u> Les cancers les plus fréquents dans le monde en 2005.....	18
<u>Figure 6:</u> Taux d'incidence et de mortalité issues du cancer de poumon par rapport aux autres cancers en 2005.....	18
<u>Figure 7:</u> Macroscopie de la tumeur pulmonaire.....	21
<u>Figure 8:</u> Structure de la chromatine.....	25
<u>Figure 9:</u> Les mécanismes épigénétiques chez les eucaryotes.....	26
<u>Figure 10 :</u> Représentation des histones.....	27
<u>Figure 11:</u> Le nucléosome.....	28
<u>Figure 12:</u> La famille PRMT chez l'humain.....	31
<u>Figure 13:</u> Métabolisme des protéines arginines méthyltransférases.....	32
<u>Figure 14:</u> Invalidation de CARM1 chez la souris.....	35
<u>Figure 15:</u> Rôle de CARM1 et PRMT1 dans l'activation transcriptionnel des gènes hormones- récepteurs nucléaires dépendants.....	38
<u>Figure 16:</u> Les donneurs de méthyl à partir du métabolisme des mono-carbones.....	40
<u>Figure 17:</u> La réaction chimique de méthylation de l'ADN.....	41
<u>Figure 18:</u> Représentation schématique des différentes ADN méthyltransférases.....	42
<u>Figure 19:</u> Mécanismes de répression de la transcription.....	45
<u>Figure 20:</u> L'hypométhylation globale et l'hyperméthylation régionale dans la transformation tumorale.....	47
<u>Figure 21:</u> Les mécanismes potentiels de la méthylation de l'ADN.....	49
<u>Figure 22:</u> Cross talk entre les modifications des histones et la méthylation de l'ADN.	51
<u>Figure 23:</u> Régulation transcriptionnelle dans les cellules souches embryonnaires humaines.....	57
<u>Figure 24:</u> Gènes cibles de SOX2, NANOG et OCT-4 dans les cellules souches embryonnaires humains.....	57

Figure 25 : Modèle de circuit de régulation de la pluripotence des cellules souches embryonnaires (ES).....58

Figure 26 : Pluripotence et différenciation des cellules souches.....59

Figure 27: Les étapes précoces du développement d'un embryon.....60

Etude expérimentale :

Partie I :

Tableau 1: Caractéristiques des échantillons provenant de patients atteints de cancer du poumon à non petites cellules.....66

Figure 1. (A, B) CARM1 et PRMT1 sont surexprimés dans les cellules d'adénocarcinome pulmonaire à non petites cellules A549 et H1299 comparativement aux cellules saines NHBE (contrôle). (C, D) La suppression de CARM1 ou PRMT1 diminue d'une manière efficace le taux des ARN et des protéines de CARM1 ou PRMT1.....68

Figure 2. L'inactivation de CARM1 ou PRMT1 réduit la prolifération cellulaire in vitro ainsi que la croissance dépendant de l'ancrage sur l'agar..... 70

Figure 3. L'inactivation de CARM1 ou PRMT1 induit une augmentation de l'expression des cytokératines dans les cellules A549 et une diminution de l'expression de NMBR dans les cellules A549 et H1299.....72

Figure 4. CARM1 et PRMT1 présentent un marquage significativement plus intense dans le tissu tumoral que dans le tissu sain apparié provenant du même malade et l'inactivation de CARM1 ou PRMT1 agit en synergie avec le Pemetrexed, le Paclitaxel et le Carboplatine dans les cellules A549 en inhibant la croissance cellulaire et avec le Pemetrexed et le Paclitaxel seulement dans les cellules H1299.....74

Partie II :

Figure 1. Analyse de l'expression de CARM1, PRMT1, SOX2 et NANOG dans les cellules A549 et H1299.....76

Figure 1 bis. CARM1 est active sur les promoteurs de SOX2 et de NANOG dans les cellules A549 mais pas dans les cellules H1299.....78

Figure 2. CARM1 et PRMT1 sont co-localisées dans les cellules A549 mais pas dans les cellules H1299 et CARM1 est moins phosphorylée dans les cellules A549 que dans les cellules H1299.....80

Figure 3. MAP2K3 est une kinase candidate pour la phosphorylation de CARM1 sur la ser 228 et la phosphorylation de CARM1 l'empêche la formation du complexe CARM1-PRMT1. Fig3A. Seul PD184352 qui inhibe MAP2K3 inhibe la phosphorylation de CARM1 sur Ser228.....82

Abréviations:

AT1/AT2 : Alveolar cells type 1 ou alveolar cells type 2

REL: Réticulum endoplasmique lisse

REG: Réticulum endoplasmique granuleux

KRAS: Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog

EGFR: Epidermal growth factor receptor

CBNPC: Cancers bronchiques à non petites cellules

ADN: Acide désoxyribonucléique

ARN: Acide ribonucléique

HAT: Histone acétyltransférases

HDAC: Histone déacétyltransférases

HKMT: Histone lysine méthyltransférases

PRMT: Protéine arginine méthyltransférases

LSD1 : Lysine déméthylase

a DMA : Asymétrique diméthylarginine

sDMA : Symétrique diméthylarginine

JMJD6 : Jumonji Domain Containing 6

CARM1 : Coactivator-associated arginine methyltransferase 1

PADI4 : Peptidyl arginine deiminase 4

GAR motifs : Glycine arginine rich

PGM : Proline-glycine-méthionine

GRIP1: Glutamate receptor interacting protein 1

SOX2: SRY-related HMG-box gene 2

OCT4: Octamer-binding transcription factor 4

ICM: Inner cell mass

AD: Activation domain

DBD: DNA binding domain

NR: Nuclear receptor

HRE: Hormone response element

SAM: S-adenosylmethionine

SAH: S-adenosylhomocysteine

DNMT: DNA méthyltransférases

MDBP: Méthyl CpG binding protein

FT: Facteurs de transcription
TBP: TATA box binding protein
HP1: Heterochromatin Protein 1
ESC: Embryonic stem cells
SRR: Sox-2 regulatory region
PolR2A: ARN polymerase 2
GAPDH: Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
NHBE: Normal Human Bronchial/tracheal Epithelial cells
CKs: Cytokératines
IgG: Immunoglobuline classe G
NMBR: Neuromedin B receptor
RT-qPCR: Reverse transcription quantitative polymerase chain reaction
PLA: Proximity Ligation Assay
MLK3: Mixed lineage kinase-3
CAMK1: Calcium/calmodulin-dependent protein kinase type 1
MAP2K3: Mitogen-activated protein kinase kinase 3
DMSO : Dimethyl sulfoxide
SDS-PAGE : Sodium dodecyl sulfate- Polyacrylamide gel electrophoresis
AMPc : Adénosine monophosphate cyclique
ER alpha : Estrogen receptor alpha
Tyr : Tyrosine
Ser : Sérine
Asn : Asparagine
Asp: Acide aspartique
R: Arginine
K: Lysine

CONTEXTE BIBLIOGRAPHIQUE

Pré-introduction : Pourquoi explorer CARM1 et PRMT1 dans le cancer du poumon ?

Les modifications épigénétiques sont des modifications héritables qui n'affectent pas la séquence d'ADN. Les modifications épigénétiques les plus étudiées sont, la méthylation de l'ADN et les modifications des histones. L'ensemble de ces 2 modifications constitue ce qu'on appelle le code épigénétique. Le code épigénétique change d'une cellule à l'autre ou d'un tissu à l'autre, et est influencé par les conditions environnementales.

Le cancer du poumon est la première cause de mort par cancer dans le monde entier. Le nombre des cas continue à augmenter chaque jour.

Actuellement, le cancer du poumon touche les femmes de moins de 50 ans à une fréquence plus élevée que les hommes, même si ces femmes ne sont pas des « fumeuses ». Les raisons de cette augmentation ne sont pas très connues. Il existe des facteurs appelés facteurs étiologiques comme le tabagisme passif, l'exposition à l'amiante, au radon et aux métaux lourds. En plus, certains facteurs génétiques (gènes qui participent aux mécanismes de carcinogenèse, de contrôle de la croissance cellulaire, et de la réparation d'ADN), et les hormones comme l'estrogène (chez les femmes) peuvent contribuer au développement de ce type de cancer. Ces facteurs seront discutés dans une partie à part.

Le cancer du poumon a un mauvais pronostic dû aux difficultés d'établir un diagnostic à un stade précoce de la maladie. L'identification des marqueurs génétiques et épigénétiques devient un outil important pour l'oncologie moléculaire et le traitement personnalisé.

Des modifications épigénétiques aberrantes, comme la méthylation d'ADN, les modifications des histones ainsi que la dérégulation des microRNAs, ont été détectés dans le cancer du poumon, dans les stades précoces et tardifs de la maladie. Puisque les modifications épigénétiques sont réversibles, leur correction constitue un élément prometteur dans la thérapie du cancer.

Une des modifications épigénétiques les plus observées et les plus étudiées dans les cellules tumorales, est la méthylation aberrante des îlots CpG de l'ADN. L'hypométhylation globale des îlots CpG est un marqueur dans divers types de cancers, y compris le cancer du poumon.

Généralement, la déméthylation globale s'effectue pendant l'initiation et la progression de la carcinogenèse. L'hypométhylation des « LINE-1 » induit une instabilité du génome et par la suite une progression du cancer. Dans le cancer du poumon, une hypométhylation de LINE-1 a été détectée. Une hypométhylation du promoteur de P73 a été détectée aussi dans les cancers du poumon à cellules squameuses. L'hyperméthylation de l'ADN est surtout liée aux gènes suppresseurs de tumeurs (Brzezińska et al., 2013).

Plusieurs études ont suggéré que l'hyperméthylation de certains gènes était un marqueur prédictif dans le cancer du poumon. Kwon et al 2012 ont décrit l'implication de la méthylation de 6 gènes (CCDC37, CYTL1, CDD1, SLIT2, LMO3 et SERPINB5) dans le cancer du poumon à cellules squameuses. Cortese et al 2008 ont suggéré que la méthylation de MEOX2, FGF3 MDK, RASSF1A, P16 était impliquée dans le cancer du poumon non à petites cellules.

L'examen de l'hyperméthylation des promoteurs de RASSF1A chez des patients atteints de cancer du poumon à non petites cellules représente une sensibilité de 83.36% et une spécificité de 74% (Brzezińska et al., 2013).

Une relation entre la méthylation de l'ADN et la fumée de tabac a été observée dans plusieurs études. CDKN2A, DAPK1 et APC sont hyperméthylés chez les fumeurs et les non fumeurs. RASSF1A et CCND2 sont hyperméthylés seulement chez les fumeurs.

Dans le cancer du poumon, l'hyperméthylation de l'ADN est souvent associé à des modifications des histones comme la déacétylation de H3 et H4, la perte de H3K4me₂, le gain de H3K9me₃ et H3K27me₂. Une acétylation excessive de H4K3 et H4K8 et une perte de H4K20me₃ a été détectée dans les cancers du poumon à non petites cellules (Brzezińska et al., 2013).

Les modifications des histones sont liées à une dérégulation des HATs et des HDACs. L'attention est actuellement focalisée sur les inhibiteurs des HDACs comme cible thérapeutique dans le cancer du poumon. L'inhibition des HDACs induit une augmentation de l'acétylation et par voie de conséquence une activation des gènes impliqués dans l'apoptose et la différenciation ainsi qu'une activation des gènes suppresseurs de tumeur comme TGFBR2, et DAPK (Brzezińska et al., 2013).

Song et al (2012) ont identifié H3K9ac, H3K9me₃ et H4K16ac comme marqueurs prédictifs dans le cancer du poumon. Barlési et al 2007 ont conclu que les modifications H3K4me₂, H3K9ac et H2AK5Ac permettaient de prédire le pronostic

des tumeurs réséquées chez des patients atteints de cancer du poumon non à petites cellules. Ils suggèrent que l'intérêt de ces modifications est surtout important dans les stades précoces du cancer et qu'elles peuvent faire partie d'un algorithme permettant de sélectionner les patients susceptibles de bénéficier d'un traitement associant chimiothérapie et molécules interférant avec les modifications des histones. Les modifications des histones pourraient constituer des marqueurs prédictifs des cancers en général. Seligson et al 2009 ont décrit que les profils de modifications globales des histones permettent de prédire le risque de récurrence des cancers de la prostate. Certaines modifications changent en fonction de la progression de la maladie. Par exemple, le niveau de H4K20me3 diminue avec la progression de la maladie (Chervona et Costa 2012).

Alors que la méthylation de l'ADN et les modifications des histones au niveau de la lysine sont largement étudiées dans le domaine du cancer, les modifications des arginines sont peu documentées. Les arginines des histones sont méthylées par les Protein Arginines MethylTransférases (PRMT). CARM1 (PRMT4) est connue comme coactivateur transcriptionnel des récepteurs nucléaires et interagit avec une autre PRMT, PRMT1. Elle joue un rôle important dans la différenciation de certains types cellulaires mais semble aussi impliquée dans la prolifération tumorale. L'expression de CARM1 est hétérogène dans les cancers et son rôle est tissu et contexte dépendant. (Al Dhaheri et al., 2011). D'autre part, la méthylation des arginines est nécessaire au maintien de la pluripotence et à l'inhibition de la différenciation dans les cellules souches embryonnaires et dans l'embryon de souris (Torres padilla et al., 2007).

CARM1 est impliquée dans le développement pulmonaire. Les souris CARM1^{-/-} sont des souris de petite taille et meurent 20 minutes après la naissance par insuffisance respiratoire ce qui montre que CARM1 a un rôle vital dans le développement du poumon. Chez les souris CARM1^{-/-}, les pneumocytes AT2 ne se différencient plus en pneumocytes AT1 ce qui cause une accumulation de surfactant et une hyperprolifération des cellules AT2. Donc, au cours du développement pulmonaire, CARM1 est indispensable pour inhiber la prolifération et induire la différenciation (O'Brien et al., 2010).

L'expression de CARM1 a été étudiée dans divers types de cancers, le cancer du sein, de la prostate, du colon, et du cerveau, mais son expression dans les cancers

du poumon n'a pas été étudiée malgré son rôle important et vital au cours du développement pulmonaire. Dans ce travail nous avons exploré le rôle de CARM1 et PRMT1 dans le cancer du poumon.

A- L'arbre respiratoire :

1- Organisation générale :

L'arbre respiratoire (figure 1) se divise en deux parties, la partie aérienne extra pulmonaire composée des fosses nasales, naso-pharynx, larynx, trachée et début des bronches souches et la partie intra pulmonaire composée des bronches souches, des extensions bronchiques, des bronchioles et des alvéoles.

La partie aérienne extra-pulmonaire est tapissée par un épithélium pseudo-stratifié cylindrique cilié de type respiratoire mêlé à quelques cellules muco-sécrétantes au niveau des bronches (la muqueuse bronchique). La muqueuse bronchique contient aussi quelques cellules neuroendocriniennes porteuses de granules neuro-sécrétoires.

Les parois alvéolaires sont constituées de plusieurs éléments; l'endothélium capillaire, la membrane basale, le tissu conjonctif et l'épithélium alvéolaire.

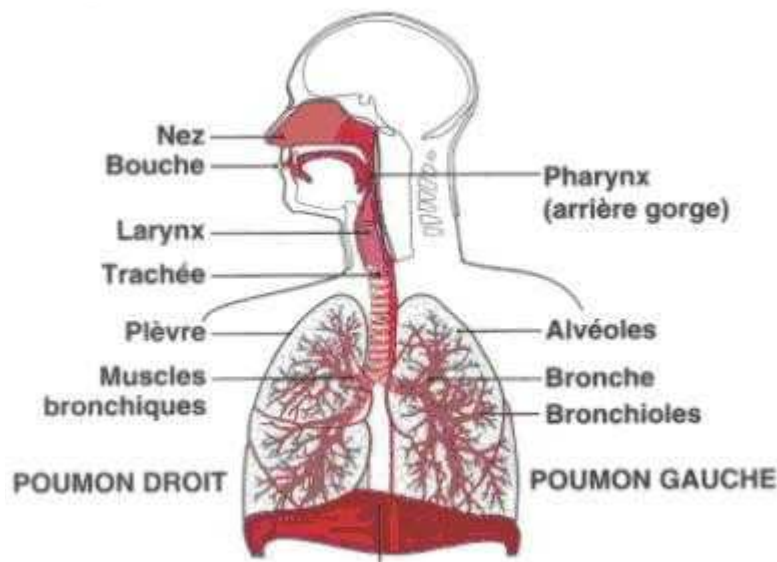


Figure 1: Représentation de l'arbre respiratoire

2- L'épithélium alvéolaire :

L'épithélium alvéolaire est formé d'une couche continue de cellules, de deux principaux types : les pneumocytes de type I (AT I ou pneumocytes membraneux ou cellules de Clara), aplatis, tapissant 95% de la surface alvéolaire et les pneumocytes de type II (AT II) responsables de la synthèse de surfactant. Les cellules progénitrices pulmonaires se différencient au cours du développement de l'arbre distal sous l'influence de différentes hormones et facteurs de transcription, en cellules de Clara ou en cellules AT II.

2-1- Pneumocyte de type I : (figure 2)

Les pneumocytes membraneux ou de type I possèdent de nombreux prolongements très fins recouvrant la majorité (90%) des alvéoles. Ces prolongements contiennent des microvésicules de transfert ainsi que de nombreux replis indiquant une cellule adaptée aux échanges. Les AT I bordent la barrière air-sang, et sont strictement jointifs (tight junctions) donc imperméables aux échanges hydriques. Ils coordonnent les échanges gazeux dans les capillaires distaux et ne se divisent pas. Les AT II, qui recouvrent 5 % de la surface alvéolaire (O'Brien et al., 2010), se différencient en AT I. Ainsi le renouvellement des AT I est-il assuré par les nombreux AT II enchassés dans leurs prolongements cytoplasmiques. La desquamation des AT 1, en cas d'agression, rend hasardeux le remplacement de l'épithélium.

2-2- Pneumocyte de type II : (figure 2)

Les pneumocytes granuleux ou de type II ne possèdent pas de prolongement cytoplasmique. Ils sont nombreux puisqu'ils représentent 90% des cellules de l'épithélium alvéolaire mais recouvrent uniquement 5% de la surface alvéolaire. Ils subissent la mitose. Les pneumocytes de type II reposent par une large base d'implantation sur la lame basale. Ils sont véritablement enchâssés dans les voiles cytoplasmiques des pneumocytes de type I, et ne dépassent que de très peu le niveau de la surface épithéliale. Ils sont riches en organites de synthèse (REL, REG, appareil de Golgi, mitochondries...).

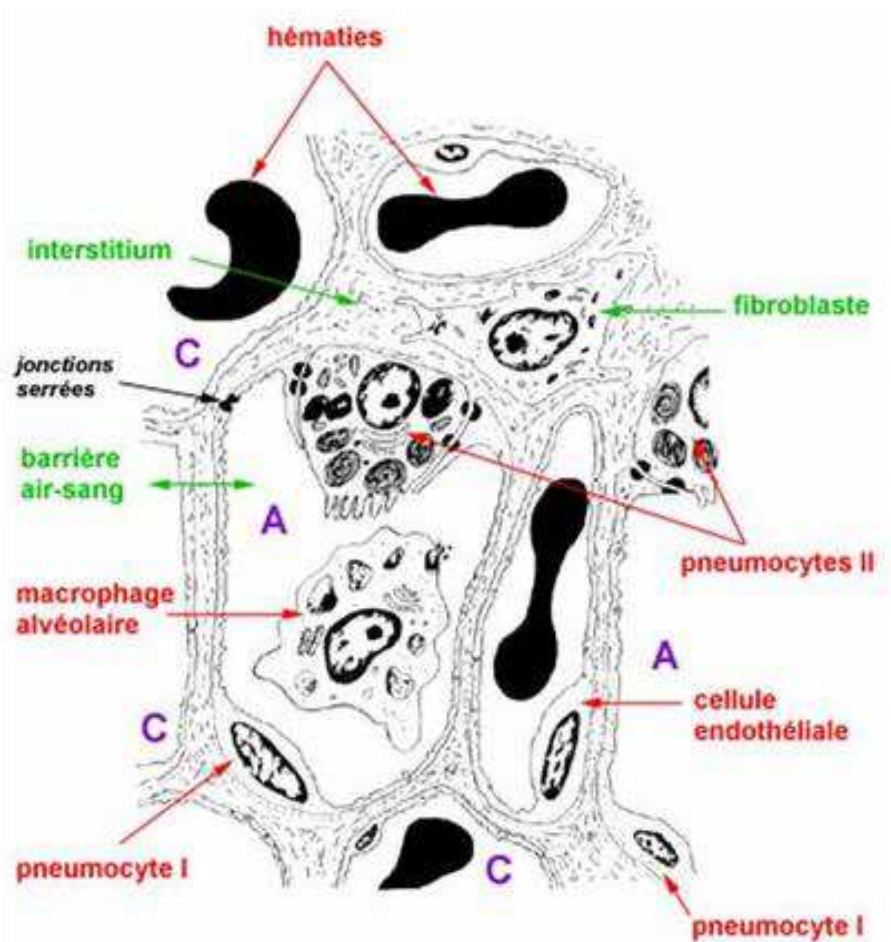


Figure 2 : Alvéole pulmonaire. Présentation des pneumocytes de type I et II.

2-3 Le système surfactant du poumon : (figure 3)

Les substances actives de surface garantissent un collapsus alvéolaire limité lors de la phase expiratoire et une expansion correcte des alvéoles au cours de l'inspiration.

La capacité réactionnelle de ce système est d'autant plus importante que toutes les structures de l'arbre respiratoire, tant bronchiques qu'alvéolaires, sont sans cesse exposées aux influences de multiples facteurs exogènes transportés dans l'air. Le substrat morphologique de ces agents actifs de surface est encore appelé 'surfactant' (de 'surface active agent'). Les cellules échangent leur surfactant au niveau des pores de Kohn.

Le surfactant bouge : par sa structure bipolaire cette substance possède d'importantes propriétés tensioactives de surface ; il se contracte ou s'étale en fonction de l'arrivée d'air, ce qui permet de diminuer la tension nécessaire à l'ouverture des alvéoles. Dans le poumon adulte, l'augmentation du volume respiratoire minute s'accompagne d'une augmentation de la production de surfactant alvéolaire.

Le surfactant possède deux phases : l'épiphase, la partie superficielle du surfactant en contact avec l'air, et l'hypophase, la partie profonde du surfactant en contact avec les cellules. Près de 85% des précurseurs du surfactant sont réutilisés.

La quantité totale de surfactant dans le poumon est très faible : 3% environ de la barrière air-sang est composée de surfactant qui occupe une couche de 500Å d'épaisseur. Il y a près de 50 mm³ de surfactant par m² de surface alvéolaire.

La biosynthèse du surfactant a été étudiée sur du matériel de lavage broncho-alvéolaire. Le surfactant n'est pas une substance chimique pure mais un mélange (une émulsion) de lipides (90%), notamment de phospholipides, de protéines (10%) et d'hydrates de carbone. La lécithine entre pour 65% dans la constitution des lipides pulmonaires (phosphatidylcholine).

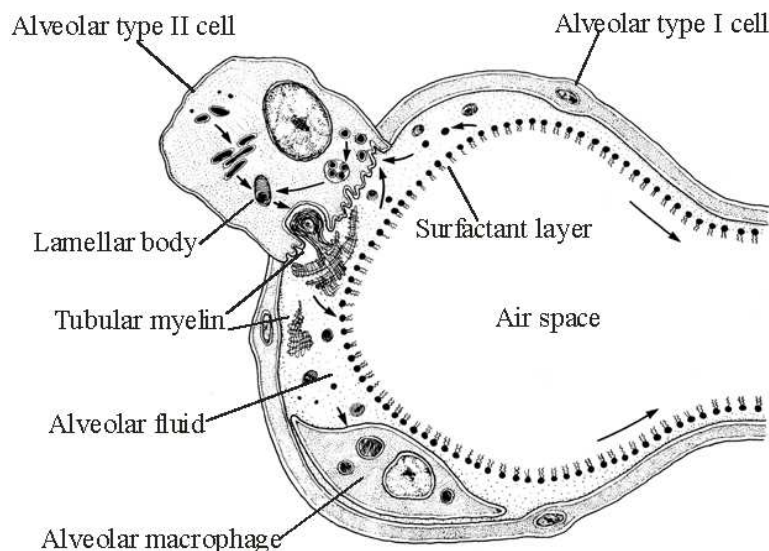


Figure 3 : Synthèse du surfactant. Les précurseurs du surfactant sont apportés aux cellules épithéliales par l'intermédiaire du système vasculaire par diffusion à travers l'endothélium capillaire. Après un passage par le complexe golgien, la synthèse a lieu, par étapes successives, dans le réticulum endoplasmique du pneumocyte de type II. Le surfactant est produit par les corps lamellaires osmiophiles et est excrété dans la lumière alvéolaire sur le mode mérocrine.

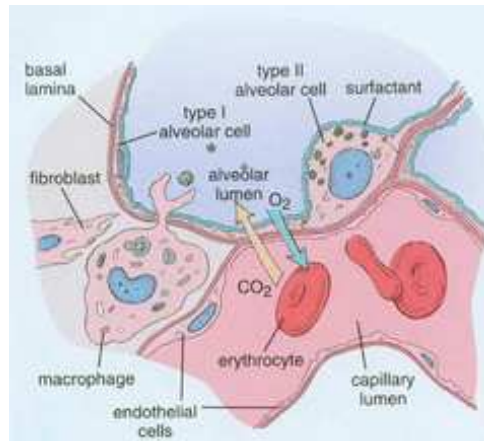


Figure 4 : Barrière air-sang alvéolaire. Les alvéoles sont tapissées par une couche continue de pneumocytes de type II. La barrière des échanges gazeux est constituée de la lumière alvéolaire, de pneumocytes membraneux, des deux membranes basales épithéliale et capillaire fusionnées, de l'endothélium et de la lumière vasculaire.

B- Cancer du poumon : selon l'OMS

1- Définition :

Le cancer du poumon, appelé aussi cancer bronchique, est une des maladies des cellules des bronches ou, plus rarement, des cellules qui tapissent les alvéoles pulmonaires. Il se développe à partir d'une cellule initialement normale qui se transforme, sous l'effet d'agressions comme le tabac, le radon, l'amiante, les rayonnements, les produits chimiques et les virus, et se multiplie de façon anarchique.

2- Epidémiologie :

Avec plus de 1,1 millions de décès par an dans le monde, le cancer du poumon est la première cause de décès par cancer en France et dans le monde. Chez la femme, il est en progression constante : son incidence a triplé ces 20 dernières années, vue l'augmentation du nombre de femmes qui fument. Le tabac est de loin le premier facteur de risque de cette pathologie. Une décroissance de l'incidence chez l'homme a été observée. En 2010, le nombre de nouveaux cas estimés de cancer du poumon est de 37 000 (27 000 hommes et 10 000 femmes), avec un taux d'incidence standardisé dans le monde de 51,9 pour 100 000 hommes et 17,8 pour 100 000 femmes. Le nombre de décès par cancer du poumon estimé en 2010 est égal à 28 700 (21 000 hommes et 7 700 femmes) et celui estimé en 2012 est égal à 32000. Le taux de

mortalité (standardisée monde) estimé en 2010 est égal à 38,6 pour 100 000 hommes et 12,1 pour 100 000 femmes.

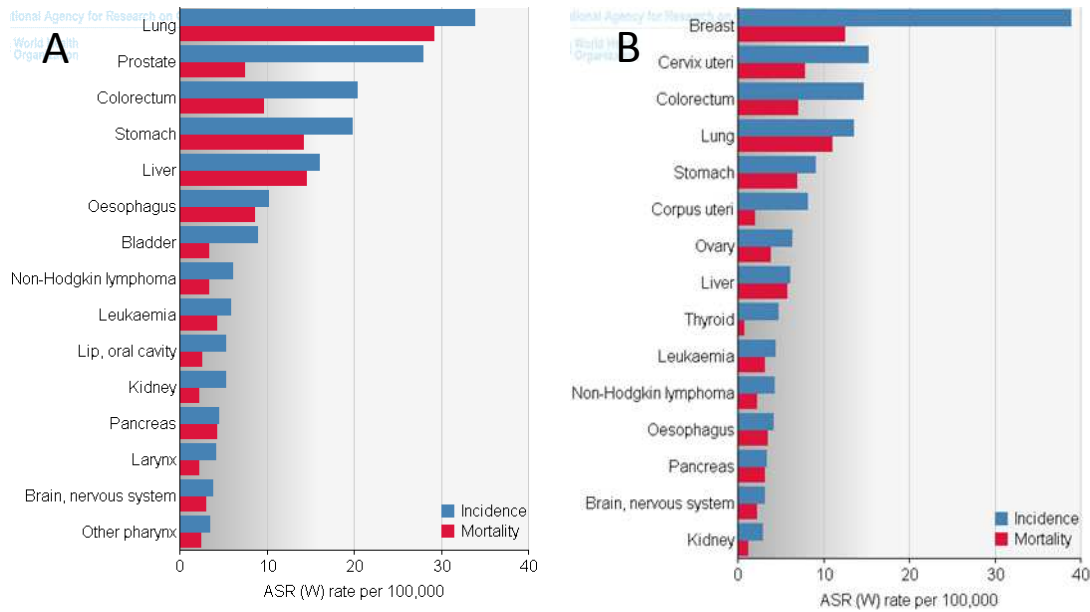


Figure 5 : Les cancers les plus fréquents dans le monde en 2005 : A: Homme ; B: Femme (selon l’OMS)

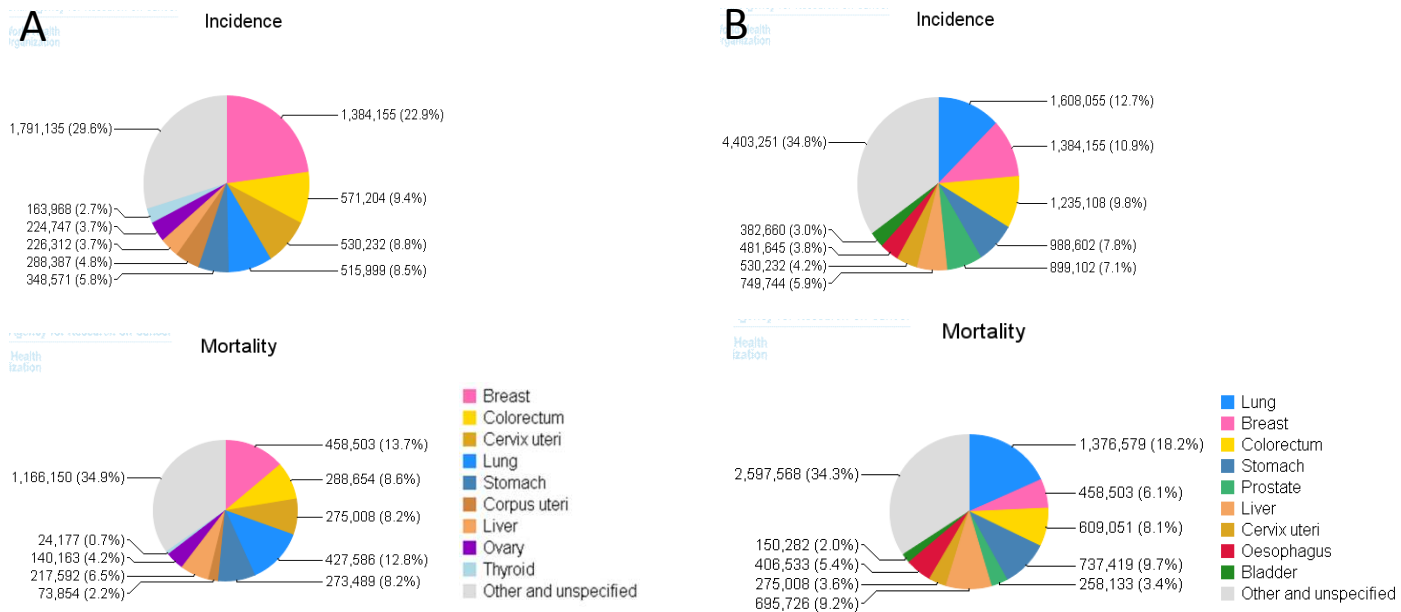


Figure 6: Taux d'incidence et de mortalité issues du cancer de poumon par rapport aux autres cancers en 2005 : A: Homme ; B: Femme (selon l’OMS)

3- Etiologie :

Si le cancer du poumon peut avoir différentes origines, le tabagisme reste le principal responsable.

- Tabac : L'exposition à la fumée de tabac est responsable d'environ 85 % des cancers du poumon. Ce risque concerne non seulement les fumeurs, mais aussi leur entourage proche (tabagisme passif). L'usage régulier de cannabis est également un facteur de risque. La fumée de Cannabis contient quatre fois plus de goudrons que celle du tabac et renferme davantage de cancérigènes. L'arrêt du tabac diminue significativement le risque d'avoir un cancer du poumon contrairement à la réduction de la consommation. La durée de l'exposition au tabac est quatre fois plus déterminante que la quantité des cigarettes fumées.
- Exposition professionnelle : Les travailleurs exposés, régulièrement et sur le long terme, à des substances cancérigènes telles que l'amiante, le radon, l'arsenic, le nickel, le chrome, les goudrons... présentent un risque accru de développer un cancer du poumon.
- Facteurs environnementaux : Des études sont menées sur un éventuel impact de la pollution atmosphérique sur l'apparition de cancers du poumon. Pour l'heure, aucun rapprochement n'a été observé. L'existence de gènes de « protection » ou de prédisposition au cancer du poumon est également envisagée, mais non démontrée à ce jour.
- Autres évènements impliqués : Différents événements interviennent dans la cancérogénèse pulmonaire, notamment les pertes alléliques (LOH), les instabilités et déséquilibres chromosomiques, les mutations d'oncogènes et gènes suppresseurs de tumeur, les modifications épigénétiques comme l'hyperméthylation de l'ADN ou les modifications des histones et l'expression aberrante de gènes impliqués dans la prolifération cellulaire (Travis 2004). Dans ce cadre, l'oncogène KRAS est muté dans 30% des cas. MYC, Cycline D1 et EGFR sont amplifiés et hyper-exprimés dans 2,5 à 10%, 5% et 6% des CBNPC (cancer bronchique non à petites cellules), respectivement. L'hyper-expression de c-erbB2 (Her-2/neu) ou BCL2 est impliquée dans 25% des cas. Les mutations de BRAF sont présentes dans 2% des adénocarcinomes ne présentant pas de mutations KRAS. Les mutations de l'EGFR sont détectées dans 10% des adénocarcinomes et ce statut mutationnel va influencer la réponse clinique au traitement par les inhibiteurs de la tyrosine kinase. Parmi les adénocarcinomes, 3-4% expriment un transcrite de fusion EML4-ALK. Les gènes suppresseurs de tumeur impliqués dans le

cancer du poumon sont p53, p16, RB et récemment p34. La transcription anormale du gène FHIT est rapportée dans 40% des CBNPC et sa fonction est liée à un signal proapoptotique (Risch et Plass., 2008).

4- Pronostic :

Le pronostic du cancer du poumon est toujours aussi sévère avec un taux de survie à 5 ans de 10 % dans la plupart des pays. La mortalité élevée est due au diagnostic tardif, au dépistage précoce inexistant et à l'échec des thérapeutiques cytotoxiques conventionnelles.

5- Classification des tumeurs de poumons :

Les cancers du poumon se divisent en deux grandes familles, différenciées en fonction de la nature des cellules tumorales.

Les cancers « à petites cellules » représentent 20% des cancers du poumon. Ces cancers sont dits « agressifs » : les cellules malades se multiplient rapidement. Il existe un risque de métastases. Pour définir l'étendue du cancer, différents examens permettent de constater :

- l'étendue du cancer dans les poumons ;
- l'atteinte ou non des ganglions lymphatiques par des cellules cancéreuses ;
- l'atteinte ou non des structures voisines ;
- la présence ou non de métastases en dehors du thorax.

Pour les cancers à petites cellules localisés la chimiothérapie et la radiothérapie sont les traitements de référence. Pour les cancers à petites cellules métastatiques, la chimiothérapie est le principal traitement.

Les cancers « non à petites cellules » représentent 80% des cancers du poumon et regroupent trois grands types de tumeurs :

- L'adénocarcinome bronchique (40%)
- Le carcinome épidermoïde (40%)
- Le carcinome à grandes cellules (20%).

Pour définir l'étendue du cancer, différents examens permettent de constater :

- la taille de la tumeur ;
- l'atteinte ou non des ganglions lymphatiques par des cellules cancéreuses ;
- l'atteinte ou non des structures voisines ;
- la présence ou non de métastases à distance.

Le traitement des cancers « non à petites cellules » varie en fonction de leur stade d'évolution au moment du diagnostic. Mais la chirurgie constitue le traitement de référence des cancers bronchiques non à petites cellules précoces.

5-1 L'adénocarcinome bronchique :

Il s'agit d'une tumeur épithéliale maligne avec différenciation glandulaire ou mucosécrétante, présentant une architecture lépidique, acineuse, papillaire, micropapillaire ou solide. Ces tumeurs peuvent être uniques ou multiples et sont variables en taille. Souvent, il s'agit d'une tumeur localisée en périphérie et naissant à partir des pneumocytes des bronchioles et alvéoles. Macroscopiquement, elle est lobulée ou mal limitée, spiculée, d'aspect gris, blanchâtre avec une cicatrice centrale (voir figure 7)

L'adénocarcinome bronchique représente environ 40% de l'ensemble des CBNPC. Jusqu'à présent, cette forme de cancer bronchique était le plus souvent observée chez les non-fumeurs et les femmes. Aujourd'hui, les fumeurs sont de plus en plus souvent atteints par cette forme de cancer bronchique. Selon les dernières observations épidémiologiques, cette augmentation serait en lien avec une amélioration de leur détection et des habitudes tabagiques en évolution, comme la consommation de cigarettes « light » sur lesquelles les fumeurs « tirent » plus fortement. Ces cigarettes engendrent des lésions situées plutôt en périphérie du poumon, qui ont donc une topographie différente de celles observées jusqu'à présent.



Figure 7 : Macroscopie de la tumeur pulmonaire (Adénocarcinome pulmonaire)

6- Diagnostic :

A ce jour, il n'existe pas de moyens pour dépister précocement les cancers du poumon. L'introduction de nouvelles techniques d'imagerie et de tests biologiques et/ou génétiques pourrait faire évoluer cette situation dans les années à venir.

Le diagnostic du cancer du poumon se réalise en deux étapes :

- Le bilan diagnostique
- Le bilan d'extension

6-1 Le bilan diagnostique s'articule autour d'un examen clinique et d'une imagerie pulmonaire (radiographie, scanner, IRM). Le premier permet de déterminer l'état général du patient et la seconde de repérer une éventuelle tumeur. Les progrès de l'imagerie permettent actuellement une grande précision. La confirmation de la présence d'une tumeur cancéreuse se fait par le biais de prélèvements (biopsie) réalisés au cours d'une fibroscopie bronchique. Les biopsies permettent de prélever un fragment de la tumeur dont l'examen microscopique est indispensable pour affirmer le diagnostic et obtenir des indications sur le type de cancer (cancer « à petites cellules » ou « non à petites cellules »).

D'autres prélèvements et examens peuvent être réalisés si les premiers ne suffisent pas à poser un diagnostic précis.

6-2 Le bilan d'extension permet d'évaluer l'extension du cancer aux organes proches et/ou lointains, afin de déterminer les possibilités chirurgicales éventuelles et les traitements médicaux complémentaires les plus adaptés. Les principaux examens réalisés sont :

- la médiastinoscopie, pour déterminer le stade du cancer et l'atteinte des ganglions médiastinaux ;
- le scanner thoracique, pour repérer la taille et la localisation des anomalies ou nodules, même de très petite taille (inférieure ou égale à 3 millimètres) ;
- l'échographie hépatique, à la recherche de métastases dans le foie ;
- la scintigraphie osseuse, à la recherche de métastases dans les os ;
- l'échographie endo-oesophagienne pour apprécier l'extension du cancer à l'œsophage et aux vaisseaux du cœur ;
- l'angiographie pour vérifier la connexion de la tumeur avec l'aorte et les vaisseaux pulmonaires ;

- un PETscan (scanner + scintigraphie) pour détecter d'éventuels micro-nodules. Cet examen se pratique si une intervention chirurgicale est envisagée.

7- Traitement :

Trois types de traitements sont utilisés pour traiter les cancers du poumon :

- La chirurgie
- La radiothérapie
- Les traitements médicamenteux (chimiothérapie, thérapies ciblées).

Ces traitements peuvent être utilisés seuls ou associés les uns aux autres. Le choix des traitements dépend des caractéristiques du cancer et de son degré d'extension. Ces caractéristiques sont déterminées grâce aux examens du bilan diagnostique, ainsi que l'âge, les antécédents médicaux et chirurgicaux, et l'état de santé global.

Pour les cancers bronchiques non à petites cellules précoces (stades I et II), la chirurgie constitue le traitement de référence. Si la chirurgie n'est pas possible (compte tenu de l'emplacement de la tumeur ou de votre état de santé, par exemple), une radiothérapie pourra être proposée. Le recours à une radiothérapie, en complément du traitement chirurgical, est également discuté en cas d'atteinte de la paroi du poumon ou lorsque le chirurgien n'a pas pu enlever l'intégralité de la tumeur (on parle d'exérèse incomplète). Selon les cas, une chimiothérapie postopératoire peut être proposée. Pour les cancers bronchiques non à petites cellules localement avancés (stade III), la faisabilité d'une chirurgie est toujours évaluée. Si une chirurgie est réalisée, elle peut être complétée par une radiothérapie. Si la chirurgie n'est pas réalisable, le traitement local reposera sur une radiothérapie. Dans tous les cas, une chimiothérapie est faite pour compléter le traitement local.

Pour les cancers bronchiques non à petites cellules présentant des métastases (stade IV), une chimiothérapie et/ou une thérapie ciblée constituent le traitement de référence.

Plusieurs types de médicaments anticancéreux sont utilisés pour traiter les cancers du poumon, les chimiothérapies et thérapies ciblées. La chimiothérapie et les thérapies ciblées n'ont pas le même mode d'action.

Les médicaments de chimiothérapie agissent sur les mécanismes de la division cellulaire, alors que les thérapies ciblées bloquent des mécanismes spécifiques des cellules cancéreuses.

Une chimiothérapie peut comporter un seul médicament (monothérapie) ou plusieurs médicaments (polythérapie). Une association de plusieurs médicaments de

chimiothérapie correspond à ce qu'on appelle un schéma ou un protocole de chimiothérapie.

Le schéma de chimiothérapie le plus utilisé pour traiter un cancer bronchique est à base de platine. Administrés par perfusion intraveineuse, le cisplatine ou le carboplatine sont habituellement associés à l'un des agents chimiothérapeutiques suivants: étoposide (en perfusion intraveineuse (IV) ou en capsules); paclitaxel (IV); docétaxel (IV); gemcitabine (IV); vinorelbine (IV ou en capsules) et pemetrexed (IV).

Les molécules de thérapies ciblées actuellement utilisées sont les suivantes: erlotinib (en comprimés); bévacizumab (en perfusion intraveineuse); gefitinib (en comprimés).

Les médicaments employés, les doses administrées ainsi que le rythme des cures varient d'une personne à l'autre, en fonction des caractéristiques du cancer et de la tolérance au traitement. C'est pourquoi le plan de traitement est déterminé au cas par cas.

C- Les modifications épigénétiques :

1- Structure de la chromatine :

Le génome humain se présente sous la forme d'une double hélice d'ADN dont la taille à l'état déroulé est de deux mètres. La fibre d'ADN est organisée sous forme d'une structure appelée chromatine. Cette chromatine est composée d'ADN associé à des protéines. On distingue deux types des protéines liées à l'ADN : les histones et les protéines chromosomiques non histones. Les histones sont les protéines les plus abondantes de la chromatine. Elles possèdent une masse moléculaire comprise entre 10 et 24 kDa. Elles sont très basiques et riches en résidus lysine et arginine. Les histones sont retrouvées uniquement chez les eucaryotes. Il en existe 5 types qui se répartissent en deux familles : les histones nucléosomiques (H2A, H2B, H3 et H4) qui sont responsable de l'enroulement de l'ADN dans les nucléosomes et les histones H1 qui sont des histones internucléosomiques. Dans le noyau, la chromatine est formée d'une répétition de sous-unités appelés nucléosomes. Le nucléosome est constitué de 146 pb d'ADN enroulées deux fois autour d'un octamère d'histones. Chaque octamère comprend deux exemplaires des histones H2A, H2B, H3 et H4. Deux nucléosomes sont séparés l'un de l'autre par une cinquantaine de paires de bases d'ADN nu et par l'histone internucléosomique H1. Les nucléosomes vont ensuite être assemblés en des structures

de plus en plus complexes pour atteindre le niveau d'organisation maximale : le chromosome (figure 8). Il existe deux types de chromatine : l'euchromatine et l'hétérochromatine. L'euchromatine correspond à la chromatine à l'état relâché et l'hétérochromatine correspond à la chromatine à l'état condensé donc inaccessible aux facteurs de transcription (Vandermeers et al., 2008).

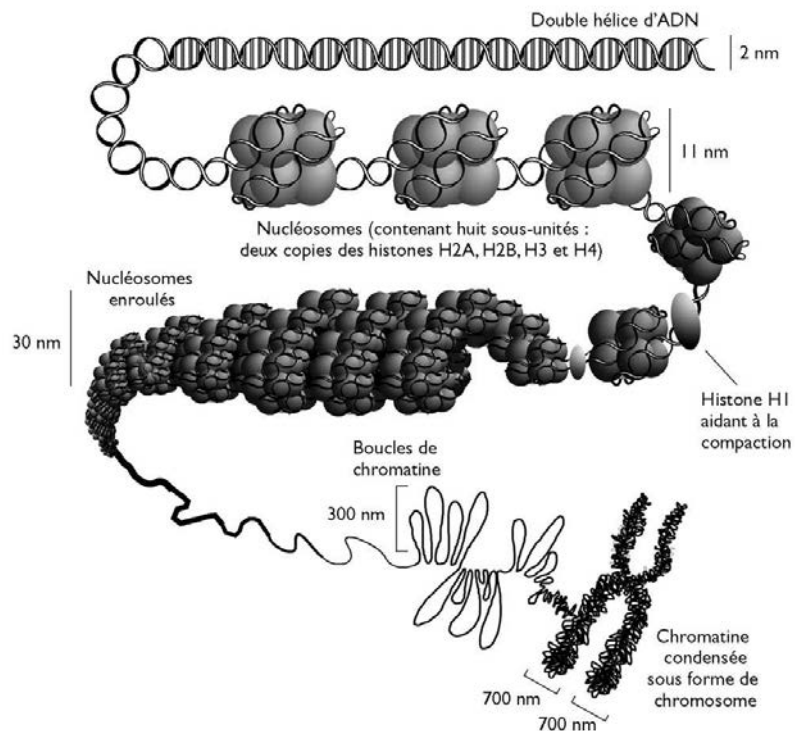


Figure 8 : Structure de la chromatine. Organisation de l'information génétique sous forme de chromatine. (<http://monde.ccdmd.qc.ca/ressource/?id=55483&demande=desc>)

2- Généralités :

Les modifications épigénétiques peuvent être définies comme étant des changements dans l'expression des gènes qui sont réversibles et héréditaires lors de la mitose et/ou de la méiose, et qui ne résultent pas de modifications de la séquence d'ADN (Waterland et al., 2007).

La mémoire épigénétique est établie en trois étapes, la première consiste en des combinaisons transitoires de facteurs de transcription qui initient le profil d'expression spatio-temporel des gènes cibles, la deuxième est une étape de transition dans laquelle les facteurs de transcription disparaissent et la mémoire épigénétique est établie. La dernière étape est l'étape de maintenance pour garder les modifications épigénétiques à

travers les divisions cellulaires successives, cette étape est réalisée par le système polycomb/trithorax.

Les mécanismes épigénétiques les plus étudiés sont notamment la méthylation de l'ADN, les modifications post-traductionnelles des queues des histones et l'interférence à l'ARN (Figure 9). D'autres mécanismes existent comme le système trithorax/polycomb et le système de remodelage de la chromatine.

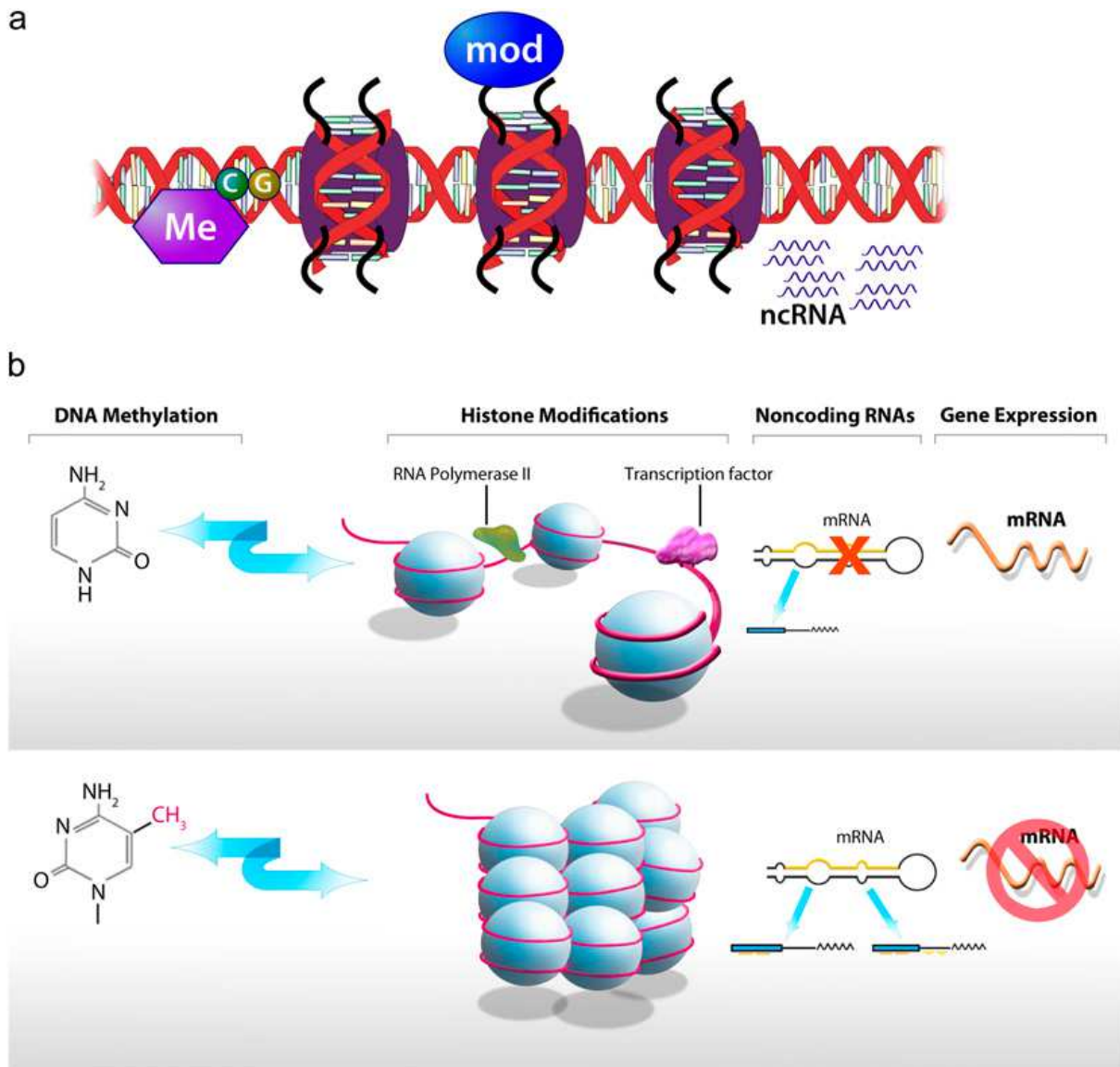


Figure 9 : (a) Les mécanismes épigénétiques chez les eucaryotes. La méthylation d'ADN, les modifications des queues des histones et les ARN non codants. (b) L'effet des modifications épigénétiques sur l'expression des gènes. Les flèches bleues indiquent le cross talk entre la méthylation de l'ADN et les modifications des histones (Yang et Schwartz., 2011).

3- Les modifications post-traductionnelles des queues des histones :

Les histones (H2A, H2B, H3 et H4) partagent une structure similaire (Hadnagy et al., 2008). L'extrémité N-terminale des histones subit plusieurs modifications comme la méthylation, l'acétylation, la phosphorylation, la sumoylation, et l'ubiquitination (Biancotto et al., 2010) (figure 10 et figure 11), ainsi que d'autres modifications encore comme l'ADP ribosylation, la déimination, l'isomérisation de la proline et la propionylation (Swan et Herceg., 2010). Les modifications sur les queues des histones sont des modifications covalentes (Swan et Herceg., 2010) qui donnent lieu au code des histones. Ce code est lu par un ensemble de protéines qui le traduisent en état actif ou répressif (Kouzarides., 2002). L'acétylation des histones est liée à un relâchement de la chromatine alors que la déacétylation est liée à une condensation de la chromatine (Biancotto et al., 2010).

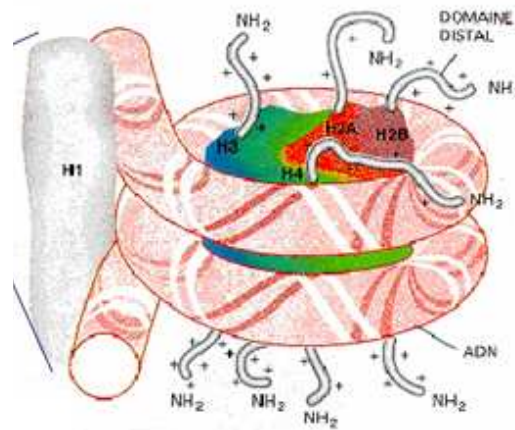


Figure 10 : Représentation des histones

<http://archimede.bibl.ulaval.ca/archimede/fichiers/23265/ch01.html>

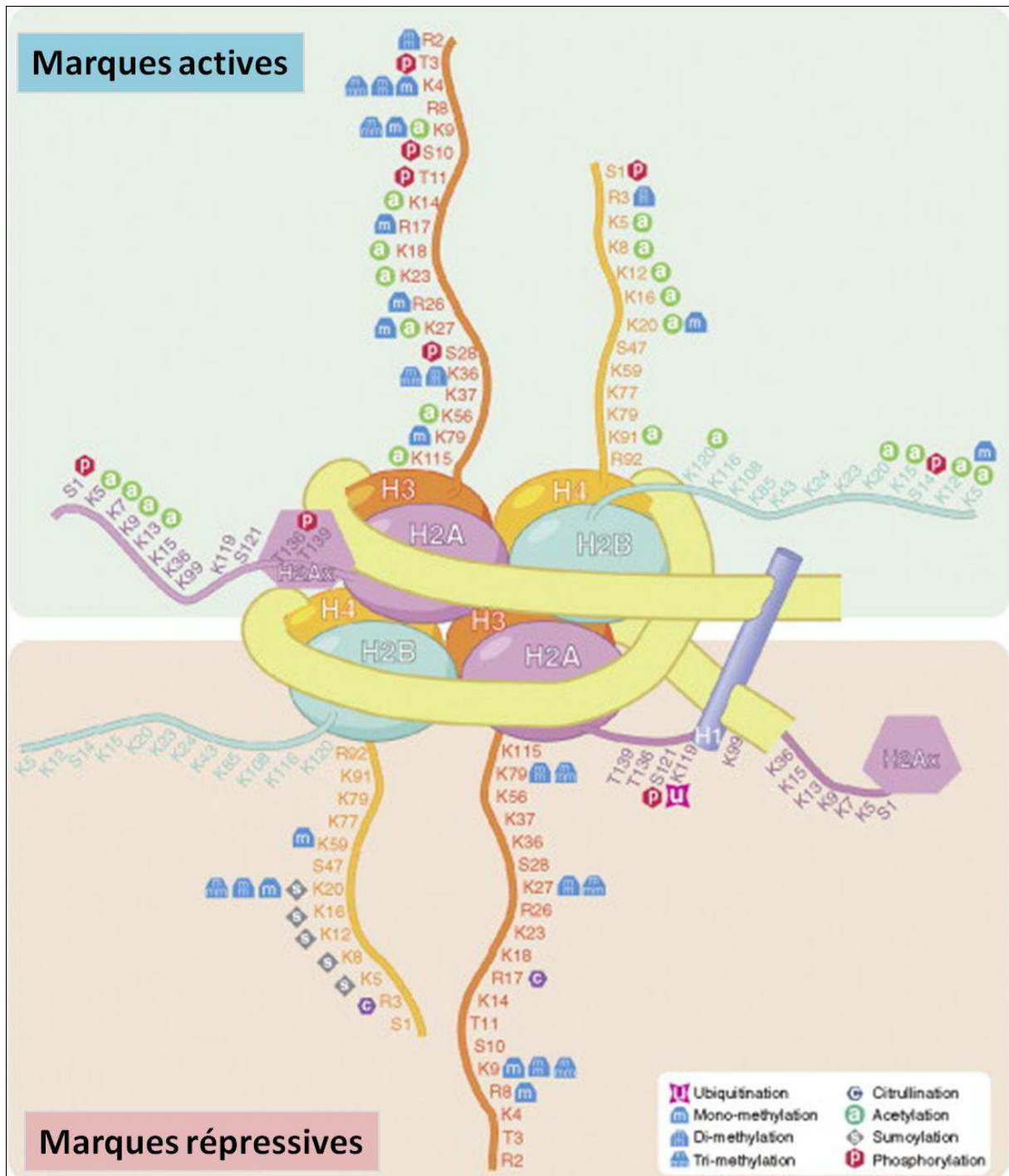


Figure 11: Le nucléosome. L'ADN est enroulé autour d'un octamère à partir des 4 « coeurs » d'histones H2A, H2B, H3 et H4. L'histone H1 effectue la liaison en se liant à l'ADN entre chaque nucléosome. Différents acides aminés constituant les « queues » des histones sont représentés avec leurs différentes modifications covalentes spécifiques. Les marques actives sont indiquées sur le panneau du haut et les marques répressives sur celui du bas. K : lysine, R : arginine, S : sérine, T : thréonine (modifié d'après Sawan et Herceg., 2010).

3-1 L'acétylation des histones :

Dans les histones H3 et H4, l'acétylation concerne les résidus lysine (Minucci et Pelicci., 2006 ; Swan et Herceg., 2010). Elle est contrôlée par deux familles d'enzymes. Les histones acétyltransférases (HATs) utilisent un acétyl coA pour transférer un groupement acétyle sur le groupement amine-epsilon. Cette réaction est réversible grâce à la famille des histones déacétylases (HDACs) (Waterland et al., 2007).

Les résidus lysine des histones sont chargés positivement ce qui leur permet d'interagir avec l'ADN chargé négativement (Luger et Richmond., 1998). L'acétylation des histones permet de neutraliser la charge positive et affaiblit l'interaction entre histones et ADN induisant ainsi un changement de conformation de la chromatine. Ce changement de conformation rend la chromatine plus accessible aux facteurs de transcription. L'hyperacétylation de la chromatine est un signe d'activation de la transcription, alors que l'hypoacétylation mène à la répression de la transcription des gènes (Swan et Herceg., 2010).

Des modifications aberrantes de l'acétylation des histones sont impliquées dans divers maladies y compris le cancer (Yang et Schwartz., 2011). Une augmentation de l'expression des HDACs a été détectée dans le cancer des poumons non à petites cellules chez les patients au stade III et IV (Bowman et al., 2006). Une diminution de H4K16Ac et H4K20me3 et une augmentation de H3K27me3 sont des caractéristiques de la progression du cancer du poumon (Yang et Schwartz., 2011).

Des changements globaux dans les modifications des histones ont été également observés dans le cancer hépatique induit par un déficit en groupements méthyles. Ce cancer présente une perte de H4K20me3, H3K9ac et H4K16ac et une augmentation remarquable de H3K9me3 (Pogribny et al., 2007).

La perte de la marque H4K16Ac serait une marque universelle de la tumorigenèse (Fraga et al., 2005). De plus, cette acétylation déstabilise le nucléosome et serait corrélée à une décondensation de certaines régions de la chromatine, ce qui pourrait réguler l'accès des facteurs de transcription ainsi que le remodelage de la chromatine (Shogren-Knaak et al., 2006).

3-2 La méthylation des histones :

Une des modifications que subissent les queues des histones, notamment l'histone 3 et l'histone 4, est la méthylation sur leurs résidus lysine ou arginine (Lee et Stallcup., 2005). Cette méthylation est réalisée grâce aux enzymes histone lysine méthyle transférases

(HKMTs) qui méthylent les lysines et aux protéines arginine méthyltransférases (PRMTs) qui méthylent les arginines. Ces enzymes permettent de transférer les groupements méthyles de la S-adénosyl méthionine sur les substrats. Une activité anormale de ces enzymes est rencontrée dans diverses maladies y compris dans les cancers (Biancotto et al., 2010).

3-3 La méthylation des lysines :

Les lysines peuvent être mono, di ou tri méthylées. La méthylation des lysines a des conséquences diverses selon la lysine méthylée. Par exemple les méthylations des lysines 9 et 27 de l'histone 3 et de la lysine 20 de l'histone 4 sont impliquées dans la formation de l'hétérochromatine. A l'opposé, les méthylations des lysines 4, 36 et 79 de l'histone 3 sont corrélées avec la formation de l'euchromatine. Un équilibre est nécessaire entre la méthylation de H3K4 (marqueur d'activation) et celle de H3K27 (marqueur de répression) pour maintenir la pluripotence dans les cellules souches (Bernsteinl et al., 2006). Pendant longtemps, la méthylation des lysines a été considérée comme irréversible jusqu'à la découverte de la première lysine déméthylase (LSD1) (Shi et al., 2004).

3-4 La méthylation des arginines :

L'arginine est un acide aminé chargé positivement. Le nitrogène de la chaîne latérale de l'arginine peut être modifié post-traductionnellement par l'addition d'un groupement méthyle, cette réaction est la méthylation des arginines (Bedford et Richard., 2005).

La famille PRMT est une famille conservée parmi les espèces incluant les champignons les plantes et les êtres humains (Kleinshmidt et Bauer., 2008). Le nombre des membres de cette famille est différent selon l'espèce. Cette famille a été découverte il y a plus de 40 ans maintenant dans des extraits nucléaires de thymus. Jusqu'à présent, 11 PRMTs ont été identifiées (figure 12). La majorité d'entre elles présentent une activité méthyltransférase sauf PRMT2, 10 et PRMT11. Les PRMT sont impliquées dans divers processus comme le remodelage de la chromatine, la traduction des protéines, le transport nucléocytosolique, la transcription des gènes, la réparation de l'ADN, et l'épissage des ARNs (Wolf., 2009).

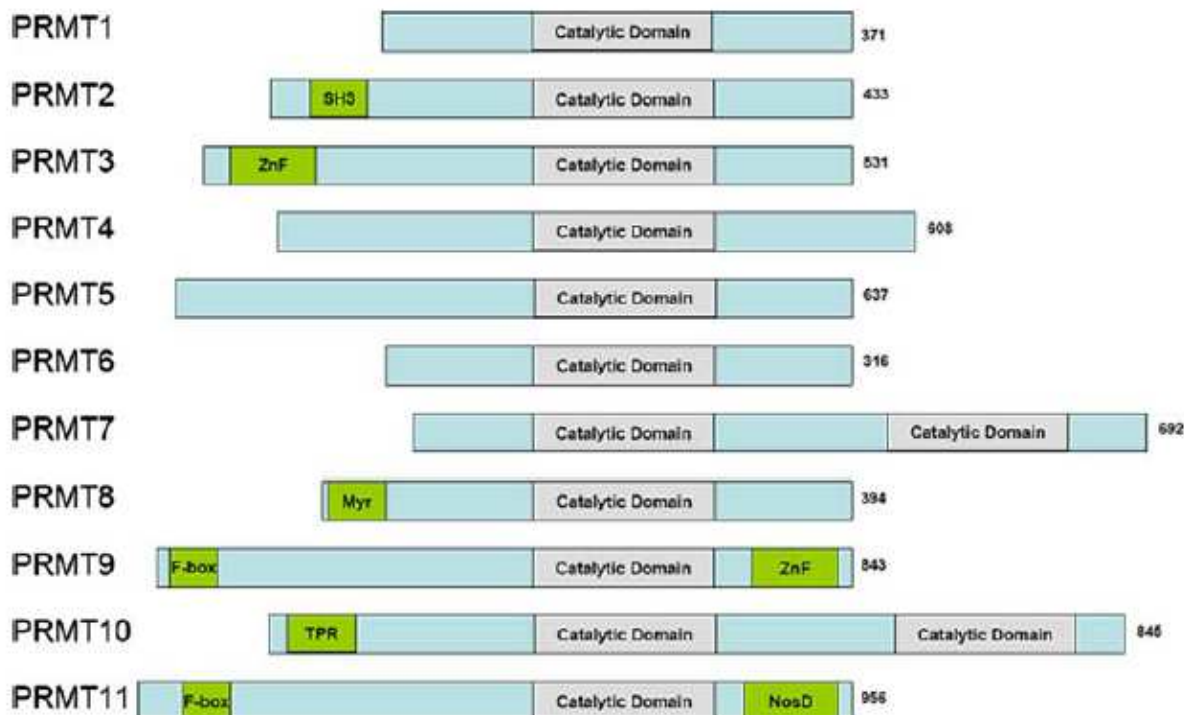


Figure 12: La famille PRMT chez l'humain. Onze membres de la famille PRMTs ont été identifiés, leur taille est différente d'un membre à l'autre. Toutes les PRMTs ont au moins un domaine catalytique conservé (en gris) et des domaines non conservés (vert) :SH3, ZnF (doigt de zinc), Myr (myristoylation) F-Box, TPR (tétratrico peptide) et NosD (protéine accessoire nitrous oxidase) (Wolf., 2009).

La méthylation des arginines peut générer une mono-méthyl arginine (MMA) ou une diméthylarginine (DMA). La diméthyl arginine peut être symétrique (sDMA) ou assymétrique (aDMA). Les PRMTs sont classées en plusieurs types, les PRMTs type I, catalysent la formation de MMA et de aDMA, et les PRMTs type II, catalysent la formation de MMA et sDMA. Les PRMTs type I sont PRMT1, PRMT3, PRMT4 (CARM1), PRMT6 et PRMT8, les PRMTs type II sont PRMT5, PRMT7 et PRMT9.

La fonction des PRMTs est liée à une activation de la transcription, cependant PRMT5 est impliquée dans la répression des gènes cibles de c-myc et la répression du promoteur de la cycline E (Lee et Stallcup., 2005). Les PRMTs peuvent être localisées dans le cytoplasme, dans le noyau ou même dans la membrane cellulaire.

Pendant de longues années la méthylation des arginines était considérée comme une réaction non réversible. Récemment, certaines déméthylases ont été identifiées, notamment JMJD6. Ces résultats montrent que la méthylation des arginines, comme les autres modifications, est une modification réversible (Wolf., 2009).

La déimination est une réaction qui permet de convertir une arginine en citrulline. PADI4 (peptidyl arginine deiminase 4) empêche la méthylation des arginines effectuée par CARM1 sur l'histone 3. PADI4 peut agir sur des résidus arginines non méthylés ou monométhylés mais pas diméthylés. Donc PADI4 a été identifiée comme antagoniste de l'activation de la transcription médiée par la méthylation des arginines par CARM1 (Cuthebert et Kouzarides., 2004) (figure 13).

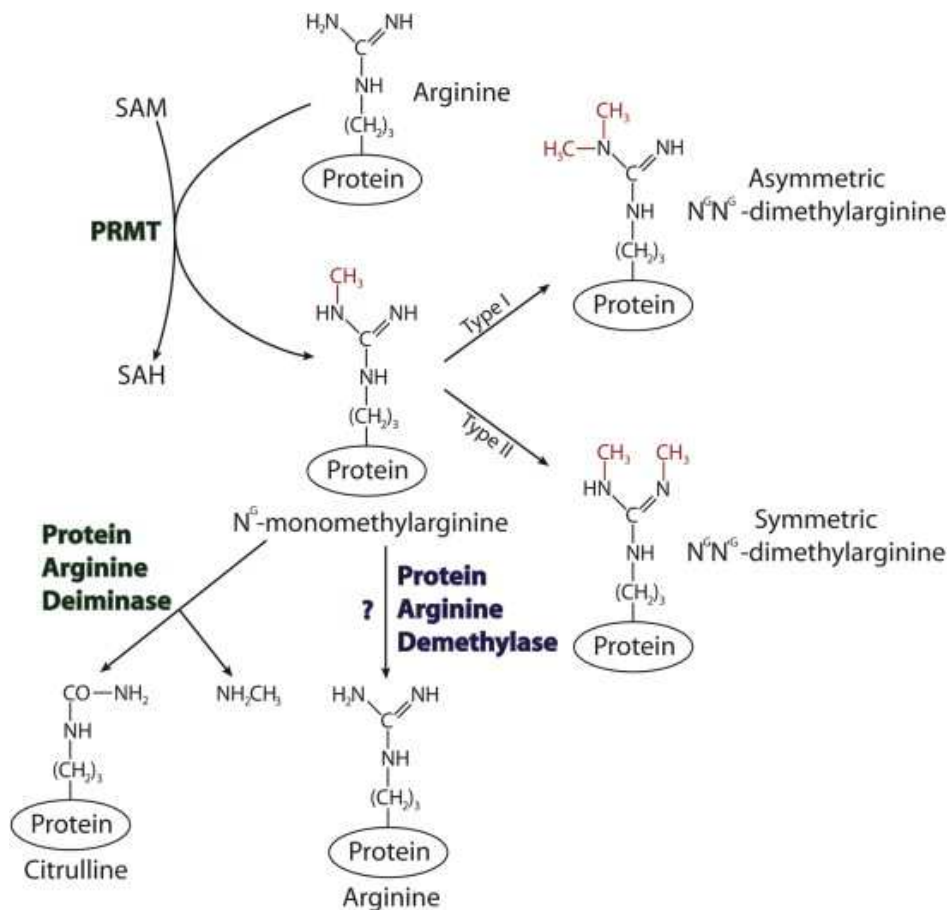


Figure 13: Métabolisme des protéines arginine méthyltransférases. La méthylation des arginines est catalysée par une famille d'enzymes appelée protéines arginine méthyle transférases (PRMT), les protéines N^G-mono-méthylées sont métabolisées par au moins trois réactions : (1) l'addition d'un deuxième groupement méthyle en configuration asymétrique par une PRMT type I, (2) l'addition d'un deuxième groupement méthyle en configuration symétrique par une PRMT type II, (3) la déimination de N^G-mono-méthylarginine en citrulline. (Aletta et Hu., 2008).

4- Rôles principaux des PRMTs :

La régulation de la transcription: La méthylation des arginines affecte des protéines qui sont impliquées dans divers processus de la régulation cellulaire, le transport nucléocytoplasmique, la transduction du signal, l'activation de la transcription. Certaines « DNA binding proteins » nécessitent d'être méthylées pour pouvoir se lier à l'ADN et ensuite recruter d'autres protéines qui activent et recrutent à leur tour l'ARN polymérase II et la machinerie basale de la transcription. L'activateur transcriptionnel P53 recrute P300, CARM1 et PRMT1 sur le promoteur de ses gènes cibles. L'activité de ces enzymes est indispensable pour la fonction de P53.

La transduction du signal : Comme pour la phosphorylation, la méthylation des protéines est impliquée dans les mécanismes de signalisation. La méthylation de certaines protéines affecte leur forme et leur stabilité. Cette méthylation permet d'établir une interaction ou une dissociation intermoléculaire. Par exemple, PRMT1 se fixe sur le domaine cytoplasmique du récepteur de l'interféron α/β . Les cellules qui ne contiennent pas PRMT1 sont plus résistantes à l'inhibition de la croissance par les interférons. PRMT1 recrutée par l'interféron activé méthyle stat 1 (Lee et Stallcup., 2005).

4-1 PRMT1 :

C'est la première PRMT identifiée chez les mammifères (Scott et al., 1998). C'est la PRMT de type I la plus abondante dans la cellule. Elle est présente dans tous les types des cellules (Wolf., 2009). L'activité de PRMT1 dans la cellule représente 85% de l'activité méthyltransférase totale (Lorenzo et Bedford., 2010) et elle a une double localisation, nucléaire et cytoplasmique (Wolf., 2009).

Il existe plusieurs variants de PRMT. Cependant, dans le sein, l'épissage n'est pas le même dans les cellules normales et les cellules cancéreuses. Cet épissage différentiel pourrait constituer un marqueur essentiel dans le diagnostic du cancer du sein. Sept isoformes de PRMT1 existent et présentent une localisation et une expression différentes. Les isoformes 4-7 sont exprimés dans le cœur, muscle, et pancréas. Les isoformes 1-3 sont ubiquitaires, les isoformes 1 et 7 sont localisés dans le noyau, l'isoforme 2 dans le cytosol et les isoformes 3 et 6 dans le noyau et le cytosol. Quarante substrats ont été identifiés pour PRMT1 (Wolf., 2009).

PRMT1 méthyle préférentiellement l'arginine présente dans un motif riche en arginine et glycine (GAR motifs) (Bedford et Clarke., 2008). L'analyse de la structure

tridimensionnelle montre que PRMT1 est active sous forme d'homodimères (Lorenzo et Bedford., 2010).

PRMT1 est impliquée dans la réparation de l'ADN (Kleinshmidt et Bauer., 2008), la transcription des gènes et la transduction du signal. P53 interagit directement avec PRMT1 : le recrutement de PRMT1 sur le promoteur du gène GADD45 in vivo est corrélé à la méthylation de l'arginine 3 de l'histone 4 (An et al., 2004). PRMT1 méthyle aussi des protéines impliquées dans le processing des ARN, comme les Poly(A) Binding Proteins, et dans l'élongation de la traduction comme par exemple le facteur de l'élongation SPT5. PRMT1 méthyle aussi SAM68 (kinase adaptor protein) ce qui indique son rôle dans la régulation cellulaire. Récemment, il a été démontré que PRMT1 joue un rôle dans la voie de signalisation d'ER α , en méthylant des résidus arginine dans ER α dans des cellules du sein. PRMT1 est aussi impliquée dans la régulation de la voie de signalisation de l'interféron. En plus, PRMT1 peut interagir avec d'autres PRMTs (Wolf., 2009).

PRMT1 joue un rôle essentiel dans le développement. Les souris avec PRMT1 invalidée meurent à un stade précoce juste avant l'implantation à E6.5 (Bedford et Richard., 2005). La méthylation de l'arginine 3 de l'histone 4 par PRMT1 prédispose à d'autres modifications covalentes (Lorenzo et Bedford., 2010).

4-2 CARM1 (PRMT4):

4-2-1 Quelques généralités :

PRMT4 a été décrite pour la première fois dans le laboratoire de M. Stallcup et identifiée comme une nouvelle protéine interagissant avec GRIP1 (membre de la famille des protéines P160) qui augmente l'activité transcriptionnelle des récepteurs nucléaires. Un seul variant a été isolé codant une protéine de 608 acides aminés. Son gène est exprimé dans tous les tissus mais présente un niveau plus élevé dans le cœur, les reins, et les testicules. Elle pourrait interagir avec d'autres PRMT comme PRMT1 (Wolf., 2009). CARM1 est localisée dans le noyau (Wolf., 2009) et méthyle préférentiellement les motifs PGM (proline-glycine-méthionine) (Bedford et Clarke., 2008).

L'invalidation de CARM1 chez les embryons de souris entraîne un blocage du développement des thymocytes, une altération du métabolisme lipidique et une mort rapide, juste après la naissance (Bedford et Clarke., 2008) (Figure 14).



Figure 14 : Invalidation de CARM1 chez la souris. Photos d'embryons de souris sauvage (+/+) et mutant CARM1 (-/-) au stade E18.5 (Yadav et al., 2003)

4-2-2 CARM1 est un co-activateur transcriptionnel :

Les récepteurs nucléaires des hormones sont des facteurs de transcription qui régulent l'expression des gènes après liaison avec le ligand. La plupart des récepteurs nucléaires contiennent trois domaines : un domaine d'activation en N-terminal (AD1), un domaine de liaison à l'ADN et un domaine C-terminal responsable de la liaison avec les hormones.

Les récepteurs nucléaires comprennent notamment les récepteurs des androgènes, des estrogènes, des stéroïdes, des glucocorticoïdes et des hormones thyroïdiennes. Ils recrutent SRC/P160, CBP/P300 (histone acétyltransférase) et CARM1 (coactivateur associated arginine méthyltransférase) sur les gènes cibles. CARM1 est donc un co-activateur secondaire des récepteurs nucléaires. Par exemple, les fibroblastes issus des embryons de souris qui ne contiennent pas de CARM1 présentent une diminution de l'activité des récepteurs des estrogènes (Feng et al., 2009).

La famille P160 est une famille qui contient 3 co-activateurs transcriptionnels qui sont capables de se lier directement aux récepteurs nucléaires, et peuvent aussi recruter d'autres co-activateurs secondaires. CARM1 interagit avec P160 puis méthyle CBP/P300 pour amplifier l'activité transcriptionnelle médiée par les récepteurs nucléaires (Wolf., 2009).

4-2-3 Cibles de CARM1 :

CARM1 méthyle l'arginine 17 et l'arginine 26 de l'histone 3. CARM1 méthyle aussi des facteurs d'épissage comme CA150, SAP49, SmB et U1C (O'Brien et al., 2010) et des facteurs de croissance comme E2F1 et cycline E1 (Feng et al., 2009).

De nombreux gènes actifs ont des promoteurs enrichis en H3R17 comme PS2, CITED2 et les gènes de pluripotence SOX2 et OCT-4..... et en H3R26 comme CCNE1. (Wolf., 2009). CARM1 méthyle aussi HuR (Li et al., 2002) et HuD (Fujiwara et al., 2006) qui sont des protéines qui stabilisent l'ARN, ce qui indique son rôle dans la régulation post-transcriptionnelle des gènes (Wolf., 2009).

CARM1 régule la fonction de plusieurs co-activateurs transcriptionnels en méthylant un ou plusieurs résidus arginine. CARM1 est impliquée dans la régulation des gènes cibles de STAT 5 et NF- κ B et dans la modulation de l'activation transcriptionnelle initié par P53, (Wolf., 2009), wnt/béta caténine (Ou et al., 2011), NF- κ B, c-Fos et LEF1/TCF4 (O'Brien et al., 2010).

4-2-4 Activité enzymatique de CARM1 :

Les voies de signalisation physiologiques impliquées dans la régulation de l'activité enzymatique de CARM1 ne sont pas très étudiées. Il a été démontré que la phosphorylation de CARM1 sur la serine 229 chez la souris ou le rat et la serine 228 chez l'homme inhibe son activité enzymatique (Higashimito et al., 2007). CARM1 peut aussi être phosphorylée sur la sérine 217: cette phosphorylation, détectée surtout pendant la mitose, induit son inactivation enzymatique et sa translocation dans le cytoplasme. Ainsi la phosphorylation de CARM1 apparaît comme un switch moléculaire qui contrôle l'activité enzymatique (Feng et al., 2009).

4-2-5 Un double rôle pour CARM1 dans la prolifération et la différenciation :

CARM1 joue un rôle pléiotropique dans la prolifération et la survie cellulaire. CARM1 est surexprimée dans les cancers du sein grade III (El Messaoudi et al., 2006), dans certains adénocarcinomes de la prostate (Hong et al., 2004), et dans le cancer du côlon (Kim et al., 2010). D'une façon imprévue, CARM1 peut être sous exprimée dans le cancer du sein, certains cancers de la prostate, de l'ovaire et du cerveau. Ces résultats sont inattendus vu que CARM1 est un co-activateur des récepteurs des hormones (Kim et al., 2010).

CARM1 est importante pour la différenciation des adipocytes (O'Brien et al., 2008), des myocytes (Chen et al., 2002) et des thymocytes (Kim et al., 2004). CARM1 est surexprimée dans les cellules souches embryonnaires et joue un rôle essentiel dans le maintien de la pluripotence (Wu et al., 2009).

4-2-6 CARM1 et pluripotence :

Les cellules souches embryonnaires dérivent de l'ICM (Inner cell mass). Dans l'ICM, CARM1 est surexprimée et cette surexpression est accompagnée d'une augmentation de SOX2 et NANOG. La délétion de CARM1 dans les cellules souches embryonnaires entraîne la différenciation cellulaire ainsi qu'une diminution de l'expression de SOX2, NANOG et OCT-4 (Wu et al., 2009).

La surexpression forcée de CARM1 dans les blastomères (stade 2 cellules) favorise l'orientation des cellules vers l'ICM. Chez l'embryon de souris et dans les cellules souches embryonnaires, CARM1 est requise pour le maintien de la pluripotence (Torres-Padilla et al., 2007).

4-2-7 CARM1 et poumon :

CARM1 est exprimée dans les cellules épithéliales pulmonaires. La perte de CARM1 chez l'embryon de souris induit une hyperprolifération des cellules AT II immatures et une absence de formation des cellules AT I. Il a été suggéré que CARM1 inhibe la prolifération des cellules pulmonaires et facilite leur différenciation. CARM1 joue un rôle crucial dans le développement, la croissance et la fonction des poumons (O'Brien et al., 2010).

4-2-8 CARM1 et P53 :

P53 est une protéine formée de plusieurs domaines: un domaine d'activation (AD1 et AD2), un domaine de liaison à l'ADN (DBD), un signal de localisation nucléaire, un domaine de tétramérisation et un domaine basique. Chaque domaine joue un rôle important dans sa fonction. La protéine P53 contient 27 arginines qui sont majoritairement présentes dans le DBD. P53 présente des mutations sur ces arginines dans certains cancers. P53 se lie à PRMT1 par son AD1 et à CARM1 par son DBD. Ces 2 PRMTs agissent comme des co-activateurs de P53. Il n'est pas connu si P53 est méthylée par ces PRMTs (Scoumane et Chen., 2008).

4-3 Cross talk entre CARM1 et PRMT1 et acétylation des histones :

CARM1 et PRMT1 ont été identifiées comme des co-activateurs individuels de certains gènes. CARM1 potentialise l'activité transcriptionnelle de NF- κ B, MEF2 et bêta Caténine alors que PRMT1 potentialise l'activité d'YY1. CARM1 et PRMT1 interagissent ensemble (et recrutent des acétyltransférases) pour réguler la transcription induite par les récepteurs nucléaires (figure 15) et P53. CARM1 et PRMT1 interagissent pour méthyler CBP/P300, SRC-3 (membre de la famille P160), PGC-1, NIP45 et RIP140. Cette méthylation module les interactions de ces protéines avec des protéines partenaires, augmentent l'hydrophobicité de l'arginine et altère les interactions intra et inter-moléculaires.

Aucun gène ne présente une expression significativement modifiée suite à une invalidation individuelle de CARM1 ou PRMT1 dans les cellules Hela. Cependant, la double invalidation de CARM1 et PRMT1 change l'expression de 46 gènes (Kleinschmidt et Bauer., 2008).

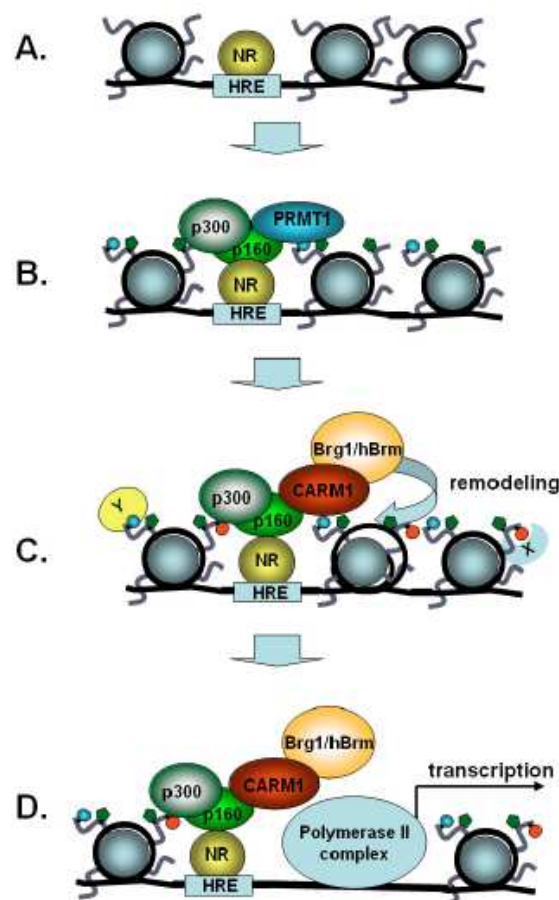


Figure 15: Rôle de CARM1 et PRMT1 dans l'activation transcriptionnelle des gènes hormones-récepteurs nucléaires dépendants. (A) Recrutement du ligand qui active

les récepteurs nucléaires (NR) sur l'élément de réponse de l'hormone (HRE). (A) L'association du premier co-activateur P160 avec le NR induit un co-recrutement de P300 et PRMT1. La méthylation de H4R3 par PRMT1 (cercle bleu) stimule l'activité acétyltransférase de P300 (cercle vert) mais l'acétylation de H4 par P300 inhibe la méthylation par PRMT1. (C) l'acétylation de l'histone 3 par P300 (cercle vert) potentialise la méthylation de H3R17 par CARM1 (cercle rouge). L'association de CARM1 avec le complexe brg1/hBrm stimule l'activité ATPase. Les queues des histones méthylées peuvent servir aussi comme une plateforme pour d'autres effecteurs. (D) l'assemblage de complexe de co-activation sur HRE, les modifications des histones et le remodelage de la chromatine induit une activation de la transcription des gènes hormones-récepteurs nucléaires dépendants (Wysocka et al., 2006).

5- Donneurs de méthyle, méthylation d'ADN et métabolisme des mono-carbones :

Le groupement méthyle est essentiel pour l'établissement et la maintenance de la méthylation. Il est fourni par l'alimentation. Dans la cellule, il provient de la S-adénosyl-méthionine (SAM), qui est un produit final du métabolisme des mono-carbones. Les folates sont les donneurs de méthyles primaires et des médiateurs essentiels du métabolisme des mono-carbones. Les autres donneurs de méthyles sont la choline et la vitamine B12. Le 5,10-méthylène-THF (tetrahydrofolate) est réduit en 5-méthyle THF par l'enzyme méthylène-THF réductase (MTHFR). En cédant un groupement méthyle, le méthyle-THF entraîne la production de tétrahydrofolates et la conversion de l'homocystéine en méthionine. La méthionine sera ensuite activée en SAM par la méthionine adénosyltransférase. SAM est le principal donneur de méthyles dans toutes les cellules. La réaction de méthylation s'accompagne de la conversion de SAM en S-adénosylhomocystéine. Le SAH est un inhibiteur potentiel de la méthylation. La perturbation du ratio SAM/SAH, suite à une augmentation de SAH ou une diminution de SAM, induit une inhibition de la réaction de méthylation. Ainsi, les folates provenant de l'alimentation sont requis comme co-facteurs pour les réactions impliquées dans le métabolisme des mono-carbones (Figure 16) Une diminution de l'apport alimentaire en folates induit une diminution des concentrations de SAM ce qui, par voie de conséquence, cause une hypométhylation de l'ADN (Poirier., 1994). Une étude analysant des échantillons de sang, 35 et 79 ans avant le diagnostic de cancer du poumon, a démontré que le risque d'avoir un cancer du poumon diminue avec l'augmentation des concentrations de vitamine B6 et méthionine (Vineis et al., 2011). Ces observations

montrent que les vitamines B pourraient avoir des effets préventifs potentiels chez les populations qui ont un risque d'avoir un cancer du poumon. Ces données sont concordantes avec des études récentes qui ont montré que l'apport en folates et l'administration de multivitamines offrent une protection significative contre la méthylation aberrante de l'ADN dans les cellules exfoliées du carrefour aéro-digestif (Herceg et Vaissière., 2011).

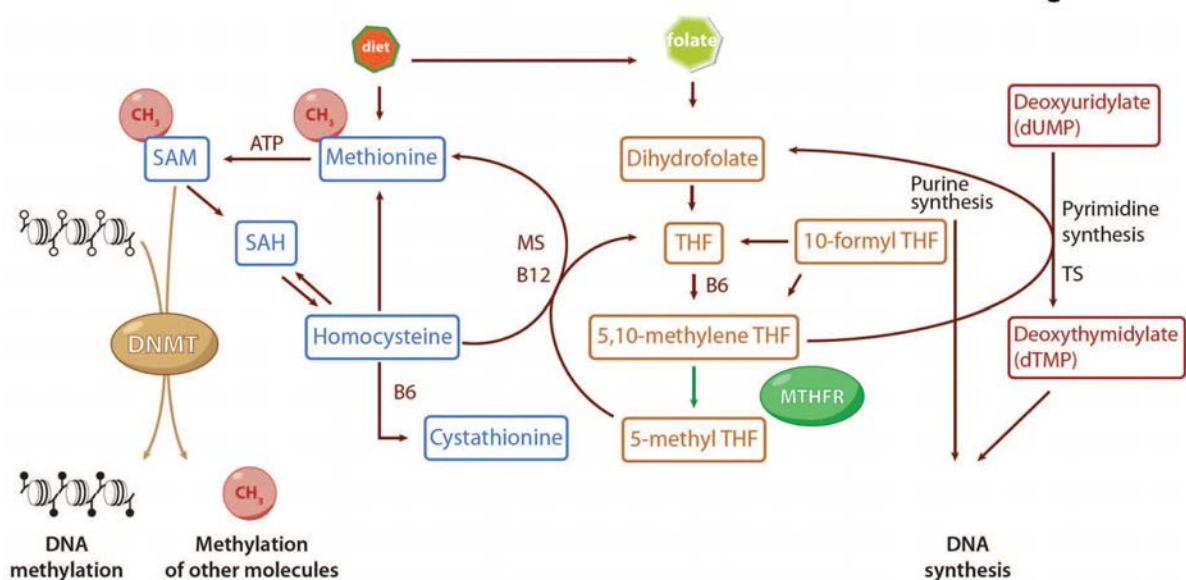


Figure 16 : Les donneurs de méthyles dans le métabolisme des mono-carbones. La méthionine interagit avec l'ATP pour former la S-adénosylméthionine (SAM), qui est le donneur de méthyle pour la méthylation de l'ADN. Les folates sous forme de THF participent aux réactions de transfert des mono-carbones. Trois des dérivés des THF sont associés avec des voies métaboliques cruciales : 5-méthyl THF requis pour la synthèse de la méthionine, 5,10-méthylène-THF essentiel pour la synthèse de déoxythymidylate et le 10-formyl THF qui est un facteur de synthèse de la purine. La Vitamine B12 agit comme un coenzyme essentiel dans le transfert du groupement méthyle de 5-méthyl THF en méthionine. La Vitamine B6 sert comme un coenzyme pour les autres réactions. TS : thymidine synthase, MS : méthionine synthase (Herceg et Vaissière., 2011).

5-1 La méthylation d'ADN :

La méthylation d'ADN est une modification covalente, héréditaire et réversible importante dans plusieurs processus biologiques. Elle est essentielle au développement normal et est associée à un certain nombre de processus clés, dont l'empreinte génomique,

l'inactivation du chromosome X, la suppression d'éléments répétitifs, et la cancérogenèse (Jair et al., 2006 ; Herceg et Vaissière., 2011).

La méthylation de l'ADN consiste à transférer un groupement méthyle de la S-adénylméthionine sur la position 5 d'une cytosine dans un doublet CG (Robertson., 2001) (figure17). Cependant des études récentes ont montré que les cytosines méthylées pourraient être dans une configuration autre que les îlots CpG (Herceg et Vaissière., 2011). Les dinucléotides CpG sont répartis de façon non uniforme dans le génome, avec une sous-représentation générale, mais un enrichissement dans de courtes régions, appelées îlots CpG, positionnées au niveau du promoteur et/ou du premier exon dans plus de 60% des gènes humains (45000 îlots CpG) (Deltour., 2005 et Robertson., 2001).

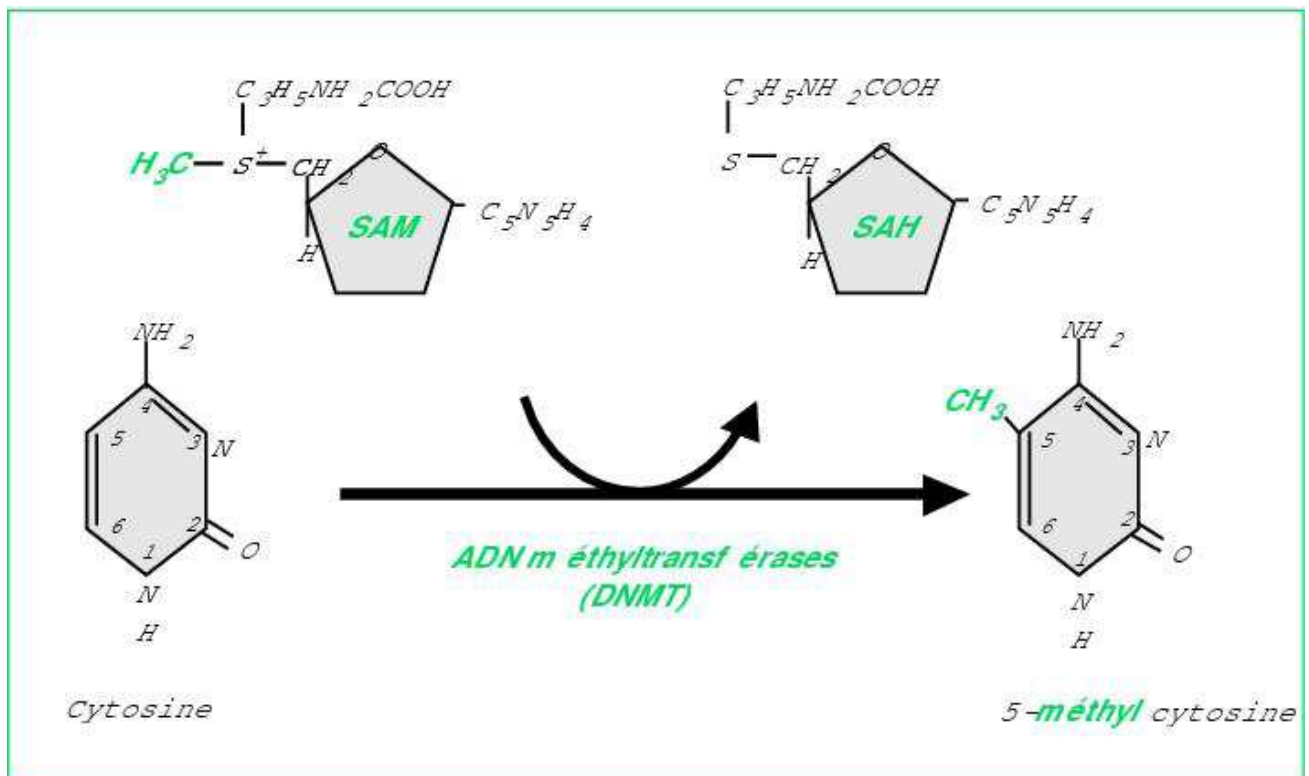


Figure17: La réaction chimique de méthylation de l'ADN. Des enzymes (ADN méthyltransférases ou DNMT) assurent l'addition d'un groupement méthyl-CH₃ à partir d'un donneur, la S-adényl-méthionine (SAM). Les produits de la réaction sont une cytosine méthylée et une molécule de S-adényl-homocystéine (SAH) (Torrisoni et al., 2008).

5-2 Les DNA méthyltransférases :

La méthylation de l'ADN se fait par une famille d'enzymes, les ADN méthyltransférases (DNMTs) (Jair et al., 2006). Les ADN méthyltransférases sont classés en plusieurs catégories (figure2), DNMT1, DNMT2, DNMT3A, DNMT3B. DNMT2 n'a pas de domaine catalytique (Robertson., 2001). Elle est impliquée dans la méthylation des ARNt (Pfeifer et Rauch., 2009) (figure 18).

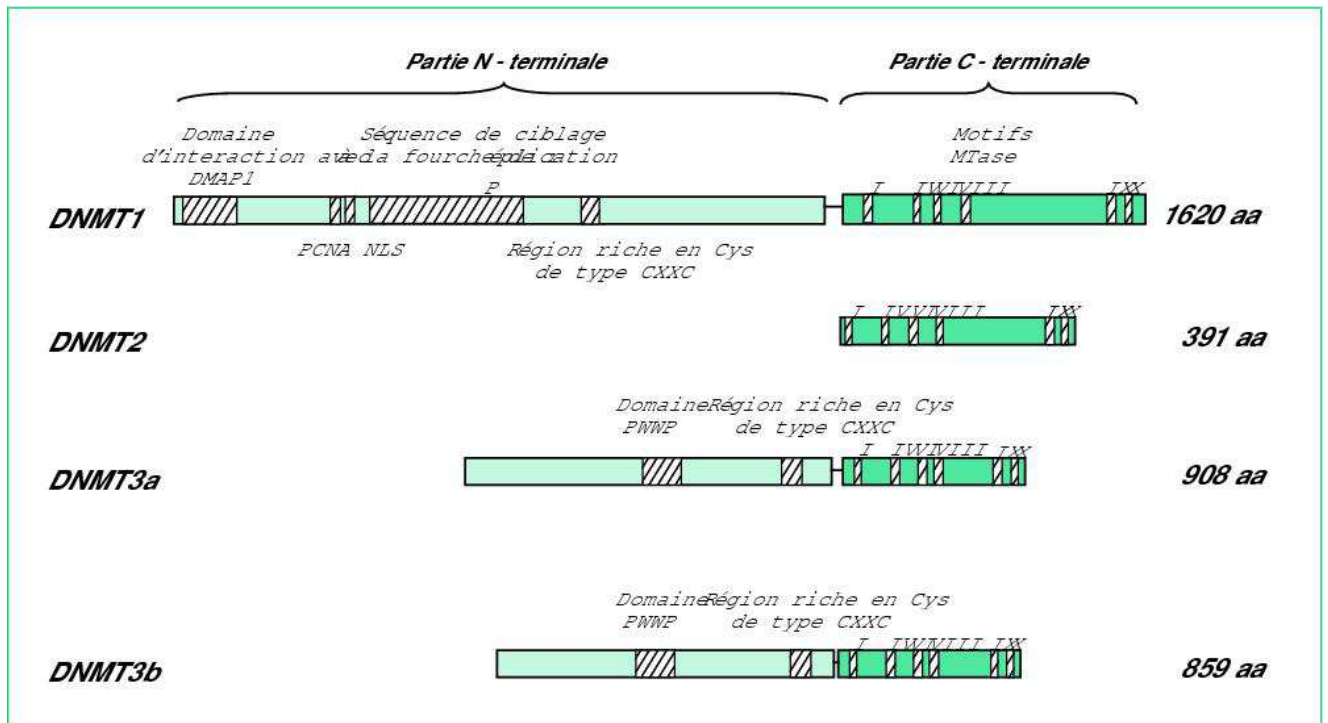


Figure 18: Représentation schématique des différentes ADN méthyltransférases. Les DNMT présentent globalement une partie N-terminale d'interaction avec l'ADN et d'autres protéines et une partie C-terminale portant l'activité catalytique. La séquence NLS (nuclear localization signal) permet le ciblage au noyau, la localisation à la fourche de réplication se fait par la protéine PCNA (proliferating cellular nuclear antigen). On trouve une séquence d'association avec un co-répresseur transcriptionnel DMAP1 (DNMT associated protein 1) et un domaine riche en cystéine – CxxC- pour le recrutement des HDAC (histone déacétylases). I, II, IV... : motifs caractéristiques des DNMT procaryotes et eucaryotes (Torrisoni., 2008).

5-2-1 DNMT1 :

C'est la méthyltransférase la plus abondante dans les cellules somatiques. Elle méthyle l'ADN hémiméthylé. Elle est responsable de la transmission du profil de méthylation de la

cellule mère aux cellules filles au cours de la réplication de l'ADN. Elle est appelée DNA méthyltransférase de maintien (Robertson., 2001).

DNMT1 est une enzyme de 193.5 KDa composée d'un domaine catalytique C-terminal et d'un domaine N-terminal régulateur impliqué dans la réplication de la méthylation pendant la division. Les souris *dnmt1* knock out représentent une réduction du taux de méthylation d'ADN globale, une léthalité embryonnaire (Herceg et Vaissière., 2011) et une empreinte anormale (Robertson., 2005).

5-2-2 DNMT3 :

Les DNMT3 peuvent méthyler des ADN hémiméthylés et non méthylés on les appelle DNA méthyltransférases de novo (Robertson., 2001). Mais elles sont aussi indispensables au maintien de la méthylation (Pfeifer et Rauch., 2009). Cette famille est divisée en 2 types : DNMT3A et DNMT3B. DNMT3A et DNMT3B sont exprimées dans le cœur, les reins, le foie, le placenta, les muscles squelettiques et dans le thymus pendant la vie fœtale (Robertson., 2001; Galetzka et al., 2006).

Les souris DNMT3A knock out meurent 4 semaines après la naissance (Robertson., 2001) alors que les souris DNMT3B knock out meurent à la naissance (Herceg et Vaissière., 2011). DNMT3A et 3B sont fortement exprimées dans les cellules souches embryonnaires. Leur expression diminue lors de la différenciation ainsi que dans les tissus somatiques adultes (Okano et al., 1999).

Au niveau structural, DNMT3A et 3B ont la même organisation, avec trois domaines conservés : une région N-terminale qui contient un domaine PWWP, un domaine à doigt de Zinc riche en cystéines qui interagit avec les répresseurs de la transcription (histones déacétylases et histones méthyltransférases) et un domaine C-terminal. L'activité méthyltransférase de DNMT3A et DNMT3B est très faible par rapport à celle de DNMT1 (Yu Li et al., 2009) par contre, DNMT3A est légèrement plus active que DNMT3B (Robertson., 2001).

DNMT3A et DNMT3B sont impliquées dans la méthylation des promoteurs de NANOG et OCT-4 au cours de la différenciation chez l'embryon de souris (Yu Li et al., 2009). DNMT3A et 3B sont majoritairement exprimées pendant le développement embryonnaire, DNMT3A maintient l'empreinte génomique pendant la gaméto-genèse et DNMT3B méthyle les séquences répétitives (Herceg et Vaissière., 2011).

5-3 Comment la méthylation de l'ADN inhibe la transcription ? (figure 19)

Le groupement 5-méthyle de la cytosine dépasse le grand sillon de la double hélice. Il est possible que la cytosine modifiée interfère avec les facteurs de transcription. Une étude a montré que les facteurs de transcription se lient moins efficacement à l'ADN quand celui-ci est méthylé. Un mécanisme alternatif stipule que des protéines se fixent aux promoteurs méthylés en lieu et place des facteurs transcriptionnels empêchant ainsi l'activation des gènes.

Deux protéines, MDBP-1 et MDBP-2, se lient spécifiquement à la séquence d'ADN méthylé. Une autre classe de protéines, les MeCPs, présentent une grande affinité pour les CpG hautement méthylés. Les MeCPs sont des répresseurs de la transcription. Le motif reconnu par MeCP1 contient 12 CpGs méthylés alors que celui reconnu par MeCP2 contient un seul site CpG méthylé.

MeCP2 interagit avec les histones déacétylases ce qui met en évidence l'existence d'une coopération entre la méthylation de l'ADN et les modifications des histones (Monparler et Bovenzi., 2000).

La méthylation des îlots CpG est souvent considérée comme une marque répressive associée aux marques de chromatine inactive comme les histones H3 et H4 déacétylés, et les H3K9 et H3K27 méthylés (Pfeifer et Rauch., 2009). Par contre, une hypométhylation des îlots CpG est associée à une méthylation de la lysine 4 de l'histone 3 qui est une marque d'activation de la chromatine (Pfeifer et Rauch., 2009).

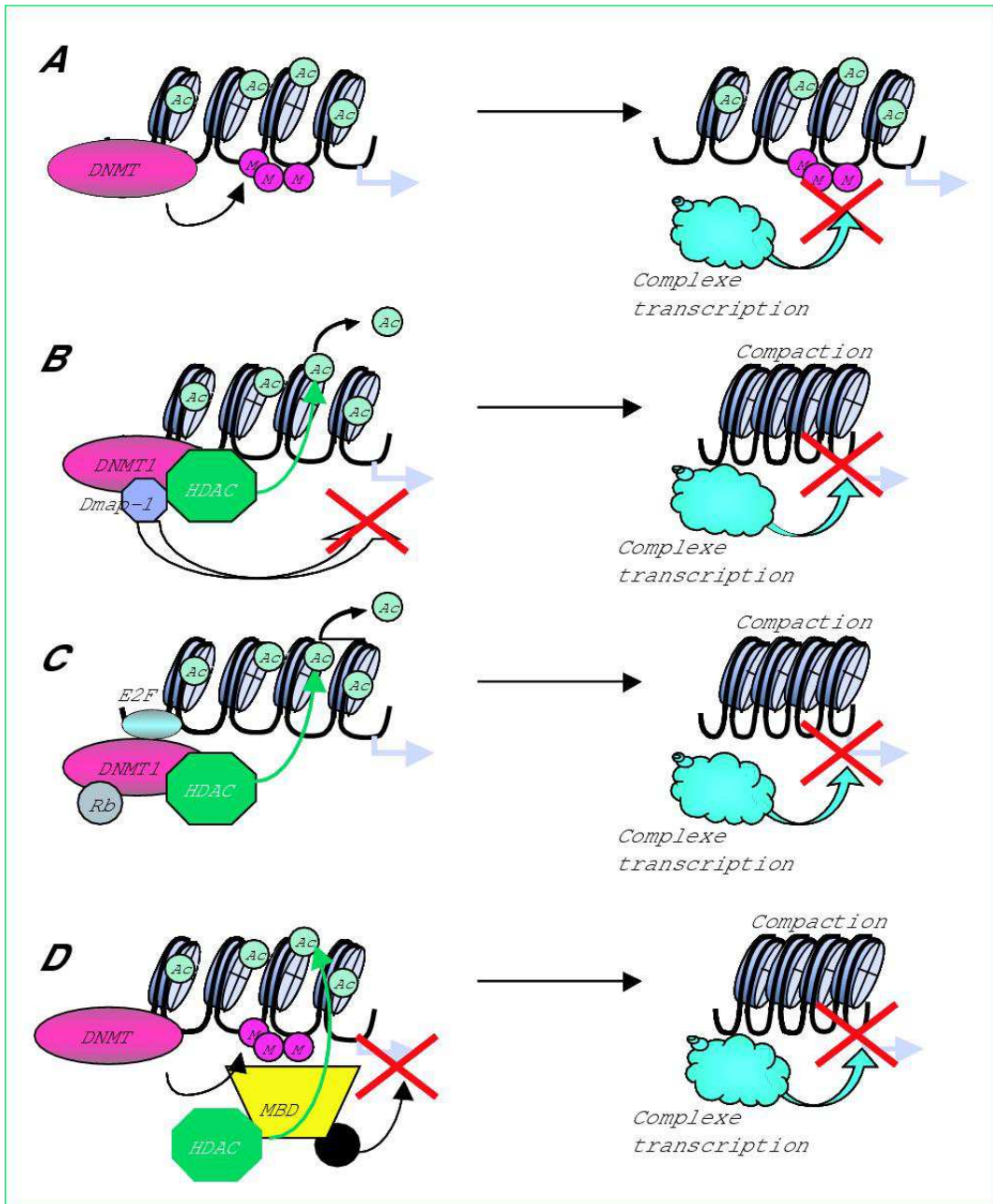


Figure 19. Mécanismes de répression de la transcription. La répression de la transcription peut être due à une absence de recrutement des complexes de transcription qui ne reconnaissent pas l'ADN méthylé par les DNMT (A), au recrutement direct (B) ou indirect (C et D) des HDAC entraînant la compaction de la chromatine et l'impossibilité pour les complexes de transcription d'accéder aux promoteurs des gènes. Ac : acétyl ; M : méthyl ; DNMT : ADN méthyltransférase ; HDAC : histone déacétylase ; MBD : méthyl CpG-binding domain.

5-4 Méthylation d'ADN et cancérogenèse :

Les cellules cancéreuses sont caractérisées par la perte de la méthylation globale du génome et par une hyperméthylation des promoteurs de certains gènes (figure 20) (Hadnagy et al., 2008). Une dérégulation de l'expression des DNMTs a été détectée dans divers types des cancers comme le cancer hépatique, le cancer du sein, le cancer de la prostate, du colon (Denis et al., 2011).

Le taux global de la méthylation dans les cellules tumorales est beaucoup plus bas que dans les cellules normales. Cette hypométhylation est impliquée dans la progression de la tumeur. Une hyperméthylation des îlots CpG a été détectée dans les cancers du colon consécutivement à la surexpression des DNA methyltransférases. P16 est un gène qui code un inhibiteur de la cycline kinase. Il est méthylé dans 48% des cancers du poumon et dans 26% des cancers du poumon non à petites cellules. L' E-cadherine antagonise le caractère invasif des cellules tumorales. Dans des lignées cellulaires de cancer de la prostate et du sein, la E-cadhérine est inhibée par hyperméthylation du promoteur favorisant ainsi les métastases cellulaires. Les récepteurs des estrogènes sont hyperméthylés dans les cancers du sein et du colon. Le récepteur de l'acide rétinoïque est aussi hyperméthylé dans le cancer du sein. La « Thrombospondin-1 » qui est un inhibiteur de l'angiogenèse est aussi hyperméthylé dans le cancer du cerveau (Monparler et Bovenzi., 2000).

L'hyperméthylation des promoteurs est un mécanisme d'inactivation de certains gènes dans les cancers humains, surtout les gènes impliqués dans la suppression des tumeurs (Jair et al., 2006).

Il existe plusieurs gènes dont la méthylation est aberrante dans le cancer de poumon. La méthylation de l'ADN a été décrite comme un événement précoce dans la tumorigenèse pulmonaire. Les gènes P16, E-cadhérine, DAPK1 et RASSF1A ont des promoteurs hyperméthylés dans les cancers du poumon (Risch et Plass., 2008).

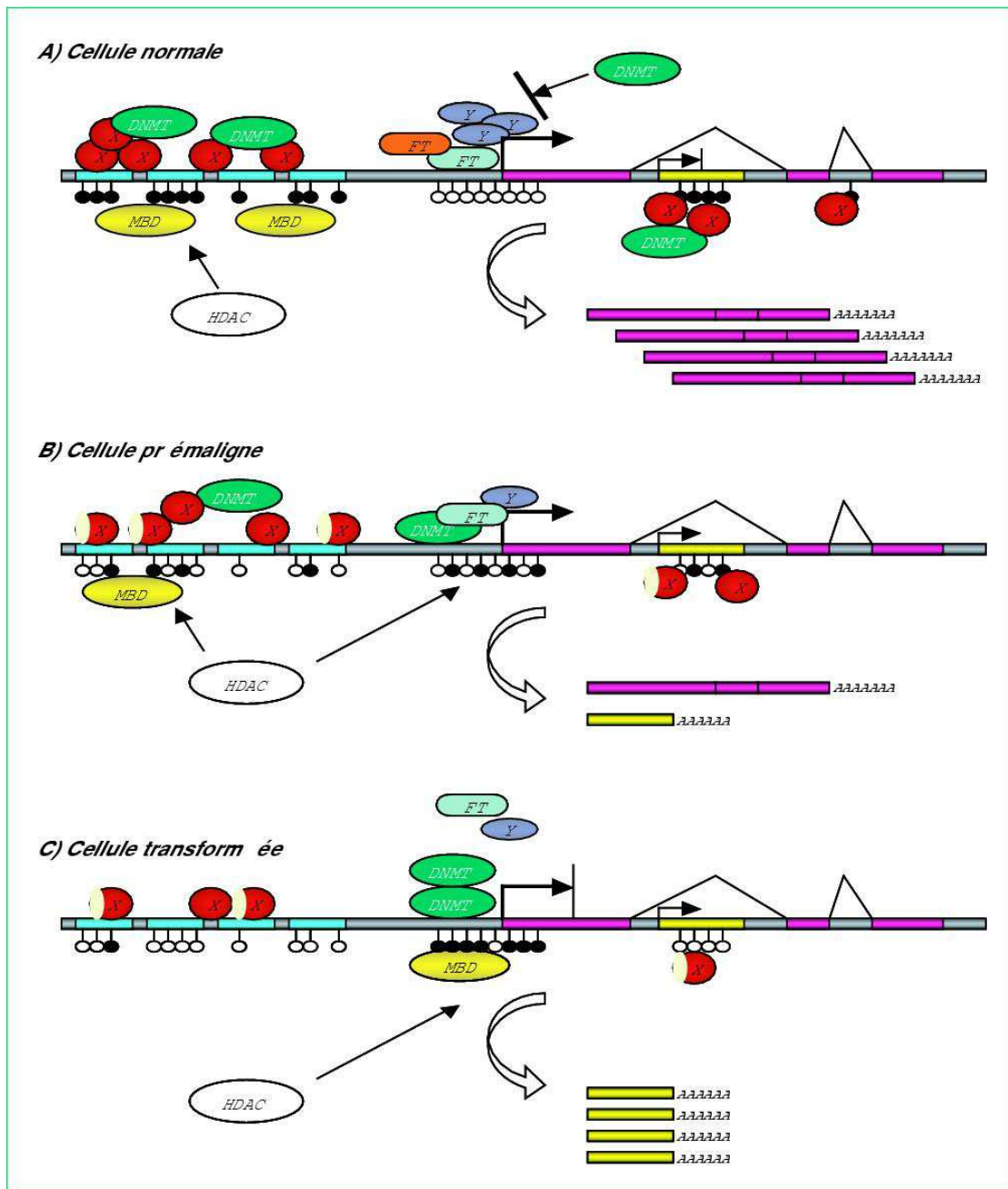


Figure 20 : L'hypométhylation globale et l'hyperméthylation régionale dans la transformation tumorale. Un segment d'ADN est représenté sur lequel on trouve un gène normalement actif (rose) avec des îlots CpG non méthylés (blanc). Les îlots CpG méthylés (gris) se retrouvent au niveau de séquences répétées (jaune) ou de gènes (bleu ciel) inactivés. A) Cellule normale. Un facteur X recrute les DNMT et cible la méthylation sur CpG des gènes inactifs (bleu et jaune) tandis qu'un facteur Y empêche la méthylation sur les gènes actifs (rose) soumis à l'activité des facteurs de transcription (FT). Le recrutement des HDAC par les MBD compacte la chromatine et rend les gènes inaccessibles. B) Cellule pré maligne. Un défaut de méthylation apparaît dû à des mutations, délétions, défauts d'expression des protéines X et/ou Y. Le défaut de ciblage

des DNMT peut entraîner la méthylation anormale d'îlots CpG (hyperméthylation) associée à une perte de méthylation sur les CpG normalement méthylés (hypométhylation). C) Cellule transformée. Les divisions cellulaires successives accentuent ce défaut de méthylation entraînant l'inhibition de l'expression de certains gènes (normaux) ou profits d'autres (anormaux) comme des séquences répétées (Torrisani., 2008).

5-5 Méthylation de l'ADN et cancer du poumon :

Dans les cancers du poumon, la méthylation de l'ADN est fortement perturbée : une hypométhylation globale, une dérégulation des DNA méthyltransférases et une hyperméthylation de certains promoteurs ont été détectés (Adcock et al., 2006). Une surexpression de DNMT3A et DNMT3B a été observée, cette surexpression est induite par une sous-expression des mir-29.

Divers gènes sont affectés par une méthylation aberrante : des gènes impliqués dans la régulation du cycle cellulaire comme CDKN2A et CHFR, des gènes impliqués dans la prolifération comme CXCL12, dans la réparation de l'ADN comme MGMT, dans l'apoptose comme FAS, Caspase 8, DAPK, dans l'invasion cellulaire comme la cadhérine et la laminine et dans la voie Wnt comme APC et DKK (Herceg et Vaissière., 2011).

L'hyperméthylation des îlots CpG des gènes suppresseurs de tumeurs RB, p16, VHL, APC, MLH1, RASSF1A and BRCA1 est une caractéristique importante des mécanismes de carcinogenèse.

Dans le cancer des poumons, les îlots CpG des promoteurs des gènes p16, RASSF1A, RARbeta, MGMT, GSTP1, CDH13, APC, DAPK, TIMP3.... sont méthylés. Le pourcentage de la méthylation varie d'un patient à l'autre selon l'histologie des tumeurs et le type de la population. A titre d'exemple, le gène suppresseur de tumeur RASSF1A est hyperméthylé dans 30-40% des cancers non à petites cellules, dans 37% des carcinomes pulmonaires à cellules squameuses et dans 80% des cancers pulmonaires à petites cellules (Pfeifer et Rauch., 2009).

5-6 Déméthylation de l'ADN :

Les mécanismes de déméthylation ne sont pas très étudiés. Cependant, plusieurs mécanismes ont été proposés. La déméthylation passive est la perte de la méthylation suite à des tours successifs de réplication d'ADN par inhibition des DNMTs comme la DNMT1. Ce mécanisme peut être chimiquement déclenché par l'utilisation de 5-Aza-2'-

deoxycytidine qui réduit l'activité et l'expression de DNMT1. Les alternatives comprennent l'attaque hydrolytique ou l'oxydation. L'existence de DNA glycosylases et de désaminases a été suggérée (figure 21). Le rôle des glycosylase a été bien mis en évidence chez les plantes mais leur implication reste un sujet de débat chez les mammifères (figure 21) (Herceg et Vaissière., 2011).

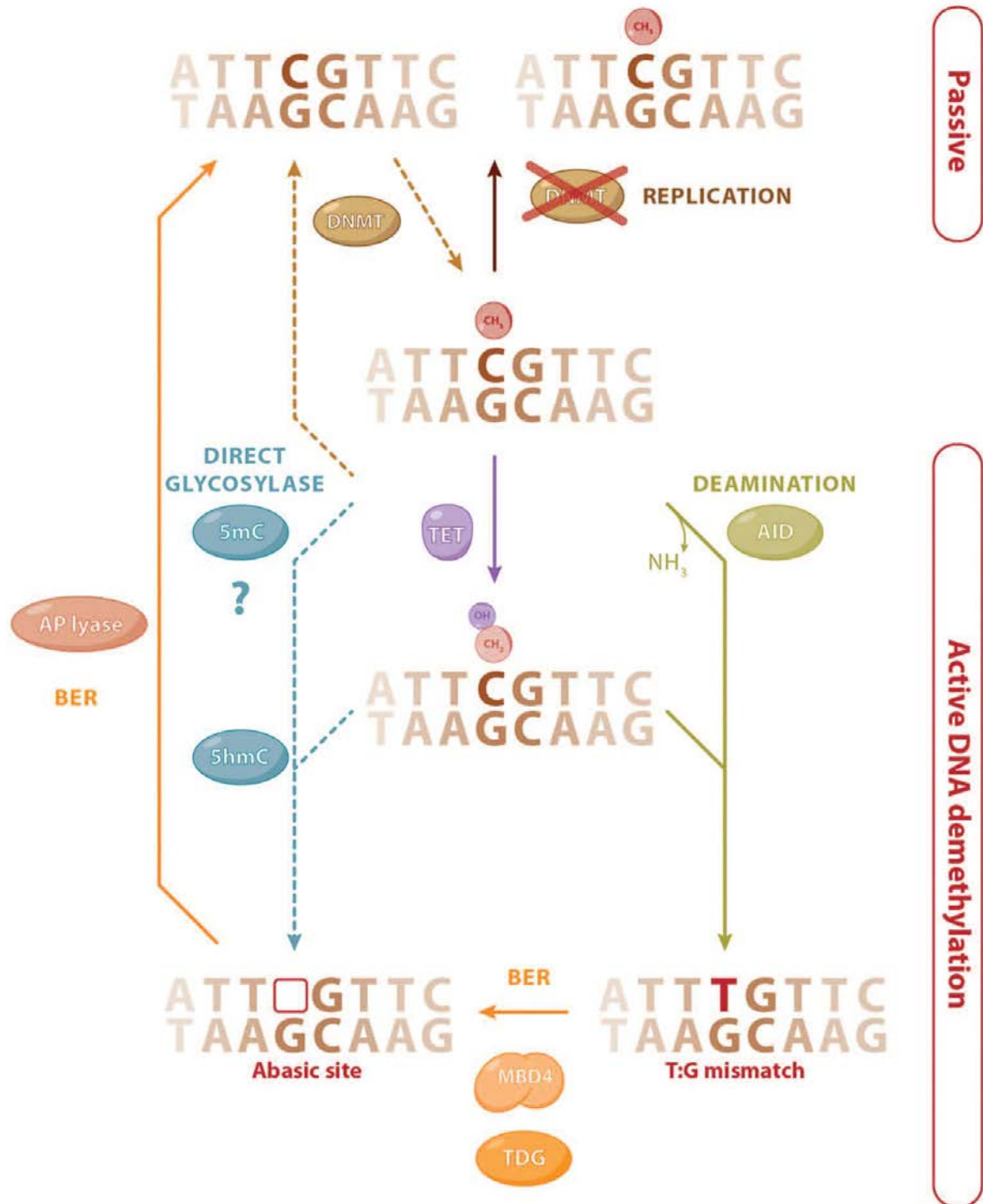


Figure 21: Les mécanismes potentiels de la méthylation de l'ADN. La déméthylation de l'ADN pourra s'établir par réplication si DNMT1 est inhibé ou absent pendant la

division cellulaire. D'une autre coté, il existe des mécanismes actifs comme la déamination des cytosines méthylés en thymines par l'activation de la cytosine deaminase en produisant un mismatch T : G. ce mismatch pourra être reconnue et réparé par BER (base excision repair) par MBD4 ou par la thymine DNA glycosylase (TDG). La délétion de la base thymine pourra induire un site non basique (apurinique et apyrimidique) les protéines TET catalyse la conversion de 5-mc en 5-hmC, qui joue un rôle d'intermédiaire qui ensuite va être pris en charge par le BER à travers le 5-hmC glucosylase ou 5-hmC déamination. 5-hmC pourra être directement converti en cytosine par les DNMTs.

5-7 Cross talk entre les modifications des histones et la méthylation de l'ADN : (figure22)

Dans certains cancers, la diminution de la méthylation de l'ADN causée par une perte de fonction de DNMT1 induit une augmentation de l'acétylation et une diminution de la méthylation de l'histone 3. Ceci montre une interaction entre les DNMT et PRMT au cours de la cancérogenèse (Hadnagy et al., 2008).

Les modifications des histones peuvent affecter directement ou indirectement le profil de méthylation de l'ADN. Inversement, la méthylation de l'ADN influence les modifications des histones. Une hyperméthylation des îlots CpG dans les promoteurs déclenche la déacétylation des histones. Des protéines possédant un domaine de liaison aux CpGs méthylés (MBD pour Methyl-CpG Binding Domain) comme MeCP2 se lient de manière sélective aux régions méthylées de l'ADN et recrutent des corépresseurs transcriptionnels et des HDACs. Au contraire, des inhibiteurs des HDAC contribuent à la dissociation des MeCP2, ce qui permet aux HATs d'acétyler à nouveau les histones favorisant ainsi la transcription des gènes. Mais quel évènement se produit en premier et lequel déclenche l'autre? Cette question reste encore ouverte au débat. Le consensus actuel semble favoriser le fait que la méthylation de l'ADN soit plutôt secondaire à l'hypoacétylation des histones dans le processus d'inactivation des gènes (Baylin et al., 2001). D'autres modifications de la chromatine comme la méthylation des histones peut diriger la méthylation de l'ADN et vice versa. La plupart des DNMTs et des protéines MBD interagissent avec des enzymes qui modifient les histones, incluant les HMTs. Les mécanismes moléculaires de la régulation de l'expression des gènes impliquent donc une coordination étroite entre DNMTs, HDACs, HMTs et d'autres protéines de remodelage de la chromatine (Moggs et al., 2004 ; Baylin et al., 2001)

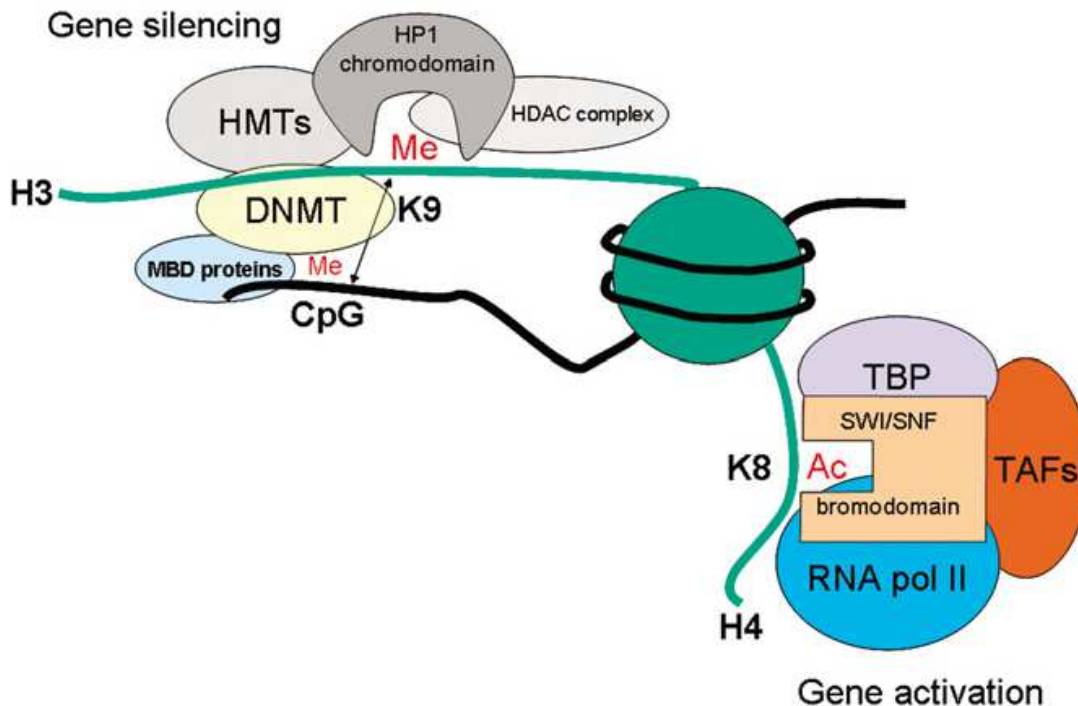


Figure 22 : Cross talk entre les modifications des histones et la méthylation de l'ADN. Les modifications des histones peuvent recruter des co-activateurs et des corépresseurs selon le site modifié. Le recrutement de la protéine de l'hétérochromatine (HP1) à partir d'une protéine à chromodomaine pourra recruter aussi des DNMT et ensuite des MBD. Ce qui implique ensuite un recrutement de certaines histones méthyltransférases (HMTs) et des histones déacétylases (HDAC) ce qui induit ensuite une répression des gènes. Par contre, l'activation des gènes requiert le recrutement du complexe d'activation y compris le TBP (TATA binding protein), les complexes de remodelage de la chromatine (SWI/SNIF) et l'ARN polymérase II. Protéines à bromodomaines : ce sont des protéines qui reconnaissent les lysines acétylés. Protéines à chromadomaines : ce sont des protéines qui reconnaissent les lysines méthylés.

6- Facteurs du risque du cancer du poumon et modifications épigénétiques :

Le tabagisme est le principal facteur de risque du cancer du poumon. Un fumeur a 10 à 15 fois plus de risque de développer un cancer qu'un non fumeur (Hubaux et al., 2012), Dans 80 à 90% des cas de cancer du poumon la fumée de tabac est incriminée (Rish et plass 2008). La méthylation de l'ADN est la modification épigénétique la plus étudiée dans le cancer du poumon lié au tabagisme. La méthylation de divers gènes a été

décrite. L'hyperméthylation du promoteur de P16 (INK4a) ainsi que des mutations de P53 sont 2 événements fréquemment détectés chez des fumeurs chroniques non atteints de cancer du poumon. Ceci suggère que l'hyperméthylation de P16 ainsi que les mutations de P53 représentent des marqueurs prédictifs du cancer du poumon tabac dépendant (Kersting et al., 2000).

Une autre étude montre que la méthylation d'ECAD et DAPK représente un marqueur précoce du cancer du poumon et que la méthylation de P16 et MGMT représente un marqueur tardif de la progression de la tumeur (Russo et al., 2005).

Les méthylation de MGMT, p16INK4a, RASSF1A, DAPK, et RAR-b, ont aussi été détectées dans le cancer du poumon. Ces méthylation sont âge et tabac-dépendant. Le tableau ci-dessous représente la relation entre la méthylation de ces gènes, l'âge ainsi que le statut des patients fumeurs/ non fumeurs (Fujiwara et al., 2005).

	% of Cases					Total
	<i>RARβ</i>	<i>p16^{INK4a}</i>	<i>DAPK</i>	<i>RASSF1A</i>	<i>MGMT</i>	
Smoking status						
Nonsmoker	0	4.4	2.2	6.5	2.2	13.0
Pack-years <40	0	0	4.8	4.8	0	9.5
Pack-years ≥40	3	3	9.1	12.1	3.0	21.2
<i>P</i>	0.359	0.626	0.379	0.550	0.736	0.442
Age						
Quartile 1*	3.5	0	6.9	0	0	10.3
Quartile 2	0	0	0	5.6	0	5.6
Quartile 3	0	5.0	5.0	20.0	5.0	25.0
Quartile 4	0	13.3	13.3	13.3	6.7	33.3
<i>P</i>	0.480	0.051	0.230	0.063	0.271	0.036

*Age quartile was defined as follows: 1, <59; 2, ≥59 and <69; 3, ≥69 and <73; and 4, ≥73.

Corrélation entre les caractéristiques cliniques et la méthylation des différents gènes

Une autre étude encore montre que les promoteurs de RASSF1A et MTHFR sont hyperméthylés dans le cancer du poumon (Vaissière et al., 2009).

Les modifications des histones sont très rarement étudiées dans le cancer du poumon lié au tabac. Une hyperacétylation de H4K5/H4K8, une hypoacétylation de H4K12/H4K16, et une perte de la triméthylation H4K20 ont été décrites chez des patients atteints de cancer du poumon sans distinction entre fumeurs et non fumeurs (Van den Broeck et al., 2008)

Plusieurs études s'intéressent aujourd'hui aux risques non liées au tabagisme, vu que le nombre des non fumeurs atteints du cancer du poumon augmente chaque année. Les non fumeurs qui ont un cancer du poumon représentent 10 à 25% des personnes qui ont un cancer du poumon (Hubaux et al., 2012).

Plusieurs autres facteurs sont reconnus comme facteurs de risques environnementaux du cancer du poumon : le tabagisme passif, l'exposition à l'amiante, aux rayons X et

gamma, au radon, à des gaz d'échappement diesel, ainsi que l'exposition à différentes substances : silice cristalline, cadmium, chrome, hexavalent, composé de nickel, arsenic, béryllium, et benzo (a) pyrène. D'autres facteurs de risques environnementaux sont toujours débattus : exposition aux fibres minérales artificielles, à la pollution atmosphérique, à diverses particules fines, à des pesticides et les métiers de la viande. Une exposition en milieu professionnel serait impliquée dans 15 à 30% des cancers du poumon.

L'arsenic, l'amiante et le radon sont les 3 facteurs de risque principaux, et les plus étudiés, du cancer du poumon non lié au tabagisme. L'exposition à ces agents induit des altérations génétiques (mutations de certains gènes) et épigénétiques (méthylation de l'ADN des promoteurs des gènes suppresseurs de tumeur, modifications des histones et dérégulation de l'expression des microRNAs). Les mécanismes moléculaires liés à ces facteurs sont différents de ceux liés au tabagisme. L'exposition chronique à ces facteurs représente un grand problème de santé publique. (Hubaux et al., 2012).

L'arsenic est un élément semi-métallique, classé comme cancérigène, non mutagène. L'exposition à l'arsenic se fait principalement à partir d'une contamination de l'eau de boisson particulièrement dans certaines régions ou l'eau souterraine entre en contact avec des minéraux contenant de l'arsenic. Elle peut être occasionnée aussi par une alimentation (le riz) contaminée ou la pollution de l'air résultant de la fonte de minerais ou de la proximité de centrales électriques au charbon. L'augmentation de la quantité de l'arsenic dans l'eau est associée avec une augmentation de l'incidence du cancer du poumon surtout le cancer du poumon à cellules squameuses et à petites cellules (Hubaux et al., 2012). L'effet de l'arsenic est dose et durée dépendants (Zhou et al., 2008). Le mécanisme carcinogène de l'arsenic consiste en un processus de biotransformation. Plusieurs réactions ont lieu comme la réduction, l'oxydation et la méthylation. Actuellement, Les recherches s'intéressent aux modifications épigénétiques causées par l'arsenic. Une étude effectuée chez les souris montre que l'arsenic induit une hyperméthylation et par conséquent l'inactivation des gènes suppresseurs des tumeurs comme P53, CDKN2A et RASSF1A. L'exposition chronique à l'arsenic induit une réduction de l'expression des miR-200 dans les cellules épithéliales bronchiales humaines (HBECS). Une ré-expression des miR-200 est capable de s'opposer aux effets indésirables de l'arsenic. (Hubaux et al., 2012).

Dans l'environnement, l'arsenic est présent sous forme d'arsénate et d'arsénite qui sont deux formes bioréactives. Le métabolisme de l'arsénite nécessite la s-Adénosyl méthionine pour transformer l'arsénite en des métabolites mono ou diméthylés. Zhou et al 2008 ont travaillé sur l'exposition des cellules d'adénocarcinome de poumon A549 à l'arsenic. Ils ont remarqué une augmentation du niveau de H3K9me2 qui est une marque répressive et de H3K4me3 qui est une marque activatrice et une diminution de la marque répressive H3K27me3. H3K9me2 constitue un signal de recrutement d'enzymes qui méthylent l'ADN. Elle est corrélée avec une perte de l'expression des gènes (Jackson et al., 2004). L'augmentation continue de H3K9me2 suite à l'exposition à l'arsenic induit une méthylation de l'ADN. Cette méthylation induit une inhibition de l'expression des gènes suppresseurs de tumeurs. Cette notion est en accord avec des résultats retrouvés dans les cellules A549 et qui montrent que l'exposition à l'arsenic induit une hyperméthylation du promoteur de P53 (Mass et al., 1997).

Une faible quantité d'arsenic est suffisante pour induire une inhibition de l'expression des gènes médiée par les récepteurs nucléaires. Une étude effectuée en 2009 montre qu'une exposition chronique à l'arsenic induit une inhibition de l'expression de CARM1 mais sans évoquer une corrélation avec le cancer du poumon (Barr et al., 2009).

L'amiante est une fibre minérale, présente dans les roches profondes. Aujourd'hui, elle est très utilisée dans les usines sous plusieurs formes. Les personnes qui risquent de développer une asbestose sont les tôliers, chaudronniers, les soudeurs, les ajusteurs, les carrossiers, les plombiers, les charpentiers, les électriciens sont des professions "à risques" et les métiers du bâtiment. D'autres professionnels ont subi des expositions importantes et prolongées : les ouvriers des chantiers navals, les dockers, les techniciens de laboratoires, les peintres, les décorateurs, les bijoutiers, les cheminots (site de la ligue contre le cancer)

L'effet de l'amiante sur les poumons est dose dépendant. L'exposition à l'amiante a plusieurs impacts sur l'organisme. Elle constitue un facteur de risque du cancer du poumon. Elle induit des altérations épigénétiques comme l'inactivation des gènes suppresseurs de tumeurs tels que RASSF1A et CDKN2A. Une dérégulation de l'expression des miRNA a été observée aussi: les miR-148b, miR-374a, miR-24-1*, let-7d, Let-7e, miR-199b-5p, miR-331-3p, and miR-96, sont surexprimés, cependant, les miR-939, miR-671-5p, miR-605, miR-1224-5p et miR-202 sont sous exprimés. (Hubaux et al., 2012).

Le radon est un gaz radioactif qui résulte de la dégradation de l'uranium. L'exposition au radon est associée à 20,000 cas du cancer du poumon aux états unis. Ce ne sont pas seulement les mineurs qui sont exposés au radon, les habitants à côté des mines ou des usines le sont aussi. Une exposition à long terme au radon induit une méthylation des promoteurs de CDKN2A et MGMT et par la suite leur inactivation (Hubaux et al., 2012).

Type of alteration	Carcinogen	Gene
Hypermethylation	Radon, Asbestos	CDKN2A
Hypermethylation	Arsenic	TP53
Hypermethylation	Arsenic, Asbestos	RASSF1A
Histone Methylation	Arsenic	H3K4, H3K9, H3K27
Histone Hypoacetylation	Arsenic	H4K16
Global DNA Hypomethylation	Arsenic	N.A.
miR Downregulation	Arsenic	miR-200
miR Overexpression	Asbestos	miR-148b, miR-374a, miR-24-1*, Let-7d, Let- 7e, miR-199b-5p, miR- 331-3p, miR-96, miR- 17-92
miR Downregulation	Asbestos	miR-939, miR-671-5p, miR-605, miR-1224-5p, miR-202

Tableau: les modifications épigénétiques observées dans le cancer du poumon associé avec l'exposition à l'arsenic, amiante et radon (Hubaux et al., 2012).

D'autres facteurs sont impliqués aussi dans le cancer du poumon mais qui ne sont pas beaucoup étudiés dans la littérature. Les radiations ionisantes sont liées à une augmentation du risque d'adénocarcinome du poumon médiée par la méthylation des promoteurs des gènes suppresseurs de tumeur comme P16 et CDKN2A. (Hubaux et al., 2012). L'exposition chronique aux rayons UV induit une hypométhylation globale chez les souris. Le nickel induit une augmentation de la méthylation de l'ADN et une diminution

globale de l'acétylation des histones H3 et H4 et une augmentation de H3K9me2 (yan et al., 2003). Le cadmium est un inhibiteur enzymatique, il inhibe l'ADN méthyltransférase induisant une hypométhylation (Vaissière et al., 2008).

De nombreuses études montrent que des polymorphismes (SNP : Single Nucleotide Polymorphisms) dans les enzymes qui modifient les histones sont associées avec le risque de cancer bronchique (Yoon et al., 2007 ; Yoon et al., 2010). Certains variants génétiques augmentent le risque de cancer du poumon alors que d'autres le diminuent. Des SNP identifiés notamment dans SUV39H2, EZH2 et RIZ (3 histones méthyltransférases) sont candidats à constituer des marqueurs prédictifs du cancer du poumon. Des études supplémentaires sont nécessaires pour corrélérer ces polymorphismes au type histologique. De même, il est important de déterminer si ces variants génétiques induisent des modifications aberrantes des histones et s'ils sont préférentiellement associés à des facteurs de risque particuliers du cancer du poumon.

D- Gènes de pluripotence :

1- Cellules souches pluripotentes :

Les cellules souches pluripotentes sont des cellules capables de générer plusieurs types cellulaires (Miyanari et Torres-padilla., 2012). Les cellules souches embryonnaires (ES cells) proviennent de la masse cellulaire interne (ICM) (Boyer et al., 2005). Les facteurs de transcription OCT-4, SOX2 et NANOG jouent un rôle essentiel dans le développement précoce et sont requis pour la propagation des cellules souches embryonnaires non différenciées en culture. Ils contribuent au maintien de la pluripotence et l'auto-renouvellement des cellules souches embryonnaires (Boyer et al., 2005).

OCT-4, SOX2 et NANOG, forment une boucle autorégulatrice interconnectée suggérant que ces trois facteurs de transcription fonctionnent collaborativement pour maintenir leur propre expression. Les trois co-facteurs co-occupent souvent leurs gènes cibles (figure23). Ils ciblent collectivement deux séries de gènes : l'une est activement exprimée et l'autre est « en silence » dans les cellules souches embryonnaires mais sera exprimée ultérieurement au cours de la différenciation (figure 24) (Boyer et al., 2005). OCT-4, SOX2 et NANOG co-occupent les promoteurs d'un groupe de gènes impliqués dans le

développement et la différenciation (Boyer et al., 2005) (figure 25, 26). Dans les cellules de l'ICM, la surexpression de CARM1 induit une augmentation de l'expression de SOX2 et NANOG accompagnée par une méthylation de l'arginine 17 de l'histone 3. L'expression d'OCT-4 reste inchangée (Torres-padilla et al., 2007).

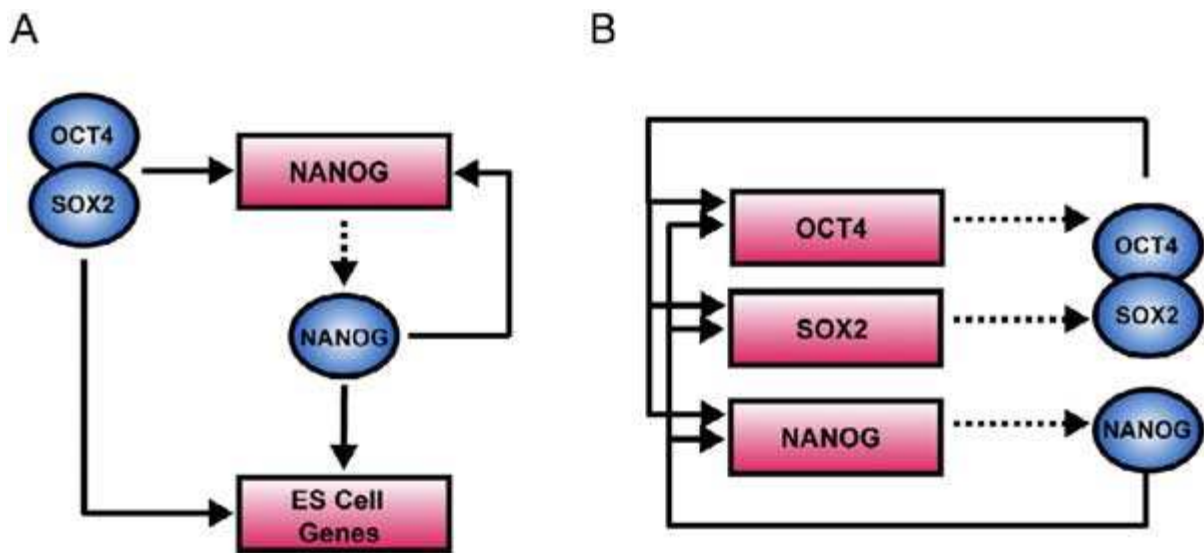


Figure 23 : Régulation transcriptionnelle dans les cellules souches embryonnaires humaines. A : Les régulateurs sont représentés en bleu et les promoteurs des gènes en rouge. B : la boucle d'interconnexion de régulation formée par SOX2, NANOG et OCT-4 (Boyer et al., 2005).

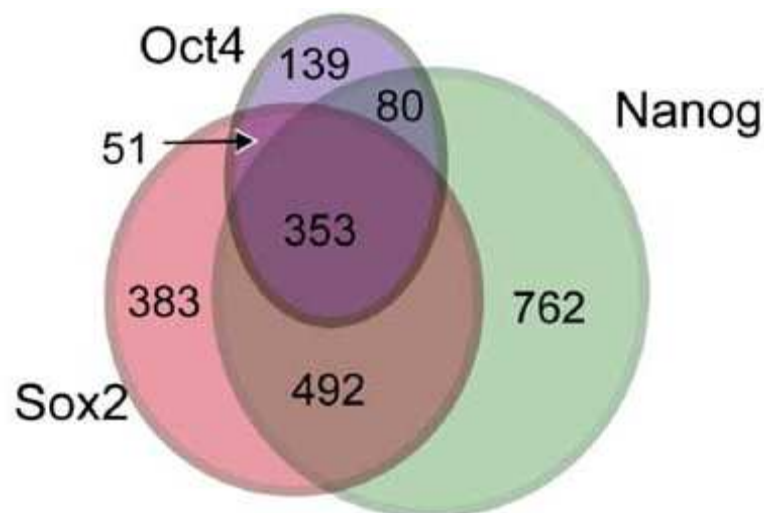


Figure 24: Gènes cibles de SOX2, NANOG et OCT-4 dans les cellules souches embryonnaires humaines (Boyer et al., 2005).

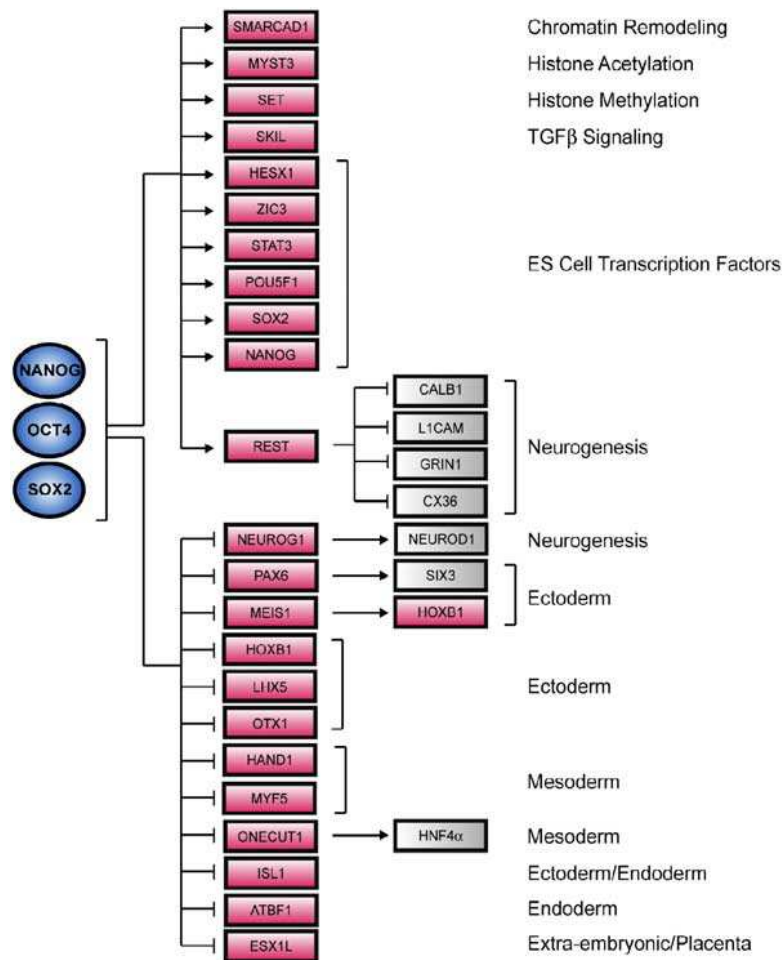


Figure 25 : Modèle de circuit de régulation de la pluripotence des cellules souches embryonnaires (ES). Les facteurs de transcription OCT-4, SOX2 et NANOG co-occupent les promoteurs des gènes actifs incluant d'autres facteurs de transcription et des éléments de signalisation nécessaire au maintien des cellules souches embryonnaires. Les trois facteurs de transcription co-occupent également des gènes mis en silence qui codent pour des facteurs de transcription et de différenciation cellulaire (Boyer et al., 2005).

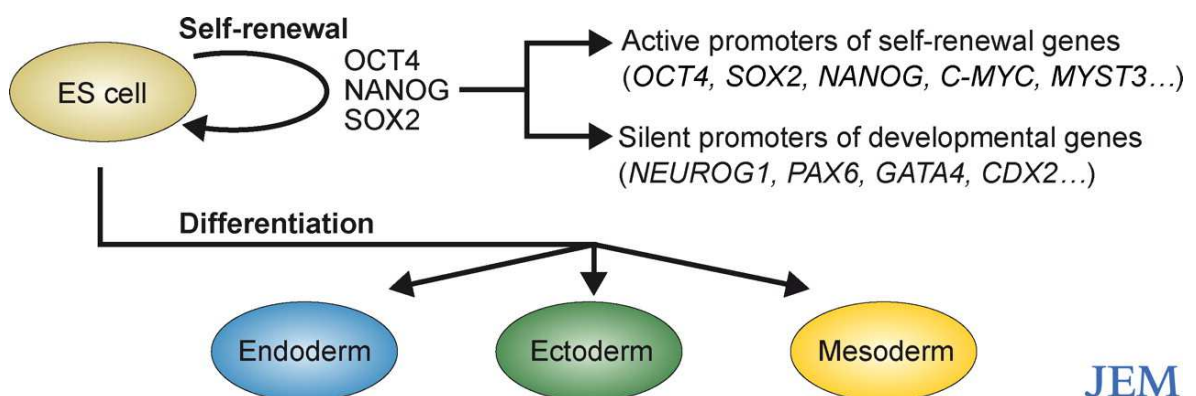


Figure 26 : Pluripotence et différenciation des cellules souches. NANOG, SOX2, OCT 4, sont des facteurs de transcription tous essentiels pour maintenir le phénotype de pluripotence embryonnaire des cellules souches. Les cellules souches embryonnaires possèdent l'unique propriété d'être capable de conserver leur capacité d'auto-renouvellement et le potentiel de former les trois couches embryonnaires (endoderme, mésoderme, ectoderme) (Chickarmane et al., 2006).

2- Formation de l'embryon : des cellules pluripotentes aux cellules différenciées (figure 27)

Après la fécondation, l'embryon précoce acquiert de manière transitoire un état de pluripotence qui lui permet ensuite de générer tous les tissus différents qui constituent l'organisme. Ceci est le résultat du phénomène de reprogrammation cellulaire, au cours duquel l'embryon forme un « épiblaste » pluripotent. Cette reprogrammation implique de nombreux facteurs de transcription (Miyazari et Torres-padilla., 2012).

Les cellules pluripotentes sont les cellules filles des cellules totipotentes. Les cellules souches de la masse cellulaire interne de l'embryon au stade blastocyste sont pluripotentes. Elles ont déjà subi une première étape de différenciation, puisque les cellules de la masse interne se sont séparées des cellules du trophoctoderme et peuvent maintenant générer les cellules des trois lignées germinales qui constitueront l'endoderme, le mésoderme et l'ectoderme. Les cellules du trophoctoderme seront à l'origine des cellules des annexes embryonnaires. Les cellules de l'ICM ont donc la capacité de générer un organisme entier mais ne peuvent fournir l'environnement propice à son développement constitué par les annexes embryonnaires.

Les cellules souches embryonnaires, également appelées ESC (Embryonic Stem Cells) sont des cellules pluripotentes obtenues à partir d'un embryon à un stade très précoce du développement, entre le stade de morula et blastocyste. Le blastocyste est un embryon de moins de 7 jours constitué de 3 parties, le trophoblaste périphérique, la masse cellulaire interne et une grande cavité remplie de liquide, le blastocèle. Les cellules de la masse cellulaire interne du blastocyste sont des « ESC » capables de donner à elles seules l'organisme entier. Le trophoblaste donnera le placenta qui reliera l'embryon à l'utérus maternel. Le blastocèle disparaîtra progressivement au cours du développement embryonnaire. C'est à partir de la masse cellulaire interne du blastocyste que les premières cellules ES humaines ont été isolées.

Il est possible d'obtenir des « ESC » à un stade un peu plus tardif du développement embryonnaire en isolant les cellules germinatives primitives juste avant leur migration extra-embryonnaire. Ces cellules sont des cellules souches qui donneront les cellules germinales, les ovogonies à l'origine des ovules chez la femelle et les spermatogonies à l'origine des spermatozoïdes chez l'homme. Elles s'individualisent très tôt du reste de l'embryon en s'établissant transitoirement dans les parties extra-embryonnaires. Cette migration aurait pour objet de les soustraire à la méthylation de l'ADN (qui se produit dans les autres cellules embryonnaires) et ainsi à sauvegarder leur potentiel de différenciation afin qu'elles produisent plus tard les gamètes.

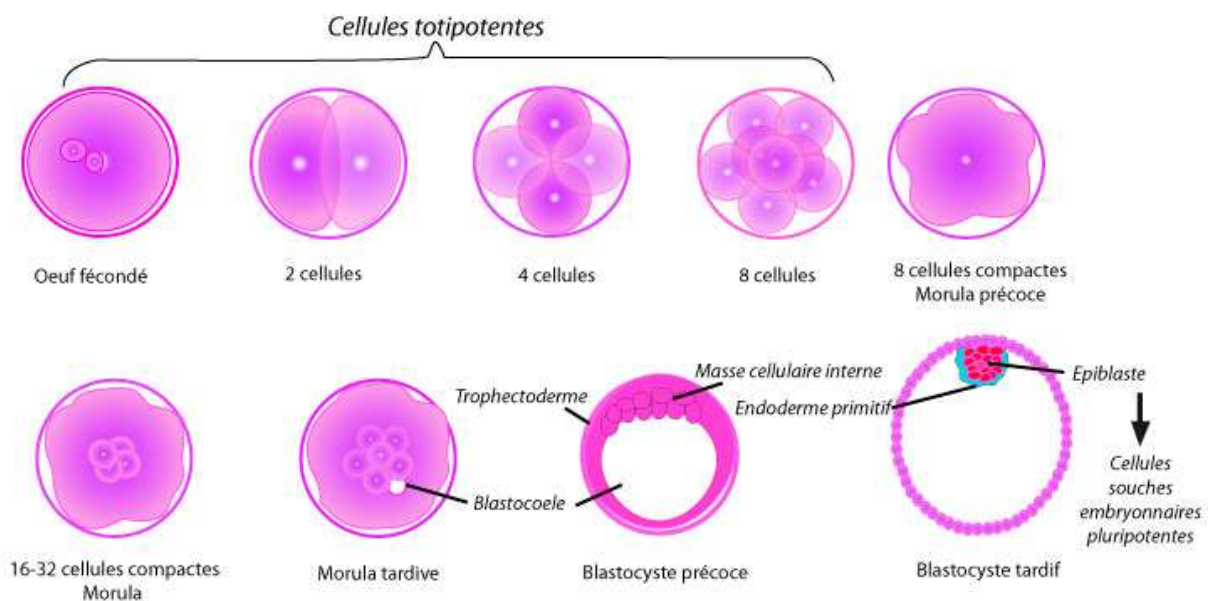


Figure 27: Les étapes précoces du développement d'un embryon : de l'œuf fécondé jusqu'aux cellules souches embryonnaires

3- Gènes de pluripotence :

3-1 SOX2 (Sex determining Region Y-Box2)

SOX2 est un facteur de transcription à domaine HMG (High Mobility Group) impliqué dans le maintien de la pluripotence et l'auto-renouvellement des cellules souches embryonnaires (Jia et al., 2011). Il est localisé sur le chromosome 3q26.33 (Lengerke et al., 2011) et fait partie de la famille des protéines SOX. Cette famille n'a pas beaucoup d'affinité avec l'ADN c'est pourquoi elle a besoin de se lier à d'autres partenaires pour

faciliter et stabiliser sa liaison avec l'ADN (Chen et al., 2008). SOX2 s'hétérodimérise avec OCT-4 pour se fixer sur le promoteur de NANOG (Rodda et al., 2005).

SOX2 joue un rôle important au cours de l'organogenèse et dans le développement embryonnaire de plusieurs tissus (Lengerke et al., 2011) y compris les poumons (Gonton et al., 2008 ; Park et al., 2006). Il joue un rôle important dans les cellules épithéliales trachéales et il est exprimé dans les voies aériennes principales (Yuan et al., 2010). SOX2 a été détecté aussi dans les gonades mâles ou femelles juste avant la détermination du sexe ou pendant le premier trimestre (Perrett et al., 2008). La méthylation par CARM1 de l'arginine 17 sur l'histone 3 associée au promoteur de SOX2 est requise pour le maintien de la pluripotence au stade blastomère (Torres-padilla et al., 2007).

La surexpression de SOX2 dans les cellules souches neurales de la souris bloque leur différenciation alors que la délétion de SOX2 dans ces cellules entraîne leur sortie prématurée du cycle cellulaire et leur différenciation en neurones. Une surexpression forcée de SOX2 au cours de la bronchogenèse induit un blocage dans les dérivations respiratoires (Lengerke et al., 2011). SOX2 est exprimé dans les tissus neuroectodermiques au cours du développement embryonnaire (Alcock et al., 2009). L'expression de la famille SOX est perturbée dans divers types des cancers. SOX2 est surexprimé dans le cancer du poumon à petites cellules et à cellules squameuses (Yuan et al., 2010 ; Wilbertz et al., 2011 ; Maier et al., 2011) et dans le méningiome. SOX2 contribue au pouvoir invasif et métastatique du cancer du pancréas. Il est également exprimé dans le cancer de l'estomac (Tsukamoto et al., 2005), de la prostate (Jia et al., 2011), de l'œsophage (Wilbertz et al., 2011) du sein (Chen et al., 2008), alors qu'il n'est pas exprimé dans les tissus adultes du sein (Lengerke et al., 2011).

Une étude récente a montré aussi que SOX2 est exprimé dans le cancer du sein et que la protéine SOX2 est méthylée sur l'arginine 113 par CARM1, ce qui montre bien que CARM1 joue un rôle de modulateur de l'expression de SOX2 (Zhao et al., 2011).

L'expression de SOX2 au cours du neurodéveloppement est régulée par deux enhanceurs conservés au cours de l'évolution, SRR1 (upstream) et SRR2 (downstream) (Chew et al., 2005 ; Sikorska et al., 2008). Mais les mécanismes de régulation de cette expression ne sont pas encore identifiés. Dans les cellules souches, SOX2 est fortement impliqué dans la régulation de l'expression de NANOG et OCT-4. SRR1 contient un motif POU et SRR2 contient un motif bipartite permettant la fixation d'OCT-4 et SOX2. Les deux enhanceurs SRR1 et SRR2 sont impliqués dans la régulation de l'expression de SOX2 alors que

seulement SRR2 est impliqué dans la régulation de l'expression de NANOG et OCT-4 (Sikorska et al., 2008). SRR1 et SRR2 exercent leur fonction seulement à l'état non différencié (Tomioka et al., 2002).

3-2 NANOG et OCT-4 :

NANOG est un facteur de transcription à domaine homéobox, essentiel dans le maintien de la pluripotence et l'auto-renouvellement des cellules souches embryonnaires issues de la masse cellulaire interne. C'est le premier facteur de transcription qui apparaît après la compaction. La compaction est un phénomène qui initie les premiers événements de la différenciation embryonnaire en générant une nouvelle répartition des cellules dans la morula pendant le stade 8 à 16 cellules. OCT-4 est exprimé juste après la compaction dans tous les blastomères. Le promoteur de NANOG est occupé par SOX2 et OCT-4 dans les cellules souches pluripotentes humaines et murines (Rodda et al., 2005).

NANOG est un marqueur de métastase dans les tumeurs des cellules germinales (Levasseur et al., 2009). La dimérisation de NANOG est requise pour le maintien de la pluripotence (Wang et al., 2008). L'expression de Nanog est essentiellement monoallélique pendant les tous premiers stades embryonnaires. Il a été démontré que NANOG passe d'une expression monoallélique dans les stades 2, 4 et 8 cellules à une expression bi-allélique au stade « épiblaste ». Son expression redevient ensuite monoallélique après l'implantation de l'embryon dans l'utérus (Miyanari et Torres-padilla., 2012). Le promoteur de NANOG (comme celui de SOX2 d'ailleurs) est méthylé par les DNMT3A et 3B seulement après la différenciation (Kashyap et al., 2009).

NANOG est surexprimé dans l'adénocarcinome du poumon (Chiou et al., 2010) et dans l'hépatocarcinome hépatique (Shan et al., 2012). Dans les cellules souches embryonnaires, la fixation de P53 sur le promoteur de NANOG induit la différenciation (Lin et al., 2004).

OCT-4 et NANOG sont des régulateurs essentiels du développement précoce et contribuent au maintien de l'identité des cellules souches embryonnaires. Une perturbation de l'expression d'OCT-4 et NANOG résulte en une différenciation de l'ICM en trophectoderme et des cellules souches embryonnaires en endoderme. Une surexpression d'OCT-4 dans les cellules souches embryonnaires induit un phénotype similaire à celui de la perte de la fonction de NANOG.

OCT-4 interagit avec d'autres facteurs de transcription pour activer ou réprimer l'expression de certains gènes dans les cellules souches embryonnaires de la souris

(Pesce et Scholer., 2001). Par exemple, OCT-4 s'hétérodimerise avec SOX2 pour réguler l'expression de divers gènes dans les cellules souches embryonnaires de la souris (Botquin et al., 1998; Nishimoto et al., 1999; Yuan et al., 1995). OCT-4 est surexprimé dans le cancer de la prostate (Bae et al., 2010), le cancer du poumon à non petites cellules (Karoubi et al., 2009), le cancer du sein, de la thyroïde et du cerveau (Madjd et al., 2009).

Objectifs :

L'expression des Proteine Arginine Méthyltransférases (PRMTs) est dérégulée dans les cancers, cependant leur rôle semble être contexte dépendant. Par exemple explorer le rôle de CARM1 et PRMT1 selon les études, CARM1 est décrit comme étant nécessaire à la différenciation ou la prolifération. CARM1 est impliqué dans le développement du poumon mais le rôle de CARM1 n'a pas encore été exploré dans le cancer du poumon.

Les PRMTs sont impliquées dans les modifications épigénétiques des histones et dans l'altération des interactions protéine-protéine, cependant les mécanismes qui régulent leur fonction ne sont que partiellement connus. La caractéristique commune des PRMTs est la formation de dimères ou multimères nécessaire à la fixation de l'AdoMet et donc à l'activité enzymatique. Les PRMTs peuvent former des homodimères ou des hétérodimères et peuvent aussi s'oligomériser. Cette interaction peut être nécessaire à la fonction puisque CARM1 et PRMT1 notamment, coopèrent dans la régulation de l'expression des gènes. La phosphorylation de CARM1 inhibe son activité enzymatique et selon le résidu sérine peut empêcher la dimérisation ou pas.

Les objectifs fixés dans ce travail sont les suivants :

- Explorer le rôle de CARM1 et PRMT1 dans la croissance cellulaire dans 2 lignées cellulaires d'adénocarcinome du poumon, A549 et H1299.
- Explorer la conséquence de la phosphorylation de CARM1 sur l'interaction entre CARM1 et PRMT1

ETUDE EXPERIMENTALE

Partie I : L'invalidation de CARM1 ou PRMT1 induit une réduction de la prolifération des lignées cellulaires de cancer du poumon A549 et H1299.

Pour cette étude, en plus de 2 lignées cellulaires d'adénocarcinome pulmonaire à non petites cellules, A549 et H1299, des échantillons humains de cancer du poumon ont été utilisés. Pour chaque individu, un tissu tumoral a été apparié avec un tissu sain avoisinant afin de comparer le profil d'expression dans les 2 compartiments. Le tableau 1 ci-dessous présente les caractéristiques des patients présentant un cancer non à petites cellules.

Table 1. Non-small cell lung cancer patients' characteristics

Characteristic	No. of Patients (N=60)	%
Age, years		
< 70	41	68
≥ 70	19	32
Sex		
male	57	95
female	3	5
Histology		
adenocarcinoma	30	50
squamous cell carcinoma	30	50
Differentiation grade		
well differentiated	27	45
moderately differentiated	9	15
poorly differentiated	24	40
Tumor status		
T1	15	25
T2	42	70
T3	3	5
Nodal status		
N0	43	72
N1	16	27
N2	1	1
Stage		
IA	11	18,5
IB	29	48,5
IIA	3	5
IIB	16	27
IIIA	1	1

Tableau 1: caractéristiques des échantillons provenant de patients atteints de cancer du poumon à non petites cellules.

1-Analyse de l'expression de CARM1 et PRMT1 dans les cellules A549 et H1299, et analyse de la prolifération tumorale après invalidation de CARM1 ou PRMT1 par des siCARM1 ou siPRMT1.

Les transcrits de CARM1 et PRMT1 ont été mis en évidence par RT-qPCR (figure 1A) et les protéines par Western Blot (figure 1B). Les résultats montrent que dans les cellules A549, CARM1 et PRMT1 sont surexprimés comparativement aux cellules saines NHBE (Normal Human Broncho Epithelial cells). Les ARNm de CARM1 et PRMT1 sont augmentés ($P < 0.005$ et $P < 0.0005$ respectivement) ainsi que les protéines ($P < 0.0005$ et $P < 0.05$ respectivement). Dans les cellules H1299, seule CARM1 est surexprimée : les ARNm et les protéines sont élevés ($P < 0.01$). PRMT1 présente une augmentation non significative des ARNm alors que l'augmentation des protéines est significative ($P < 0.05$). Les transcrits ont été quantifiés en normalisant les valeurs obtenues sur l'expression de l'ARN polymérase II (POLR2A) considérée comme gène de référence. Les taux des protéines ont été normalisés sur le taux de la Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH).

Afin d'évaluer les conséquences de l'invalidation de CARM1 et PRMT1 sur la prolifération tumorale, nous avons effectué une transfection transitoire par des siRNA dirigés contre CARM1 ou PRMT1. Deux siRNAs ciblant CARM1 (siCARM1-1 et -2) et 2 siRNA ciblant PRMT1 (siPRMT1-1 et -2) ont été utilisés et leur effet a été comparé à celui d'un siRNA non spécifique (siNON targeting). Les siRNA anti-CARM1 ont efficacement diminué les produits de CARM1 ($P < 0.0001$) et les siPRMT1 ont efficacement diminué les produits de PRMT1 ($P < 0.0001$). Il est à noter que l'invalidation de CARM1 induit une diminution de l'expression de PRMT1 comme ceci a été décrit précédemment (Kleinshmidt et al., 2008) (figure 1C et 1D).

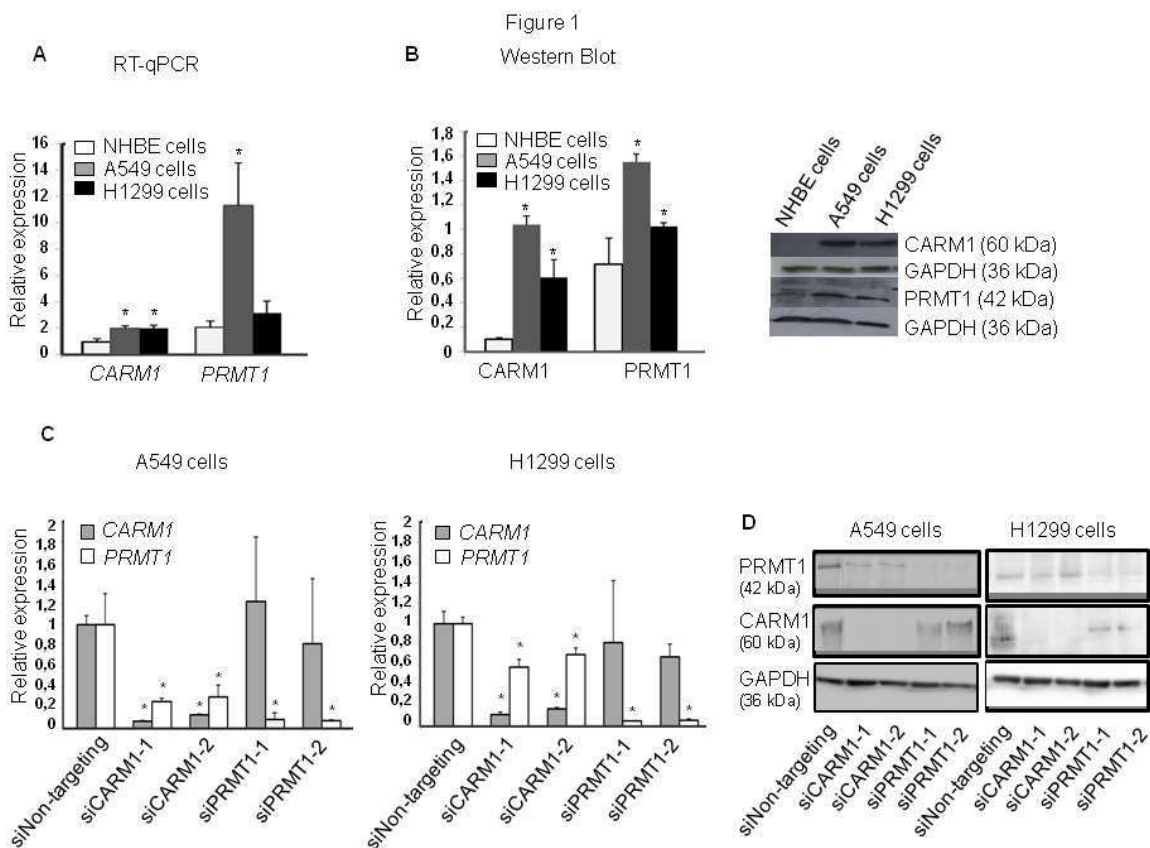


Figure 1. (A, B) CARM1 et PRMT1 sont surexprimés dans les cellules d'adénocarcinome pulmonaire à non petites cellules A549 et H1299 comparativement aux cellules saines NHBE (contrôle). (C, D) la suppression de CARM1 ou PRMT1 diminue d'une manière efficace le taux des ARN et des protéines de CARM1 ou PRMT1. (A) Après extraction des ARNs, les taux des transcrits de CARM1 ou PRMT1 ont été mesurés par qRT-PCR; **(B)** Les extraits protéiques ont été séparés par SDS-PAGE et l'immunodétection a été réalisée en utilisant des anticorps spécifiques dirigés contre CARM1 et PRMT1. **(C, D)** Les cellules A549 et H1299 ont été transfectés par des siNON-targeting (contrôle) ou 2 siRNAs alternatifs dirigés contre CARM1 ou PRMT1. Cinq jours après transfection, les ARNs de CARM1 et PRMT1 ont été mesurés par RT-qPCR **(C)** et les protéines ont été analysées par Western Blot **(D)**. Dans **C** Les taux de transcrits ont été quantifiés en normalisant les valeurs par l'utilisation d'un gène de référence, l'ARN polymérase II (POLR2A). Dans **D**, les taux des protéines ont été normalisés sur le taux de la Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH).

Les histogrammes représentent les moyennes issues de trois expérimentations indépendantes pour chaque échantillon \pm l'erreur standard à la moyenne. * différents significativement par rapport au contrôle.

La coloration au bleu Trypan montre que l'invalidation de CARM1 et PRMT1 induit une réduction de la viabilité des cellules A549 et H1299, 5 jours après la transfection et au delà, c'est-à-dire durant la phase de différenciation (par exemple, siCARM1 ou siPRMT1 vs siNON-spécifique, $P < 0.005$ à jour 7) (figure 2A). En outre, les cellules A549 et H1299 transfectées par des siCARM1 ou siPRMT1 ont perdu leur capacité de former des colonies sur l'agar en comparaison aux cellules transfectées avec des siNON-spécifiques ($P < 0.001$) (figure 2B). L'immunocytochimie montre que le nombre des cellules A549 et H1299 marquées avec du ki-67 (marqueur de prolifération) diminuent après transfection par siCARM1 ou siPRMT1 (33% et 37% respectivement) en comparaison aux cellules transfectées avec des siNON-spécifiques (47%) (Figure 2C). Ces résultats montrent que l'invalidation de CARM1 et PRMT1 induit une réduction de la prolifération cellulaire dans les lignées A549 et H1299.

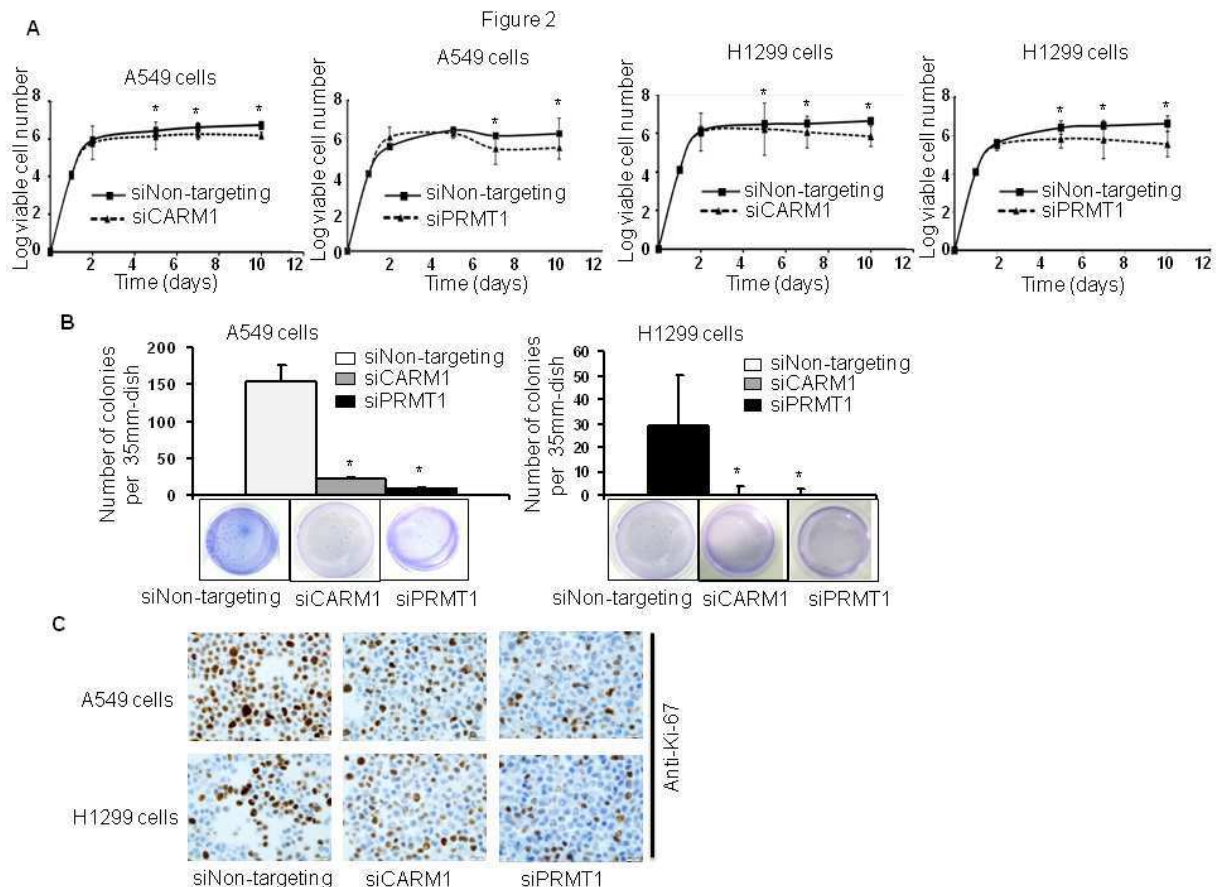


Figure 2. L'inactivation de CARM1 ou PRMT1 réduit la prolifération cellulaire *in vitro* ainsi que la croissance dépendant de l'ancrage sur l'agar. **(A)** siCARM1 ou siPRMT1 réduit le nombre des cellules *in vitro*. Les cellules A549 et H1299 ont été transfectées 2 fois, 12 heures après l'ensemencement et à jour 5 avec des siNON-spécifiques (contrôle), siCARM1 ou siPRMT1. Les cellules ont été comptées après coloration par le bleu de Trypan. **(B)** siCARM1 ou siPRMT1 inhibe la formation des colonies sur l'agar mou. Trois jours après transfection, les cellules diluées ont été étalées sur des couches de gélose. Trois semaines après, les colonies ont été fixées, colorées avec le bleu de méthylène et les boîtes ont été photographiées. Les résultats A et B représentent les moyennes issues de trois expérimentations indépendantes \pm l'erreur standard à la moyenne. * différents significativement par rapport au contrôle. **(C)** Les siCARM1 ou siPRMT1 réduisent le nombre des cellules A549 et H1299 marquées positivement par la couleur marron qui représente le marqueur de prolifération Ki-67. L'immunocytochimie a été réalisée 5 jours après la transfection des cellules avec les siNON-spécifiques, les siCARM1 ou les siPRMT1. Les cellules ont été fixées par la formaline puis intégrées dans la paraffine et marquées avec des anticorps dirigés spécifiquement contre Ki-67. Grossissement original, X40. Tous les résultats représentés

sont issus de 3 expérimentations indépendantes. * différents significativement par rapport au contrôle.

2- Analyse de l'expression des cytokératines et du récepteur de la neuromédine B dans les cellules A549 et H1299 après invalidation de CARM1 ou PRMT1.

Nous avons analysé les conséquences de l'invalidation de CARM1 et PRMT1 sur l'expression de deux marqueurs épithéliaux (cytokératines et récepteur de la neuromédine B) dans les 2 lignées cellulaires d'adénocarcinome à non petites cellules A549 et H1299. Les cytokératines (CKs) sont des marqueurs des cellules épithéliales exprimées dans plusieurs types de cellules. Les cytokératines 7, 8 sont exprimées dans les cellules A549 mais pas H1299 (Kanaji et al., 2011). Le récepteur de la neuromédine B (NMBR) se lie à la neuromédine B qui est un facteur mitogène et de croissance dans les tissus gastro-intestinaux et pulmonaires normaux et dans le tissu néoplasique pulmonaire. Il a été démontré que le NMBR est exprimé dans divers lignées cellulaires d'adénocarcinome pulmonaire à non petites cellules (Gonzales et al., 2008), parmi lesquelles figurent les cellules H1299 et A549 (Corjay et al., 1991).

Nous avons confirmé par Western Blot que les cytokératines 7, 8 et le NMBR sont effectivement exprimés dans les cellules A549 alors que les cellules H1299 expriment le NMBR mais pas les cytokines 7 et 8. Dans les cellules A549, le Western Blot montre une augmentation de l'expression de CK7 ($P < 0.0001$) et CK8 ($P < 0.005$) et une diminution de l'expression de NMBR (< 0.0001) après transfection par siCARM1 ou siPRMT1, en comparaison avec les cellules transfectées avec des siNON-spécifiques. Dans les cellules H1299, l'invalidation de CARM1 ou PRMT1 réduit l'expression de NMBR ($P < 0.005$ pour siCARM1 et $P < 0.0005$ pour siPRMT1 en comparaison avec les siNON-spécifiques) (figure 3A).

Ces résultats ont été confirmés par immunocytochimie (figure 3B). Les cellules A549 transfectées par siCARM1 ou siPRMT1 présentent une intensité plus forte pour CK7 ($Q=234$ et $Q=267$ respectivement) en comparaison avec les cellules transfectées avec des siNON-spécifiques ($Q=207$). L'expression de CK8 est plus forte dans les cellules transfectées avec des siCARM1 ou siPRMT1 ($Q=180$ et $Q=163$ respectivement) en comparaison avec les cellules transfectées par des siNON-spécifiques ($Q=131$). Les cellules A549 transfectées par siCARM1 ou siPRMT1 montrent une diminution de l'intensité de l'expression de la NMBR ($Q=205$ et $Q=176$ respectivement) en comparaison avec les cellules transfectées avec des siNON-spécifiques ($Q=224$). De

même, les cellules H1299 transfectées par des siCARM1 ou siPRMT1 montrent une diminution de l'intensité d'expression du NMBR (Q=141 et Q=103 respectivement) par rapport aux cellules transfectées avec des siNON-spécifiques (Q=160).

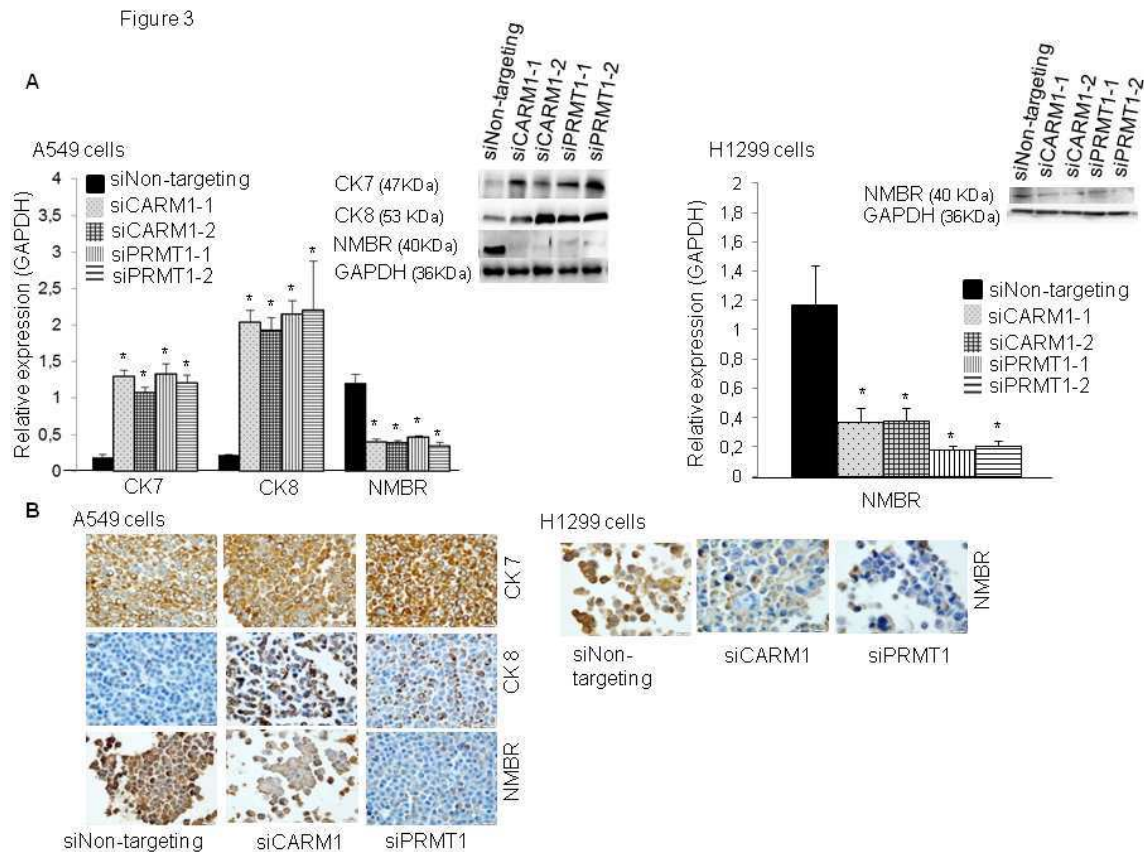


Figure 3. L'inactivation de CARM1 ou PRMT1 induit une augmentation de l'expression des cytokératines dans les cellules A549 et une diminution de l'expression de NMBR dans les cellules A549 et H1299. Les cellules A549 et H1299 ont été transfectées avec des siCARM1, siPRMT1 ou siNON-spécifiques (contrôle) 12 h après l'ensemencement et maintenues en culture pendant 5 jours. **(A)** les protéines ont été extraites puis analysées par Western Blot. Les résultats représentent les moyennes \pm l'erreur standard à la moyenne. **(B)** L'immunocytochimie a été réalisée après fixation des cellules par la formaline et ensuite intégration des cellules dans la paraffine, en utilisant des anticorps dirigés contre les cytokératines 7, 8 et le récepteur de la neuroméline B. * différents significativement par rapport au contrôle

3- CARM1 et PRMT1 sont surexprimés dans le poumon de patients atteints de cancer non à petites cellules: leur invalidation dans les cellules A549 et H1299 est synergique avec l'action du pemetrexed et du paclitaxel.

Dans le but d'approfondir notre étude, nous avons analysé le niveau d'expression de CARM1 et PRMT1 dans des tissus tumoraux pulmonaires humains dont les caractéristiques sont présentées dans le tableau 1.

Conformément aux résultats observés dans les cellules A549 et H1299, nous avons trouvé que CARM1 et PRMT1 sont surexprimés dans les tissus tumoraux (figure 4A). L'analyse immunohistochimique montre que, chez un même malade, CARM1 et PRMT1 sont surexprimés dans les parties tumorales comparativement aux parties saines appariées ($P < 0.001$). Dans les parties tumorales, le score de l'immunomarquage par CARM1 est $Q < 100$ dans 6 (10%) échantillons, $100 < Q < 200$ dans 30 (50%), $Q > 200$ dans 24 (40%). Dans les parties saines, le score de l'immunomarquage par CARM1 est $Q < 100$ dans 52 (87%) échantillons, $100 < Q < 200$ dans 8 (13%). Aucun échantillon ne représente un immunomarquage > 200 . Le score de l'immunomarquage par PRMT1 est également plus élevé dans les parties tumorales que dans les parties saines ($p < 0.001$). Dans le tissu tumoral, $Q < 100$ dans 15 échantillons (25%), $100 < Q < 200$ dans 37 (62%) et $Q > 200$ dans 8 (13%). Dans le tissu sain, le score de l'immunomarquage de PRMT1 est $Q < 100$ dans 46 (77%) échantillons, $100 < Q < 200$ dans 14 (23%). Aucun échantillon ne représente un immunomarquage > 200 .

Par la suite, nous avons examiné si les siCARM1 ou siPRMT1 potentialisent l'activité du Paclitaxel, Pemetrexed et Carboplatine, 3 médicaments utilisés dans le traitement du cancer pulmonaire (figure 4B). La transfection par les siCARM1 ou siPRMT1 et l'administration des médicaments ont été appliquées pendant 24 heures, ensuite la densité optique a été mesurée afin d'estimer la viabilité cellulaire. L'administration combinée de [siCARM1 (ou siPRMT1) et Pemetrexed] était plus efficace que celle des [siNON-spécifiques et Pemetrexed] dans la réduction de la croissance cellulaire ($P < 0.005$ dans les cellules A549 et $P < 0.05$ dans les cellules H1299). De même, la combinaison [siCARM1 ou siPRMT1 et Paclitaxel] potentialise significativement l'activité antiproliférative : $p < 0.005$ dans les cellules A549 pour [siCARM1 (ou siPRMT1) + Paclitaxel] vs [siNON-spécifiques + Paclitaxel], $p < 0.005$ dans les cellules H1299 pour [siCARM1 + Paclitaxel] vs [siNON-spécifiques + Paclitaxel] et $p < 0.05$ pour [siPRMT1 + Paclitaxel] vs [siNON-spécifiques + Paclitaxel]. De surcroît, l'invalidation de CARM1 ou PRMT1 potentialise l'activité antiproliférative de la Carboplatine dans les cellules A549

mais pas dans les cellules H1299. Dans les cellules A549, $p < 0.05$ pour [siCARM1 (ou siPRMT1) + Carboplatine] vs [siNON-spécifiques + Carboplatine]. Ces résultats sont préliminaires et nécessitent des études supplémentaires avant de considérer la suppression de CARM1 ou PRMT1 comme des adjuvants dans les traitements anti-prolifératifs.

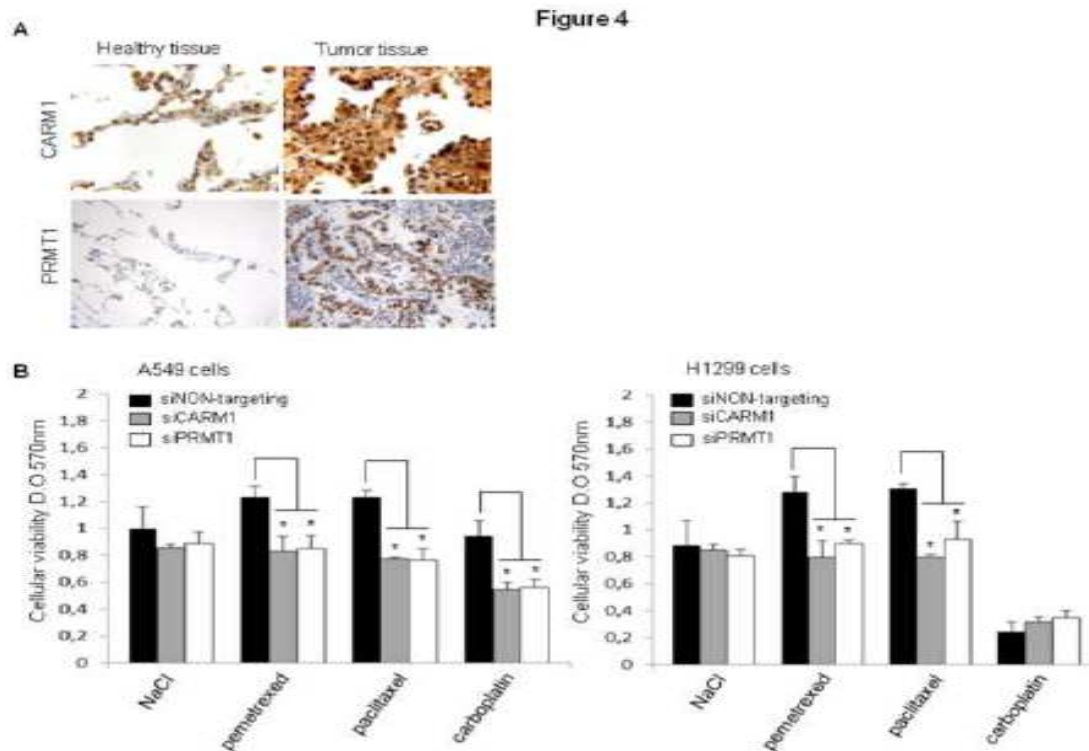


Figure 4. CARM1 et PRMT1 présentent un marquage significativement plus intense (marron) dans le tissu tumoral que dans le tissu sain apparié provenant du même malade ($p < 0.001$) et l'inactivation de CARM1 ou PRMT1 agit en synergie avec le Pemetrexed, le Paclitaxel et le Carboplatine dans les cellules A549 en inhibant la croissance cellulaire et avec le Pemetrexed et le Paclitaxel seulement dans les cellules H1299. **(A)** L'immunocytochimie a été réalisée après fixation des cellules par la formaline et après intégration dans la paraffine, en utilisant des anticorps dirigés spécifiquement contre CARM1 et PRMT1. Grossissement original, CARM1 X400 et PRMT1 X200. **(B)** les cellules A549 et H1299 ont été transfectées par des siCARM1, siPRMT1 ou des siNON-spécifiques (contrôle). Le diluent (NaCl 0.9%) a été utilisé afin de confirmer que l'effet observé est spécifique. Les cellules ont par la suite été traitées par du Pemetrexed, Paclitaxel et Carboplatine et l'activité cellulaire a été mesurée par le test MTT. * différents significativement par rapport au contrôle

Partie II: La phosphorylation de CARM1 humain sur la sérine 228 inhibe son interaction avec PRMT1.

1- Les profils d'expression de CARM1, PRMT1, SOX2 et NANOG sont différents dans les cellules A549 et H1299.

Les transcrits de CARM1, PRMT1, SOX2 et NANOG ont été mis en évidence par RT-qPCR et les protéines par Western Blot (figure 1A). Les résultats montrent que dans les cellules A549, CARM1 et PRMT1 sont surexprimés comparativement aux cellules saines NHBE (Normal Human Broncho Epithelial cells). Les ARNm de CARM1 et PRMT1 sont augmentés ($P < 0.001$ et $P < 0.0001$ respectivement) ainsi que les protéines ($P < 0.0001$). Cette augmentation est corrélée avec une surexpression des ARNm ($P < 0.0001$) et des protéines ($P < 0.001$) de SOX2 et NANOG. Ces résultats sont concordants avec une étude qui montre que CARM1 et PRMT1 coopèrent dans la régulation des gènes (Kleinschmidt et al., 2008). Par conséquent, quand leur expression est élevée, l'expression de 2 de leurs gènes cibles SOX2 et NANOG (Wu Q et al., 2009) augmente aussi.

Dans les cellules H1299, seul CARM1 est surexprimé: $P < 0.001$ et $P < 0.0001$ pour les ARNm et les protéines respectivement. Cette augmentation est corrélée avec une surexpression de NANOG, $P < 0.01$ et $P < 0.001$ pour les ARNm et les protéines respectivement, et une sous expression des ARNm de SOX2 ($P < 0.001$) alors que les protéines SOX2 diminuent de façon non significative (figure 1A). PRMT1 présente une augmentation non significative. Les transcrits ont été quantifiés en normalisant les valeurs obtenues sur l'expression de l'ARN polymérase II (POLR2A) considérée comme gène de référence. Les taux des protéines ont été normalisés sur le taux de la Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH). Ces résultats ne permettent pas de conclure à une relation de cause à effet entre les variations de CARM1, PRMT1, SOX2 et NANOG. Cependant, il faut remarquer que CARM1, PRMT1 et leurs gènes cibles SOX2 and NANOG montrent des profils d'expression différents dans les cellules A549 et H1299.

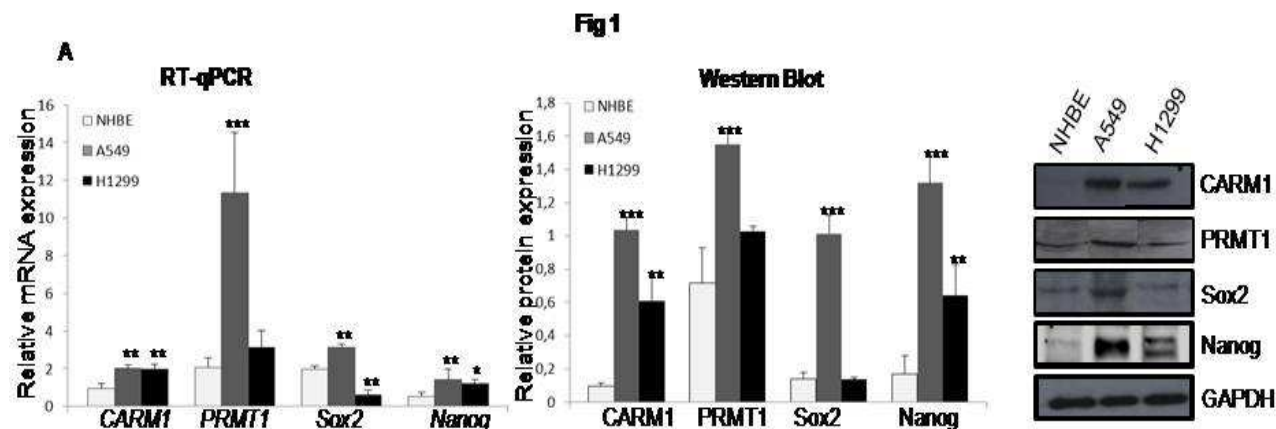


Figure 1. Analyse de l'expression de CARM1, PRMT1, SOX2 et NANOG dans les cellules A549 et H1299. **A.** CARM1, PRMT1 et les gènes cibles de CARM1, SOX2 et NANOG ne sont pas exprimés de la même façon dans les cellules A549 et H1299. CARM1 et PRMT1 sont surexprimés dans les cellules A549 et H1299 comparativement aux cellules NHBE. PRMT1 est significativement élevée seulement dans les cellules A549. Les ARNs ont été extraits et le taux des transcrits a été quantifié par RT-qPCR; les extraits protéiques ont été séparés par SDS-PAGE, l'immunodétection a été effectuée avec des anticorps spécifiques dirigés contre CARM1, PRMT1, SOX2, NANOG et GAPDH. Les transcrits ont été quantifiés en normalisant les valeurs obtenues sur l'expression de l'ARN polymérase II (POLR2A) considérée comme gène de référence. Les taux des protéines ont été normalisés sur le taux de la Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH). Les histogrammes représentent les moyennes issues de 3 expérimentations indépendantes \pm l'erreur standard à la moyenne. * $p < 0.01$, ** $p < 0.001$ et *** $p < 0.0001$. NHBE: Normal Human Bronchal/tracheal Epithelial cells

2- Les promoteurs de SOX2 et NANOG sont enrichis avec la marque des histones de CARM1 (H3R17me2) dans les cellules A549 mais pas dans les cellules H1299.

Dans les cellules A549, les produits des 4 gènes (CARM1, PRMT1, SOX2 et NANOG) sont élevés alors que dans les cellules H1299 seuls CARM1 et NANOG sont élevés. Nous avons émis l'hypothèse que l'activité méthyltransférase de CARM1 et/ou PRMT1 serai(ent) diminuée(s) dans les cellules H1299. Afin d'explorer cette hypothèse, nous avons effectué une immunoprécipitation de la chromatine en utilisant des anticorps anti-H3R17me2 (modification de CARM1) et anti-H4R3me2 (modification de PRMT1) et en amplifiant ensuite l'ADN avec des amorces spécifiques des régions promotrices de SOX2 (figure 1B) et NANOG (figure 1B). Un anticorps anti-IgG de lapin a été utilisé comme

contrôle négatif et a servi à la normalisation des résultats. Les résultats montrent que dans les cellules A549, les promoteurs associés à la chromatine de SOX2 et de NANOG sont enrichis avec les marques de CARM1 et PRMT1 (pour H3R17me2 $p < 0.001$ sur le promoteur de SOX2 et $p < 0.0001$ sur le promoteur de NANOG et pour H4R3me2 $p < 0.001$ sur le promoteur de SOX2 et $p < 0.0001$ sur le promoteur de NANOG) (fig.1B). Cependant, dans les cellules H1299, la marque H3R17me2 est à peine détectable: H4R3me2 est la marque prédominante sur les promoteurs associés à la chromatine de SOX2 et de NANOG ($p < 0.001$ et $p < 0.0001$ respectivement fig 1B). Il semble que le niveau de PRMT1 dans les cellules H1299 est suffisant pour établir une modification au niveau des histones, cependant, CARM1 reste inactive. Diverses raisons peuvent expliquer pourquoi CARM1 est inactive dans les cellules H1299. Une de ces raisons est que CARM1 n'a pas interagit avec PRMT1, sachant que CARM1 et PRMT1 coopèrent dans la régulation des gènes (Kleinschmidt et al., 2008). Une autre raison est que CARM1 est phosphorylée dans les cellules H1299 et pas dans les cellules A549, puisque la phosphorylation de CARM1 inhibe son activité enzymatique (Feng et al., 2009, Higashimoto et al., 2007). Ces deux mécanismes peuvent être liés si on considère que la phosphorylation de CARM1 peut empêcher l'interaction CARM1-PRMT1. Chez la souris, il a été démontré que CARM1 est phosphorylée sur les résidus Sérine 217 et 229 mais seule la phosphorylation de Ser 229 empêche la dimérisation de CARM1 (Feng et al., 2009). L'équivalent humain de la Ser229 de CARM1 murin est la Ser228. Par conséquent, nous avons décidé d'étudier les effets de la phosphorylation de la sérine 228 dans les cellules A549 et les cellules H1299.

Fig 1

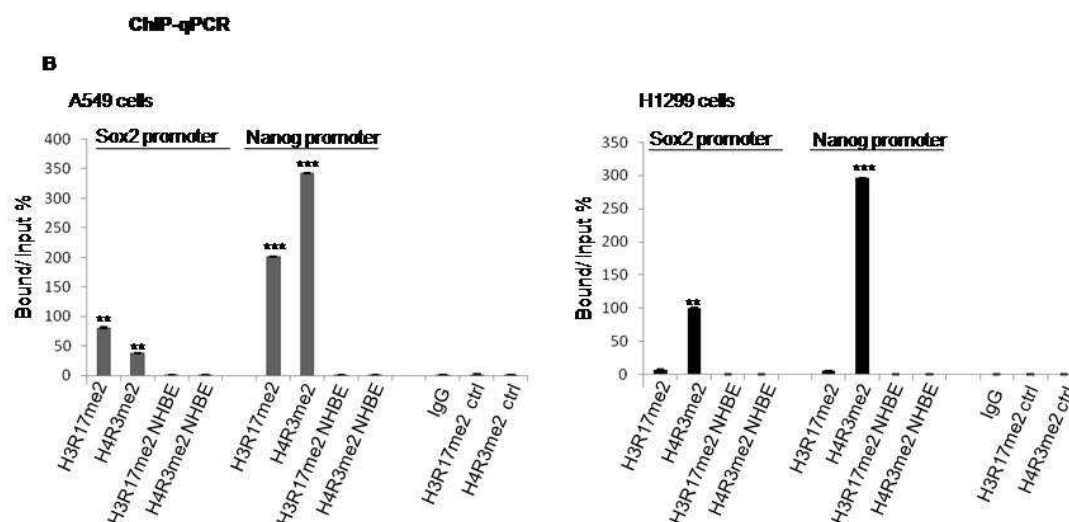


Figure 1 bis. CARM1 est active sur les promoteurs de SOX2 et de NANOG dans les cellules A549 mais pas dans les cellules H1299. B. Les promoteurs de SOX2 et NANOG sont enrichis avec la marque de CARM1 (H3R17me2) dans les cellules A549 mais pas dans les cellules H1299. L'immunoprécipitation de la chromatine a été réalisée sur la chromatine soniquée issue des cellules A549, H1299 et NHBE en utilisant des anticorps anti-histone H3R17me2 et H4R3me2 (l'anticorps contrôle: IgG). L'ADN élué après immunoprécipitation par les anticorps a été analysé par PCR en temps réel avec des amorces amplifiant une région de 400 pb avoisinant le site d'initiation de la transcription du gène cible. Les valeurs sont calculées sous forme de pourcentage de « l'input ». La région contrôle (ctrl) est une région inter génique. Les histogrammes représentent les moyennes issues de 3 expérimentations indépendantes \pm l'erreur standard à la moyenne. ** $p < 0.001$ and *** $p < 0.0001$. NHBE: Normal Human Bronchal/tracheal Epithelial cells,

3- CARM1 et PRMT1 sont co-localisées dans les cellules A549 mais pas dans les cellules H1299 et CARM1 est moins phosphorylé dans les cellules A549 que dans les cellules H1299.

Afin d'examiner la localisation de CARM1 et PRMT1 dans les cellules A549 et H1299, nous avons utilisé la technique Duolink-PLA. Cette méthode détecte les protéines distantes de moins de 40nm. Les cellules sont immunomarquées par 2 anticorps, le premier dirigé contre PRMT1 et le deuxième contre CARM1. L'interprétation du duolink montre que les « spots » rouges sont moins fréquents dans les cellules H1299 que dans

les cellules A549 ($P < 0.0001$) (chaque spot rouge indique une interaction entre les 2 protéines) (figure 2A). Aucun signal n'a été observé quand les cellules ont été immunomarquées avec anti-CARM1 seul ou anti-PRMT1 seul, ces 2 conditions ont été utilisées comme contrôles négatifs. Ces résultats indiquent que la colocalisation de CARM1-PRMT1 est prédominante dans les cellules A549 et moins fréquente dans les cellules H1299. Puisque la marque de CARM1 (H3R17me2) est présente sur les promoteurs de SOX2 et NANOG dans les cellules A549 et pas dans les cellules H1299, la formation du complexe CARM1-PRMT1 est peut-être requise pour l'activation de CARM1.

Dans le but de caractériser la localisation subcellulaire de CARM1 et PRMT1, des fractions nucléaires et cytosoliques ont été analysées avec un Western Blot en utilisant des anticorps anti-CARM1, anti-CARM1 phospho-ser228, et anti-PRMT1 (figure 2B). Les résultats du Western Blot montrent que la protéine CARM1 est abondante dans les 2 lignées cellulaires A549 et H1299 et qu'elle est localisée dans le noyau. Par contre, CARM1 phospho-ser228 est principalement présente dans les cellules H1299 et localisée dans le cytoplasme. La localisation de PRMT1 est inversée dans les 2 lignées cellulaires. Dans les cellules A549, PRMT1 est fortement localisée dans le noyau cependant, dans les cellules H1299, PRMT1 est fortement localisée dans le cytoplasme. Ces résultats suggèrent que CARM1 et PRMT1 ne sont pas enclins à former un complexe de la même façon dans les cellules A549 et les cellules H1299. Ensuite, nous avons testé si la phosphorylation de CARM1 sur la sérine 228 affecte l'association de CARM1 et PRMT1 *in vivo*. Pour cela, une co-immunoprécipitation sur des extraits protéiques des cellules A549 et H1299 a été réalisée avec un anticorps anti-PRMT1 suivie d'un Western Blot avec un anticorps anti-CARM1 (figure 2C). Le même gel a été « strippé » et l'immuno détection a été effectuée avec un anticorps anti-CARM1 phospho-Ser228. L'anticorps anti-PRMT1 coprécipite CARM1 dans les extraits protéiques des cellules A549 mais pas dans ceux des cellules H1299. L'anticorps anti-PRMT1 ne coprécipite pas CARM1 phospho-Ser228. Ces résultats suggèrent que CARM1 et PRMT1 ne peuvent pas interagir si CARM1 est phosphorylée sur le résidu sérine 228.

Figure 2

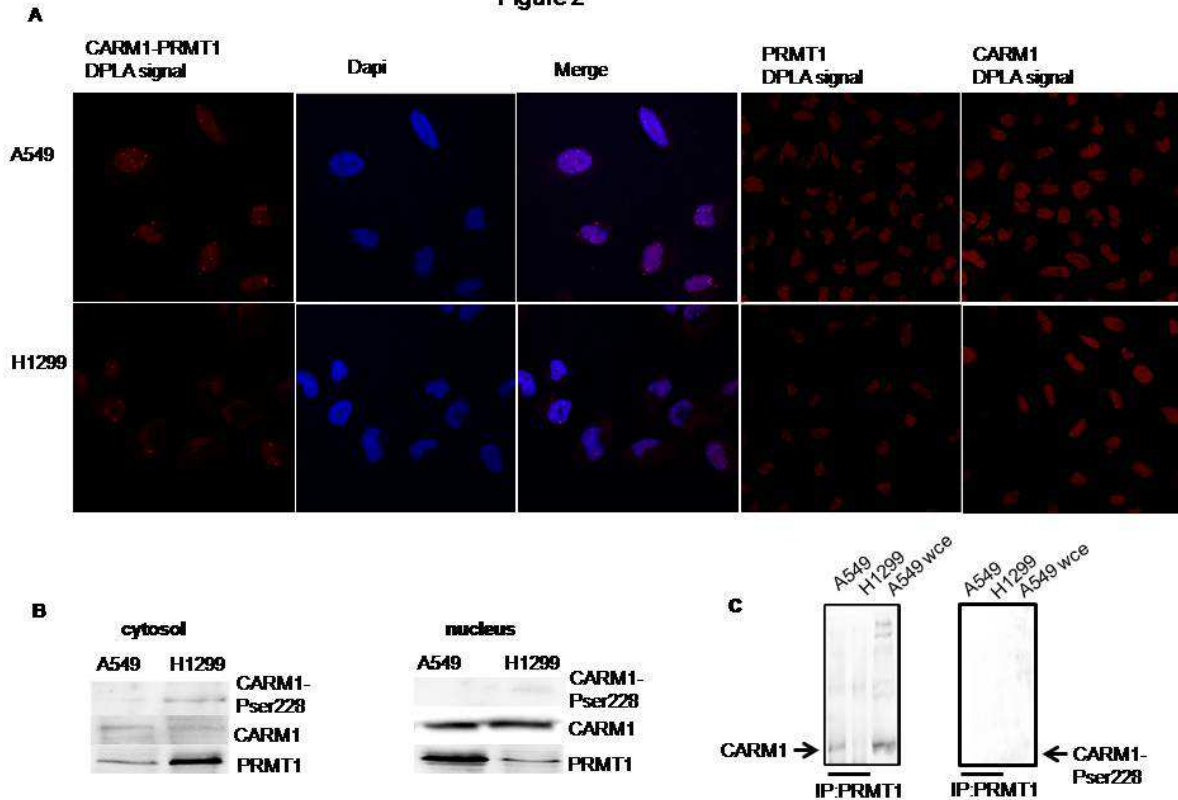


Figure 2. CARM1 et PRMT1 sont co-localisées dans les cellules A549 mais pas dans les cellules H1299 et CARM1 est moins phosphorylée dans les cellules A549 que dans les cellules H1299. (A) La colocalisation de CARM1-PRMT1 est prédominante dans les cellules A549 et moins fréquente dans les cellules H1299. Les cellules A549 et H1299 ont été incubées avec des anticorps dirigés contre CARM1 et PRMT1, ensuite les anticorps ont été marqués par des sondes PLA. Chaque spot rouge indique une interaction entre anti-CARM1 et anti-PRMT1. Les résultats du duolink montrent que les « spots » rouges sont moins fréquents dans les cellules H1299 que dans les cellules A549. Aucun signal n'a été observé quand les cellules ont été immunomarquées avec anti-CARM1 seul ou anti-PRMT1 seul, ces 2 conditions ont été utilisées comme contrôles négatifs. (B) CARM1 phospho-ser228 est présente exclusivement dans les cellules H1299 et localisée dans le cytoplasme. CARM1 non phosphorylée est présente dans les 2 lignées cellulaires et localisée dans le noyau. Dans les cellules A549, CARM1 non phosphorylée et PRMT1 colocalisent dans le noyau alors que dans les cellules H1299, CARM1 phospho-Ser228 et PRMT1 colocalisent dans le cytoplasme. (C) Interaction CARM1/PRMT1 dans les cellules A549 et les cellules H1299. Etude par co-immunoprécipitation. CARM1 et PRMT1 interagissent dans les cellules A549 mais pas dans les cellules H1299. PRMT1 ne peut pas interagir avec la

forme phosphorylée de CARM1 sur la sérine 228. Le puits « A549 contrôle » correspond à un extrait protéique total non immunoprécipité et a été utilisé pour vérifier la validité de l'anticorps anti-CARM1

4- L'inhibition de la phosphorylation du résidu Ser228 de CARM1 restaure la formation du complexe CARM1-PRMT1 dans les cellules H1299.

La kinase qui phosphoryle CARM1 n'est pas encore identifiée. L'examen de la séquence primaire de CARM1 prédit que le peptide contenant la sérine 228 représente un site de phosphorylation pour 3 kinases putatives MLK3 (Mixed lineage kinase-3), CAMK1 (Calcium/calmodulin-dependent protein kinase type 1) et MAP2K3 (Mitogen-activated protein kinase kinase 3) (Xue et al., 2008). Ces 3 kinases sont des kinases candidates qui pourraient phosphoryler la sérine 228 de CARM1. En général, les inhibiteurs des protéines kinases ne sont pas spécifiques d'une seule kinase ce qui représente une difficulté dans le choix d'un inhibiteur spécifique. En se basant sur des études antérieures qui décrivent les inhibiteurs et leurs kinases cibles (Bain et al., 2007, Roux et al., 2002), nous avons sélectionné les inhibiteurs considérés les plus efficaces et les plus spécifiques. Les inhibiteurs sélectionnés sont PD184352 contre MAP2K3, Akt-I-1-2 contre CAMK1 et K252a contre MLK3. Seul l'inhibiteur de MAP2K3 (PD184352) s'est révélé capable d'inhiber la phosphorylation de la sérine 228 de CARM1 dans les cellules H1299 (figure 3A) suggérant que MAP2K3 est la kinase susceptible de phosphoryler le résidu ser228 de CARM1. Cette hypothèse est renforcée par le résultat du Western Blot indiquant que MAP2K3 est surexprimée dans les cellules H1299 par rapport aux cellules A549 (figure 3B). Les cellules H1299 ont été traitées avec la phosphatase alcaline, enzyme qui enlève les groupements phosphates de façon non spécifique, et avec PD184352 qui inhibe MAP2K3. L'anticorps anti-PRMT1 co-précipite CARM1 dans les cellules H1299 traitées par la phosphatase alcaline et le PD184352, mais pas dans les cellules non traitées ni celles traitées avec du DMSO, utilisé comme diluant de PD184352 (contrôle négatif). Inversement, l'anticorps anti CARM1 coprécipite PRMT1 dans les cellules H1299 traitées avec PD184352 (figure 3C). Les conséquences de la phosphorylation de CARM1 sur la sérine 228 ont été aussi étudiées par duolink-PLA. Les cellules A549 et H1299 immunomarquées par les anticorps anti-CARM1 phospho-Ser228 et anti-PRMT1 ne montrent aucun signal PLA. Cependant, le traitement avec le PD184352 restaure la colocalisation CARM1-PRMT1 dans les cellules H1299 comme ceci est indiqué par la détection du signal PLA. Le nombre de spots rouges détectés

dans les cellules H1299 traitées par le PD184352 est plus élevé que celui détecté dans les cellules H1299 non traitées, $p < 0.0001$ (figure 3D). L'ensemble de ces résultats indique que la phosphorylation de CARM1 sur le résidu sérine 228 régule négativement la formation du complexe CARM1-PRMT1.

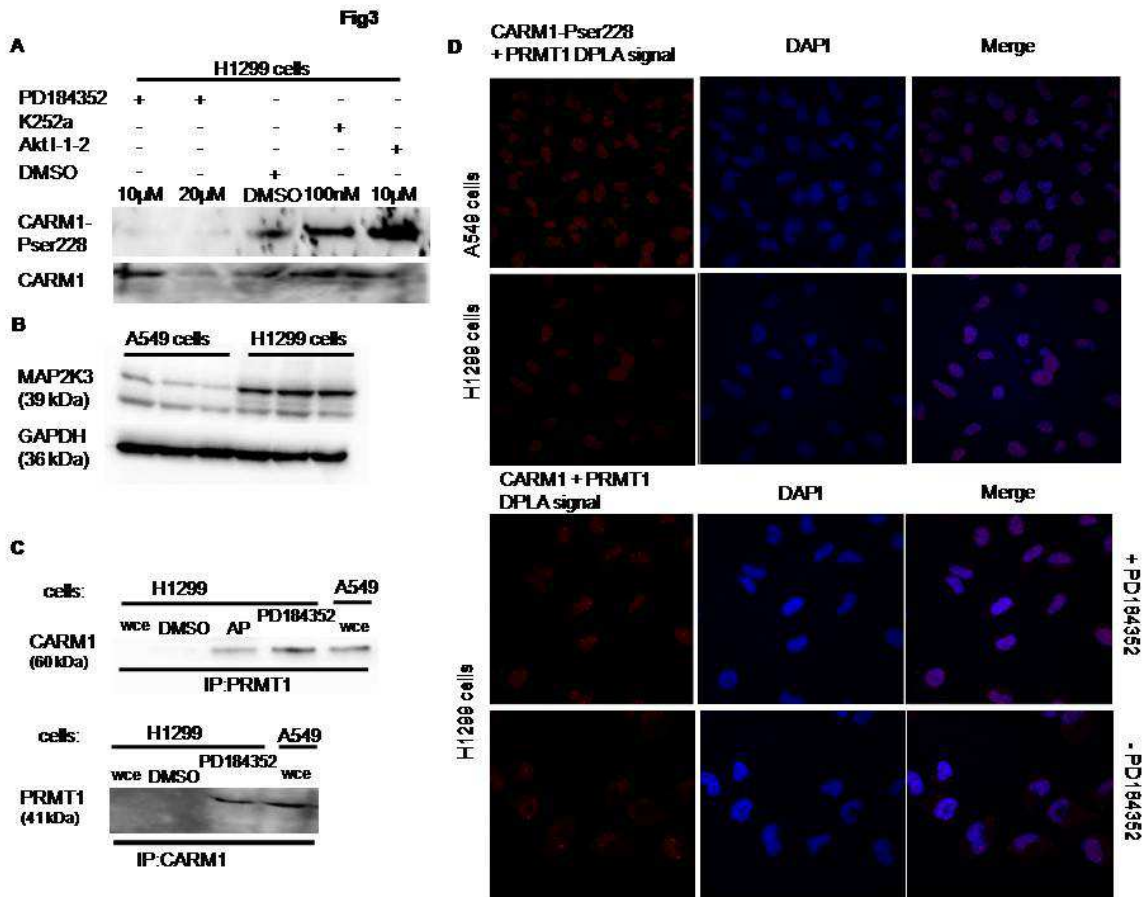


Figure 3. MAP2K3 est une kinase candidate pour la phosphorylation de CARM1 sur la ser 228 et la phosphorylation de CARM1 l'empêche la formation du complexe CARM1-PRMT1. Fig3A. Seul PD184352 qui inhibe MAP2K3 inhibe la phosphorylation de CARM1 sur Ser228. Les cellules H1299 ont été incubées au moins une heure avec les inhibiteurs PD184352, K252a et Akt I-1-2 aux concentrations indiquées. Ces molécules inhibent les kinases MAP2K3, CAMK1 et MLK3 respectivement. Le DMSO a été utilisé comme agent de contrôle. Les extraits cellulaires ont été analysés par SDS-PAGE suivi d'une immunodétection par des anticorps dirigés contre CARM1 phospho-Ser228 (CARM1-PSer228) et CARM1. **(B)** MAP2K3 est surexprimée dans les cellules A549. Les extraits protéiques ont été séparés par SDS-PAGE et l'immunodétection a été effectuée avec un anticorps spécifique dirigé contre MAP2K3. GAPDH a été utilisée comme contrôle qui permet la normalisation des valeurs. **(C)** L'anticorps anti-PRMT1 coprécipite CARM1 et l'anticorps anti-CARM1

coprécipite PRMT1 dans les cellules H1299 traitées avec l'inhibiteur de MAP2K3, PD184352. Les cellules H1299 ont été traitées ou non avec la phosphatase alcaline (PA), PD184352 ou DMSO. Puisque CARM1 phosphorylée n'a pas été détectée dans les cellules A549, ces cellules n'ont pas été traitées par les inhibiteurs des kinases. Les immunoprécipitats avec les anticorps anti-PRMT1 (et anti-CARM1) des extraits cellulaires totaux issus des cellules A549 et H1299 ont été séparés par SDS-PAGE, transférés sur une membrane et immuno-détectés avec des anticorps anti-CARM1 (et anti-PRMT1). **(D) L'analyse par Duolink montre que l'interaction CARM1-PRMT1 est restaurée dans les cellules H1299 après un traitement avec PD184352.** Les cellules A549 et H1299 non traitées ont été immuno-marquées simultanément avec des anticorps dirigés contre CARM1 phospho-Ser228 (CARM1-Pser228) et PRMT1 selon le protocole DPLA. Ensuite, seules les cellules H1299 ont été incubées avec PD184352 et immuno-détectées par des anticorps dirigés contre CARM1 et PRMT1. La fluorescence rouge, qui indique la colocalisation de deux protéines, est détectée dans le cas de la combinaison des 2 anticorps CARM1 et PRMT1 mais pas dans la combinaison CARM1-Pser228 et PRMT1. Cette fluorescence est plus importante dans les cellules traitées avec le PD184352 que les cellules non traitées $p < 0.0001$. Tous les résultats représentés sont issues de 3 expérimentations indépendantes. * différents significativement par rapport au contrôle.

**DISCUSSION
CONCLUSION
PERSPECTIVES**

Discussion/Conclusion :

Partie I: l'invalidation de CARM1 ou PRMT1 induit une réduction de la prolifération dans les lignées cellulaires de cancer de poumon A549 et H1299.

Dans cette étude, nous avons démontré que CARM1 et PRMT1 sont surexprimés significativement dans les tissus tumoraux de 60 patients atteints de cancer du poumon à non petites cellules comparativement aux tissus sains appariés. CARM1 et PRMT1 sont également surexprimés dans les 2 lignées cellulaires de cancer du poumon à non petites cellules, A549 et H1299. Nous avons démontré que l'invalidation de CARM1 ou PRMT1 par transfection transitoire par des siRNA réduit la prolifération cellulaire et inhibe la formation des colonies sur agar. Nos résultats préliminaires montrent que les cytokératines 7 et 8 sont exprimées dans les cellules A549 mais pas dans les cellules H1299 et que le récepteur de la neuromédine B est exprimé dans les 2 lignées cellulaires. Les 2 siRNA ciblant CARM1 et PRMT1 ont induit l'augmentation de l'expression des cytokératines et la diminution de l'expression du récepteur de la neuromédine B. Les siCARM1 et siPRMT1 ont une activité synergique avec l'effet anti-tumoral du paclitaxel, pemetrexed et carboplatine. Ces résultats qui suggèrent que CARM1 et PRMT1 sont impliquées dans la croissance des cellules cancéreuses pulmonaires sont en accord avec la capacité connue de ces 2 enzymes à faciliter la prolifération cellulaire. Le rôle de CARM1 dans le cancer est ambigu. Dans la lignée cellulaire du cancer du sein MCF-7, CARM1 est requis pour l'expression, induite par l'œstrogène, du facteur critique E2F1, qui active le cycle cellulaire (Frieze et al., 2008). Cependant, dans le cancer du sein exprimant le récepteur alpha aux œstrogènes, CARM1 a été identifié comme inhibiteur de la progression tumorale en activant P21 et P27 qui sont des régulateurs négatifs du cycle cellulaire (Al-Dhaderi et al., 2011).

Il a été démontré que la délétion de CARM1 chez les souris (souris CARM1^{-/-}) induit l'augmentation de la prolifération des cellules pulmonaires et le blocage de la différenciation des pneumocytes type 1 vers pneumocytes type 2 (O'Brien et al., 2010). Contrairement à ces résultats reportés pendant le développement embryonnaire, nous montrons dans cette étude que CARM1 et PRMT1 sont surexprimés dans les cancers de poumon et que l'invalidation de CARM1 ou PRMT1 par des siRNA réduit la prolifération et favorise la différenciation. Nous ne pouvons pas expliquer ce résultat divergent. Il est

probable que CARM1 déclenche plusieurs événements dans la cellule et ces événements sont divergents selon le type cellulaire et le contexte biologique.

En plus de CARM1, PRMT1 est probablement impliquée dans la carcinogénèse pulmonaire. Sa fonction proliférative a été déjà démontrée. La perte de PRMT1 dans les fibroblastes de l'embryon de souris induit une hypométhylation de plusieurs protéines, des lésions spontanées de l'ADN, un retard du cycle cellulaire, des défauts de réparation au niveau des points de contrôle du cycle cellulaire, des aneuploidies et polyploidies suggérant que la méthylation par PRMT1 est un événement critique pour assurer l'intégrité du génome et la prolifération cellulaire (Yu et al., 2009). Globalement, quand les PRMTs sont dérégulés, ils en résultent une méthylation aberrante d'une large variété des substrats induisant une activation de diverses voies oncogénique. Du fait d'une coopération réciproque, la dérégulation d'une PRMTs affecte la fonction d'autres PRMTs. En outre, plusieurs PRMTs peuvent modifier le même site sur les protéines histones. Par exemple, H3R17 est méthylée par CARM1 mais aussi par PRMT6 et H4R3 est méthylée par PRMT1-5-6 et 7 (Bedford et Clarke., 2009). Par conséquent, il n'est pas clairement connu ce qui importe le plus, l'activité d'une PRMT spécifique ou le statut de méthylation des arginines en général?

Les PRMTs contribuent à la cancérogenèse notamment en activant la voie de signalisation Wnt/beta-catenin et en potentialisant le niveau d'expression des gènes de pluripotence.

Dans le cancer du colon, le domaine méthyltransférase de CARM1 est responsable de la liaison de CARM1 à la bêta-caténine (Ou et al., 2011). Puisque le domaine méthyltransférase est conservé parmi les PRMTs, il est probable que d'autres PRMTs se lient à la bêta caténine. En effet, nous avons trouvé que l'anticorps anti-PRMT1 co-immunoprécipite la bêta caténine (données non présentées). PRMT1 est impliquée de plusieurs façons dans la régulation de la voie Wnt/ bêta caténine. La stimulation de Wnt active PRMT1 qui stimule G3BP1 (dishevelled-associated protein) provoquant l'accumulation des ARNm de la beta caténine et l'activation de la voie Wnt canonique (Bikkavilli et al., 2011). A l'opposé, PRMT1 méthyle et stabilise l'axine, un régulateur négatif de la voie Wnt (Cha et al., 2011). Chez le xénopus, Wnt contrôle la formation de l'axe dorsal suite à un recrutement de PRMT2 sur les promoteurs des gènes cibles de la voie Wnt (Blythe et al., 2010).

La méthylation des arginines semble être un mécanisme général exigé pour la pluripotence puisque CARM1, PRMT1 et PRMT5 agissent pour maintenir la pluripotence

dans les cellules souches embryonnaires (Wang et al., 2006; Torres-Padilla et al., 2007; Wu et al., 2009; Kim et al., 2008; Tee et al., 2010). Il est raisonnable d'estimer que ces PRMTs assurent la même fonction dans les cellules souches adultes. Ils pourraient détourner l'auto-renouvellement et les voies de pluripotence des cellules souches adultes normales qui, par conséquent, acquièrent la capacité de proliférer et d'initier la cancérogenèse.

Le fait que l'inactivation de CARM1 ou PRMT1 entraîne l'augmentation de l'expression des cytokératines pourrait constituer un mécanisme qui atténue le caractère invasif des cellules du cancer de poumon. En effet, les cytokératines semblent réguler négativement la puissance invasive des lignées cellulaires du cancer du poumon. Il a été démontré que les lignées cellulaires invasives obtenues par sélection répétée des lignées A549 et H1299 (adénocarcinomes pulmonaires), présentent un niveau bas d'expression des cytokératines, en comparaison avec les cellules parentales (Kanaji et al., 2011).

Le récepteur de la neuromédine B (NMBR) fait partie de la famille des récepteurs des bombésines (Jensen et al., 2008). Les récepteurs des bombésines se lient à des peptides bombésin-like libérant la gastrine (GRP) et aux neuromédines B (NMB) qui sont des neuropeptides régulateurs agissant comme des facteurs de croissance autocrine et/ou paracrine. Les peptides bombésin-like et les NMBR sont surexprimés dans les tumeurs, comme le cancer du poumon humain, et favorisent la croissance des cellules (Jensen et al., 2008). Plusieurs travaux ont montré que GRP et NMB stimule la croissance des lignées cellulaires du cancer de poumon (Moody et al., 1992; Siegfried et al., 1999; Makarenkova et al., 2003; Moody et al., 2010). Les inhibiteurs des récepteurs des peptides type bombésine font preuve d'une activité anti-tumorale dans plusieurs cas, ce qui permet de les considérer comme des agents thérapeutiques potentiels contre le cancer (Gonzalez et al., 2008; Jensen et al., 2008; Nagy et al., 2005). Nous avons trouvé que les siCARM1 ou les siPRMT1 induisent une diminution de l'expression de NMBR dans les cellules A549 et les cellules H1299 mettant ainsi en évidence un mécanisme additionnel qui contribue à l'inhibition de la prolifération.

Les protocoles combinant des molécules de platine (cisplatine ou carboplatine) à des agents cytotoxiques comme le paclitaxel ou le pemetrexed sont considérés comme les traitements de première ligne contre le cancer de poumon. Cependant, ces protocoles ont atteint un plateau thérapeutique et d'autres molécules sont nécessaires afin d'élaborer des traitements plus efficaces. Les résultats décrits ci-dessous sont préliminaires et nécessitent d'être approfondis. Nous avons trouvé que les siCARM1 ou

siPRMT1 potentialisent l'activité anti-proliférative du pemetrexed, paclitaxel et carboplatine dans les cellules A549 et du pemetrexed et paclitaxel dans les cellules H1299. Ces résultats doivent être considérés seulement comme un point de départ pour construire un plan de développement et recherches afin de définir l'utilité de cibler CARM1 ou PRMT1 dans le traitement du cancer.

En conclusion, nous avons démontré que CARM1 et PRMT1 sont surexprimés dans 60 échantillons de tumeurs dérivés de patients atteints de cancer du poumon à non petites cellules et dans 2 lignées cellulaires d'adénocarcinome de poumon à non petites cellules. L'inactivation de CARM1 ou PRMT1 induit une diminution de la prolifération, favorise la différenciation et agit en synergie avec les médicaments anti-tumoraux utilisés dans le traitement du cancer du poumon. CARM1 et PRMT1 pourraient activer des voies spécifiques induisant la prolifération ou alternativement la méthylation des arginines pourrait constituer un signal qui incite la cellule à proliférer. Ces résultats justifient l'intérêt de poursuivre les efforts en vue de définir l'utilité d'une stratégie thérapeutique visant à cibler spécifiquement CARM1 ou PRMT1 ou à développer des agents régulant la méthylation des arginines dans les cancers du poumon (Cha et Jho., 2012).

Partie II : La phosphorylation de CARM1 humain sur la sérine 228 inhibe son interaction avec PRMT1

Chez la souris, CARM1 est phosphorylée sur plusieurs résidus serine. Les phosphorylations des résidus serine 217 (Feng et al., 2009) et Ser229 (Higashimoto et al., 2007) sont effectuées par des kinases inconnues jusqu'à l'heure actuelle. Ces phosphorylations se produisent pendant la mitose, induisant une translocation de CARM1 dans le cytoplasme et une inhibition de son activité méthyltransférase. La phosphorylation de la ser217 n'inhibe pas la dimérisation de CARM1 et n'affecte pas la formation du complexe avec P300 et SRC-3, 2 coactivateurs des récepteurs nucléaires. La phosphorylation de la ser229 inhibe la dimérisation de CARM1 mais son effet sur l'interaction de CARM1 avec des protéines partenaires n'a pas été testé. L'équivalent de CARM1 ser229 chez la souris est CARM1 ser228 chez l'être humain. D'un autre côté, la PKA phosphoryle CARM1 sur la sérine 448 (Carascossa et al., 2010). La phosphorylation de la ser448 n'inhibe pas l'activité méthyltransférase mais elle est nécessaire et suffisante pour la liaison directe de CARM1 à ER alpha et cette liaison entraîne l'activation AMPc-dépendante d'ERalpha. Ainsi CARM1 est-elle assujettie à des stimuli régulateurs variés qui conduisent à des réponses spécifiques du signal initiateur.

Nous avons posé la question de savoir si la phosphorylation de CARM1 ser228 chez l'être humain affecte l'interaction entre CARM1 et PRMT1.

Les résultats du Duolink et de l'immunoprécipitation montrent que l'interaction CARM1/PRMT1 a lieu dans les cellules A549 plus fréquemment que dans les cellules H1299 et que CARM1 phospho-Ser228 n'interagit pas avec PRMT1 (Fig.2A et 2C). CARM1 phospho-Ser228 est détectée dans les cellules H1299 mais pas dans les cellules A549 et elle est localisée dans le cytoplasme (Fig.2B). Curieusement, PRMT1 est localisée principalement dans le noyau dans les cellules A549 et dans le cytoplasme dans les cellules H1299. Puisque PRMT1 est un coactivateur transcriptionnel, sa fonction dans le cytoplasme reste à identifier. La localisation subcellulaire de CARM1 et PRMT1 et l'état de phosphorylation de CARM1 incitent à supposer que CARM1 est plus active dans les cellules A549 que dans les cellules H1299. En effet, CARM1 méthyle le promoteur de SOX2 et NANOG dans les cellules A549 mais pas dans les cellules H1299 (Fig.1B) alors que la modification de PRMT1 (H4R3me2) est détectée sur les promoteurs de SOX2 et NANOG dans les 2 lignées cellulaires.

Deux mécanismes entrecroisés pourraient expliquer pourquoi CARM1 est inactive dans les cellules H1299. Le premier est qu'une fraction de CARM1 présente dans les cellules H1299 est phosphorylée sur la sérine 228 et donc elle a perdu son activité méthyltransférase. Le deuxième est que la concentration de PRMT1 dans le noyau est faible ce qui ne favorise pas l'interaction CARM1/PRMT1 (Fig.2B). Ce résultat renforce l'hypothèse que l'interaction de CARM1 avec PRMT1 est requise pour que CARM1 soit active (Kleinschmidt et al., 2008).

Par contre, PRMT1 est active dans les cellules H1299 même si elle n'interagit pas avec CARM1 (Fig.2C). Dans les cellules H1299, la concentration nucléaire de PRMT1 est faible mais elle est suffisante pour méthyliser les promoteurs de SOX2 et de NANOG (Fig.1B). Cependant, l'expression de SOX2 reste inchangée alors que NANOG est surexprimé. Ce résultat suggère que l'expression de NANOG est moins dépendante de CARM1 que celle de SOX2. L'activation de NANOG pourrait être liée majoritairement à l'activité de PRMT1 ou à des mécanismes mettant en jeu d'autres voies de signalisation. En se basant sur un programme de prédiction des kinases spécifiques, nous avons sélectionné 3 kinases putatives (MAP2K3, CAMK1 et MLK3) susceptibles de phosphoryler la ser228 de CARM1. Seul l'inhibiteur de MAP2K3 est efficace pour empêcher la phosphorylation de CARM1 Ser228 (Fig.3A). De plus, l'expression de MAP2K3 est élevée dans les cellules H1299 en comparaison avec les cellules A549

(Fig.3B) fournissant ainsi un mécanisme direct qui explique pourquoi CARM1-phospho-Ser228 est détecté dans les cellules HT1299 et pas A549. D'ailleurs, l'inhibition totale de la phosphorylation de CARM1 par la phosphatase alcaline ou l'inhibition de la phosphorylation de CARM1 Ser228 avec l'inhibiteur de MAP2K3 restaure l'interaction CARM1/ PRMT1 dans les cellules H1299. Ce résultat renforce l'hypothèse que la phosphorylation de CARM1 sur la ser228 altère la formation du complexe entre CARM1 et PRMT1.

Plusieurs mécanismes contribuent à expliquer pourquoi la phosphorylation de CARM1 bloque la méthylation. Il a été suggéré que la phosphorylation de CARM1 sur la ser217 chez la souris n'empêche pas la dimérisation de CARM1 mais rompt la liaison hydrogène entre ser217 et tyr154. Or, cette liaison est critique pour la formation de la poche de liaison dans laquelle se positionne la S-adénosylméthionine (Feng et al., 2009). La phosphorylation de CARM1 sur la ser229 chez la souris agit par un autre mécanisme. La dimérisation des PRMTs est essentielle pour la liaison de la S-adénosylméthionine et le déclenchement de l'activité enzymatique. Il a été proposé que la phosphorylation de CARM1 sur la ser229 déstabilise la formation du dimère CARM1 en interférant avec la liaison entre Asn230 et Asp323 (Higashimoto et al., 2007). Il est à noter que la phosphorylation ne bloque pas toujours la méthylation. En effet, PRMT1 et PRMT5 gardent leur activité de méthylation mais quand elles sont phosphorylées (Rust et al., 2011). D'autres facteurs pourraient intervenir dans la perte de fonction de la protéine si elle est phosphorylée. L'addition d'un groupement phosphate chargé négativement peut désorganiser la structure du peptide. Une protéine donnée pourrait avoir besoin d'interagir avec une autre protéine pour être active. La phosphorylation pourrait perturber la surface d'interaction et abolir ce « crosstalk » ce qui génère une perte de fonction.

Conclusion générale et perspectives :

Notre premier objectif était d'explorer le rôle de CARM1 et PRMT1 dans la croissance cellulaire dans 2 lignées cellulaires d'adénocarcinome du poumon, A549 et H1299. Nos résultats montrent que l'inactivation de CARM1 ou PRMT1 induit une réduction de la prolifération cellulaire et augmente l'activité des médicaments utilisés dans le traitement du cancer du poumon. Afin de valider et approfondir nos résultats, il serait judicieux de déterminer si les siCarm1 agissent contre la transition épithélio-mésenchymateuse ce qui signifierait que Carm1 facilite les métastases : il faudrait analyser des marqueurs

mésenchymateux comme la vimentine et d'autres marqueurs épithéliaux. Il est aussi possible d'analyser la E-cadhérine qui favorise les jonctions cellulaires. Ensuite, il serait possible d'explorer s'il y a une corrélation entre CARM1 et/ou PRMT et l'agressivité de la tumeur chez des patients. Il est intéressant aussi de réaliser une xénogreffe qui consiste à greffer des tumeurs chez des souris puis injecter siCARM1 et siPRMT1 et voir si le volume de la tumeur diminue. Nos résultats montrent aussi que les siCARM1 augmentent l'efficacité de la chimiothérapie. Or, l'inhibition de CDK8 semble augmenter l'efficacité de la chimiothérapie en interférant avec l'activité paracrine des cellules tumorales. L'inhibition de CDK8 diminue le volume des xénogreffes chez les souris soumises à la chimiothérapie. Il serait intéressant d'explorer si la CDK8 est régulée par CARM1.

Le deuxième objectif était d'explorer la conséquence de la phosphorylation de CARM1 sur l'interaction entre CARM1 et PRMT1. Nous avons trouvé que la phosphorylation de Carm1 empêche la formation du dimère CARM1-PRMT1, est ce que ceci est vrai pour d'autres protéines partenaires de CARM1 ?

Pour cela, nous avons essayé de chercher d'autres partenaires de CARM1 et PRMT1. CARM1 et PRMT1 sont impliquées dans l'activation des gènes cibles de P53 (Woojin et al., 2004). Egalement, CARM1 est un modulateur positif de l'activité transcriptionnelle de la voie Wnt/bêta caténine dans le cancer du côlon (Ou et al., 2011). Nos résultats préliminaires montrent que P53 et bêta caténine sont des protéines candidates intéressantes pour approfondir les études mécanistiques surtout dans les cellules H1299. Nous avons déjà mis en route des expérimentations qui visent à déterminer si la phosphorylation de CARM1 empêche le recrutement de CARM1 par la bêta-caténine et par conséquent si la phosphorylation de CARM1 modifie l'expression des gènes cibles de la voie Wnt-bêta caténine. Cette hypothèse est importante dans la mesure où la bêta caténine est dérégulée dans de nombreux cancers. D'autre part, P53 est impliquée dans la régulation de la MAP2K3 dans ces cellules. En effet, une mutation « null » de P53 dans les cellules H1299 induit une surexpression de MAP2K3 (Gurtner et al., 2010). Il est essentiel de déterminer si P53 est mutée dans les cellules H1299 et si la mutation de P53 induit la surexpression de MAP2K3. Par la suite le déroulement des événements serait le suivant: MAP2K3 activerait la phosphorylation de CARM1 sur la serine 228 entraînant la dissociation du complexe CARM1/PRMT1 et la diminution l'expression de SOX2.

Finalement, il serait intéressant de faire une étude transcriptomique pour comparer des cellules exprimant CARM1 et des cellules transfectées avec siCARM1 surtout au niveau de l'expression des gènes de pluripotence (SOX2 et NANOG) et sur les gènes impliqués dans la transition épithélio-mésenchymateuse.

D'autre part, Nous avons achevé de construire une puce (BeadChip) Illumina contenant 384 SNPs localisés dans les enzymes suivantes qui modifient les histones : SUV39H1, SUV39H2, EHMT1, EHMT2, MML2, SET2, DOT1, SUV420H1, SUV420H2, EZH2, CARM1, PRMT1, EP300 et SIRT2. Ces SNPs ont été sélectionnés notamment en fonction des critères suivants: informations recueillies dans la littérature indiquant l'implication des variants génétiques dans les cancers et en particulier dans le cancer bronchique, fréquence allélique, prédiction de l'effet fonctionnel en combinant les résultats de plusieurs bases de données comme VisualSNP et Pupasuite, localisation exonique ou intronique, bloc haplotypique et association avec des Tag SNP.

Cette puce sera testée dans la plateforme de génomique fonctionnelle qui se trouve dans l'équipe Inserm 954- Nancy où j'ai effectué ma thèse afin d'évaluer son intérêt dans le diagnostic et le pronostic du cancer du poumon. Le but est d'identifier un profil de polymorphismes spécifique du sexe, de l'histologie (adénocarcinomes, carcinomes épidermoïdes et carcinomes à petites cellules), du stade TNM (stades I à IIIA), du statut tabagique et des expositions professionnelles. Les échantillons qui seront analysés proviennent d'une population archivée dans le Centre de Ressources Biologiques de Nancy. Ce centre conserve les prélèvements opératoires de plus de 2000 patients opérés pour un cancer du poumon depuis 1989 (tumeurs fixées et congelées, tissu sain fixé et congelé, informations cliniques et survie). Les données concernant le tabagisme et les expositions professionnelles sont également collectées. Dans un premier temps les cancers de poumon « tout venant » seront explorés avec cette puce puis progressivement les patients seront classés en fonction de l'exposition professionnelle. Le résultat attendu est d'identifier une corrélation entre variants génétiques, facteur de risque et type histologique.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Références bibliographiques

Addis RC, Prasad MK, Yochem RL, Zhan X, Sheets TP, Axelman J, Patterson ES, Shablott MJ. Oct3/4 and sox2 regulate Oct3/4 gene in embryonic stem cells. *The journal of biological chemistry* 2004; 280 (7): 5307-5317.

An W, Kim J, Roeder RG. Ordered cooperative functions of PRMT1, p300, and CARM1 in transcriptional activation by p53. *Cell* 2004; 117(6):735-748.

Aletta JM, Hu JC. Protein arginine methylation in health and disease. *Biotechnology annual Review* 2008; 14:203-224.

Angela Risch and Christoph Plass. Lung cancer epigenetics and genetics. *Int. J. Cancer* 2008; 123, 1–7.

Alcock J, Lowe J, England T, Bath P, Sottile V. Expression of sox1, sox2 and sox9 is maintained in adult human cerebellar cortex. *Neuroscience letters* 2009; 450(2):114-116.

Al-Dhaheeri M, Wu J, Skliris GP, Li J, Higashimoto K, Wang Y, White KP, Lambert P, Zhu Y, Murphy L, Xu W. CARM1 is an important determinant of ER α -dependent breast cancer cell differentiation and proliferation in breast cancer cells. *Cancer Res* 2011; 71:2118-2128.

Baylin SB, Esteller M, Rountree MR, Bachman KE, Schuebel K, Herman JG. Aberrant patterns of DNA methylation, chromatin formation and gene expression in cancer. *Hum Mol Genet* 2001; 10(7): 687-692.

Bedford MT, Richard S. Arginine methylation: An emerging regulator of protein function. *Molecular cell* 2005; 18: 263-272.

Boyer LA, Lee TI, Cole MF, Johnstone SE, Levine SS, Zucker JP, Guenther MG, Kumar RM, Murray HL, Jenner RG, Gifford DK, Melton DA, Jaenisch R, Young RA. Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. *Cell* 2005; 122: 947-956

Bernstein B.E, Mikkelsen TS, Xie X, Kamal M, Huebert DJ, Cuff J, Fry B, Meissner A, Wernig M, Plath K, Jaenisch R, Wagschal A, Feil R, Schreiber SL, Lander ES. A bivalent chromatin structure marks key developmental genes in embryonic stem cells. *Cell* 2006; 125, 315–326.

Bowman RV, Yang IA, Semmler AB, Fong KM. Epigenetics of lung cancer. *Respirology* 2006; 11 (4):355-365.

Bain J, Plater L, Elliott M, Shapiro N, Hastie CJ, McLauchlan H, Klevernic I, Arthur JS, Alessi DR, Cohen P. The selectivity of protein kinase inhibitors: a further update. *Biochem J.* 2007,408: 297-315.

Bachand F. Protein arginine methyltransferases: from unicellular eukaryotes to humans. *Eukaryotic cell* 2007 (6): 889-898.

Barr FD, Krohmer LJ, Hamilton JW, Sheldon LA. Disruption of histone modification and CARM1 recruitment by arsenic represses transcription at glucocorticoidreceptor-regulated promoters. *PLoS One* 2009; 4(8):e6766.

Benetti R, Gonzalo S, Jaco I, Muñoz P, Gonzalez S, Schoeftner S, Murchison E, Andl T, Chen T, Klatt P, Li E, Serrano M, Millar S, Hannon G, Blasco MA. A mammalian microRNA cluster controls DNA methylation and telomere recombination via Rbl2-dependent regulation of DNA methyltransferases. *Nature structural and molecular biology* 2008; 15 (3):268-279

Bedford MT, Clarke SG. Protein arginine methylation in mammals: Who, What and Why. *Molecular cell* 2009; 33(1):1-13.

Bedford MT, Tenen DG, Kobayashi S. CARM1 is required for proper control of proliferation and differentiation of pulmonary epithelial cells. *Development* 2010;137: 2147-5216.

Blythe SA, Cha SW, Tadjuidje E, Heasman J, Klein PS. beta-Catenin primes organizer gene expression by recruiting a histone H3 arginine 8 methyltransferase, Prmt 2. *Dev Cell* 2010;19: 220-231.

Biancotto C, Frigè G, Minucci S. Histone modification therapy of cancer. *Advances in genetics* 2010; 70:341-386.

Barrand S, Collas P. Chromatin states of core pluripotency-associated genes in pluripotent, multipotent and differentiated cells. *Biochemical and biophysical research communications* 2010; 391: 762-767.

Bae KM, Su Z, Frye C, McClellan S, Allan RW, Andrejewski JT, Kelley V, Jorgensen M, Steindler DA, Vieweg J, Siemann DW. Expression of pluripotent stem cell reprogramming factors by prostate tumor initiating cells. *Journal of urology* 2010; 183: 2045-2053.

Bikkavilli RK, Malbon CC. Arginine methylation of G3BP1 in response to Wnt3a regulates β -catenin mRNA. *J Cell Sci* 2011; 124: 2310-2320.

Brzeziańska E, Dutkowska A, Antczak A. The significance of epigenetic alterations in lung carcinogenesis. *Mol Biol Rep* 2013; 40(1):309-325

Corjay MH, Dobrzanski DJ, Way JM, Viallet J, Shapira H, Worland P, Sausville EA, Battey JF. Two Distinct Bombesin Receptor Subtypes Are Expressed and Functional in Human Lung Carcinoma Cells. *J Biol Chem*. 1991; 266: 18771–18779.

Chen SL, Loffler KA, Chen D, Stallcup MR, Muscat GE. The coactivator-associated arginine methyltransferase is necessary for muscle differentiation: CARM1 coactivates myocyte enhancer factor-2. *J Biol Chem* 2002; 277(6):4324-4333.

Cuthbert GL, Daujat S, Snowden AW, Erdjument-Bromage H, Hagiwara T, Yamada M, Schneider R, Gregory PD, Tempst P, Bannister AJ, Kouzarides T. Histone deimination antagonizes arginine methylation. *Cell* 2004; 118(5): 545-553.

Catena R, Tiveron C, Ronchi A, Porta S, Ferri A, Tatangelo L, Cavallaro M, Favaro R, Ottolenghi S, Reinbold R, Schöler H, Nicolis SK. Conserved POU binding DNA sites in the sox2 upstream enhancer regulate gene expression in embryonic and neural stem cells. *The journal of biological chemistry* 2004; 279 (40):41846-41857.

Chew JL, Loh YH, Zhang W, Chen X, Tam WL, Yeap LS, Li P, Ang YS, Lim B, Robson P, Ng HH. Reciprocal transcriptional regulation of POU5f1 and sox2 via the OCT4/Sox2 complex in embryonic stem cells. *Molecular and cellular biology* 2005; 25 (14): 6031-6046.

Chickarmane V, Troein C, Nuber UA, Sauro HM, Peterson C. Transcriptional dynamics of the embryonic stem cell switch. *PLoSComput Biol* 2006; 2(9):e123.

Chen Y, Shi L, Zhang L, Li R, Liang J, Yu W, Sun L, Yang X, Wang Y, Zhang Y, Shang Y. The molecular mechanism governing the oncogenic potential of SOX2 in breast cancer. *The journal of biological cancer* 2008; 283 (26) 17969-17978.

Cortese R, Hartmann O, Berlin K, Eckhardt F. Correlative gene expression and DNA methylation profiling in lung development nominate new biomarkers in lung cancer. *Int J Biochem cell boil* 2008; 40:1494–1508.

Carascossa S, Dudek P, Cenni B, Briand PA, Picard D. CARM1 mediates the ligand-independent and tamoxifen-resistant activation of the estrogen receptor alpha by cAMP. *Genes Dev* 2010, 24: 708-719.

Chiou SH, Wang ML, Chou YT, Chen CJ, Hong CF, Hsieh WJ, Chang HT, Chen YS, Lin TW, Hsu HS, Wu CW.. Coexpression of oct4 and nanog enhances malignancy in lung adenocarcinoma by inducing cancer stem cell-like properties and epithelial-mesenchymaltransdifferentiation. *Cancer Res* 2010; 70 (24) 10433-10444.

Cha B, Kim W, Kim YK, Hwang BN, Park SY, Yoon JW et al. Methylation by protein arginine methyltransferase 1 increases stability of Axin, a negative regulator of Wnt signaling. *Oncogene* 2011; 30: 2379-2389.

Cha B, Jho EH. Protein arginine methyltransferases (PRMTs) as therapeutic targets. *Expert Opin Ther Targets* 2012; 16: 651-664.

Chervona Y, Costa M. Histone modifications and cancer: biomarkers of prognosis? *Am J Cancer Res* 2012; 2(5):589-597.

Deltour S. Modifications épigénétiques et cancer. *Medecine Sciences* 2005; 21: 405-411.

Denis H, Ndlovu MN, Fuks F. Regulation of mammalian DNA methyltransferases: a route to new mechanisms. *EMBO Rep.* 2011; 12(7): 647-656.

Eminli S, Utikal J, Arnold K, Jaenisch R, Hochedlinger K. Reprogramming of neural progenitor cells into induced pluripotent stem cells in the absence of exogenous sox2 expression. *Stem Cells* 2005; 26: 2467-2474.

El Messaoudi S, Fabrizio E, Chuchana P, Fauquier L, Chen D, Theillet C, Vandell L, Bedford MT, Sardet C. Coactivator-associated arginine methyltransferase 1 (CARM1) is a positive regulator of the cyclin E1 gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103: 13351-13356.

Fathi Z, Way JW, Corjay MH, Viallet J, Sausville EA, Battey JF. Bombesin Receptor structure and expression in human lung carcinoma cell lines". *Journal of cellular biochemistry* 1996; 24: 237-246.

Fukunaga Y, Bandoh S, Fujita J, Yang Y, Ueda Y, Hojo S, Dohmoto K, Tojo Y, Takahara J, Ishida T. Expression of cytokeratin 8 in lung cancer cell lines and measurement of serum cytokeratin 8 in lung cancer patients. *Lung cancer* 2002; 38: 31-38.

Feinberg AP, Tycko B. The history of cancer epigenetics. *Nature Review/Cancer* 2004; 4:143-153.

Fraga MF, Ballestar E, Villar-Garea A, Boix-Chornet M, Espada J, Schotta G, Bonaldi T, Haydon C, Ropero S, Petrie K, Iyer NG, Pérez-Rosado A, Calvo E, Lopez JA, Cano

A, Calasanz MJ, Colomer D, Piris MA, Ahn N, Imhof A, Caldas C, Jenuwein T, Esteller M. Loss of acetylation at lys16 and trimethylation at lys20 of histone H4 is a common hallmark of human cancer. *Nature genetics* 2005; 37 (4): 391:400

Fujiwara K, Fujimoto N, Tabata M, Nishii K, Matsuo K, Hotta K, Kozuki T, Aoe M, Kiura K, Ueoka H, Tanimoto M. Identification of epigenetic aberrant promoter methylation in serum DNA is useful for early detection of lungcancer. *Clin Cancer Res* 2005; 11(3):1219-25.

Fujiwara T, Mori Y, Chu DL, Koyama Y, Miyata S, Tanaka H, Yachi K, Kubo T, Yoshikawa H, Tohyama M. CARM1 regulates proliferation of PC12 cells by methylating HuD. *Mol Cell Biol.* 2006; 26(6): 2273-2285.

Fabbri M, Garzon R, Cimmino A, Liu Z, Zanesi N, Callegari E, Liu S, Alder H, Costinean S, Fernandez-Cymering C, Volinia S, Guler G, Morrison CD, Chan KK, Marcucci G, Calin GA, Huebner K, Croce CM. MicroRNA-29 family reverts aberrant methylation in lung cancer by targeting DNA methyltransferases 3A and 3B. *PNAS* 2007; 104 (40):15805-15810

Frietze S, Lupien M, Silver PA, Brown M. CARM1 regulates estrogen-stimulated breast cancer growth through up-regulation of E2F1. *Cancer Res.* 2008,68:301-306.

Feng Q, He B, Jung SY, Song Y, Qin J, Tsai SY, Tsai MJ, O'Malley BW. Biochemical control of CARM1 enzymatic activity by phosphorylation. *J Biol Chem.* 2009; 284(52): 36167-36174.

Greatens TM, Niehans GA, Rubins JB, Jessurun J, Kratzke RA, Maddaus MA, Niewoehner DE. Do molecular markers predict survival in Non-Small-Cell Lung cancer? *Am J respire Crit Care Med* 1998; 157: 1093-1097.

Galetzka D, Tralau T, Stein R, Haaf T. Expression of DNMT3A transcripts and nucleolar localization of DNMT3A protein in human testicular and fibroblast cells suggest a role for de novo DNA methylation in nucleolar inactivation. *J Cell Biochem* 2006;98(4):885-894.

Gurtner A, Starace G, Norelli G, Piaggio G, Sacchi A, Bossi G. Mutant P53-induced up-regulation of mitogen-activated protein kinase kinase 3 contributes to gain of function. *J Biol Chem* 2010; 285 (19) 14160-14169.

He H, Lehming N. Global effects of histones modifications. *Briefings in functional genomics and proteomics* 2003; (3): 234-243.

Hong H, Kao C, Jeng MH, Eble JN, Koch MO, Gardner TA, Zhang S, Li L, Pan CX, HuZ, MacLennanGT, ChengL. Aberrant expression of CARM1, a transcriptional coactivator of androgen receptor, in the development of prostate carcinoma and androgen-independent status. *Cancer* 2004; 101(1): 83-89.

Hart AH, Hartley L, Parker K, Ibrahim M, Looijenga LH, Pauchnik M, Chow CW, Robb L. The pluripotency homeobox gene NANOG is expressed in human germ cell tumors. *Cancer* 2005; 104 (10): 2092-2098.

Higashimoto K, Kuhn P, Desai D, Cheng X, Xu W. Phosphorylation-mediated inactivation of coactivator-associated arginine methyltransferase 1. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007, 104: 12318-12323.

Hadnagy A, Beaulieu R, Balicki D. Histone tail modifications and monocanonical functions of histones: perspectives in cancer epigenetics. *Mol Cancer Ther*. 2008; 7(4):740-748.

Hu T, Liu S, Breiter DR, Wang F, Tang Y, Sun S. Octamer 4 small interfering RNA results in cancer stem cell-like cell apoptosis. *Cancer Res* 2008; 68 (16):6533-6540.

Herrmann F, Pably P, Eckerich C, Bedford MT, Fackelmayer FO. Human protein arginine methyltransferases in vivo distinct properties of eight canonical members of the PRMT family. *J Cell Sci* 2009; 122(Pt 5):667-677.

Huang PZ, Lu CL, Li BK, Hong J, Huang L, Wang L, Zhang Y, Yuan YF. OCT4 expression in hepatocellular carcinoma and its clinical significance. *Stem Cells Dev* 2009; 18 (7):1093-1108.

Herceg Z, Vaissière T. Epigenetic mechanisms and cancer. *Epigenetics* 2011; 6 (7):804-819.

Hashimoto S, Chen H, Que J, Brockway BL, Drake JA, Snyder JC, Randell SH, Stripp BR. β -catenin-SOX2 signaling regulates the fate of developing airway epithelium. *Journal of cell science* 2011; 125: 932-942.

Hotta K, Kiura K, Fujiwara Y, Takigawa N, Hisamoto A, Ichihara E, Tabata M, Tanimoto M. Role of survival post-progression in phase III trials of systemic chemotherapy in advanced Non-Small-Cell Lung Cancer: A systematic Review". *Plos One* 2011; 6(11):e26646.

Hubaux R, Becker-Santos DD, Enfield KS, Lam S, Lam WL, Martinez VD. Arsenic, asbestos and radon: emerging players in lung tumorigenesis. *Environ Health* 2012;11:89.

Imhof A. Histone modifications: An assembly line for active chromatin? *Current Biology* 2003; 13: 22-24.

Iberg AN, Espejo A, Cheng D, Kim D, Michaud-Levesque J, Richard S, Bedford MT. Arginine methylation of the histone H3 tail impedes effector Binding". *The journal of biological chemistry* 2007; 283 (6):3006-3010.

Ishii T, Bandoh S, Fujita J, Ohtsuki Y, Tojo Y, Kanaji N, Fukunaga Y, Ueda Y, Ishida T, Kubo A. Full-length cytokeratin 8 is released and circulates in patients with Non-Small Cell lung cancer. *Tumor Biology* 2008; 29:57-62.

Jackson JP, Johnson L, Jasencakova Z, Zhang X, PerezBurgos L, Singh PB, Cheng X, Schubert I, Jenuwein T, Jacobsen SE. Dimethylation of histone H3 lysine 9 is a critical mark for DNA methylation and gene silencing in *Arabidopsis thaliana*. *Chromosoma* 2004 ;112(6):308-315.

Jair KW, Bachman KE, Suzuki H, Ting AH, Rhee I, Yen RW, Baylin SB, Schuebel KE. De novo CpG island methylation in human cancer cells. *Cancer Res* 2006; 66(2):682-692.

Jensen RT, Battey JF, Spindel ER, Benya RV. International union of pharmacology.LXVIII. Mammalian Bombesinreceptors: Nomenclature, distribution, pharmacology, signaling and functions in normal and disease states. *Pharmacol Rev* 2008; 60:1-42.

Jia X, Li X, Xu Y, Zhang S, Mou W, Liu Y, Liu Y, Lv D, Liu CH, Tan X, Xiang R, Li N. SOX2 promotes tumorigenesis and increases the anti-apoptotic property of human prostate cancer cell. *Journal of molecular cell biology* 2011; 3 (4):230-238.

Kersting M, Friedl C, Kraus A, Behn M, Pankow W, Schuermann M. Differential frequencies of p16(INK4a) promoter hypermethylation, p53 mutation, and K-ras mutation in exfoliative material mark the development of lung cancer in symptomatic chronic smokers. *J Clin Oncol* 2000;18(18):3221-9

Kouzarides T. Histone methylation in transcriptional control. *Current opinion in genetics and development* 2002; 12: 198-209.

Kim J, Lee J, Yadav N, Wu Q, Carter C, Richard S, Richie E, Bedford MT. Loss of CARM1 results in hypomethylation of thymocyte cyclic AMP-regulated phosphoprotein and deregulated early T cell development. *J Biol Chem*. 2004; 279(24):25339-25344.

Kleinschmidt MA, Bauer UM. The protein arginine methyltransferases CARM1 and PRMT1 cooperate in gene regulation. *Nuc.Ac.Res* 2008; 36 (10): 3202-3213.

Kashyap V, Rezende NC, Scotland KB, Shaffer SM, Persson JL, Gudas LJ, Mongan NP. Regulation of stem cell pluripotency and differentiation involves a mutual regulatory circuit of the nanog, oct4 and sox2 pluripotency transcription factors with polycomb repressive complexes and stem cell micro-RNAs. *Stem cells Dev* 2009; 18(7):1093-1108.

Kim D, Lee J, Cheng D, Li J, Carter C, Richie E, Bedford MT. Enzymatic activity is required for the in vivo functions of CARM1. *J Biol Chem*. 2010; 285(2):1147-1152.

Kim YR, Lee BK, Park RY, Nguyen NT, Bae JA, Kwon DD, Jung C. Differential CARM1 expression in prostate and colorectal cancers. *BMCCancer*. 2010;10:197.

Kanaji N, Bando S, Ishii T, Fujita J, Ishida T, Matsunaga T, Kubo A. Cytokeratins negatively regulate the invasive potential of lung cancer cell lines. *Oncology Reports* 2011; 26:763-768.

Kwon YJ, Lee SJ, Koh JS, Kim SH, Lee HW, Kang MC, Bae JB, Kim YJ, Park JH. Genome-wide analysis of DNA methylation and the gene expression change in lung cancer. *J Thorac Oncol* 2012; 7(1):20-33.

Luger K, Richmond TJ. DNA binding within the nucleosome core. *Curr Opin Struct Biol*. 1998; 8(1):33-40.

Li H, Park S, Kilburn B, Jelinek MA, Henschen-Edman A, Aswad DW, Stallcup MR, Laird-Offringa IA. Lipopolysaccharide-induced methylation of HuR, an mRNA-stabilizing protein, by CARM1. Coactivator-associated arginine methyltransferase. *J Biol Chem* 2002; 277(47):44623-44630.

Lee DY, Teyssier C, Strahl BD, Stallcup MR. Role of protein methylation in regulation of transcription. *Endocr Rev* 2005; 26(2):147-170.

Lin T, Chao C, Saito S, Mazur SJ, Murphy ME, Appella E, Xu Y. P53 induces differentiation of mouse embryonic stem cells by suppressing Nanog expression. *Nat Cell Biol* 2005; 7(2):165-171.

Levasseur DN, Wang J, Dorschner MO, Stamatoyannopoulos JA, Orkin SH. Oct4 dependence of chromatin structure within the extended nanog locus in ES cells. *Genes Dev* 2008; 22: 575-580.

Lorenzo AD, Bedford MT. Histone arginine methylation. *FEBS letters* 2010; 585: 2024-2031.

Lokk K, Vooder T, Kolde R, Välk K, Võsa U, Roosipuu R, Milani L, Fischer K, Koltsina M, Urgard E, Annilo T, Metspalu A, Tõnisson N. Methylation markers of early stage Non-small cell lung cancer. *Plos One* 2010; 7 (6) e39813.

Lengerke C, Fehm T, Kurth R, Neubauer H, Scheble V, Müller F, Schneider F, Petersen K, Wallwiener D, Kanz L, Fend F, Perner S, Bareiss PM, Staebler A. Expression of the embryonic stem cell marker SOX2 in early-stage breast carcinoma. *BMC cancer* 2011; 11:42.

Moody TW, Staley J, Zia F, Coy DH, Jensen RT. Neuromedin B binds with high affinity, elevates cytosolic calcium and stimulates the growth of small-cell lung cancer cell lines. *J Pharmacol Exp Ther* 1992; 263:311-317.

Mass MJ, Wang L. Arsenic alters cytosine methylation patterns of the promoter of the tumor suppressor gene p53 in human lung cells: a model for a mechanism of carcinogenesis. *Mutat Res* 1997; 386(3):263-277.

Momparler RL, Bovenzi V. DNA methylation and cancer. *J Cell Physiol.* 2000; 183(2):145-154.

Makarenkova VP, Shurin GV, Tourkova IL, Balkir L, Pirtskhalaishvili G, Perez L, Gerein V, Siegfried JM, Shurin MR. Lung cancer-derived bombesin-like peptides down-regulate the generation and function of human dendritic cells. *J Neuroimmunol* 2003; 145: 55-67.

Moggs JG, Goodman JI, Trosko JE, Roberts RA. Epigenetics and cancer: implications for drug discovery and safety assessment. *Toxicol Appl Pharmacol* 2004; 196(3): 422-430.

Minucci S, Pelicci PG. Histone deacetylase inhibitors and the promise of epigenetic (and more) treatments for cancer. *Nat Rev Cancer* 2006; 6(1):38-51. Review.

Majumder S, Liu Y, Ford OH 3rd, Mohler JL, Whang YE. Involvement of arginine methyltransferase CARM1 in androgen receptor function and prostate cancer cell viability. *Prostate* 2006; 66(12):1292-1301.

Madjd Z, Hashemi F, Shayanfar N, Farahani E, Zarnani AH, Sharifi AM, Akbari ME. OCT-4, an Embryonic Stem Cell Marker Expressed in Breast, Brain and Thyroid Carcinomas Compared to Testicular Carcinoma. *IJCP* 2009; 4: 167-173

Moody TW, Berna MJ, Mantey S, Sancho V, Ridnour L, Wink DA, Chan D, Giaccone G, Jensen RT. Neuromedin B receptors regulate EGF receptor tyrosine phosphorylation in lung cancer cells". *European Journal of pharmacology* 2010; 637: 38-45

Miyanari Y, Torres-Padilla ME. Control of ground-state pluripotency by allelic regulation of Nanog. *Nature* 2012;483(7390):470-473.

Nagy A, Schally AV. Targeting cytotoxic conjugates of somatostatin, luteinizing hormone-releasing hormone and bombesin to cancers expressing their receptors: a "smarter" chemotherapy. *Curr Pharm Des* 2005; 11:1167-1180.

Ng JH, Heng JC, Loh YH, Ng HH. Transcriptional and epigenetic regulations of embryonic stem cells. *Mutation research* 2008; 647: 52-58

Nelson HH, Marsit CJ, Christensen BC, Houseman EA, Kotic M, Wiemels JL, Karagas MR, Wrensch MR, Zheng S, Wiencke JK, Kelsey KT. Key epigenetic changes associated with lung cancer development. *Epigenetics* 2012; 7: 559-566.

Okano M, Bell DW, Haber DA, Li E. DNAmethyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell*.1999 Oct 29;99(3):247-257.

O'Brien KB, Alberich-Jordà M, Yadav N, Kocher O, Diruscio A, Ebralidze A, Levantini E, Sng NJ, Bhasin M, Caron T, Kim D, Steidl U, Huang G, Halmos B, Rodig SJ, Daujat S, Kouzarides T. Crosstalk between CARM1 methylation and CBP acetylation on histone H3. *Current biology* 2002; 12: 2090-2097.

O'Brien KB, Alberich-Jordà M, Yadav N, Kocher O, Diruscio A, Ebralidze A, Levantini E, Sng NJ, Bhasin M, Caron T, Kim D, Steidl U, Huang G, Halmos B, Rodig SJ, Bedford MT, Tenen DG, Kobayashi S. CARM1 is required for proper control of proliferation and differentiation of pulmonary epithelial cells. *Development* 2010; 137: 2147-2156.

Poirier L A. Methyl group deficiency in hepatocarcinogenesis. *Drug MetabRev* 1994; 26: 185-199.

Pogribny IP, Tryndyak VP, Muskhelishvili L, Rusyn I, Ross SA. Methyl deficiency, alterations in global histone modifications, and carcinogenesis. *J Nutr.* 2007; 137(1 Suppl):216S-222S.

Perrett, Rebecca M, Turnpenny, Lee, Eckert, Judith J, O'shea, Marie, Sonne, Si Brask, Cameron, Iain T, Wilson, David I, Rajpert-De Meyts, Ewa R. and Hanley, Neil A. The early human germ cell lineage does not express SOX2 during in vivo development or upon in vitro culture. *Biology of reproduction* 2008; 78: 852-855.

Pfeifer GP, Rauch TA. DNA methylation patterns in lung carcinomas. *Seminars in cancer biology* 2009; 19: 181-187.

Parfitt DE, Goetz MZ. Epigenetic modification affecting expression of cell polarity and cell fate genes to regulate lineage specification in the early mouse embryo. *Molecular Biology of the cell* 2010; 21: 2649-2660.

Robertson KD. DNA methylation, methyltransferases, and cancer. *Oncogene* 2001; 20: 3139-3155.

Roux PP, Dorval G, Boudreau M, Angers-Loustau A, Morris SJ, Makkerh J, Barker PA. K252a and CEP1347 are neuroprotective compounds that inhibit mixed-lineage kinase-3 and induce activation of Akt and ERK. *J Biol Chem.* 2002, 277:49473-49480.

Russo AL, Thiagalingam A, Pan H, Califano J, Cheng KH, Ponte JF, Chinnappan D, Nemani P, Sidransky D, Thiagalingam S.

Differential DNA hypermethylation of critical genes mediates the stagespecific tobacco smoke-induced neoplastic progression of lung cancer. *Clin Cancer Res* 2005; 11(7):2466-2470.

Risch A, Plass C. Lung cancer epigenetics and genetics. *Int J Cancer* 2008; 123:1-7

Robertson KD. DNA methylation and human disease. *Nature Reviews Genetics* 2005; 6: 597-610.

Rodda DJ, Chew JL, Lim LH, Loh YH, Wang B, Ng HH, Robson P. Transcriptional regulation of Nanog by OCT4 and NANOG. *The journal of biological chemistry* 2005; 280 (26): 24731-24737.

Rezai-Zadeh N, Zhang X, Namour F, Fejer G, Wen YD, Yao YL, Gyory I, Wright K, Seto E. Targeted recruitment of a histone H4-Specific methyltransferase by the transcription factor YY1. *Gens and development* 2010; 17: 1019-1029.

Rust HL, Thompson PR. Kinase consensus sequences: a breeding ground for crosstalk. *ACS Chem Biol* 2011, 6:881-892.

Scott HS, Antonarakis SE, Lalioti MD, Rossier C, Silver PA, Henry MF. Identification and characterization of two putative human arginine methyltransferases (HRMT1L1 and HRMT1L2). *Genomics* 1998; 48 (3):330-340.

Siegfried JM, Krishnamachary N, Gaither Davis A, Gubish C, Hunt JD, Shriver SP. Evidence for autocrine actions of neuromedin B and gastrin-releasing peptide in Non-Small cell lung cancer. *Pulmonary pharmacology and therapeutics* 1999; 12: 291:302.

Shi Y, Lan F, Matson C, Mulligan P, Whetstine JR, Cole PA, Casero RA, Shi Y. Histone Demethylation Mediated by the Nuclear Amine Oxidase Homolog LSD1" *Cell* 2004;119: 941-953.

Scoumanne A, Chen X. Protein methylation: anew regulator of the P53 tumor suppressor. *Histolhistopathol* 2008; 23 (9): 1143-1149.

Sikorska M, Sandhu JK, Deb-Rinker P, Jeziernski A, Leblanc J, Charlebois C, Ribocco-Lutkiewicz M, Bani-Yaghoob M, Walker PR. Epigenetic modifications of SOX2 enhancers, SRR1 and SRR2, correlate with in vitro neural differentiation. *Journal of neuroscience Research* 2008; 86: 1680-1693.

Seligson DB, Horvath S, McBrien MA, Mah V, Yu H, Tze S, Wang Q, Chia D, Goodglick L, Kurdistani SK. Global levels of histone modifications predict prognosis in different cancers. *Am J Pathol.* 2009;174(5):1619-1628.

Sawan C, Herceg Z. Histone modifications and cancer. *Advances in genetics* 2010; 70:57-85.

Sholl LM, Barletta JA, Yeap BY, Chirieac LR, Hornick JL. SOX2 protein expression is an independent poor prognostic indicator in stage I lung adenocarcinoma. *Am J SurgPathol* 2010; 34 (8): 1193-1198.

Shan J, Shen J, Liu L, Xia F, Xu C, Duan G, Xu Y, Ma Q, Yang Z, Zhang Q, Ma L, Liu J, Xu S, Yan X, Bie P, Cui Y, Bian XW, Qian C. Nanog regulates self renewal of cancer stem cells through the insulin like growth factor pathway in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology.* 2012; 56(3):1004-1014.

Tomioka M, Nishimoto M, Miyagi S, Katayanagi T, Fukui N, Niwa H, Muramatsu M, Okuda A. Identification of sox2 regulatory region which is under the control of oct-3/4-sox2 complex. *Nuc ac Res* 2002; 30 (14): 3202-3213.

Tsukamoto T, Mizoshita T, Mihara M, Tanaka H, Takenaka Y, Yamamura Y, Nakamura S, Ushijima T, Tatematsu M. Sox2 expression in human stomach adenocarcinomas with gastric and intestinal-mixed phenotypes. *Histopathology* 2005; 46: 649-658.

Torres-Padilla ME, Parfitt DE, Kouzarides T, Zernicka-Goetz M. Histone arginine methylation regulates pluripotency in the early mouse embryo. *Nature* 2007;445(7124):214-218.

Torrisani J, Hanoun N, Laurell H, Lopez F, Maoret JJ, Souque A, Susini C, Cordelier P, Buscail L. Identification of an upstream promoter of the human somatostatin receptor, hSSTR2, which is controlled by epigenetic modifications. *Endocrinology* 2008; 149(6):3137-3147.

Terry J, Leung S, Laskin J, Leslie KO, Gown AM, Ionescu DN. Optimal immunohistochemical markers for distinguishing lung adenocarcinomas from squamous cell carcinomas in small tumor samples. *Am J SurgPathol* 2010; 34: 1805-1811

Tee WW, Pardo M, Theunissen TW, Yu L, Choudhary JS, Hajkova P, Surani MA. Prmt5 is essential for early mouse development and acts in the cytoplasm to maintain ES cell pluripotency. *Genes Dev* 2010;24: 2772-2777.

Vuillemenot BR, Hutt JA, Belinsky SA. Gene-promoter hypermethylation as a biomarker in lung cancer. *Mol Cancer Res.* 2006; 4(4):267-273.

Van Den Broeck A, Brambilla E, Moro-Sibilot D, Lantuejoul S, Brambilla C, Eymin B, Khochbin S, Gazzeri S. Loss of histone H4K20 trimethylation occurs in preneoplasia and influences prognosis of Non-Small Cell Lung Cancer. *Human Cancer Biology* 2008; 14 (22):7237-7245.

Vaissière T, Sawan C, Herceg Z. Epigenetic interplay between histone modifications and DNA methylation in gene silencing. *Mutat Res* 2008 Jul-Aug;659(1-2):40-8.

Vandermeers F, Kettmann F, Willems L. Implication des modifications épigénétiques dans les cancers: développement de nouvelles approches thérapeutiques. *BiotechnolAgronSoc Environ* 2008; 12 (2) 211-218

Van den Berg DL, Zhang W, Yates A, Engelen E, Takacs K, Bezstarosti K, Demmers J, Chambers I, Poot RA. Estrogen-related receptor beta interacts with oct4 to positively regulate nanog gene expression. *Molecular and cellular biology* 2008; 28 (19) 5986-5995.

Vaissière T, Hung RJ, Zaridze D, Moukeria A, Cuenin C, Fasolo V, Ferro G, Paliwal A, Hainaut P, Brennan P, Tost J, Boffetta P, Herceg Z. Quantitative analysis of DNA methylation profiles in lung cancer identifies aberrant DNA methylation of specific genes and its association with gender and cancer risk factors. *Cancer Res* 2009; 69 (1): 243-252.

Vineis P, Chuang SC, Vaissière T, Cuenin C, Ricceri F; Genair-EPIC Collaborators, Johansson M, Ueland P, Brennan P, Herceg Z. DNA methylation changes associated with cancer risk factors and blood levels of vitamin metabolites in a prospective study. *Epigenetics* 2011; (2):195-201.

Wysocka J, Allis CD, Coonrod S. Histone arginine methylation and its dynamic regulation. *Frontiers in Bioscience* 2006; 11: 344-355.

Waterland RA, Travisano M, Tahiliani KG. Diet-induced hypermethylation at agouti viable yellow is not inherited transgenerationally through the female. *FASEB J* 2007; 21(12):3380-3385.

Watanabe H, Soejima K, Yasuda H, Kawada I, Nakachi I, Yoda S, Naoki K, Ishizaka A. Deregulation of histone lysine methyltransferases contributes to oncogenic transformation of human bronchoepithelial cells. *Cancer Cell Int* 2008; 38:15.

Wang J, Levasseur DN, Orkin SH. Requirement of nanog dimerization for stem cell self-renewal and pluripotency. *PNAS* 2008; 105 (17) 6326-6331.

Wolf SS. The protein arginine methyltransferase family: an update about function, new perspectives and the physiological role in humans. *Cell Mol Life Sci* 2009; 66: 2109-2121.

Wu SC, Zhang Y. Minireview: Role of protein methylation and demethylation in nuclear hormone signaling. *Molecular endocrinology* 2009; 23: 1323-1334.

Wu Q, Bruce AW, Jedrusik A, Ellis PD, Andrews RM, Langford CF, Glover DM, Zernicka-Goetz M. CARM1 is required in embryonic stem cells to maintain pluripotency and resist differentiation. *Stem Cells* 2009;27: 2637-2645.

Wilbertz T, Wagner P, Petersen K, Stiedl AC, Scheble VJ, Maier S, Reischl M, Mikut R, Altorki NK, Moch H, Fend F, Staebler A, Bass AJ, Meyerson M, Rubin MA, Soltermann A, Lengerke C, Perner S. SOX2 gene amplification and protein overexpression are associated with better outcome in squamous cell lung cancer. *Modern Pathology* 2011; 24: 944-953.

Xue Y, Ren J, Gao X, Jin C, Wen L, Yao X. GPS 2.0, a tool to predict kinase-specific phosphorylation sites in hierarchy. *Mol Cell Proteomics* 2008; 7:1598-1608.

Yadav N, Lee J, Kim J, Shen J, Hu MC, Aldaz CM, Bedford MT. Specific protein methylation defects and gene expression perturbations in coactivator-associated arginine methyltransferase 1-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100(11):6464-6468.

Yan Y, Kluz T, Zhang P, Chen HB, Costa M. Analysis of specific lysine histone H3 and H4 acetylation and methylation status in clones of cells with a gene silenced by nickel exposure. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2003;190(3):272-277.

Yoon KA, Park S, Hwangbo B, Shin HD, Cheong HS, Shin HR, et al. Genetic polymorphisms in the Rb-binding zinc finger gene RIZ and the risk of lung cancer. *Carcinogenesis* 2007;28(9):1971-1977.

Yuan H, Corbi N, Basilico C, Dailey L. Developmental-specific activity of the FGF-4 enhancer requires the synergistic action of sox2 and oct3. *Genes ET development* 2009; 9: 2635-2645.

Yu Z, Chen T, Hébert J, Li E, Richard S. A mouse PRMT1 null allele defines an essential role for arginine methylation in genome maintenance and cell proliferation. *Mol Cell Biol.* 2009; 29(11):2982-2996.

You JS, Kang JK, Seo DW, Park JH, Park JW, Lee JC, Jeon YJ, Cho EJ, Han JW. Depletion of embryonic stem cell signature by histone deacetylase inhibitor in NCCIT cells: involvement of nanog suppression. *Cancer Res* 2009; 69 (14):5716-5725.

Yuan P, Kadara H, Behrens C, Tang X, Woods D, Solis LM, Huang J, Spinola M, Dong W, Yin G, Fujimoto J, Kim E, Xie Y, Girard L, Moran C, Hong WK, Minna JD, Wistuba II. Sex determining region Y-Box 2 (SOX2) is a potential cell-lineage gene highly expressed in the pathogenesis of squamous cell carcinomas of the lung. *Plos one* 2010; 5 (2).

Yang M, Nonaka D. A study of immunohistochemical differential expression in pulmonary and mammary carcinomas. *Modern Pathology* 2010; 23:654-661.

Yoon KA, Gil HJ, Han J, Park J, Lee JS. Genetic polymorphisms in the polycomb group gene EZH2 and the risk of lung cancer. *J Thorac Oncol.* 2010; 5(1):10-6.

Yang IV, Schwartz DA. Epigenetic control of gene expression in the lung. *Am J Respir Crit Care Med* 2011; 183:1295-1301.

Y.Lee and M.R.Stallcup. Roles of protein arginine methylation in DNA damage signaling pathways. *Cell Cycle* 2011; 10 (9):1343-1344.

Zhou X, Sun H, Ellen TP, Chen H, Costa M. Arsenite alters global histone H3 methylation. *Carcinogenesis* 2008; (9):1831-1836.

<http://www.ligue-cancer.net/shared/brochures/dangers-amiante.pdf>

FICHES TECHNIQUES

Fiche 1

LIGNEES CELLULAIRES-CONDITIONS DE CULTURE

Les lignées cellulaires utilisées sont les cellules NHBE⁽¹⁾, A549⁽²⁾ et H1299⁽³⁾. La lignée NHBE est une lignée des cellules épithéliales bronchiales saines bien différenciées. Les cellules A549 et H1299 sont issues d'un carcinome pulmonaire à non petites cellules. Les cellules NHBE sont maintenues dans du milieu BEBM complété avec des matières nutritives pour devenir BEGM⁽⁴⁾. Les cellules A549 sont maintenues dans du milieu F12K⁽⁵⁾ et les cellules H1299 dans du milieu RPMI⁽⁶⁾ tous les deux supplémenté par 10% de sérum de veau foetal décomplémenté⁽⁷⁾, 100U/ml pénicilline⁽⁸⁾ et 100µg/ml de streptomycine⁽⁸⁾.

- Décongeler une ampoule de lignée cellulaire (Fiche 2)
- Introduire 5 mL de la solution dans un flacon de culture de 25 cm²⁽⁹⁾
- Incuber à 37°C en atmosphère humide (5% CO₂/ 95% air)
- Changer le milieu tous les deux ou trois jours

Elles sont étudiées lorsqu'elles ont atteintes 80% de confluence. Des tests de mycoplasmes sont réalisés régulièrement.

⁽¹⁾Lignée NHBE : LONZA (France) ; CC-2541, numéro de lot **10000105116**

⁽²⁾Lignée A549 : ATCC (Manassas) ; CRL-185, numéro de lot **7503618**

⁽³⁾Lignée H1299 : ATCC (Manassas) ; CRL-5803, numéro de lot **58108466**

⁽⁴⁾BEGM, Lonza (USA)

⁽⁵⁾F-12K,+L-Glutamine, GIBCO/Invitrogen ; Cergy-Pantoise, France

⁽⁶⁾RPMI 1640, +L-Glutamine, GIBCO/Invitrogen ; Cergy-Pantoise, France

⁽⁷⁾SVF, Sérum de veau foetal non décomplémenté : Eurobio ; Courtabœuf, France

⁽⁸⁾Penicilline/Streptomycine,GIBCO/Invitrogen

⁽⁹⁾ Plastiques stériles à usage unique : Falcon, Dutscher, Brumath, France

Fiche 2

DECONGELATION DES LIGNEES

- Sortir le cryotube⁽¹⁾ de l'azote liquide et le réchauffer rapidement dans un bain-marie à 37°C
- Nettoyer l'extérieur du cryotube à l'alcool
- Transvaser le contenu du cryotube dans un tube de 15 mL contenant 10 mL de milieu de culture
- Centrifuger 5 min à 700 g pour l'élimination du glycérol ou du DMSO⁽²⁾
- Eliminer le surnageant et reprendre le culot dans 5 mL de milieu de culture
- Ensemencer une boîte de culture de 25 cm²
- Changer le milieu après 48h

⁽¹⁾Cryotube, Nalgène : VWR international, Fontenay-sous-Bois, France

⁽²⁾DMSO (Dimethylsulfoxide) : Gibco/ Invitrogen ; Cergy-Pontoise, France

Fiche3

REPIQUAGE DES LIGNEES

Tous les produits doivent être à température ambiante

- Eliminer le milieu de culture
- Rincer le tapis cellulaire avec du PBS stérile⁽¹⁾
- Ajouter de la trypsine-EDTA⁽²⁾ 0,05% à raison de 40 µL par cm² à trypsiner
- Incuber 5 à 10 min à 37°C
- Préparer pendant ce temps un tube de 15 mL avec du milieu de culture correspondant à la lignée (2 fois le volume de trypsine)
- Décrocher les cellules à la pipette
- Resuspendre les cellules trypsinées dans le tube de 15 ml pour stopper la réaction
- Centrifuger à 700 g pendant 5 min
- Eliminer le surnageant et reprendre le culot dans 2 à 5 ml de milieu de culture correspondant au milieu dans lequel les cellules serontensemencées
- Compter les cellules sur 2 grilles d'une cellule de Thoma⁽³⁾
- Faire la moyenne des 2 grilles, le nombre trouvé correspond à $N \cdot 10^4$ cellules/ml
- Pour l'entretien des cellules, ensemercer à $1,5 \cdot 10^4$ cellule par cm²

⁽¹⁾PBS sans Ca²⁺ ni Mg²⁺ : GibcoInvitrogen, Cergy Pontoise, France

⁽²⁾Trypsine-EDTA trypsine 0.05% : GibcoInvitrogen, Cergy Pontoise, France

⁽³⁾Cellule de Thoma : VWR international, Fontenay-sous-Bois, France

Fiche4

CONGELATION DES LIGNEES

Dans du DMSO (9% DMSO, 36% SVF, 55% DMEM)

Pour une ampoule contenant $2 \cdot 10^6$ cellules :

- Préparer le milieu de congélation dans de la glace : 70 μ L de DMSO, 300 μ L de SVF
- 450 μ L de milieu de culture correspondant aux cellules, Après avoir trypsiné, et compté les cellules, centrifuger de nouveau et retirer le surnageant. Déposer délicatement les 800 μ L de milieu de congélation en agitant légèrement le tube à 4°C
- Transférer les cellules ainsi suspendues dans un cryotube
- Placer les tubes dans la boîte de congélation⁽¹⁾
- Placer cette boîte 24h à -80°C. Puis transférer les tubes dans un container à azote liquide
- Référencer les tubes congelés et décongelés dans les registres de cultures cellulaires

⁽¹⁾Boîte de congélation : NalgèneCryo (VWR international, Fontenay-sous-Bois, France) dans laquelle l'alcool isopropylique permet une congélation progressive

Fiche 5

TEST DE VIABILITE CELLULAIRE: METHODE D'EXCULSION AU BLEAU TRYPAN

- Ensemencer des plaques 24 puits avec $1,5 \cdot 10^5$ cellules par puits
- Incuber 24 h à 37°C en atmosphère humide 5% CO₂ / 95% air
- Rincer 2 fois avec du PBS⁽¹⁾ stérile
- Trypsiner⁽²⁾ les tapis cellulaires
- Prélever 200 µL de l'homogénat cellulaire dans un tube à essai
- Introduire 500 µL de la solution de Bleu trypan⁽³⁾ 0,4% (p/v) et 300 µL de milieu de culture
- Homogénéiser doucement et incuber 15 minutes à température ambiante
- Déposer une goutte du mélange entre lame et lamelle de l'hématimètre⁽⁴⁾
- Compter les cellules au microscope inversé à contraste de phase
- Faire la moyenne des 2 grilles
- Les cellules bleues correspondent aux cellules mortes
- Déterminer le pourcentage de cellules mortes, en tenant compte de la dilution (Dilution 5)

Remarque :

Il est important de vérifier lors du comptage que le nombre de cellules associées en amas n'excède pas 10% du total sans quoi il est indispensable de recommencer l'opération pour permettre une dissociation des amas.

Comptage des cellules : nombre moyen de cellules par carré x facteur de dilution x 10^4 (comptage sur 10 carrés)

Nombre de cellules totales : nombre de cellules / mL x volume d'origine de la suspension cellulaire.

(1) PBS sans Ca²⁺ ni Mg²⁺ : GibcoInvitrogen, Cergy-Pontoise, France

(2) Trypsine-EDTA trypsine 0.05% : GibcoInvitrogen, Cergy-Pontoise, France

(3) Solution Bleu trypan : GibcoInvitrogen, Cergy-Pontoise, France

(4) Cellule de Thoma ou Mallassez : VWR international, Fontenay-sous-Bois, France

Fiche 6

TEST DE VIABILITE CELLULAIRE (REDUCTION MITOCHONDRIALE DU MTT) D'APRES DENIZOT ET LANG (1986) ⁽¹⁾

- Ensemencer les cellules sur des plaques de 96 puits à une densité de 1.10^5 cellules par puits
- Dissoudre du MTT⁽²⁾ à 5 mg/mL dans du PBS-glucose⁽³⁾
- Filtrer sur un filtre de 0,22 μ m
- Ajouter 1/10ème de la solution de MTT par puits
- Incuber de 1 à 2 heures dans un incubateur à 37°C en atmosphère humide 5% CO₂/95% air
- Enlever délicatement le milieu
- Ajouter 100 μ L de DMSO⁽⁴⁾ par puits
- Agiter horizontalement 10 à 15 min à température ambiante pour dissoudre les cristaux de formazan
- Les blancs de lecture contiennent uniquement du DMSO
- La lecture des densités optiques est réalisée avec le lecteur de plaques⁽⁵⁾ à 570 nm

⁽¹⁾(Denizot et Lang ,1986) : J. Immunol. Methods

⁽²⁾ MTT, 3-(4,5dimethylthiazol-2-yl)-2-5-diphenyl-tetrazolium bromide conservé à 4°C : Gibco, Invitrogen, Cergy Pontoise, France

⁽³⁾ PBS sans CaCl₂, ni MgCl₂, glucose (d'après DULBECCO): Gibco/Invitrogen ; Cergy Pontoise, France

⁽⁴⁾ DMSO (Dimethylsulfoxide) : Gibco/ Invitrogen ; Cergy Pontoise, France

⁽⁵⁾ Lecteur de plaques Victor3 WallacMultilabel, Perkin Elmer

Fiche7

TEST DE PROLIFERATION SUR AGAR

Principe : Les cellules tumorales ont la capacité de former des colonies lorsqu'elles sont cultivées dans du milieu solide à base d'agarose mou.

➤ **Préparation du milieu base agar :**

- Stabiliser le milieu RPMI supplémenté avec 20% SVF dans un bain marie à 40°C pendant 30 minutes
- Dissoudre l'agar dans de l'eau stérile en le chauffant dans la micro onde (agar 0.5%)
- Stabiliser l'agar dans un bain marie à 40°C
- Mélanger le milieu RPMI avec l'agar 0.5% pour former le milieu base agar
- Couler 1.5 ml de milieu dans chaque boite de diamètre 35mm
- Laisser sécher et conserver les boites à 4°C

➤ **Préparation du top agarose :**

- La densité des cellules par boite 35 mm est de 8.10^4 cellules
- Traiter les cellules traitées ou non avec des si RNA à la trypsine après 2 lavages au PBS 1X. Transvaser les cellules dans un falcon 15 ml
- Centrifuger 5 minutes à 500g
- Eliminer le surnageant
- Resuspendre le culot avec 3ml du milieu de culture RPMI supplémenté avec 20% SVF et 3ml d'agarose 0.7% déjà stabilisé à 40°C
- Ensemencer 1.5ml de ce mélange sur la base d'agar. Chaque condition a été réalisée 3 fois
- Arroser les boites tous les 2 jours avec 1 ml du milieu RPMI supplémenté avec 20%SVF

➤ **Coloration des boites au Crystal violet :**

- Préparer 0.5ml de Crystal violet à 0.005% par boite dans de l'eau ultrapure
- Eliminer le milieu de culture de la surface des boites
- Distribuer 500µl de Crystal violet par boite
- Incuber une heure à température ambiante

- Eliminer l'excédent du colorant
- Compter les colonies formées

Fiche 8

MARQUAGE IMMUNOCYTO/HISTOCHIMIQUE

Principe : Le but de l'IHC est la mise en évidence d'antigènes sur une coupe de matériel de tissu qu'il soit préalablement fixé ou congelé. L'antigène est d'abord reconnu par un anticorps primaire spécifique, celui-ci étant secondairement révélé par un montage variable dont le marquage peut se faire soit par réaction colorimétrique soit par un marqueur fluorescent.

Au sein du laboratoire d'Anatomie pathologique du CHRU Hôpital Central de Nancy, le système d'amplification et de révélation utilisé est celui de la technique « Flex+ lapin » EnVision™ FLEX (Dako, Carpinteria, CA, USA). Cette technique utilise un kit commercialisé par Dako et est réalisée sur l'automate Autosteiner Plus Link® Dako. Ce système permet une amplification du signal de 2 à 3 fois par rapport à une technique streptavidine-biotine standard et permet d'éviter un signal non spécifique généré par les biotines endogènes.

Schématiquement l'antigène est détecté par un anticorps primaire de lapin. Celui-ci se lie à un anticorps secondaire anti-lapin. Ce dernier se fixe à un polymère composé d'un dextrane lié à des anticorps de chèvre se fixant aux immunoglobulines de lapin et à de multiples molécules de peroxydase. Le montage est ensuite révélé par un système chromogène-substrat avec l'ajout de peroxyde d'hydrogène et de diaminobenzidine (DAB).

➤ **Fixation, inclusion et coupe :**

- Fixer les tissus dans du formaline 10% et les inclure dans du paraffine. les cellules sont fixées avec un gel histologique (thermoscientifique)
- Couper les tissus et les cellules fixées en coupes épaisses de 3µM
- Monter les tissus à l'eau sur des lames Polysine™ (LABONORD S.A., Templemars, FR), séchées pendant 5 min sur une platine chauffante à 58°C puis placées à l'étuve à 56°C pendant 1 à 2 heures

➤ **Prétraitement :**

- Le déparaffinage et le démasquage des sites antigéniques sont réalisés dans le même temps dans un bain-marie PTLINK™ DAKO en tampon citrate pH 6,0 pendant 20 min.

➤ **Dilution des anticorps :**

- Dilués les anticorps primaires dans le diluant EnVision™ FLEX Antibody Diluent (DM 830) soit un tampon Tris, pH 7,2, NaN₃ 15mmol/L.

➤ **Technique Flex+ lapin sur automate Autosteiner Plus Link® Dako :**

- Rincer les lames avec une solution saline de tampon Tris contenant du Tween 20, pH 7,6 (±0,1) pendant 5 min
- Bloquer des peroxydes endogènes avec le réactif EnVision™ FLEX Peroxidase-BlockingReagent (SM 801) soit un tampon phosphate contenant du peroxyde d'hydrogène, NaN₃ 15mmol/L et un détergent pendant 5 min
- Laver 2 fois, 5min
- Incuber avec l'anticorps primaire pendant 1h
- Laver 2 fois, 5min
- Ajouter l'anticorps secondaire avec EnVision™ FLEX+ Rabbit (LINKER) (SM 805) soit une solution tampon contenant une protéine stabilisante et un agent antimicrobien pendant 15 min
- Laver 2 fois, 5min
- Déposer un polymère marqué avec EnVision™ FLEX/HRP (SM802) soit un dextrane couplé à des molécules de peroxydase et à des molécules secondaires de l'espèce concerné dans une solution tamponnée contenant une protéine stabilisante et un agent conservateur pendant 20 min
- Laver 2 fois, 5min
- Révéler le système par un chromogène-substrat avec EnVision™ FLEX Substrate Buffer (SM 803) soit une solution tamponnée diluant une solution contenant du peroxyde d'hydrogène et le chromogène diaminobenzidine (DAB) et un agent conservateur pendant 10 min
- Laver 2 fois, 5min
- Réaliser la contre-coloration avec EnVision™ FLEX Hematoxylin (SM 806) soit une solution aqueuse d'hématoxyline pendant 5 min
- Les derniers rinçages sont réalisés avec le tampon Tris et l'eau distillée

➤ **Montage des lames :**

- Déshydrater les lames dans des bains successifs d'éthanol absolu, d'éthanol 96° et toluène, pendant 5 min chacun
- Réaliser le montage à l'Eukitt® (LABONORD S.A., Templemars, FR)

➤ **Analyse :**

- L'interprétation des lames se fait en réalisant un score en multipliant l'intensité du marquage, allant de 0 pour un marquage nul à 3 pour un marquage intense, par le pourcentage de cellules marquées, au sein des cellules tumorales d'une part et des cellules saines d'autre part. Le score varie donc de 0 à 300.

	Anticorps anti-	Source	Dilution	Fournisseurs
Anticorps primaires	CARM1	Lapin	1/50	Millipore
	PRMT1	Lapin	1/50	Cell Signalling
	Cytokératine 7	Souris	1/50	Abcam
	Cytokératine 8	Souris	1/50	Abcam
	RcNeuromédine B	Lapin	1/50	Acris
	Ki-67	Souris	1/200	Dako

Tableau 1 : Anticorps primaires utilisés en immunocytochimie

Fiche 9

DUOLINK

Principe: Cette technique permet de détecter, visualiser et quantifier des protéines individuelles, des modifications post-traductionnelles ou des interactions protéiques dans des échantillons cellulaires et tissulaires. Les réactifs Duolink sont basés sur le PLA® (Proximity Ligation Assay). Lorsque les sondes PLA sont à proximité (28Å), les brins d'ADN peuvent interagir et se lier grâce à un ajout ultérieur d'oligonucléotides et d'une ligase. Ils sont ensuite amplifiés plusieurs centaines de fois à l'aide d'une polymérase et l'ajout de sondes oligonucléotidiques complémentaires fluorescentes mettent en évidence le produit final. Le signal de chaque paire de sondes PLA détectées est visualisé comme un spot fluorescent individuel.

➤ **Protocole :**

- Ensemencer sur des lamelles en verre, $3 \cdot 10^5$ cellules traitées avec une solution de poly-L-lysine de 15 µg/mL
- Rincer 2 fois 5 min avec du PBS
- Fixer les cellules 10 min avec une solution de para-formaldéhyde ⁽¹⁾ à 4%
- Rincer 2 fois 5 min avec du PBS ⁽²⁾
- Perméabilisation membranaire : 2 fois 10 min avec une solution de Triton 0,1% (Triton X-100 ⁽³⁾/PBS)
- Rincer 3 fois 5 min avec du PBS
- Incuber 1h à température ambiante avec une solution de BSA ⁽⁴⁾ à 1%
- Déposer environ 100µl d'anticorps primaire (diluer l'anticorps dans une solution de PBS 1X-BSA 10%) si il y a deux anticorps sinon 200µl et laisser incuber de 24 à 72h selon anticorps dans une chambre humide à 4°C
- Laver dans un bain de PBS 1X, 3 fois pendant 5min à température ambiante sous agitation douce
- Déposer environ 80µl de chaque PLA probes ⁽⁵⁾ (diluer les anticorps au 1/5° dans une solution PBS 1X-BSA 10%) NB : les deux PLA probes utilisés doivent avoir une dénomination différente → une « espèce » minus et une « espèce » plus et incuber pendant 1h dans une chambre humide à 37°C

- Laver dans un bain de TBST⁽⁶⁾, 2 fois pendant 5min à température ambiante sous agitation douce
- Déposer environ 80µl de la solution de ligation (Diluer la solution stock de ligation au 1/5° dans de l'eau MilliQ puis diluer dans cette solution la ligase au 1/40°) et laisser incubé 30min dans une chambre humide à 37°C
- Laver dans un bain de TBST, 2 fois pendant 2min à température ambiante sous agitation douce

NB : ce réactif est sensible à la lumière donc à partir de cette étape procéder à l'obscurité. Déposer environ 80µl de la solution de ligation (Diluer la solution stock d'amplification au 1/5° dans de l'eau MilliQ puis diluer dans cette solution la polymérase au 1/80°) et laisser incubé 100min dans une chambre humide à 37°C.

- Laver dans un bain de tampon de lavage B⁽⁷⁾, 2 fois pendant 10min à température ambiante sous agitation douce
- Déposer environ 200µl de DAPI⁽⁸⁾ (dilution 1/200° dans du PBS 1X soit une concentration finale de 5µg/ml) et laisser incubé de 30s à 1min à température ambiante
- Laver dans un bain d'eau distillé, 3 fois pendant 5min à température ambiante sous agitation douce
- Monter les lames au montage fluo⁽⁹⁾ (Fluoromount, Sigma) (verser sur le milieu de la coupe une goutte, poser une lamelle et laisser sécher à 4°C
- Conserver bien les lames à l'obscurité dans du papier aluminium à 4°C
- L'observation se fait au microscope à fluorescence ou au confocale⁽¹⁰⁾
- Pour le comptage, utiliser le logiciel

⁽¹⁾Paraformaldéhyde (PAF) à 4%→ 20g de paraformaldéhyde dans 450 ml d'eau distillée. Ajouter 50 ml de PBS 10X

⁽²⁾PBS 10X → 12,1g de Na₂HPO₄, 2g de KH₂PO₄, 80g de NaCl, 2g de KClQsp 1 litre d'eau distillée et ajuster à pH=7,4. Pour du PBS 1X mélanger 100ml de PBS 10X dans 900ml d'eau distillée

⁽³⁾Triton 0,1%→ Ajouter avec un cône coupé à l'extrémité 1ml de Triton dans 1l de PBS 1X

⁽⁴⁾BSA 10%→ 10g de BSA dans 100ml de PBS 1X

⁽⁵⁾PLA probes : Mouse, Rabbit, Goat MINUS ou PLUS, Kit DuolinkDetectionreagent Orange (OlinkBioscience, Suède)

⁽⁶⁾*Solution de TBST* (Tris-Buffered Saline Tween-20) : diluer 100ml de la solution TBS 10X + qsp H₂O MQ 1 litre + 1ml de Tween 20 à 0,1%. TBS 10X (pour 1 litre) → Tris 200 mM, NaCl 1,5 M, pH 7,4, qsp H₂O MQ 1 litre (à ajuster avec HCl ; conserver à 4°C

⁽⁷⁾Tampon de lavage B : Dans 500 ml d'eau MilliQ dissoudre 5,84g de NaCl ; 4,24g de Tris base et 26g de Tris HCl. Ajuster le pH à 7,5 par ajout d'HCl et compléter à 1 litre avec de l'eau MilliQ. Filtrer la solution avec un filtre de 0,22µm et stocker à 4°C

⁽⁸⁾DAPI → Diamidino-4',6 phénylindol-2 dichlorhydrate

⁽⁹⁾Liquide de montage, Aqua-polymont : Polysciences, France

⁽¹⁰⁾Microscope : microscope à fluorescence : BX51WI ; Olympus, Rungis, France ou microscope confocal ; LeicaTCS SP2-AOBS ; Leicamicrosystems, Wetzlar, Allemagne

	Anticorps anti-	Source	Dilution	Fournisseurs
Anticorps primaires	CARM1	Lapin	1/100	Millipore
	PRMT1	Lapin	1/100	Cell Signalling
	CARM1-PSER228	Lapin	1/100	Millipore

Tableau 2 : Anticorps primaires utilisés en Duolink

Fiche 10

EXTRACTION DES PROTEINES POUR L'ETUDE PAR WESTERN BLOT

L'extraction se fait en maintenant les échantillons à 4°C (dans la glace).

- Entretien des cellules dans des boîtes de Pétri⁽¹⁾ (ø 100mm)
- Lorsque les cellules sont à « confluence » rincer 3 fois les boîtes avec 5 mL de PBS⁽²⁾ froid
- Aspirer soigneusement le dernier rinçage pour bien assécher les flasques (possibilité de congeler les boîtes à -80°C jusqu'au jour de l'extraction)
- Introduire 500 µL de tampon RIPA⁽³⁾ par boîte et maintenir sur de la glace pendant 10 min
- Gratter les cellules au policeman et transférer dans des microtubes
- Effectuer 3 cycles de congélation et décongélation (Azote liquide-bain marie à 37°C)
- Centrifuger 30 min à 20 000 tours par min à 4°C
- Récupérer le surnageant et doser les protéines par la méthode de l'acide bicinchoninique (BCA) (Fiche 13)

⁽¹⁾Plastiques stériles à usage unique : Falcon, Dutscher, Brumath, France

⁽²⁾ PBS sans Ca²⁺ ni Mg²⁺ : GibcoInvitrogen, Cergy-Pontoise, France

⁽³⁾ Tampon de lyse RIPA : NaCl 140 mM, sodium deoxycholate 0,5% (w/v), Nonidet P-40 1% (v/v), 0,1% (w/v) SDS, cocktail d'inhibiteurs de protéases (Roche Applied Science, Meylan, France)

Fiche 11

FRACTIONNEMENT DES PROTEINES CYTOSOLIQUES ET NUCLEAIRES

L'extraction se fait en maintenant les échantillons à 4°C.

- Préparer les tampons de lyse et RIPA juste au moment de l'utilisation :

Tampon de lyse	Tampon RIPA
10mM Tris_HCl (pH 7.5)	10mM Tris_HCl (pH 7.4)
100mM NaCl	150mM NaCl
2.5 mM MgCl ₂	1mM EDTA
40µg/ml digitonine	1mM DTT
Inhibiteurs des protéases	0.1% SDS
Inhibiteurs des phosphatases	1% NP-40
EAU (10ml)	Inhibiteurs des protéases
	Inhibiteurs des protéases
	EAU (10ml)

- Décoller les cellules des boîtes de culture (boîtes 100mm) dans 2-3ml de milieu complet de culture. Transférer dans des tubes de 15 ml et centrifuger 5 minutes à 800g
- Laver les cellules deux fois avec 10ml PBS 1x puis éliminer complètement le PBS
- Pour la préparation de la fraction cytosolique, 8.10⁶ cellules sont lysées dans 600µl de tampon de lyse froid
- Le lysat est incubé 15 min dans la glace
- Ajouter 15µl de NP-40 à 10% et Centrifuger 8 minutes à 2000g à 4°C
- Le surnageant correspond à la fraction cytosolique
- Le culot est lavé deux fois avec du tampon de lyse
- Ajouter 100 µl du tampon RIPA
- Incuber les tubes 30 minutes à 4°C en remuant de temps en temps
- Le lysat nucléaire est purifié par centrifugation 10minutes à 21000g à 4°C
- Le surnageant est collecté (extrait nucléaire)

Fiche 12

DOSAGE DES PROTEINES PAR LA METHODE DE L'ACIDE BICINCHONNIQUE (BCA)

- Préparer une gamme étalon (0, 50, 100, 200, 400, 800, 1200, 1600 et 2000 µg/mL, en triple) à partir d'une solution stock de BSA⁽¹⁾ (bovine serum albumin) diluée dans le même tampon que les échantillons à doser
- Préparer le réactif de travail en mélangeant 50 volumes de réactif A (BCA)⁽²⁾ avec 1 volume de réactif B (CuSO₄)⁽³⁾
- Distribuer 25 µL de chaque dilution de BSA ou d'échantillon à doser sur une plaque de 96 puits
- Deux blancs sont réalisés avec 25 µL de diluant seul
- Ajouter 200 µL de réactif de travail et agiter la plaque
- Couvrir la plaque et la placer 30 min à 37°C
- Laisser refroidir la plaque à température ambiante
- Mesurer l'absorbance sur un spectrophotomètre lecteur de plaques⁽⁴⁾ à 570 nm
- La droite de régression étalon est tracée et la concentration protéique des échantillons déduite
- La concentration en protéines est déterminée à partir de courbe étalon

Smith *et al.* (1985) *Anal.Biochem.*, 150 : 76-85

⁽¹⁾Ampoule contenant de la BSA à 2,0 mg/mL dans une solution de NaCl à 0,9% (p/v) et NaN₃ à 0,05% (p/v)

⁽²⁾Réactif A : solution aqueuse contenant BCA-Na₂ 1% (p/v), Na₂CO₃ 2% (p/v), tartrate-Na₂ 0,16%, NaOH 0,4% (p/v) et NaHCO₃ 0,95% (p/v) (pH 11,25)

⁽³⁾Réactif B : solution de CuSO₄.5H₂O à 4% (p/v) dans de l'eau déionisée

⁽⁴⁾Pierce, Rockford, IL, USA kit BCA ProteinAssay® Reagent(Pierce, Rockford, IL, USA)
Lecteur de plaques Victor3 WallacMultilabel, Perkin Elmer

Fiche 13

ELECTROPHORESE ANALYTIQUE DES PROTEINES SUR GEL DENATURANT DE POLYACRYLAMIDE (SDS-PAGE)

- Visser les plaques de verre séparées par des espaceurs sur leur support et fixer l'ensemble sur le socle de coulage
- Couler le gel de séparation⁽¹⁾ selon le (*tableau 2*) entre les plaques de verre, recouvrir sa surface avec de l'isopropanol
- Laisser polymériser pendant 20 min à température ambiante
- Aspirer l'isopropanol et rincer abondamment la surface du gel avec de l'eau distillée
- Eliminer toutes traces d'eau et couler le gel de concentration (*tableau 2*)
- Positionner le peigne en Téflon en évitant de piéger des bulles au niveau des dents et laisser polymériser à nouveau 20 min. La hauteur du gel de concentration est de 1 cm à partir du bas des puits de dépôt
- Retirer le peigne et rincer soigneusement chaque puits avec une pissette d'eau distillée afin de supprimer l'acrylamide non polymérisé
- Eliminer l'eau restant dans les puits
- Former le réservoir de tampon cathodique en assemblant les 2 supports de gel sur le système central d'électrodes en forme de U
- Remplir ce réservoir central avec du tampon de migration⁽²⁾ et contrôler l'étanchéité
- Ajouter 1 volume de tampon de dépôt⁽³⁾ pour 1 volume d'échantillon
- Chauffer les échantillons à 100°C pendant 5 min, dans un bloc chauffant
- Charger les puits du gel avec les échantillons et les standards dénaturés⁽⁴⁾
- Brancher la cuve d'électrophorèse sur un générateur de courant continu. La migration débute à 50 V constant (~10 mA) le temps que les protéines pénètrent dans le gel de concentration puis 120 V (25 mA) jusqu'à ce que le front de migration atteigne le bas du gel

Appareil d'électrophorèse Mini-PROTEAN® II (Bio-Rad Laboratories, Marnes-la-Coquette, France)

⁽¹⁾Gel de séparation : 12% (p/v) acrylamide : bisacrylamide (29:1) (Bio-Rad Laboratories), tampon Tris-HCl 0,125M (pH 6,8) polymérisé avec persulfate d'ammonium 0,05% (p/v) et TEMED 0,05% (v/v) ; Euromedex (France) et SDS 0,1% (Bio-Rad Laboratories)

⁽²⁾ Tampon de migration : Tris 25 mM contenant glycine 192 mM et SDS 0,1% (p/v) pH~8,3 (ne pas ajuster avec HCl)

⁽³⁾Tampon Laemmli 2X ; Sigma-Aldrich (St Louis, USA)

⁽⁴⁾ Marqueurs de poids moléculaires : *LowMolecularWeight*, LMW - Amersham Pharmacia, UK

Gel de migration		5 mL	10 mL	15 mL	20 mL	25 mL	30 mL	40 mL	50 mL
6 %	H ₂ O MQ	2,7	5,3	8	10,6	13,3	15,9	21,1	26,5
	Acrylamide Mix 29:1	1	2	3	4	5	6	8	10
	Tris 1,5M pH 8,8	1,3	2,5	3,8	5	6,3	7,5	10	12,5
	SDS 10%	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4	0,5
	APS 10%	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4	0,5
	TEMED	0,004	0,008	0,012	0,016	0,02	0,024	0,032	0,04
8 %	H ₂ O MQ	2,3	4,6	7	9,3	11,6	13,9	18,6	23,2
	Acrylamide Mix 29:1	1,3	2,7	4	5,3	6,7	8	10,7	13,4
	Tris 1,5M pH 8,8	1,3	2,5	3,8	5	6,3	7,5	10	12,5
	SDS 10%	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4	0,5
	APS 10%	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4	0,5
	TEMED	0,003	0,006	0,009	0,012	0,015	0,018	0,024	0,03
10 %	H ₂ O MQ	2	4	5,9	7,9	9,9	11,9	15,8	20
	Acrylamide Mix 29:1	1,7	3,3	5	6,7	8,3	10	13,3	16,6
	Tris 1,5M pH 8,8	1,3	2,5	3,8	5	6,3	7,5	10	12,5
	SDS 10%	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4	0,5
	APS 10%	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4	0,5
	TEMED	0,002	0,004	0,006	0,008	0,01	0,012	0,016	0,02
12 %	H ₂ O MQ	1,7	3,3	5	6,6	8,3	9,9	13,2	16,4
	Acrylamide Mix 29:1	2	4	6	8	10	12	14	20
	Tris 1,5M pH 8,8	1,3	2,5	3,8	5	6,3	7,5	10	12,5
	SDS 10%	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4	0,5
	APS 10%	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4	0,5
	TEMED	0,002	0,004	0,006	0,008	0,01	0,012	0,016	0,02
15 %	H ₂ O MQ	1,2	2,3	3,5	4,6	5,7	6,9	9,2	11,4
	Acrylamide Mix 29:1	2,5	5	7,5	10	12,5	15	20	25
	Tris 1,5M pH 8,8	1,3	2,5	3,8	5	6,3	7,5	10	12,5
	SDS 10%	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4	0,5
	APS 10%	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4	0,5
	TEMED	0,002	0,004	0,006	0,008	0,01	0,012	0,016	0,02

Gel de concentration		1 mL	2 mL	3 mL	4 mL	5 mL	6 mL	8 mL	10 mL
	H ₂ O MQ	0,68	1,4	2,1	2,7	3,4	4,1	5,5	6,8
	Acrylamide Mix 29:1	0,17	0,33	0,5	0,67	0,83	1	1,3	1,7
	Tris 0,5M pH 6,8	0,13	0,25	0,38	0,5	0,63	0,75	1	1,25
	SDS 10%	0,01	0,02	0,03	0,04	0,05	0,06	0,08	0,1
	APS 10%	0,01	0,02	0,03	0,04	0,05	0,06	0,08	0,1
	TEMED	0,001	0,002	0,003	0,004	0,005	0,006	0,008	0,01

Tableau 3 : Solution pour préparation des gels de concentration et de séparation pour SDS-PAGE Tris/Glycine.

Fiche 14

TRANSFERT DES PROTEINES SUR LA MEMBRANE DE PVDF (ELECTRO-TRANSFERT LIQUIDE) ⁽¹⁾

- Tremper le gel d'électrophorèse pendant 15 min dans le tampon de transfert à 4°C ⁽²⁾
 - Couper la membrane de PVDF ⁽³⁾, les papiers filtres ⁽⁴⁾ à la dimension du gel (~5x8 cm) et les immerger dans du tampon de transfert à 4°C pendant 15 min
 - Superposer les différents éléments du sandwich sur la partie transparente de la cassette du système de transfert dans l'ordre suivant :
 - éponge
 - un papier filtre
 - la membrane de PVDF
 - le gel de polyacrylamide
 - un papier filtre
 - éponge
 - Expulser les bulles d'air en faisant rouler une pipette plastique, cassée en deux, sur le sandwich
 - Placer la cassette dans son socle en mettant bien la partie noire de la cassette contre la partie noire du socle et refermer l'appareil
 - Placer le montage dans la cuve remplie de tampon de transfert
 - Brancher l'appareil sur un générateur de courant continu et transférer à ampérage constant
 - 250 mA pendant 1h
 - Démonter le sandwich et récupérer la membrane PVDF
 - Colorer la membrane avec une solution de rouge Ponceau S ⁽⁵⁾ pendant 5 min, décolorer partiellement à l'eau distillée puis repérer les standards de poids moléculaires au crayon de papier
 - Poursuivre le rinçage jusqu'à décoloration complète de la membrane
- **Vérification du transfert (non obligatoire)**
- Colorer la membrane avec une solution de Rouge Ponceau S ⁽⁶⁾ pendant 5mn puis décoloration à l'eau distillée

- NB : A ce stade on peut laisser sécher la membrane et la conserver au frigo pour une révélation ultérieure. Avant de réutiliser une membrane sèche, la repasser dans un bain de méthanol.

⁽¹⁾ Appareil de transfert électrophorétique Mini-Trans-Blot Cell (Bio-Rad Laboratories)

⁽²⁾ Tampon de transfert : Tris 48 mM, glycine 39 mM, SDS 0,0375% (p/v) pH~9,2 (ne pas ajuster avec HCl)

⁽³⁾ Membrane polyvinylidenedifluoride membrane, (PVDF), porosité 0,2 μm (Bio-Rad Laboratories, Marnes-la-Coquette, France)

⁽⁴⁾ Papier buvard d'épaisseur 1 mm (blottingpaper, Sigma-Aldrich (St Louis, USA))

⁽⁵⁾ Solution filtrée de rouge Ponceau S à 0,5% (p/v) contenant acide acétique à 1% (v/v) : Sigma Aldrich (St Louis,USA)

⁽⁶⁾ Solution aqueuse de Rouge Ponceau S à 0.2% (p/v), acide acétique 0.1% (v /v), filtrée 0.2 μm , 4°C)

Fiche15

IMMUNOBLLOT

➤ **Blocage**

- Mettre les membranes dans une solution de TBST⁽¹⁾/lait écrémé 5% sous agitation pendant 1 heure à température ambiante afin de bloquer les sites aspécifiques.

N.B : suivant les anticorps, la solution de blocage peut être faite soit avec de la BSA soit avec du lait écrémé (idem pour la dilution des anticorps)

➤ **Anticorps primaire⁽²⁾**

- Découper une pochette plastique légèrement supérieure à la surface de la membrane
- Préparer la solution avec le premier anticorps dilué à la concentration souhaitée dans TBST/lait 5% (4 à 5ml au total)
- Placer la membrane dans la pochette plastique, mettre la solution d'anticorps, souder la pochette et incuber pendant 1 nuit à 4°C sous agitation lente

➤ **Lavage**

- Sortir la membrane de sa pochette plastique
- Rincer la membrane avec du TBST 4X10mn sous agitation rapide à température ambiante

➤ **Anticorps secondaire⁽³⁾**

- Procéder de la même façon qu'avec le 1er anticorps
- Incuber 1 heure sous agitation lente à température ambiante

➤ **Lavage**

Idem lavage ci-dessus

➤ **Révélation ECL**

- Préparer la solution ECL^{TM(4)} (pour une membrane prévoir 1ml au total)
- Sur un film SaranTM déposer l'ECLTM

- Sortir la membrane du tampon de lavage, la secouer pour éliminer l'excès de tampon, la poser sur l'ECL™, protéines vers le bas en évitant la formation de bulles
- Incuber 1mn
- Bien sécher la membrane entre deux papiers absorbants et la mettre dans une cassette entre deux films Saran™, protéines vers le haut
- Révéler à l'aide de la machine Fusion FX7⁽⁵⁾
- Réajuster le temps d'exposition si nécessaire

(1) *Solution de TBST* (Tris-Buffered Saline Tween-20) : diluer 100ml de la solution TBS 10X + qsp H₂O MQ 1 litre + 1ml de Tween 20 à 0,1%.TBS 10X (pour 1 litre) → Tris 200 mM, NaCl 1,5 M,pH 7,4,qsp H₂O MQ 1 litre (à ajuster avec HCl ;conserver à 4°C)

(2) Voir fiche « liste des anticorps primaires utilisés en western blot »

(3) Voir fiche « liste des anticorps secondaires utilisés en western blot »

(4) Amersham Pharmacia Biotech

(5) Fusion Fx7, Fisher, S/N 10-201068.

LISTE DES ANTICORPS PRIMAIRES ET SECONDAIRES UTILISES EN WESTERN BLOT:

Anticorps primaires	Espèces	Fournisseurs	Dilution
CARM1	Lapin	Millipore	1/1000
PRMT1	Lapin	CellSignalling	1/700
SOX2	Souris	Chemicon	1/200
NANOG	Lapin	Chemicon	1/3000
CARM1-PSER228	Lapin	Millipore	1/500
CYTOKERATINE8	Souris	Abcam	1/1000
NEUROMEDINE B Rc	Lapin	Acris	1/1000
MAP2K3	Lapin	Gene Tex	1/1000
GAPDH	Poule	Millipore	1/1000

Tableau 4 : Anticorps primaires utilisés en western blot

ANTICORPS SECONDAIRES	ESPECES HOTES	ESPECES RECONNUE	FOURNISSEUR
Anticorps HRP âne anti IgG de souris	Ane	souris	Santa cruz
Anticorps HRP âne anti IgG de lapin	Ane	lapin	Santa cruz
Anticorps HRP âne anti IgG de poule	Ane	poule	Santa cruz

Tableau 5 : Anticorps secondaires utilisés en western blot

➤ **DESHYBRIDATION DE MEMBRANE WESTERN BLOTTING (STRIPPING)**

Principe: Les membranes ayant déjà été incubées avec des anticorps primaire et secondaire peuvent être ré-incubées avec un autre anticorps après avoir été déshybridées

- Chauffer le tampon à 50°C
- Sous hotte, remplir un bac en verre de tampon de déshybridation⁽¹⁾ chaud
- Immerger les membranes pendant 30 mn à 50°C en agitant de temps en temps
- Rincer rapidement les membranes à l'eau distillée
- Rincer ensuite avec du TBST⁽²⁾ 2x10 mn sous agitation

- Reprendre le protocole de western à partir du tampon bloquant

⁽¹⁾ Tampon de déshybridation: Pour 1 litre

100 mM 2-mercaptoethanol 7 ml

2 % SDS 20g

62,5mM Tris HCL pH 6,7 7,57g

⁽²⁾ *TBST* 10x : Pour 1 litre

Tris 200 mM 24,2g

NaCl 1,5 M 87,5g

pH 7,4 à ajuster avec HCl

qsp H₂O MilliQ

Conserver à 4°C

Fiche 16

CO-IMMUNOPRECIPITATION (kit Pierce Co-immunoprecipitation)

NB : 10⁶cellules nécessaires minimum.

➤ Immobilisation de l'anticorps

NB : le protocole est fait pour coupler de 10 à 75µg d'anticorps affinity-purified dans une solution d'amines libre et de protéines couplées. Echelonner ce protocole à vos besoins (cf Tableau 6).

Table 6. quantité d'anticorps, couplage résine, tampon de lavage et tampon d'élution

Quantité d'anticorps (µg)	Couplage résine volume (µl) (volume de 50% slurry)	Volume du tampon de lavage (µl)	Volume du tampon d'élution (µl)
250-1,000	100 (200)	400	100-150
75-250	50 (100)	300	75-100
10-75	25 (50)	200	50-75
<10	10 (20)	200	50

- Equilibrer l'AminoLinkCouplingResin et les réactifs à température ambiante
- Préparer 2mL de Coupling buffer 1X pour chaque réaction de Co-IP (100µL Coupling Buffer 20X et 1900µL eau ultra pure)
- Agiter doucement la bouteille d'AminoLink Plus CouplingResin pour obtenir une suspension homogène. Utiliser un cône coupé et ajouter 50µL de « resineslurry » dans la colonne. Placer la colonne dans un microtube à centrifuger et centrifuger à 1000g pendant 1min. Jeter le surnageant.
- Lavage : -200µL de Coupling buffer 1X
 -.centrifuger à 1000 g pendant 1min } x2
 -jeter le surnageant
- Taper doucement le fond de la colonne sur du papier absorbant pour éliminer l'excès de liquide. Insérer le bouchon inférieur
- Préparer 10-75µg d'anticorps. Ajuster le volume à 200µL avec de l'eau ultra pure et du couplage buffer 20x dilué au final 1x. (10µL de couplage buffer 20x + V Ac + H2O UP qsp 200µL). Déposer la solution directement sur la colonne.

- **SOUS LA HOTTE** ajouter 3µL de sodium **cyanoborahydre**/ 200µL de volume de réaction
- Fermer le tube avec le bouchon à vis. Incuber avec agitation à température ambiante pendant 90 à 120 min! Veuillez à ce que la résine reste bien en suspension pendant l'incubation !!!
- Enlever et conserver le bouchon inferieur. Desserrer le bouchon à vis. Placer la colonne dans un tube collecteur et centrifuger. Conserver le surnageant pour vérifier le couplage de l'Ac
- Ajouter 200µL de Tp de couplage 1x
 - Centrifuger } x2
 - Jeter le surnageant }
- Ajouter 200µL de quenching buffer sur la colonne
- Centrifuger et jeter le surnageant
- Taper doucement le fond de la colonne sur du papier absorbant
- Mettre le bouchon inferieur et ajouter 200µL de quenching buffer sur la résine
- **SOUS LA HOTTE** ajouter 3µL de sodium cyanoborahydre. Fermer avec le bouchon à vis et laisser incuber 15 min sous agitation douce ou en remuant de temps en temps.
- Enlever le bouchon inferieur, et desserrer le bouchon à vis. Placer la colonne sur un tube collecteur et centrifuger
- Jeter le surnageant
- Enlever le bouchon à vis. Laver la résine :
- Ajouter 200µL de couplage buffer } x2
- Centrifuger après chaque lavage }
- Laver la résine avec 150µL de solution de lavage } X6
- Centrifuger après chaque lavage }
- Soit faire la lyse des cellules pour l'immunoprécipitation
- Soit faire les étapes suivantes pour la conservation des colonnes
- Laver avec 200µL de couplage buffer 1X } x2
- Centrifuger après chaque lavage }
- Taper doucement le bas de la colonne sur du papier absorbant et placer le bouchon inferieur
- Ajouter 200µL de couplage buffer 1x. Fermer le bouchon à vis.

- Stocker à 4°C

* Pour du stockage à long terme ajouter du sodium azide de concentration final 0,02%

➤ **Lyse des cellules adhérentes.**

- Retirer le milieu de culture
- Laver les cellules avec du dulbecco's PBS modifié 1x
- Ajouter le tampon de lyse et lavage (cf tableau 2) sur les cellules
- Incuber 5 min sur glace en mixant de temps en temps

Taille/surface de la boîte	Volume de tampon IP Lysis/wash
100x100 mm	500-1,000 µL
100x60 mm	250-500 µL
6-well plate	200-400 µl per well
24 – well plate	100-200 µl per well

- Transférer le lysat dans un microtube
- Centrifuger 10min a 13 000g
- Transférer le surnageant dans un nouveau tube pour déterminer la concentration en protéine faire des analyses complémentaires

➤ **Co Immunoprécipitation**

TOUTE LA MANIPULATION SE FAIT A 4°C (sauf indication contraire)

NOTE : * Les temps d'incubations dépendent des protéines de l'anticorps utilisé et de l'affinité de l'anticorps

* Les lysats peuvent être pré nettoyés avec une résine de contrôle pour diminuer les liaisons non spécifiques.

* Le protocole utilise du tampon IP lyse/wash pour coupler et nettoyer l'immuno-complexe.

Le Dulbecco PBS 20x modifié qui est fourni dans le kit comme un tampon binding/wash alternatif. Utiliser ce tampon pour des complexes qui pourraient être altérés par des détergents.

* Pour chaque Co-IP préparer 2mL de Dulbecco PBS modifié 1x dilué dans de l'eau ultra pure.

- Mélanger les protéines cibles et « proies » (si elles sont séparées) et préparer un contrôle
- Diluer les protéines et le contrôle dans du tampon lysis/wash ou un autre tampon qui convienne. Le volume final recommandé est de 100-500µL par colonne
- Laver la résine en ajoutant 200µL de tampon IP lysis /wash directement sur la colonne contenant l'anticorps couplé à la résine
- Centrifuger et jeter le surnageant
- Taper doucement le bas de la colonne sur du papier absorbant pour éliminer l'excès de liquide. Insérer le bouchon inférieur
- Ajouter l'échantillon avec les protéines et les contrôles sur les résines correspondantes. Mettre le bouchon (classique) et incuber sous agitation douce 1-2h ou la nuit à 4°C
- **Note :** il est nécessaire d'optimiser le temps de couplage pour chaque application. Pour un grand volume
- Enlever le bouchon inférieur, desserrer le bouchon à vis et placer la colonne sur un tube collecteur. Centrifuger la colonne. Garder le surnageant pour des analyses postérieures.
- Enlever le bouchon à vis, placer la colonne dans un nouveau tube
- Ajouter 200µL d'IP Lysis/ Wash buffer et centrifuger } X3
- **Note :** Evaluer le nombre de lavage (A280, SDS PAGE, kit BCA) pour chaque Co-IP. Il ne doit plus y avoir de protéine dans le dernier lavage. Faire autant de lavage que nécessaire.
- **Lavage optionnel :** Pour améliorer l'élution, effectuer un lavage supplémentaire avec 100µL de conditioning buffer 1X. Ce tampon contient peu de sels et du tampon minimum ; donc tester le « flow-through » pour confirmer que le complexe protéine cible et proie est intacte.
- **Elution de la Co-IP**
- **Note :** Si la protéine et/ou l'anticorps est sensible à un pH bas, utiliser un système pour neutraliser le pH. Pour des dosages enzymatiques ou fonctionnels par la suite, ajouter 5µL de Tris1M pH 9,5, dans le tube de collecteur, pour neutraliser le pH du tampon d'élution pendant la centrifugation
- Placer la colonne dans un nouveau tube collecteur. Ajouter 10µL de tampon d'élution et centrifuger

- Laisser la colonne dans le tube et ajouter 50µL de tampon d'éluion. Incuber 5 min à température ambiante. La colonne ne doit pas être fermée ou agitée

Note : Pour concentrer plus l'éluât, utiliser moins de tampon d'éluion, cependant le rendement global peut être réduit.

- Centrifuger le tube et collecter l'éluât. Doser les protéines. Refaire des élution (étapes D1-D3) si nécessaire. Doser chaque éluât séparément pour être sûr que la protéine est complètement éluee

Pour préserver l'activité de l'anticorps couplé à la résine, procéder à l'étape E : régénération et stockage de la résine.

➤ **Re-génération et stockage de la résine**

- Ajouter 100µL de couplage buffer 1X sur la colonne
 - Centrifuger
 - Jeter le surnageant
- } x2
- Remplacer le bouchon inférieur sur la colonne. Ajouter 200µL de couplage buffer 1X sur la colonne. Remplacer le bouchon à vis. Emballer le bas de la colonne avec du film cellophane pour éviter que la colonne sèche.

Pour un stockage supérieur à 2 semaines ajouter de sodium azide à une concentration finale de 0,02%.

➤ **Préparation de l'échantillon pour l'analyse sur gel SDS-PAGE**

- Equilibrer le « lane marker sample buffer 5X » à température ambiante. Agiter doucement le sample buffer par 5-10 retournements. Pour un gel en condition réductrice, ajouter du DTT 1M (dithiothréitol) au sample buffer 5X pour obtenir une concentration finale de 100mM.
- Ajouter du sample buffer 5X à l'échantillon pour obtenir une concentration final 1X (par exemple 5µL de sample buffer pour 20µL d'échantillon)
- Chauffer l'échantillon à 95-100°C pendant environ 5min. Laisser refroidir l'échantillon à température ambiante avant de déposer dans le gel

Fiche 17

EXTRACTION DES ARN AVEC le Kit RNeasy⁽¹⁾ AVEC TRAITEMENT A LA Dnase

Principe : Ce kit est utilisé pour extraire les ARN servant à la RT-PCR semi-quantitative. Avec la procédure RNease toutes les molécules d'ARN d'une taille supérieure à 200 nucléotides sont isolées. Par conséquent les ARNr 5,8S ; 5S, et les ARNt, sont exclus (15-20% des ARN totaux). Toutes les étapes du protocole RNeasy devront être accomplies à température ambiante. Pendant la procédure, il faut travailler rapidement. Toutes les étapes de centrifugation sont menées à 20-25°C. Ne pas utiliser la centrifugeuse si elle est en dessous de 20°C.

➤ **Protocole :**

- Lysér les cellules poussant sur des plaques de diamètre <6 cm avec 350 µL RLT/b-
- Mercaptoéthanol⁽²⁾ directement dans la plaque de culture après avoir aspiré complètement le milieu
- Récupérer le lysat cellulaire dans un tube de 1,5 mL
- Passer le lysat au moins 5 fois au travers d'une aiguille de 0,9 mm de diamètre adaptée à une seringue RNase-free
- Ici, les échantillons peuvent être placés à -80°C et être utilisés après plusieurs mois. Pour traiter les lysats congelés, décongeler les échantillons pendant 15-20 min à 37°C dans un bain-marie pour diluer les sels. Si du matériel insoluble est visible, centrifuger pendant 5 min à 3000-5000 g. Transférer le surnageant dans un nouveau tube
- Ajouter 1 volume d'éthanol 70% (RNase-free) et bien mélanger en pipetant. Ne pas centrifuger
- Déposer jusqu'à 700 µl de l'échantillon sur une mini-colonne RNeasy placée dans un tube collecteur de 2 mL. Centrifuger pendant 15 s à ≥8000 g. Jeter l'éluat. Si le volume excède 700 µl, chargé les aliquots successivement sur la colonne RNeasy et centrifuger comme ci-dessus. Jeter l'éluat après chaque étape de centrifugation.
- Pour le traitement à la DNase, déposer 350 µL de tampon RW1 sur la mini-colonne, et centrifuger pendant 15s à ≥8000 g pour laver. Jeter l'éluat
- Préparer le volume nécessaire de DNase I à savoir 10 µL de solution stock DNase I aliquotée⁽³⁾ à 70µl de tampon RDD. Mélanger doucement par inversion du tube

- Déposer 80 µl préparés par membrane, et incuber sur la paillasse pendant 15 min (20-30°C)
- Laver avec 350 µL de tampon RW1, et centrifuger pendant 15 s à ≥ 8000 g. Jeter l'éluat
- Transférer la colonne dans un nouveau tube collecteur de 2 mL. Laver avec 500 µL de tampon RPE⁽⁴⁾ la colonne et centrifuger à ≥ 8000 g. Jeter l'éluat
- Ajouter encore 500 µL de tampon RPE à la colonne. Centrifuger pendant 2 min à ≥ 8000 g. Jeter l'éluat et recentrifuger 1 min pour sécher la membrane
- Transférer la colonne dans un nouveau tube collecteur de 1,5 mL. Déposer 30-50 µL d'eau RNasefree sur la membrane. Centrifuger à ≥ 8000 g pour éluer
- Si le taux d'ARN attendu est >30 µg, répéter l'étape d'élution avec un second volume d'eau. Eluer dans le même tube collecteur

⁽¹⁾Rneasy Mini Kit : Qiagen, Courtaboeuf, France

⁽²⁾ Préparer le volume à utiliser, à savoir 10 ml de b-Mercaptoéthanol par ml de tampon RLT.

⁽³⁾DNase set Qiagen. Diluer la DNase I solide (1500 Kunitz unités) dans 550 µl d'eau fournie. La DNase I est particulièrement sensible à la dénaturation physique. Il faut mixer seulement en inversant doucement les tubes. Ne pas mélanger au vortex. Préparer des aliquots de 10 µl.

⁽⁴⁾ Ajouter de l'éthanol au tampon RPE avant utilisation soit 44 ml d'éthanol 70% Rnase-free dans les 11 ml de tampon RPE

Fiche 18

QUANTIFICATION DES ADN OU ARN

- Diluer l'ADN ou l'ARN dans de l'eau à un 1/100ème dans une cuve en quartz
- Lire l'absorbance à 260 et 280 nm avec à un spectrophotomètre⁽¹⁾

Une concentration d'ARN de 40 µg/mL donne une absorbance d'environ une unité de DO
Pour mesurer la concentration en ADN double brin (µg /µL), il faut multiplier par 50 la valeur de l'absorbance à 260 nm ainsi que par le facteur de dilution

Le ratio A_{260} / A_{280} est également calculé pour vérifier la pureté de la solution. Celui-ci doit être compris entre 1,6 et 1,8. Un ratio inférieur signifie une contamination par des protéines. Un ratio supérieur indique une dégradation des ARN.

⁽¹⁾ Spectrophotomètre, biophotometer, Eppendorf

Fiche 19

TRANSCRIPTION INVERSE DES ARN (RT-PCR)

Principe : La RT-PCR (Reverse Transcriptase PCR) est une technique qui associe une transcription inverse (RT) suivie d'une PCR. Elle permet de synthétiser le brin complémentaire d'un ARN avec des désoxyribonucléotides en utilisant une ADN polymérase ARN dépendante (transcriptase inverse).

NB : Utilisation du kit QuantiTectReverse Transcription de Qiagen⁽¹⁾

➤ Préparation des échantillons

- A partir des dosages faits précédemment, préparer un volume d'ARN équivalent à 1µg par échantillon et compléter avec de l'eau (RNase free water) jusqu'à 12µl
- Ajouter dans chaque tube 2µl de tampon gDNAWipeout®
- Homogénéiser à la pipette et centrifuger brièvement à la centrifugeuse de pailasse
- Incuber 9 minutes à 42°C au thermocycleur
- Mettre les tubes rapidement dans la glace

➤ Préparation des réactifs de la RT-PCR

- Dans un microtube stérile, mélanger dans l'ordre :

	Pour un tube (échantillon)	Témoin négatif
Quantiscript RT buffer	4µl	4µl
RT primer Mix	1µl	1µl
Quantiscript Reverse transcriptase (enzyme)	1µl	0µl
ARN+gDNAWipeout	14µl	14µl

- Homogénéiser à la pipette et centrifuger brièvement
- Placer dans le thermocycleur⁽²⁾ préchauffé
- Sélectionner le programme RT suivant : 15 minutes à 42°C, 3 minutes à 95°C pendant 1 cycle
- Conserver les ADNc produit à -20°C

⁽¹⁾Quantitect® Reverse Transcription Kit : Qiagen, Courtaboeuf, France

⁽²⁾ThermocyclerGeneAmp® PCR System 2400 (Perkin Elmer Biosystems, 91945 - Courtaboeufcedex)

Fiche 20

PCR QUANTITATIVE EN TEMPS REEL AVEC LE kit Quantitect® SYBR® Green PCR

(1)

➤ Description des composants :

1- HotStarTaq DNA Polymerase: forme modifiée de l'ADN polymerase recombinante (94kDa) isolée de Thermusaquaticus clonée chez E.coli. n'a pas d'activité enzymatique à température ambiante.

2- QuantiTect SYBR Green PCR Buffer: Contient Tris-HCl, KCl, (NH₄)₂SO₄, 5 mM MgCl₂, pH 8.7 (20°C)

3- dNTP mix* : Contient dATP, dCTP, dGTP, et dTTP/dUTP

4- Fluorescent dyes* : **SYBR Green I** émet de la fluorescence lorsqu'il se lie à l'ADN double brin, l'excitation du fluorophores effectuée à 494 nm et l'émission à 521 nm et **ROX** émet la même fluorescence tout au long de la PCR, il sert de niveau de référence sur lequel tous les signaux fluorescents seront normalisés, il compense les différences de détection de fluorescence entre les puits dues aux faibles variations de volume réactionnel ou encore à la position des puits.

5- RNase-free water : Eau ultrapure

- Avant de commencer :
- La longueur de l'ADN à amplifier doit être idéalement comprise entre 100 et 150 pb
- Une étape initiale d'incubation de 15 min à 95°C est nécessaire pour activer l'ADN
- Polymérase HotStart Taq

6- Toujours commencer la réaction avec une concentration finale de MgCl₂ de 2,5 mM comme cela est fourni dans le tampon quantitect SYBR Green PCR Master Mix.

➤ Procédure :

- Décongeler les échantillons dans la glace, le master mix, les amorces et l'eau
- Préparer un mix selon le tableau suivant :

Réactifs	Pour 1 puit μ l	PCR -
Eau RNase free	7.8	7.8
Master Mix 10X	10	10
Amorce sens à 10 μ M	0.6	0.6
Amorce anti sens à 10 μ M	0.6	0.6
ADNc	1	-+ 1 μ l
Volume final	20	20

- 1- Dans les puits d'une plaque 96 puits⁽²⁾, mettre 19 μ L de mix
- 2- Ajouter 1 μ L d'ADNc de la dilution souhaitée soit pour la gamme étalon soit pour l'échantillon à quantifier relativement à la gamme
- 3- Coller un film adhésif transparent sur la plaque⁽²⁾ en insistant bien sur les contours
- 4- Programmer le bloc thermostaté⁽³⁾ pour un nombre de cycle compris entre 35 et 45 avec 3 étapes par cycle : la dénaturation à 94°C pendant 30 s, l'hybridation à 55-56°C (selon les amorces utilisées) pendant 30 s, l'élongation à 72°C pendant 30 s.
Avant les 35-45 cycles, ajouter une étape de dénaturation initiale à 94 °C pendant 15 min et à la fin une élongation finale à 72°C pendant 7 min suivie d'une dénaturation à 95°C pendant 5 s. Programmer ensuite la courbe de fusion en 50 cycles en augmentant la température de 65°C à 95°C à raison de 0,5°C par seconde.
- 5- La plaque peut ensuite être conservée à -20°C pour la visualisation des ADN sur gel d'agarose.

6- Oligonucléotides utilisés⁽⁴⁾:

Gène	Amorces	Taille de l'amplicon (pb)
CARM1	S : 5'-CCAGTTTTATGGCTACCTGTCC-3' AS: 5'-TTGAAGTCGGTGTGGTTTTG-3'	107
PRMT1	S: 5'-GTCATCGGGATCGAGTGTTTC-3' AS: 5'-TCCACCTTCCCCTTGATGAT-3'	109
SOX2	S: 5'-ACTTTTGTCTGGAGACGGAGA-3' AS: 5'-CATGAGCGTCTTGGTTTTCC-3'	121
Nanog	S: 5'-AATGGTGTGACGCAGAAGG-3' AS: 5'-AGGTCTGGTTGCTCCACATT-3'	115
poll	S: 5'-CAGACCGGCTATAAGGTGGA-3' AS: 5'-GGTAGACCATGGGAGAATGC-3'	123
Gapdh	S: 5'-CCACCCATGGCAAATTCATG-3' AS: 5'-TCTAGACGGCAGGTCAGGTC-3'	132

Tableau 8: Amorces utilisés en PCR quantitative

⁽¹⁾Quantitect® SYBR® Green PCR Qiagen (Courtaboeuf, France)

⁽²⁾ABgene® PCR Plates, Thermo-Fast® 96, Semi-Skirted, AB-0990, Thermo Scientific

⁽³⁾iCycler™, Biorad

⁽⁴⁾Les oligonucléotides ont été synthétisés par Eurogentec (Les Ulis, France). Les amorces pour la PCR quantitative ont été purifiées par HPLC. Les oligonucléotides utilisés ont été choisis à l'aide du logiciel Primer 3 (Whitehead Institute, Massachusetts Institute of technology, USA) accessible par l'adresse Internet, <http://www.genome.wi.mit.edu>

Fiche 21

ANALYSE QUALITATIVE DE L'ADN SUR GEL D'AGAROSE ⁽¹⁾

- Préparation du gel d'agarose⁽¹⁾
- Dissoudre l'agarose à raison de 1 à 1,5% (p/v) dans du tampon TBE 1X⁽²⁾ (Tris, Borate, EDTA) (80-100 mL)
- Chauffer le mélange à l'aide d'un four micro-ondes jusqu'à complète dissolution de l'agarose
- Attendre quelques minutes que le mélange refroidisse
- Ajouter le bromure d'éthidium (BET) ⁽³⁾ à 0,5 µg/mL et homogénéiser
- Couler le mélange dans le support de la cuve d'électrophorèse⁽⁴⁾
- Ajouter un peigne de 15 ou 20 puits selon le nombre d'échantillons à déposer
- Laisser polymériser pendant environ 20 min
- Placer le support dans la cuve remplie de tampon TBE 1X
- Préparation et dépôt des échantillons d'ADN issus de la réaction de PCR
- Décongeler les tubes contenant l'ADN amplifié
- Prélever 10 µL de chaque échantillon et ajouter 2 µL de tampon de dépôt⁽⁵⁾
- Déposer les 12 µL finaux dans les puits du gel ainsi qu'un marqueur de taille⁽⁶⁾
- Refermer la cuve avec son couvercle et relier les électrodes à un générateur de courant continu puis faire migrer pendant 40 min à 110 V

⁽¹⁾Agarose standard, Euromedex

⁽²⁾Tampon TBE 10X: Tris 890 mM acide borique 890 mM, EDTA (Ethylene Diamine Tetra Acetic acid) 20 mM (pH 8, 0), Sigma-Aldrich (St Louis, USA)

⁽³⁾Bromure d'éthidium (BET) : Eurobio

⁽⁴⁾Cuve d'électrophorèse, BioRad

⁽⁵⁾Solution de dépôt 6X : Bleu de bromophénol 0,05% (p/v), saccharose 40% (p/v), EDTA 0,1mM (pH 8, 0), SDS 0, 5% (p/v), Sigma-Aldrich (St Louis, USA)

⁽⁶⁾Marqueur de taille (DNA ladder) 100 pb, Invitrogen, Cergy-Pontoise, France

Fiche22

TRANSFECTION DES CELLULES EN CULTURE PAR DES si RNA ⁽¹⁾

Principe : les petits ARN interférents ou siRNA sont des petits ARN pouvant se lier spécifiquement à une séquence d'ARN messager et empêcher ainsi son expression en le clivant.

- Mettre les lignées cellulaires en culture 24 heures avant la transfection dans le support de culture adapté et à une densité d'ensemencement précise. Incuber à 37°C et 5% CO₂.

Support de culture	Densité d'ensemencement
6 puits	25000 à 40000 cellules/puit
96 puits	5000 à 10000 cellules/puit
P35 mm	50000 à 80000 cellules/puit
P100mm	150000 à 800000 cellules/puit
T25 cm ²	50000 à 250000 cellules/puit
T75 cm ²	1000000 cellules/puit

Tableau 9 : Densité d'ensemencement des cellules sur le support de culture pour la transfection avec les si RNA

- Eliminer le milieu de culture complet
- Laver le tapis cellulaire 2 fois avec du PBS1X stérile
- Rajouter du milieu RPMI brut sans SVF ni antibiotiques selon le volume requis par support (tableau 10)

Support de culture		P100mm	P35mm	P6 puits	P96 puits
Densité d'ensemencement	Par boîte ou puit	900000	450000	150000	100000
Volume RPMI pendant 1 hr		5ml	2.5ml	1.5ml	30µl
Mélange 1	siRNA(pmol)	1.8	0.9	0.3	0.012
	Optimem (µl)	249.2	124.1	42.2	24.98
Mélange 2	Lipofectamine (µl) ⁽²⁾	30	15	5	0.5
	Optimem (µl) ⁽³⁾	220	110	37.5	24.5
Volume final de mélange par boîte	µl	500	250	85	50
Volume de RPMI à rajouter après 4 heures	ml	10	5	2.5	30
Utilisation		Protéines	Prolifération agar	ARN	Plasmide

Tableau 10 : Volumes recommandés du milieu de culture et des mélanges de transfection pour les si RNA

- Incuber une heure ou toute la nuit à 37°C, 5% CO₂
- Pendant ce temps préparer sur la glace les mélanges 1 et 2 (tableau 10) séparément dans des tubes eppendorfs de 2ml
- Mélanger les mélanges 1 et 2 et laisser incuber 15 minutes à température ambiante
- Déposer le volume requis de mélanges 1 et 2 sur chaque support de culture (tableau)
- Incuber 4 heures minimum dans une étuve 37°C, 5% CO₂
- Rajouter le volume nécessaire du milieu RPMI supplémenté avec 10% SVF
- Incuber 5 jours en changeant le milieu chaque deux jours

Si RNA	Séquences
SiCARM1-1	5'-GAAGGAGAUUUGCACAGGAtt-3'
SiCARM1-2	5'-AGACAGAGCUACGACAUCAAtt-3'
SiPRMT1-1	5'-GCCUGCAAGUGAAGCGGAAtt-3'
SiPRMT1-2	5'-GCAACUCCAUGUUUCAUAAtt-3'
Si contrôle négatif	5' UUGAUGUGUUUAGUCGCUA 3'

Tableau 11: Séquences des si RNA utilisés pour la transfection

⁽¹⁾ siRNA dirigé contre CARM1 et PRMT1 et siRNA contrôle négatif. Deux lots ont été utilisés pour chaque gène

SiCARM1-1: réf S20577, Ambion

SiCARM1-2: réf S20579, Ambion

SiPRMT-1: réf S6917, Ambion

SiPRMT1-2: réf S6919, Ambion

Si contrôle negative: réf 4390846

⁽²⁾ lipofectamine RNAiMax, agent transfectant, invitrogen, France

⁽³⁾ Optimem, GIBCO

Fiche23

IMMUNOPRECIPITATION DE LA CHROMATINE (RedChIP Kit-Diagenode)

- **Préparation du paraformaldéhyde 37%** (la veille ou le matin) :
 - Peser 1.85 g de paraformaldéhyde pour 5ml d'eau
 - Ajouter 70µl de KOH (56.11mg/1ml d'eau)
 - Chauffer à la microonde 2 à 3 minutes, puissance max, en agitant de temps en temps
 - Conserver à 4°C

- **Fixation au PAF et récupération des cellules**
 - Compter le nombre de cellules
 - Mélanger 445µl de PAF 37% et 1.055 ml de tampon A pour 1 boîte (soit une concentration finale de PAF de 1%)
 - Ajouter 1.5 ml de mélange PAF+tampon A dans chaque boîte. Incuber 10 minutes à 37°C en agitant de temps en temps
 - Ajouter 1.8 ml de glycine 1.25M. Incuber 5 minutes à température ambiante. Conserver à 4°C en attendant
 - Aspirer le surnageant et rincer 2 fois au PBS1X (5ml+20µl PIC SIGMA)
 - Aspirer le surnageant et ajouter du tampon B, gratter les cellules et placer sur la glace. Ajouter de nouveau du tampon B, regratter et pooler les cellules. Il est possible de pooler plusieurs boîtes dans un même tube. 500µl de tampon B pour $3 \cdot 10^6$ cellules
 - Centrifuger 5 minutes à 500g à 4°C

- **Lyse des cellules**
 - Aspirer le surnageant et ajouter du tampon C. Resuspendre le culot en pipetant. Incuber 10 minutes à 4 °C en agitant de temps en temps. 15 ml de tampon C pour $50 \cdot 10^6$ cellules
 - Centrifuger 5 minutes à 500g à 4°C
 - Préparer le mélange tampon D+ inhibiteurs des protéases. Pour $3 \cdot 10^6$ cellules : 90µl D+3.6µl PIC 25x
 - Eliminer le surnageant, reprendre le culot avec le mélange D+PIC et transférer dans un eppendorf. Le volume par eppendorf doit être au minimum de 500µl par eppendorf pour avoir une sonication efficace. Eviter au maximum la formation de mousse.

- Prélever 30µl (environ 10⁶ cellules pour vérifier la sonication. Conserver à -20°C
- **Fractionnement de la chromatine**
- Sonication : 3x15 sec_puissance 5-40%
 - Centrifuger 15 minutes à 14000g à 4°C. récupérer le surnageant et aliquoter par 30µl
 - Congeler les aliquots dans l'azote liquide et conserver à -80°C
- **Vérification de la sonication**
- Reverse cross link : Prélever 30µl de chromatine soniquée, ajouter 370µl du tampon TE, 16µl de NaCl 5M et incuber 1 nuit à 65°C
 - Extraction de l'ADN :
 - ✓ Ajouter 400µl du phénol/ chloroforme/ isoamylcool (25/24/1). Mélanger par retournement jusqu'à émulsion
 - ✓ Centrifuger 1 minute à 12000 g. récupérer la phase aqueuse
 - ✓ Ajouter 400µl de chloroforme. Mélanger par retournement
 - ✓ Centrifuger 1 minute à 12000g. Transférer la phase aqueuse dans un nouveau tube
 - Précipitation de l'ADN à l'éthanol :
 - ✓ Ajouter 5µl de co-précipitant et 40µl de précipitant, mélanger puis ajouter 1ml d'éthanol absolu froid. Mélanger. Incuber 1 heure à -80°C
 - ✓ Centrifuger 20 minutes à 14000g à 4°C. Eliminer le surnageant. Laver le culot avec 1ml d'éthanol froid (ne pas mélanger). Centrifuger 5 minutes à 14000g à 4°C
 - ✓ Eliminer l'éthanol, laisser sécher le culot sous l'hoûte, resuspendre le culot dans 20µl d'eau et déposer 10µl sur gel d'agarose
- **Immunoprécipitation :**
- Décongeler la chromatine sur la glace
 - Préparer les tubes :

5% Blocker	6µl
PI 25x	10µl
Tampon E 5X	60µl
Billes	30µl
Eau	164-vµl (v=volume de l'anticorps)
 - Ajouter 30µl de chromatine par tube

- Ajouter les anticorps :
 - Facteur de transcription : 5µg
 - Contrôle négatif : IgG lapin ou sans anticorps (v=3µl)
 - Incuber 1 nuit à 4 °C sous agitation ro tative

- **Lavages et élution :**
 - Centrifuger 2 minutes à 500g à 4 °C. Éliminer le s urnageant
 - Placer le tampon F à température ambiante
 - Laver les billes avec les tampons suivants :
 - WB1 : 2 fois
 - WB2 : 1 fois
 - WB3 : 1 fois
 - WB4 : 2 fois
 - Conditions de lavage : 350µl de tampon, agitation rotative 5 minutes à 4°C, centrifugation 2 minutes à 500g à 4°C et élimination de surnageant
 - Ajouter 400µl de tampon F. incuber 20 minutes à température ambiante sur la roue
 - Centrifuger 2minutes à 500g à TA. Transférer le surnageant dans un nouvel eppendorf

- **Reverse cross link**
 - Décongeler un aliquot de 30µl (=input). Ajouter 370µl de tampon F
 - Ajouter 16 µl de NaCl 5M dans chaque tube. Incuber une nuit à 65°C
 - Extraction d'ADN au phénol/chloroforme :
 - Ajouter 400µl du phénol/ chloroforme/ isoamylcool (25/24/1). Mélanger par retournement jusqu'à émulsion.
 - Centrifuger 1 minute à 12000 g. récupérer la phase aqueuse.
 - Ajouter 400µl de chloroforme. Mélanger par retournement
 - Centrifuger 1 minute à 12000g. Transférer la phase aqueuse dans un nouveau tube

- **Précipitation de l'ADN à l'éthanol :**
 - Ajouter 5µl de co-précipitant et 40µl de précipitant, mélanger puis ajouter 1ml d'éthanol absolu froid. Mélanger. Incuber 1 heure à -80°C
 - Centrifuger 20 minutes à 14000g à 4°C. Eliminer le surnageant. Laver le culot avec 1ml d'éthanol froid (ne pas mélanger). Centrifuger 5 minutes à 14000g à 4°C

- Eliminer l'éthanol, laisser sécher le culot sous la hôte, resuspendre le culot dans 30µl d'eau, l'input dans 90µl. Quantifier l'ADN fixé par les facteurs de transcription par la PCR en temps réel

Gène	Amorces	Taille de l'amplicon (pb)
SOX2	S :TGGTCGCTAGAAACCCATTT	122
	AS :CCCCTTTTGCAAACACTCTC	
Nanog	S :CACCAGACCTGGGAAGAAGC	251
	AS :TCAAATCTGGCTAGTTTAGGCAG	
Gapdh	S :TACTAGCGGTTTTACGGGCG	130
	AS :TCGAACAGGAGGAGCAGAGAGCGA	
Région inter génique	S :ATGGTTGCCACTGGGGATCT	
	AS :TGCCAAAGCCTAGGGGAAGA	

Tableau 12 : Couples d'amorces utilisés pour l'immunoprécipitation de la chromatine

Anticorps	Espèce	Fournisseur
Anti-ARNPOLII	Souris	Abcam
Anti-H3R17me2	lapin	Millipore
Anti H4R3me2	lapin	Upstate
Anti IgG lapin	lapin	Millipore

Tableau 13: Anticorps utilisés pour l'immunoprécipitation de la chromatine

Fiche24

TRAITEMENT DES CELLULES EN CULTURE PAR DES MEDICAMENTS

- Ensemencer les cellules sur des boites de 96 puits à une densité de 10^8 cellules/P100 dans du milieu supplémenté avec 10% SVF
- Eliminer le milieu complet. Remplacer le par du milieu brut. Laisser incuber toute la nuit à 37°C, 5% CO₂
- Traiter les boites par les médicaments Pemetrexed ⁽¹⁾, Paclitaxel ⁽²⁾ et carboplatine ⁽³⁾ et également par du NaCl 0.9%. Les médicaments sont dissouts dans du NaCl 0.9%.
- Laisser incuber 24 heures à 37°C, 5% CO₂
- Faire le test MTT (fiche 6)

⁽¹⁾Pemetrexed, 2.5mg/ml, Lilly France, France

⁽²⁾Paclitaxel, 2mg/ml, Invitrogen, Cergy-Pantaise, France

⁽³⁾Carboplatine, 10mg/ml, Sigma Aldrich, saint Louis, USA

Fiche25

TRAITEMENT DES CELLULES EN CULTURE PAR LA PHOSPHATASE ALCALINE ⁽¹⁾ et PD184352⁽²⁾

- Ensemencer les cellules dans des boites de 100mm de diamètre à une densité de 10^8 cellules/P100 dans du milieu supplémenté avec 10% SVF
- Eliminer le milieu complet. Remplacer le par du milieu brut. Laisser incuber toute la nuit à 37°C, 5% CO₂
- Traiter les boites soit par la phosphatase alcaline ⁽¹⁾ soit par le PD184352 ⁽²⁾. Egalement traiter les cellules par du DMSO. Le PD184352 est dissout dans du DMSO.
- Laisser incuber 24 heures à 37°C, 5% CO₂
- Récupérer les cellules pour extraire les protéines (fiche 11) et les doser ensuite (fiche 13)

⁽¹⁾ Phosphatase alcaline, 6U, Invitrogen, Cergy-Pantoise, France

⁽²⁾ PD184352, 10µM, Invitrogen, Cergy-Pantoise, France

LISTE DES COMMUNICATIONS ET PUBLICATIONS

Communications :

- 1- **Rania Elakoum**; Christelle Clément-Duchêne; Guillaume Gauchotte; Marie-Pierre Wissler; Jean-Michel Vignaud; Jean-Louis Guéant; Fares Namour. « L'invalidation de CARM1 ou PRMT1 induit une diminution de la prolifération dans les lignées cellulaires de cancer de poumon à non petites cellules A549 et H1299 ». VIème Journée Claude Huriet de la recherche médicale (Décembre 2010, Nancy, France).

- 2- **Rania Elakoum** ; Christelle Clément-Duchêne ; Ghemrawi Rose ; Guillaume Gauchotte ; Jean-Louis Guéant ; Farès Namour. « Chez l'humain, la phosphorylation de CARM1 sur la sérine 228 inhibe l'interaction CARM1/PRMT1 ». VIIème Journée Claude Huriet de la recherche médicale (Février 2011, Nancy, France).

- 3- **Rania Elakoum** ; Christelle Clément-Duchêne ; Ghemrawi Rose ; Guillaume Gauchotte ; Jean-Louis Guéant ; Farès Namour. « Chez l'humain, la phosphorylation de CARM1 sur la sérine 228 inhibe l'interaction CARM1/PRMT1 ». Clinical Epigenetics Society (CLEPSO) International Meeting-participation (2012, Homburg, Allemagne)

- 4- **Rania Elakoum**; Christelle Clément-Duchêne; Guillaume Gauchotte; Marie-Pierre Wissler; Jean-Michel Vignaud; Jean-Louis Guéant; Fares Namour. « Etude de l'effet d'invalidation de CARM1 ou PRMT1 sur la prolifération des lignées cellulaires A549 et H1299 ainsi du rôle de la phosphorylation de CARM1 dans l'interaction CARM1/PRMT1 ». **Prix Wittner, prix de recherche annuel** (Novembre 2012, Nancy)

Publications soumises:

- 1- **Rania Elakoum**; Christelle Clément-Duchêne; Guillaume Gauchotte; Marie-Pierre Wissler; Jean-Michel Vignaud; Jean-Louis Guéant; Fares Namour. CARM1 and PRMT1 are dysregulated in lung cancer without hierarchical features.

- 2- **Rania Elakoum**, Christelle Clément-Duchêne, Ghemrawi Rose, Guillaume Gauchotte, Jean-Louis Guéant, Farès Namour. Human CARM1 phosphorylation at serine 228 prevents interaction with PRMT1.

- 3- Jean-Louis Guéant, **Rania Elakoum**, Olivier Ziegler, david Coelho, Eva Feigerova, Jean-Luc Daval, Rosa-Maria Guéant-Rodriguez. Nutritional Models of foetal programming and epigenomic dysregulation of fatty acid metabolism in liver and heart (**Les 2 premiers auteurs ont une contribution égale**)

Résumé

CARM1 et PRMT1 sont 2 Protein Arginine MethylTransferases (PRMTs) impliquées dans la prolifération et dérégulées dans le cancer. La dimérisation est une caractéristique commune aux PRMTs. PRMT1 et CARM1 coopèrent dans la régulation des gènes mais il n'existe pas de données concernant un hétérodimère CARM1/PRMT1. Nous avons trouvé que PRMT1 et CARM1 sont surexprimées dans le cancer du poumon non à petites cellules et dans 2 lignées d'adénocarcinomes pulmonaires, A549 et H1299. Les siPRMT1 réduisent la prolifération cellulaire et facilitent la différenciation. Les siCARM1 produisent un effet similaire mais, comme ceci a déjà été décrit, suppriment l'expression de PRMT1 en plus de celle de CARM1. Ainsi, CARM1 peut-elle réduire la prolifération par un effet direct ou en inhibant PRMT1. Ce résultat souligne l'intérêt d'étudier la formation de l'hétérodimère CARM1/PRMT1. Nous avons trouvé que dans les cellules A549, CARM1 n'est pas phosphorylée sur la sérine 228, interagit avec PRMT1, méthyle les promoteurs de 2 gènes cibles (Sox2 et Nanog) et est localisée dans le noyau. Dans les cellules H1299, CARM1 est phosphorylée sur la sérine 228, n'interagit pas avec PRMT1, ne méthyle pas les promoteurs de Sox2 et Nanog et est localisée dans le cytoplasme. L'inhibition de la kinase MAP2K3 empêche la phosphorylation de CARM1 sur la sérine 228 et restaure l'interaction CARM1/PRMT1 dans les cellules H1299. En conclusion, l'invalidation de PRMT1 réduit la prolifération dans les cancers du poumon. L'invalidation de CARM1 réduit aussi la prolifération probablement par l'intermédiaire de la suppression de PRMT1. Nous suggérons que MAP2K3 est la kinase qui phosphoryle CARM1 sur la sérine 228 et que cette phosphorylation inhibe l'interaction CARM1/PRMT1. La formation de l'hétérodimère CARM1/PRMT1 pourrait constituer un moyen pour réguler l'activité de ces 2 enzymes.

Mots clés : CARM1, PRMT1, phosphorylation, prolifération, différenciation, cancer du poumon à non petites cellules

Abstract

PRMT1 and CARM1 are 2 Protein Arginine MethylTransferases (PRMTs) implicated in cell proliferation and deregulated in cancer. Dimerisation is a conserved feature in the PRMT family. PRMT1 and CARM1 cooperate in gene regulation but CARM1/PRMT1 heterodimer is not yet characterised. We report that, PRMT1 and CARM1 are overexpressed in non-small cell lung cancer samples and in 2 lung adenocarcinoma cell lines, A549 and H1299. siPRMT1 reduce proliferation and promote differentiation. siCARM1 yield similar consequences but, as this was previously described, suppress PRMT1 expression in addition to CARM1 expression. Thus CARM1 might reduce proliferation by a direct effect or alternatively through PRMT1 suppression. This result reinforces the interest of investigating the CARM1/PRMT1 heterodimer formation. We found that in A549 cells, CARM1 is not phosphorylated at serine 228, interacts with PRMT1, methylates the promoter of 2 target genes (Sox2 and Nanog) and is localized in the nucleus. In H1299 cells, CARM1 is phosphorylated at serine 228, does not interact with PRMT1, does not methylate Sox2 and Nanog promoters and is localized in the cytoplasm. Inhibition of the kinase MAP2K3 prevents the phosphorylation of CARM1 at serine 228 and restores CARM1/PRMT1 interaction in H1299 cells. In conclusion, we propose that PRMT1 knock-down reduces proliferation in lung cancer. CARM1 knock-down reduces proliferation probably through the suppression of PRMT1. We suggest that MAP2K3 is the candidate kinase that phosphorylates CARM1 at serine 228 and that phosphorylation inhibits CARM1/PRMT1 interaction. CARM1/PRMT1 heterodimer formation might be a way of regulating the activities of these enzymes.

Keywords: CARM1, PRMT1, phosphorylation, proliferation, differentiation, non-small cell lung cancer.

Pflügers Archiv - European Journal of Physiology
Nutritional models of foetal programming and nutrigenomic and epigenomic dysregulations of fatty acid metabolism in liver and heart
 --Manuscript Draft--

Manuscript Number:	PAEJ-D-13-00243R1
Full Title:	Nutritional models of foetal programming and nutrigenomic and epigenomic dysregulations of fatty acid metabolism in liver and heart
Article Type:	Invited Review
Corresponding Author:	Jean-Louis Gueant, M.D., Ph.D. Inserm U%RS 954 Nancy, FRANCE
Corresponding Author Secondary Information:	
Corresponding Author's Institution:	Inserm U%RS 954
Corresponding Author's Secondary Institution:	
First Author:	Jean-Louis Gueant, M.D., Ph.D.
First Author Secondary Information:	
Order of Authors:	Jean-Louis Gueant, M.D., Ph.D. Rania El Akoum Olivier Ziegler David Coelho Eva Feigerlova Jean-Luc Daval Rosa-Maria Guéant-Rodriguez
Order of Authors Secondary Information:	
Abstract:	<p>The Barker's concept of "foetal programming" proposes that intra-uterine growth restriction predicts complex metabolic diseases through relationships that may be further modified by post-natal environment. Dietary restriction and deficit in methyl donors, folate, vitamin B12 and choline, are used as experimental conditions of foetal programming as they lead to intra-uterine growth restriction and decreased birth weight. Overfeeding and deficit in methyl donors increase central fat mass and lead to dramatic increase of plasma free fatty acids in offspring. Conversely, supplementing the mothers under protein restriction with folic acid reverses metabolic and epigenomic phenotypes of offspring. High fat diet or methyl donor deficiency during pregnancy and lactation produce liver steatosis and myocardium hypertrophy that result from increased import of free fatty acids and impaired fatty acid β-oxidation, respectively. The underlying molecular mechanisms show dysregulations related with similar decreased expression and activity of SIRT1 and hyperacetylation of PGC1-α. High fat diet and overfeeding impairs AMPK-dependent phosphorylation of PGC1-α, while methyl donor deficiency decreases PGC1-α methylation through decreased expression of PRMT1 and cellular level of S-adenosyl methionine (SAM). The visceral manifestations of metabolic syndrome are under the influence of endoplasmic reticulum stress, in overnourished animal models. These mechanisms should also deserve attention in the foetal programming effects of methyl donor deficiency since vitamin B12 influence endoplasmic reticulum stress through impaired SIRT1-deacetylation of HSF1. Taken together, similarities and synergies of high fat diet and methyl donor deficiency suggest therefore considering their consecutive or contemporary influence in the mechanisms of complex metabolic diseases.</p>

Response to Reviewers:

We appreciate the very positive general comments and the fruitful suggestions made by the reviewer. We have prepared a point-by-point answer to the specific comments:

Point 1: “Three figures indeed improve the understanding of the basic mechanisms. However, I recommend to remove Figure 3 because the data shown are not convincing, they show no or opposite effects in female mice - that might be due to altered estrogen levels which would make the story more complicated. I rather suggest showing a cartoon demonstrating the alterations that are induced by methyl donor deficiency.”

We have deleted the figure 3. Since the review is focused on the deregulation of fatty acid metabolism in heart and liver, we thought that the main metabolic changes of MDD in liver and heart can be better described in the text than in a cartoon.

Point 2: furthermore miss a few important papers e.g. those on the epigenetic alteration of PGC1 in relatives of T2D subjects and their modifications in response to exercise and bariatric surgery as described by the Zierath group. And the paper by Kuehnen et al (PLoS Genet. 2012;8:e1002543) that demonstrates a similar epigenetic alteration of POMC in blood cells of obese subjects than in samples of the hypothalamus.”

These references have introduced and discussed at the end of the paragraph dedicated to the influences of nutrition and metabolism on the epigenome, at the end of page 10 and beginning of page 11:

“The leptin responsive preproopiomelanocortin (POMC) gene is a hypothalamic regulator of energy balance. A hypermethylation variant targeting individual CpGs at the intron2–exon3 boundary of POMC is associated to obesity in children, in another case control study. The hypermethylation of exon3 reduces the expression of POMC through reduced binding of the transcription enhancer P300 [99]. The dynamic effect of obesity on the epigenome is also illustrated by an altered promoter methylation of peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator1 α (PGC-1 α) and pyruvate dehydrogenase kinase isozyme 4 (PDK4) in skeletal muscle from adult obese subjects, which is restored to non-obese levels after weight loss induced by by-pass surgery [11]. In this study, the genome-wide DNA methylation analysis of skeletal muscle showed also that obesity is associated with hypermethylation at CpG shores and exonic regions close to transcription start sites [11]. Consistently, sedentary lifestyle and lack of physical activity may modify epigenetic programming and predisposition to obesity and T2DM, as recently reviewed [94]. In particular, in decreased expression of the mitochondrial and glucoregulatory genes PGC-1 α , Hexokinase 2 (HK2), and ATP synthase subunit beta (ATPB), through epigenomic mechanisms that involve the activation of histone deacetylase (HDAC) family members in skeletal muscle [94].”

Point 3 “The manuscript could be improved by providing a list of abbreviations used in the text. “

We have added this list of abbreviations in the revised version

Point 4: Minor points

“Page 6 line 57: of methionine by” This has been corrected

“Page 8 line 14 (T2DM)” This has been corrected

“Page 10 line 29 POMC” pomc gene refers to rats, in this sentence. In the gene nomenclature used in our review, genes in capital letter refer to non defined or human genome.

“Page 14 line 51: please indicate the tissue in which altered GLLUT4 expression was detected” This is now indicated (skeletal muscle)

“It has to be estrogen instead of oestrogen in the entire text.” This has been changed

Point 5: “The text within the figures needs to be translated.” We apologize. We have submitted a preliminary version of our figures, instead of the final version. This is now corrected.

1
2
3 **Nutritional models of foetal programming and nutrigenomic and**
4 **epigenomic dysregulations of fatty acid metabolism in liver and heart**
5
6
7
8
9

10
11
12
13 Jean-Louis Guéant*, Rania Elakoum, Olivier Ziegler, David Coelho, Eva Feigerlova, Jean-
14
15 Luc Daval, Rosa-Maria Guéant-Rodriguez
16
17
18
19
20
21
22

23 Inserm U954 N-GERE, Nutrition-Genetics-Environmental Risk Exposure, University of
24
25 Lorraine and University Hospital Center of Nancy, Vandoeuvre-lès-Nancy, France
26
27
28
29
30
31
32

33 *Corresponding author: Jean-Louis Guéant, Inserm U 954 N-GERE, Faculty of Medicine - BP
34
35 184, 54511, Vandoeuvre les Nancy. E-mail: jean-louis.gueant@medecine.uhp-nancy.fr
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Abstract

1 The Barker's concept of "foetal programming" proposes that intra-uterine growth restriction
2 predicts complex metabolic diseases through relationships that may be further modified by
3 post-natal environment. Dietary restriction and deficit in methyl donors, folate, vitamin B12
4 and choline, are used as experimental conditions of foetal programming as they lead to intra-
5 uterine growth restriction and decreased birth weight. Overfeeding and deficit in methyl
6 donors increase central fat mass and lead to dramatic increase of plasma free fatty acids in
7 offspring. Conversely, supplementing the mothers under protein restriction with folic acid
8 reverses metabolic and epigenomic phenotypes of offspring. High fat diet or methyl donor
9 deficiency during pregnancy and lactation produce liver steatosis and myocardium
10 hypertrophy that result from increased import of free fatty acids and impaired fatty acid β -
11 oxidation, respectively. The underlying molecular mechanisms show dysregulations related
12 with similar decreased expression and activity of SIRT1 and hyperacetylation of PGC1- α .
13 High fat diet and overfeeding impairs AMPK-dependent phosphorylation of PGC1- α , while
14 methyl donor deficiency decreases PGC1- α methylation through decreased expression of
15 PRMT1 and cellular level of S-adenosyl methionine (SAM). The visceral manifestations of
16 metabolic syndrome are under the influence of endoplasmic reticulum stress, in overnourished
17 animal models. These mechanisms should also deserve attention in the foetal programming
18 effects of methyl donor deficiency since vitamin B12 influence endoplasmic reticulum stress
19 through impaired SIRT1-deacetylation of HSF1. Taken together, similarities and synergies of
20 high fat diet and methyl donor deficiency suggest therefore considering their consecutive or
21 contemporary influence in the mechanisms of complex metabolic diseases.
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44

45 **Key words:** foetal programming, metabolic syndrome, high fat diet, protein restriction, folate,
46 vitamin B12, epigenomics.
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Abbreviations

1
2
3
4
5 AMP-activated protein kinase, AMPK
6
7 ATP synthase subunit beta, ATPB
8
9 Cobalamin, Cbl
10
11 Diacylglycerol, DAG
12
13 Differentially methylated region, DMR
14
15 DNA (cytosine-5)-methyltransferase, DNMT
16
17 Estrogen-related receptor alpha, ERR- α
18
19 Fatty acid, FA
20
21 Flavin adenine dinucleotide, FAD
22
23 Free fatty acids, FFA
24
25 General Control Non derepressible 5, GCN5
26
27 Glucocorticoid receptor, GR
28
29 Heat shock factor protein 1, HSF1
30
31 Hexokinase 2, HK2
32
33 Histone acetyltransferase, HAT
34
35 Histone deacetylase, HDAC
36
37 Histone demethylase, HDM
38
39 Histone methyltransferase, HMT
40
41 Hypoxia-inducible factor, HIF-1 α
42
43 Insulin-like growth factor 1, IGF1
44
45 Interleukin-6, IL-6
46
47 Intra-uterine growth restriction, IUGR
48
49 Metabolically Healthy but Obese subjects, MHO
50
51 Metabolically abnormal obese, MAO
52
53 Methionine synthase, MS
54
55 Methylenetetrahydrofolate reductase, MTHFR
56
57 Methyl donor deficiency, MDD
58
59 Target of rapamycin, mTOR
60
61 Nicotinamide, NAM
62
63 Nicotinamide dinucleotide, NAD⁺
64
65 Non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD

Non-alcoholic steato-hepatitis, NASH

One-carbon metabolism, OCM

Peroxisome proliferator activated receptor-alpha, PPAR- α

Peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator1 α , PGC-1 α

Preproopiomelanocortin, POMC

Protein kinase C, PKC

Pyruvate dehydrogenase kinase isozyme 4, PDK4

Protein arginine methyltransferase 1, PRMT1

Reactive oxygen species, ROS

S-adenosyl methionine, SAM

S-adenosyl homocysteine, SAH

Serotonin, 5-HT

Sirtuins, SIRT

Sterol response element binding protein 1c, SREBP1c

Suppressor of cytokine signalling, SOCS

Subcutaneous adipose tissue, SAT

Tumor necrosis factor-alpha, TNF α

Type 2 diabetes mellitus, T2DM

Visceral adipose tissue, VAT

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 Metabolic disorders linked to obesity represent a major health problem and a major part of the
2 health costs worldwide. Obesity is a strong predictor of metabolic syndrome and insulin
3 resistance. Insulin resistance is defined as inhibition of insulin stimulation of metabolic
4 pathways, including lipid homeostasis. Both obesity (i.e. excess of adipose tissue) and ectopic
5 fat deposition are closely associated with insulin resistance. The accumulation of excess lipids
6 or their metabolites derivatives (i.e. lipotoxicity hypothesis) in organs decreases insulin
7 signalling and activate pro-inflammatory in liver, skeletal muscle and heart. On the other
8 hand, insulin resistance is closely associated with dysregulation of fatty acid (FA)
9 metabolism. The consequences of hepatic or cardiac steatosis are non-alcoholic fatty liver
10 disease (NAFLD) and lipotoxic cardiomyopathy, respectively. How obesity promotes these
11 visceral complications is not completely understood, The influence of excessive intake of
12 macronutrients has deserved much more attention than the deficient intake in micronutrients,
13 in epidemiological and experimental studies, and the combined influence of global
14 overnutrition and selective deficit in a category of micronutrient remains an open question.
15 An increasing number of these studies have highlighted the influence of nutrients on the
16 expression of genes regulating metabolism, through a body of knowledge known as
17 "nutrigenomics."
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31

32
33
34 As recently reviewed [48, 59], genetics, epigenetics, epigenomics and environment interact in
35 defining the individual risk of obesity and related diseases. Epigenetics and epigenomics refer
36 respectively to heritable and non-heritable (e.g. dependent from environment) changes of gene
37 expression, which are caused by mechanisms such as DNA methylation, histone
38 acetylation/methylation, dysregulation of gene transactivation and synthesis of miRNA. The
39 influence of genetics is illustrated by the 2- to 3-fold increased disease risk in offspring from
40 parents with obesity and type 2 diabetes mellitus (T2DM), in European populations [115].
41 Studies in twins undergoing overfeeding suggest also a strong influence of heritability [21].
42 Beside genetics, the lifestyle and environmental factors clustered within families determine
43 dietary preferences and food availability, two factors that may trigger epigenomic
44 mechanisms. The Barker's concept of "foetal programming" [10], also named developmental
45 origins of health and disease, proposes that unfavourable intra-uterine life, including intra-
46 uterine growth restriction, predicts the risk of post-natal metabolic complex diseases through a
47 relationship that may be further modified by post-natal environment. Environmental
48 conditions of intra-uterine growth restriction include nutritional stress such as protein and/or
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 energy restriction [59, 88). Recently, experimental and epidemiological studies have also
2 highlighted the involvement of deficiencies in methyl donors during and after intra-uterine
3 life.
4

5 In this review, we will compare the epigenetic, epigenomic and nutrigenomic influences of
6 three prevalent conditions of imbalanced intake of nutrients, overfeeding, dietary restriction
7 (with a particular interest for proteins and amino acids) and deficit in methyl donors, during
8 pregnancy and early post-natal life, and their consequences on the risk of obesity and related
9 metabolic disorders in the liver and the heart. We will devote a specific interest for the
10 mechanisms related to the influence of these imbalanced intakes on deregulation of fatty acid
11 metabolism.
12
13
14
15
16
17
18
19

20 **The abnormal distribution and storage of fat influences the liver and heart** 21 **complications of metabolic syndrome and insulin resistance** 22 23 24 25

26 Obese individuals vary in their body fat distribution, their metabolic profile and the degree of
27 associated cardiovascular and metabolic risks. As far as adipose tissue distribution is
28 concerned, obesity consists of different subtypes or phenotypes with different metabolic
29 profiles. The mechanisms at the origin of the phenotype of Metabolically Healthy but Obese
30 subjects (MHO) are poorly understood. Recent studies have confirmed that the combined
31 phenotype of decreased lean body mass and central obesity reflects insulin resistance and
32 indicates a high risk of diabetes mellitus [96] in Western and Asian countries. Metabolic
33 syndrome related to central obesity may be viewed as « Unhealthy Obesity » and the
34 concerned individuals as metabolically abnormal obese (MAO) patients [17, 140]. More
35 recently, an acquired type of partial lipodystrophy closely linked with the severity of
36 metabolic complications over a wide range of BMI has been described in overweight adults,
37 children, adolescents and elderly persons [162]. As described for the genetic type of partial
38 lipodystrophy (e.g. Dunnigan syndrome), this phenotype is characterized by partial loss of
39 peripheral fat and accumulation of fat in the trunk while the clinical presentation is less
40 severe.
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52

53 Many studies support the concept of a major role for intra-abdominal fat accumulation
54 (visceral adipose tissue, VAT) in the link between abdominal obesity and insulin resistance.
55 Visceral hypertrophic adipocytes and VAT resident macrophages produce pro-inflammatory
56 cytokines like tumor necrosis factor-alpha (TNF α) and interleukin-6 (IL-6). VAT is also
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 pathogenic because its venous blood drainage is direct via the portal vein to the liver. As a
2 consequence of enlarged visceral adipocytes, the flux of free fatty acids (FFA) and pro-
3 inflammatory cytokines contributes to hepatic insulin resistance and fat deposition in the liver
4 (Portal hypothesis of insulin resistance) [15, 92] and to NAFLD in obese patients [53]. FFAs
5 promote insulin resistance by increasing hepatic glucose production. On the other hand, the
6 production of pro-inflammatory cytokines by the VAT and circulating levels of IL-6
7 accelerate the subsequent transition to non-alcoholic steato-hepatitis (NASH) and fibrosis
8 [53]. Excess VAT could be also a surrogate marker of metabolic syndrome. The preferential
9 accumulation of fat in the intra-abdominal cavity could be viewed as the consequence of an
10 ectopic deposition [42]. According to this alternative hypothesis, increased visceral fat mass
11 may represent a marker of the inability of patients with insulin-resistant obesity to store fat in
12 subcutaneous adipose tissue (SAT). When the storage capacity of adipose tissue is exceeded,
13 then a continuous exposure to fatty acids, not counter balanced by fatty acid oxidation, will
14 lead to an accumulation of FFAs and induces a lipid “spill over” to other tissues.
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26

27 **The impaired fatty acid oxidation is a major facet of the alterations of lipid** 28 **metabolism in metabolic disorders related to obesity** 29 30

31
32
33 Free fatty acids meet all the criteria to be a metabolic factor related to insulin resistance, in
34 human subjects. Plasma FFAs levels are elevated in most obese subjects and will inhibit
35 antilipolytic action of insulin, which will further increase FFAs release into the circulation
36 [86]. Most studies have devoted attention to stressed adipose tissue releasing more FFAs, but
37 decrease rate of mitochondrial fatty acid (FA) oxidation is another potential mechanism to be
38 considered. A substantial part of the insulin resistance lowering activity of thiazolidinediones
39 can be attributed to their lowering of plasma FFAs levels through increasing FFA oxidation
40 [18]. Several mechanisms grouped in the ‘lipid metabolite hypothesis’ have been proposed to
41 explain how obesity and/or FFAs can interfere with insulin signalling. An increase in plasma
42 FFA concentration results in intramyocellular and intrahepatic accumulation of triglycerides,
43 long chain Acyl-CoAs and diacylglycerol (DAG) [18]. DAG is a potent activator of
44 conventional and novel protein kinase C (PKC) isoforms. In vivo, plasma FFAs levels
45 activate NF- κ B in skeletal muscle and result in increased expression of pro-inflammatory
46 cytokines, including TNF- α , IL-1 β , IL-6 and MCP1. Possible mechanisms through which
47 FFAs and the subsequent NF- κ B activation and cytokine production can result in insulin
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 resistance include activation of JNK by cytokines and induction of suppressor of cytokine
2 signalling (SOCS), which can interfere with binding of IRS1/2 to the insulin receptor [100].
3
4

5 **Influences of nutrition and metabolism on the epigenome: a facet of the** 6 **mechanisms that may influence foetal programming and obesity** 7 8 9

10 Foetal programming can produce heritable and non-heritable changes in adiposity through
11 epigenetic and epigenomic mechanisms due to DNA methylation or histone modification of
12 DNA in gene regulatory regions. The emerging level of evidence in human population studies
13 contrasts with the number of arguments that sustain this hypothesis in experimental models
14 [31].
15
16
17
18
19

20 DNA methylation by DNA (cytosine-5)-methyltransferases (DNMT) occurs at cytosine
21 residues in CpG dinucleotides in vertebrates [140]. The methylated CG is symmetrically
22 paired with the same sequence on the opposite DNA strand, which means that after DNA
23 replication, sites are transiently methylated in only one of the two strands. Although the
24 pattern of 5-methylcytosines in the genome of differentiated somatic cells is quite stable,
25 during early development DNA methylation plays a critical role in the control of cell
26 processes including embryonic development, transcription, X-chromosome inactivation and
27 genomic imprinting. Histone modifications influence DNA replication, repair and
28 condensation and gene expression. The posttranslational covalent modifications of histones
29 include acetylation, methylation, phosphorylation and ubiquitination. The methylation and
30 acetylation of histones are dynamic processes, which depend respectively on balances
31 between histone methyltransferases (HMTs) and histone demethylases (HDMs) and between
32 histone acetyltransferases (HAT) and three classes of histone deacetylases (HDAC). The
33 methylations and acetylations of histone residues obey to inter- and trans-histone regulatory
34 pathways forming a “histone code”. Lysine methylation displays a high degree of complexity
35 since each lysine residue can be mono-, di- or tri-methylated and each site of methylation can
36 influence gene activity independently. Arginine residues can be mono-methylated or di-
37 methylated symmetrically or asymmetrically [140].
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52

53 Folate and vitamin B12 (cobalamins, Cbl) are supposed to play a key role in epigenomic
54 dysregulations of metabolism [64, 65]. These two nutritional methyl donors are needed for the
55 endogenous synthesis of methionine by methionine synthase (MS). The homeostasis of
56 methionine is crucial in cell life, since it is the aminoacid required for the translation initiation
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 and the immediate precursor of S-adenosyl methionine (SAM) [56]. They play a significant
2 modulating role on DNA methylation through their influence on the cellular content of SAM,
3 which is the universal methyl donor in transmethylation reactions [64, 65]. The cellular deficit
4 in cobalamin and Me-THF leads also to decreased synthesis of methionine and accumulation
5 of homocysteine, which produces cellular stress by mechanisms largely documented in the
6 literature [177]. The role of SAM as methyl donor used by HMTs and DNMTs explains the
7 influence of the deficiency in dietary methyl donors on histone and DNA methylation in rats
8 [132, 25]. The importance of vitamin B12 and folate for maintaining an adequate cellular
9 content of SAM is illustrated by the consequences of their deficiency on the cellular
10 concentration of SAM, S-adenosyl homocysteine (SAH) and SAM/SAH ratio [61, 62]. The
11 subsequent decreased SAM/SAH ratio impairs the cell capacity to ensure the transmethylation
12 reactions of co-regulators of nuclear receptors, which play a key role in epigenetic and
13 epigenomic mechanisms [65]
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24

25 Beside dietary methyl donors, there are also nutrigenomic and epigenomic crosstalks between
26 intermediate products of the metabolism of macronutrients and co-enzymes derived from
27 micronutrients [88]. The methylation and demethylation of DNA and histones depend on the
28 cellular availability in coenzymes and substrates involved in energy metabolism and one-
29 carbon metabolism. ATP is required for the synthesis of SAM. AMPK senses nutrient
30 deprivation through increased AMP levels, activating catabolic pathways to restore ATP
31 levels and to increase mitochondrial biogenesis [33]. The macronutrient intake modifies the
32 cellular content of nicotinamide dinucleotide (NAD^+) and flavin adenine dinucleotide (FAD),
33 which act as metabolic sensors of epigenomic regulations through demethylation and
34 deacetylation of histones [165]. There are two types of HDMs, the LSD1-containing domain
35 demethylases and the JumomjiC (JmjC) domain containing demethylases [165]. The LSD1-
36 containing domain HDM is regulated by FAD, while the activity of JmjC-containing domain
37 HDM depends on alpha-keto-glutarate, which is produced from glutamate in the Krebs cycle
38 [169] and from the vitamin B6 dependent cystathionine γ -lyase in the transulfuration pathway
39 of homocysteine, in the one carbone metabolism [65]. The loss-of-function of Jhdm2a is
40 associated with reduced expression of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha
41 (PPAR- α) and medium-chain acyl-CoA dehydrogenase [164]. NAD^+ is required for
42 activation of the class III Sirtuin HDACs. The deacetylation of histones catalyzed by Sirtuins
43 (SIRT) leads to the cleavage of NAD^+ into nicotinamide (NAM) and 1-O-acetyl-ADP-ribose
44 [34]. Butyrate, a short-chain carboxylic acid (C4) produced by the bacterial flora and the
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

intermediate metabolism of macronutrients and, in a lesser extent, acetate (C2), propionate (C3), valerate (C5) and caproate (C6), inhibit the HDAC of classes I and II [43].

DNA methylation changes during lifetime in function of environmental factors that include nutrition. This is illustrated by studies in humans and in distinct animal models, such as rodents and insects. Methylation of monozygotic twins becomes divergent with age [57]. Both restriction and over-nutrition diets are related to changes in DNA methylation in the few epigenome-wide association studies that have investigated foetal programming related risk for T2DM and obesity. In particular, the study of individuals who were prenatally exposed to famine during the Dutch hunger winter in 1944 has provided pertinent findings in favour of epigenomic mechanisms [74]: 6 decades later, these individuals exhibited obesity associated with decreased DNA methylation of the imprinted IGF2 gene, as compared to the same-sex siblings without exposure to prenatal malnutrition. Individuals with periconceptional exposure to the famine had lower methylation of the INSIGF gene and higher methylation levels for several other genes, including IL10, LEP and ABCA1 [167]. The hypocaloric diet increases methylation in three loci of DNA from subcutaneous adipose tissue in overweight or obese postmenopausal women [22]. This diet also increases methylation at two loci in DNA from peripheral blood mononuclear cells in overweight or obese men [118]. Recently, a meta-analysis of genome-wide association studies has highlighted the rs7202116 at the FTO gene locus to be correlated with BMI [185]. A role for epigenomics was suggested by the influence of methylation of a CpG site in the first intron on the association of the FTO risk allele with BMI. However, the causality role of this methylation remains unclear [13, 3]. The FTO protein has a demethylase activity on N6-Methyladenosine of nuclear RNA, but whether this metabolic function is related to the observed effects on BMI remains an open question [87]. The leptin responsive preproopiomelanocortin (POMC) gene is a hypothalamic regulator of energy balance. A hypermethylation variant targeting individual CpGs at the intron2–exon3 boundary of POMC is associated to obesity in children, in another case control study. The hypermethylation of exon3 reduces the expression of POMC through reduced binding of the transcription enhancer P300 [99]. The dynamic effect of obesity on the epigenome is also illustrated by an altered promoter methylation of peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator1 α (PGC-1 α) and pyruvate dehydrogenase kinase isozyme 4 (PDK4) in skeletal muscle from adult obese subjects, which is restored to non-obese levels after weight loss induced by by-pass surgery [11]. In this study, the genome-wide DNA methylation analysis of skeletal muscle showed also that obesity is associated with hypermethylation at CpG shores

1 and exonic regions close to transcription start sites [11]. Consistently, sedentary lifestyle and
2 lack of physical activity may modify epigenetic programming and predisposition to obesity
3 and T2DM, as recently reviewed [94]. In particular, they result in decreased expression of the
4 mitochondrial and glucoregulatory genes PGC-1 α , Hexokinase 2 (HK2), and ATP synthase
5 subunit beta (ATPB), through epigenomic mechanisms that involve the activation of histone
6 deacetylase (HDAC) family members in skeletal muscle [94].
7

8
9
10 Epigenome wide studies performed in insects and rodents under specific diets have also found
11 changes in DNA methylation. An intriguing model is provided by honeybees. Fertile queens
12 and sterile workers are alternative forms of the adult female honeybee that develop from
13 genetically identical larvae following differential feeding with royal jelly, a mixture including
14 proteins, sugars and fatty acids. Dnmt3 small interfering RNA-treated individuals emerged as
15 queens with fully developed ovaries. DNA methylation by Dnmt3 triggers epigenetic
16 informations differentially altered by nutrition, with implications in development,
17 reproduction and behavioural status of honeybees [98, 75, 55].
18
19
20
21
22
23
24
25
26

27 **High fat diet and foetal programming**

28 29 30 **The role of deacetylase sirtuin 1 (SIRT1) and peroxisome proliferator-activated receptor** 31 **γ coactivator1 α (PGC-1 α) in metabolic dysregulations** 32 33 34 35

36 Maternal obesity and high fat diet during pregnancy increase the risk of obesity in the
37 offspring through complex mechanisms, which involve metabolic deregulation and alteration
38 of food intake behaviour [82]. Paternal obesity has also to be considered. For example,
39 paternal high fat diet alters the expression of genes related to ATP binding and calcium-,
40 MAPK- and Wnt-signalling pathways, and to apoptosis and cell cycle, in the pancreas of rat
41 F1 female offspring. This suggests a role for epigenomic modifications of sperm produced by
42 the nutritional status, which continues after the epigenetic reprogramming during the meiosis
43 and first post-zygotic division [123].
44
45
46
47
48
49
50

51 Epidemiological studies have found an association between maternal overfeeding and chronic
52 diseases in offspring, when they reach adulthood [174]. Worldwide prevalence of childhood
53 obesity has increased greatly during the past three decades. The increasing occurrence of
54 metabolic syndrome in children and adolescents and of type 2 diabetes in young adults is
55 believed to be a consequence of this epidemic obesity. The pandemic obesity is largely related
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

to easy access to energy-dense cheap foods and decreased energy requirements in daily life [175]. SIRT1, PGC-1 α and the related downstream pathways play a major role in these deregulations [85, 185]. The deacetylation of PGC-1 α by SIRT1 increases while its acetylation by General Control Non derepressible 5 (GCN5) inhibits its activity [145]. High-fat feeding produces hyperacetylation of PGC-1 α and a down-regulated expression of PGC-1 α -dependent genes through increased expression of the two acetylases SRC-3 and GCN5 and decreased expression and activity of SIRT1 [39, 32]. These changes are consistent with the hyperacetylation of PGC-1 α and the down-regulated expression of PGC-1 α -dependent genes in mice lacking SRC-3 (Fig.1) [39]. SIRT1 deacetylation plays also a key role in metabolic homeostasis through regulation of the activity of Foxo transcription factors [26] and acetyl-CoA synthetases [70]. Consistently, the treatment of mice fed a high-fat diet with resveratrol and other SIRT1 agonists prevents weight gain and insulin resistance [100].

High fat diet during pregnancy influences food intake behaviour in offsprings

Aberrant expression of genes that control the feeding behaviour may contribute to the development of obesity-related diseases. Maternal preference for macronutrient and energy intakes during pregnancy rather than paternal preference is associated with fat preference in the child [24]. The control of appetite and energy balance is regulated by peripheral signals, including glucose, leptin, insulin, and gut hormones through their effects on hypothalamic neuropeptides mostly expressed in the arcuate nucleus. High fat diet and/or maternal obesity increase neurogenesis and the production of hypothalamic neuropeptides that affect food intake, such as neuropeptide Y and POMC [124, 37, 36]. A recent experimental study performed with mice showed that maternal high fat diet produces offsprings' epigenetic marks with long-term alterations in expression of dopamine and opioids-related genes [173]. The neonatal overfeeding in rats also produces epigenomic DNA marks in the hypothalamus, with increased methylation of the promoters of pomc and insulin receptor [136, 137]. Leptin is another candidate, which is secreted almost exclusively by adipocytes and exerts a pivotal role in energy homeostasis and regulation of food intake. The high-fat diet produces changes of methylation at specific CpG sites within the leptin promoter, with consequences on circulating leptin levels [119]. Consequently, pomc is not upregulated in these rats despite hyperinsulinaemia and hyperleptinaemia [136].

Consequences of high fat diet during pregnancy on offspring's liver

1
2
3
4 High fat diet produces hepatic steatosis and non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD)
5 through complex mechanisms triggered by insulin resistance, which include the imbalance
6 between uptake and de novo lipogenesis of non-esterified fatty acids and triglyceride, disposal
7 by fatty acid oxidation and secretion of triglyceride-rich lipoproteins [92]. The liver is
8 subjected to epigenomic changes produced by high fat diet during the in-utero and post-natal
9 periods, which participate in these mechanisms. In non-human primates, maternal high-fat
10 diet during pregnancy increases H3K14 and H3K18 acetylation in offspring, with locus-
11 specific effect on glutamic pyruvate transaminase 2 [1]. It increases the fetal H3K14ac, in
12 relation with decreased SIRT1 expression and activity [159]. In rats, two days-old offspring of
13 mothers fed a high fat diet display hepatic cell cycle inhibition in relation with changes in
14 DNA methylation and gene expression of the cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (Cdkn1a)
15 [50], an alteration, which may potentially contribute to NAFLD. Maternal high fat diet
16 impairs the activity of mitochondrial complexes I-IV and carnitine palmitoyl transferase-1a
17 (CPT-1a) and up-regulates the hepatic lipogenesis in adult offspring. Consistently, high fat
18 diet during pregnancy and lactation alters hepatic expression of peroxisome proliferator
19 activated receptor-alpha (PPAR- α), insulin like growth factor-2 and microRNAs, including
20 miR-122, miR-192, miR-194, miR-26a, let-7a, let7b and let-7c, miR-494 and miR-483, in
21 adult offspring [187]. High fat feeding results in up-regulation of miR-143 and down-
22 regulation of miR-27a in mouse mesenteric adipose tissue through altered expression of
23 PPARs [114]. High fat diet produces also transgenerational and sex-dependent effects in
24 mice. The male offspring of the F2 generation develop obesity and hepatic steatosis earlier
25 and more severely than the F0 and F1 generations. The transgenerational changes in liver
26 include enhanced lipogenesis and ER stress with increased expression of fatty acid synthase
27 (FAS), SREBP, LXR α and β and ERO1- α . These effects play a key role in NAFLD and
28 insulin resistance [52] and are related with epigenomic changes on histone methylations and
29 reduced binding of methylated histones in LXR α and ERO1- α gene promoters [104].
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52

Consequences of high fat diet during pregnancy on offspring's myocardium

53
54
55
56 Whether the deleterious effect of high fat intake and caloric excess on myocardium are
57 independent from those related to the consequences of obesity and insulin resistance on
58 endothelial dysfunction, hypertension and hyperlipidemia is a matter of debate in population
59
60
61
62
63
64
65

1 studies and experimental models. The fat-enriched diet induces insulin resistance,
2 inflammation and apoptosis, and these manifestations may also contribute to the cardiac
3 hypertrophy. High-fat feeding of Wistar rats produces cardiac contractile dysfunction, which
4 enhances CD36-mediated fatty acid uptake and myocardium triacylglycerol accumulation
5 [129]. Cardiac changes leading to cardiac lipotoxicity in rodents include mitochondrial
6 dysfunction and impaired biogenesis, alteration of ROS production and increased lipid
7 oxidation [188]. In Obese Zucker rats, the high-fat “Western diet” increases cardiac
8 triglyceride content within a week, while long-term exposure promotes fatty acid oxidation,
9 which correlates with the prevention of further deterioration in cardiac function and
10 triglyceride accumulation [30]. In response to high blood concentration of long-chain fatty
11 acids (FAs), the heart is forced to increase FA uptake through increased expression of the FA
12 transporter CD36, resulting ultimately to diabetic cardiomyopathy [45]. Then, this leads to the
13 further increase of FAs and lipid intermediates such as DAG and ceramide and the increased
14 production of reactive oxygen species (ROS), with a profound impact on signalling pathways
15 [45]. High-fat diet leads to glucose intolerance, elevated insulin plasma levels and reduced
16 IGF-1 levels in mice. These changes may contribute to disrupt phosphorylation of insulin
17 receptor and post-receptor signalling molecules such as insulin receptor substrate 1
18 (tyrosine/serine phosphorylation), forkhead transcriptional factors and mTOR (target of
19 rapamycin) [188].

20 PPARs play a master role in myocardium deregulations of FA uptake and mitochondrial β -
21 oxidation [171]. In particular, PPAR α up-regulates the expression of FA transporters and
22 induces the synthesis of metabolic enzymes of the β -oxidation pathway [171]. However, the
23 role of the impaired expression PPAR α in the metabolic effects of high fat diet on
24 myocardium is questioned in part by the results obtained with KO mice. This animal model
25 accumulates myocardial lipids through lower FA oxidation rate but does not produce high fat-
26 induced insulin resistance, suggesting the contribution of other regulators [177, 134]. PPAR γ
27 seems to have a limited role in regulating cardiac metabolism, probably due to its low
28 myocardial expression. Treatment of wild type and PPAR γ -KO mice subjected to high fat diet
29 with PPARs agonists, rosiglitazone, fenofibrate and pioglitazone, indirectly protects
30 myocardium from lipid accumulation and lipotoxic damage by reducing fatty acids delivery to
31 the heart. It also produces a shift of myocardial substrate utilization towards greater
32 contribution of glucose [9].

1 The influence of high fat diet on PGC-1 α down-regulation and the subsequent consequences
2 in mitochondrial dysfunctions have also been proposed to play a major role in the
3 mechanisms that relate obesity with heart failure [171]. High-fat diet induced juvenile obesity
4 leads to cardiomyocyte dysfunction, up-regulates the forkhead transcription factor Foxo3a,
5 and suppresses mitochondrial aconitase activity without affecting expression of SIRT1 [143].
6
7 However, SIRT1 seems to play an adaptive role since the myocardium stimulation of SIRT1
8 extends the life span of mice fed a high-fat diet and retards aging in the heart [184]. Another
9 deacetylase, HDAC3, may contribute to the epigenomic mechanisms underlying the
10 deleterious influence of high fat diet on myocardium [158]. Embryonic deletion of myocardial
11 Hdac3 in mice causes a major cardiomyopathy that reduces survival. When the excision of
12 Hdac3 in heart is produced during the late development, the switch to a high fat diet leads to
13 severe hypertrophic cardiomyopathy and heart failure, with down-regulation of myocardial
14 mitochondrial genes, specifically those involved in lipid metabolism, suggesting that HDAC3
15 is important in maintaining proper mitochondrial function [158].
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26

27 **Protein restriction and foetal programming**

28
29
30
31 The Dutch Hunger Winter of 1944 has provided a well-characterized population adapted for
32 studying the relations between food restriction and foetal programming in humans. In the
33 related Dutch Cohort, pregnant mothers and foetuses have experienced malnutrition during
34 the first, second, or third trimesters of pregnancy. The mother's food rations were known and
35 the follow-up medical histories of foetuses could be collected in national population registers.
36 This has permitted to highlight associations between food restriction, intra-uterine growth
37 restriction (IUGR) and increased risks of metabolic syndrome, diabetes and cardiovascular
38 diseases [110, 147, 148] and to study the epigenomic changes related to these associations
39 [167]. Beside these population studies, animal models of food and protein restriction have
40 been used to dissect the molecular mechanisms, which underlie the association between foetal
41 growth retardation and metabolic and visceral consequences. In rodents, protein restriction
42 during pregnancy and lactation results in reduced pancreatic β -cell mass at birth and reduced
43 insulin secretion in later life [135]. The transcriptional alterations induced by protein
44 restriction during pregnancy rely mainly on transient transcription factor-dependent
45 deregulations, with strong specific transcriptional changes in foetal tissue that cluster liver
46 with heart [170]. The vast majority of studies have compared the 20-18% casein diet (control
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 situation) to 10-8% casein. Methionine content is low in casein diets and these experimental
2 protocols raise the question of limiting intake of methionine, which is insufficiently
3 considered.
4
5
6

7 Dietary protein restriction in insect and rodent models has uncovered a likely role for key
8 nutrient sensors, including mTOR, insulin-like growth factor 1 (IGF1), insulin, AMP-
9 activated protein kinase (AMPK), SIRT1 [152] and PGC-1 α [51]. The effects of dietary
10 restriction on PGC-1 α regulation mirror those of the high fat diet. Decreased acetylation of
11 PGC-1 α results from decreased expression of the two acetylases SRC-3 and GCN5 and
12 increased expression of SIRT1 [39, 32]. The royal jelly diet induces queen bee differentiation
13 through the influence of mTOR and IGF1/insulin pathways, with consequences on DNA
14 methylation [125].
15
16
17
18
19
20
21
22

23 **Protein or calorie restriction during pregnancy favours hyperphagia in offspring**

24
25
26
27 The protein or calorie restriction during gestation and/or suckling of rodents produces
28 hyperphagia. Low-protein diet throughout pregnancy and lactation reduces anorexic effects of
29 serotonin (5-HT) in malnourished rats through a desensitization of 5-HT(1B) receptors. Pups
30 born from protein-restricted dams and treated with DL-fenfluramine exhibit hyperphagia, at
31 least partially related to a reduced regulatory function of 5-HT [108]. The hypothalamus is
32 one of the brain area affected by the programming effect of protein restriction. Perinatal
33 protein restriction permanently alters the expression of two gene clusters, the first one
34 regulating insulin signalling and nutrient sensing and the second a functional network of
35 nuclear receptors and co-regulators of transcription involved in the use of lipids as fuel and in
36 metabolic regulation by the circadian clock [128]. Consistently, giving the restricted diet at
37 the same time each day changes the daily profiles of PERIOD1 and PERIOD2 protein
38 expression in brain nucleus of rats [172]. Mice born to mothers fed a low-protein-diet have
39 lower body weight and adiposity and higher food intake than animals born to mothers fed a
40 control diet. These modifications persist throughout life and are associated with methylation
41 changes in leptin gene, as observed in rats subjected to high fat diet. This nutritional stress
42 results in lesser methylation of CpGs located in the promoter of leptin, causing a permanent
43 modification in the dynamics of leptin expression, with stronger induction in response to a
44 meal [90]. The low-protein diet in pregnant rats may have subsequent effects on feeding
45 behaviour of offspring through alteration in the expression level of the genes encoding Dnmt1
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 and Dnmt3a and in methylation status of promoters of genes encoding orexigenic and
2 anorexigenic hypothalamic neuropeptides, including neuropeptide Y, pro-opiomelanocortin
3 and leptin [41].
4
5
6

7 **Consequences of calorie or protein restriction during pregnancy on offspring's liver**

8
9

10 The caloric restriction causes epigenetic and epigenomic changes that contribute to an
11 increased risk of insulin resistance and NAFLD. It produces changes in acetylation and
12 methylation of histones and hypomethylation of gene promoters with consequences that
13 include reduced expression of the GLUT4 glucose transporter in rat skeletal muscle [142] and
14 it increases foetal liver phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) in primate [126]. The
15 increased expression and activity of PEPCK in liver promote gluconeogenesis and
16 consequently, the induction of insulin resistance. In contrast, hepatic PEPCK activity is
17 reduced in female offspring of dams fed a protein restriction diet [143]
18
19

20 The effects of caloric restriction are targeted by deacetylases. Low-birth weight foetuses from
21 pregnant dams fed a restricted diet have an increased prenatal hepatic SIRT1 activity. Low-
22 birth weight newborn offspring undergo postnatal suppression of hepatic SIRT1 and AMPK
23 activities in conjunction with increased lipogenesis, decreased lipolysis, and increased fat
24 stores [180]. Moreover, transgenic mice overexpressing Sirt1 exhibit metabolic and
25 physiological effects mimicking those induced by dietary restriction [8]. Moderate energy
26 restriction seems to produce distinct results influenced by sex, with lower hepatic expression
27 of SIRT1, sterol response element binding protein 1c (SREBP1c) and stearoyl-CoA
28 desaturase-1 in males and unchanged levels in females, compared to controls [130]. SIRT3 is
29 also a prominent regulator of the mitochondrial adaptation to caloric restriction by
30 coordinately deacetylating proteins involved in mitochondrial maintenance [73]. SIRT6 is
31 significantly decreased following dietary restriction and this may contribute to the increased
32 acetylation at lysine residue 9, 27 and 56 in H3 [91].
33
34

35 The low-protein diet in maternal rats produces epigenomic hallmarks of NAFLD in foetuses
36 and offsprings [144]. However, the deregulation of imprinting through a general effect on the
37 methylation of differentially methylated regions (DMRs) is unlikely to be involved in
38 developmental programming. Indeed, although expression of some imprinted genes in liver of
39 offspring is sustainably changed, the methylation of DMRs that control their monoallelic
40 expression remains largely unaltered [83]. Protein restriction during pregnancy induces
41 hypomethylation of PPAR α and glucocorticoid receptor (GR) promoters and increases
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 expression of GR and PPAR α in liver of juvenile and day-80 adult offspring [27, 29]. The
2 altered expression of GR, PPAR α and HNF4 deregulates lipid oxidative metabolism and
3 promotes liver steatosis and insulin resistance. These alterations have an epigenetic
4 characteristic with transmission to future generations [29]. Protein restriction alters the
5 epigenetic regulation of GR through reduced Dnmt1 expression in the offsprings [107]. Other
6 changes include hypomethylation of specific cytosines in PPAR α promoter, in offspring's
7 liver [107] and repressive changes in histone modifications at the cholesterol 7 α -
8 hydroxylase promoter through decreased hepatic expression of Jmjd2a demethylase in foetal
9 liver [154]. Transgenerational effects of protein restriction have been studied in rats and mice.
10 Offspring from protein-restricted F0 rats show altered fasting glucose homeostasis and
11 changes in phosphoenolpyruvate carboxykinase promoter methylation and expression in the
12 three F0, F2 and F3 generations [79]. The protein restriction in F0 produces also a lower
13 promoter methylation of PPAR α and GR in the liver from F1 and F2 generations [27].
14 Similarly to what has been observed on high fat models, the father's restriction diet may also
15 produce transgenerational effects, with elevated hepatic expression of genes involved in lipid
16 and cholesterol biosynthesis in offspring. Epigenomic profiling of offspring livers revealed
17 changes in cytosine methylation depending on paternal diet, including changes in methylation
18 over a likely enhancer for PPAR α [35].
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35

36 **Consequences of caloric or protein restriction during pregnancy on offspring's** 37 **myocardium** 38 39

40
41
42 In contrast to the deleterious effects of high fat intake and over-nutrition, long term caloric
43 restriction leads to decreased cardiac triglyceride content in obese type 2 diabetic subjects [53,
44 71] and protects healthy individuals against age-associated decline in diastolic function [117].
45 However, little is known about the long term effects of the intra-uterine exposure to protein
46 and/or caloric restriction in population studies, and in particular the molecular and metabolic
47 changes in myocardium [151]. Long-term caloric restriction decreases left ventricular wall
48 thickness and cardiomyocyte cell length and increases cardiac autophagy in C57BL/6 mice.
49 At the molecular level, it increases the phosphorylation of Akt/glycogen synthase kinase-3 β
50 and AMPK /acetyl-CoA carboxylase [72]. Long-term caloric restriction of mice reduces
51 triglyceride content in heart, with a more dynamic pool in females than in males [7]. It
52 maintains mitochondrial protein synthesis in heart and skeletal muscle, an observation, which
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 is consistent with an increased somatic maintenance [120]. In contrast, long-term caloric
2 restriction of mice decreases ubiquinone Q9 and COQ transcript levels in heart [131].

3 Food and protein restriction deregulates fat and energy metabolism in heart of pregnant rat.
4 The methylation of PPAR α promoter is decreased and mRNA expression of PPAR α and
5 carnitine palmitoyltransferase-1 is increased by maternal protein restriction diet in adult, but
6 not in neonatal offspring [153]. Maternal protein restriction of rats during gestation increases
7 the myocardial expression and deposition of collagens in day 70 offspring, compared to
8 controls, in relation with changes in the expression patterns of pro-fibrotic genes and discrete
9 structural abnormalities of heart [116].
10
11
12
13
14
15
16
17

18 **Consequences of amino-acid restriction during pregnancy**

19
20
21 Beside the large number of studies devoted to the foetal programming effects of protein
22 restriction, a lesser attention has been paid to the global or specific deficit in amino acids.
23 Amino acid homeostasis depends on dietary intake of proteins and on the endogenous
24 turnover of protein synthesis and degradation. Part of the mechanisms of foetal programming
25 related to protein restriction may be therefore related to this altered homeostasis. Some of
26 them may be explained by specific functions of amino acids [60]. For example, serotonin is
27 needed for the biosynthesis for tryptophan and glutamate is a neurotransmitter. The deficit in
28 amino acids may also produce consequences through their role as intermediate substrates in
29 many pathways of the metabolism as exemplified by the role of methionine, glycine and
30 serine in the one-carbon metabolism [65] and the role of alanine in neoglucogenesis [60].
31
32
33
34
35
36
37
38
39

40 Interestingly, tryptophan and methionine are the two least abundant essential amino acids in
41 casein, the protein commonly used in the protein restriction diets used in experiments with
42 rodents. Thus, the regimens using casein as the sole source of protein could produce effects
43 related to inadequate intake of these two amino acids, including reduced adiposity, extended
44 maximal longevity, increased resistance to acetaminophen toxicity in the liver, reduced
45 insulin, IGF1 (insulin growth factor 1) and thyroid hormone levels [121]. Methionine
46 restriction contributes to adiposity resistance by altering the lipogenic/lipolytic balance [133],
47 while leucine deprivation improves insulin sensitivity [180].
48
49
50
51
52
53

54 Two signal transduction mechanisms are involved in sensing intracellular deficit in amino
55 acids [60]. GCN2 senses the absence of many amino acids while the TOR pathway senses the
56 presence of branched amino acids (leucine, isoleucine and valine), arginine and glutamine.
57 Both repress general translation through distinct mechanisms. The signal transducing kinase
58
59
60
61
62
63
64
65

1 GCN2 binds to uncharged tRNAs, resulting in kinase activation and phosphorylation of eIF2 α
2 in brain and liver, which leads to slow down translation of most mRNAs and to favour the
3 translation of mRNAs containing specific regulatory elements in their 5'-untranslated regions
4 [60]. TOR is a serine/threonine kinase that controls cell proliferation in response to adequate
5 energy, nutrients and growth factors. The activation of TOR does not involve its binding to
6 amino acids or surrogates such as tRNAs. Rag family of small GTPases is required for amino
7 acid sensing by mTORC1 [60].

8
9 Part of the effects of protein restriction diet on food intake could be explained by the
10 influence of amino acid deprivation in the brain. Leucine reduces food intake through
11 activation of mTOR in hypothalamus [40]; mTORC1 activation by amino-acid restriction also
12 results in changes in metabolic pathways such as the stimulation of glycolysis, pentose
13 phosphate pathway and de novo lipid biosynthesis through the activation of hypoxia-inducible
14 factor (HIF-1 α), SREBP1 and SREBP2 [50]. Aversion to food intake can be produced by
15 diets lacking essential amino acids through activation of GCN2 in anterior piriform cortex
16 [63]. GCN2 can also influence fat metabolism. Expression of lipogenic genes and activity of
17 fatty acid synthase (FAS) in the liver are repressed and lipid stores in adipose tissue are
18 mobilized upon leucine deprivation in mice. In contrast, GCN2-deficient mice develop liver
19 steatosis and exhibit reduced lipid mobilization [69]. Leucine deprivation improves hepatic
20 insulin sensitivity by sequentially activating GCN2 and decreasing mTOR/S6K1 signalling
21 and by activating AMPK [180].
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37

38 **Methyl donors, foetal programming and manifestations of metabolic** 39 **syndrome.** 40 41 42 43

44 Methyl donors could play a modulating role in complex metabolic diseases, according to
45 epidemiological and experimental data. Deficiencies in folate and vitamin B12, and to a lesser
46 extent in choline, are common during the gestational period in Western countries. The animal
47 models with methyl donor deficiency (MDD) have a small birth weight and undergo altered
48 expression of key regulators of metabolism and obesity-related diseases, such as SIRT1,
49 PGC-1 α and Mir-124 [34, 65, 93]. Methyl donors play an essential role in the epigenetic and
50 epigenomic mechanisms (methylation, acetylation) that influence gene expression and cell
51 signalling. They produce IUGR with long-lasting consequences during development and
52 throughout life [65, 46]. In this context, it is noteworthy to note that experimental cellular and
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 animal models of MDD produce molecular hallmarks similar than those associated with
2 overfeeding and obesity, such as decreased expression of SIRT1 and inactivation of PGC-1 α
3 through imbalanced acetylation/methylation (Fig.1).
4
5
6

7 **Methyl donors and foetal programming: the population-based studies.**

8
9

10 Recent large epidemiological studies have shown that vitamin B12 deficit during pregnancy is
11 the most powerful micronutrient predictor for the risk of small birth weight and subsequent
12 events related to foetal programming, including metabolic syndrome and insulin resistance. In
13 contrast, the influence of folate status during pregnancy on foetal programming
14 manifestations is less consistent. In India, babies are thin but fat, compared to Europe [182]
15 and the high prevalence of mothers with low serum vitamin B12 is associated with IUGR. In a
16 rural area from South India, the most insulin resistant children were born to mothers who had
17 the lowest serum vitamin B12 and the highest erythrocyte folate concentrations [181]. Low
18 maternal vitamin B12 blood level in early pregnancy predicts an elevated risk of insulin
19 resistance, while folic acid maternal supplementation has a weak protective effect on
20 incidence of metabolic syndrome, in school-aged offsprings from rural Nepal [156].
21 Population studies focused on the influence of folate in foetal programming have also
22 produced contrasted results in Western countries. Antenatal supplementation with folic acid
23 increases birth weight, while high homocysteine and low folate concentrations in early
24 pregnancy are associated with both low placental and birth weights, and higher risk of adverse
25 pregnancy outcomes, in the Netherlands [166, 14]. Folate intake estimated by questionnaire
26 does not influence childhood body composition, in a cohort from South UK [103], while it is
27 associated with birth weight and insulin resistance in French obese adolescents [58].
28 Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) 677 C>T polymorphism is not associated
29 with obesity, BMI or metabolic syndrome in three cohorts from UK, Danemark and Italy
30 [102, 149]. In contrast, in France, this polymorphism was associated with low birth weight
31 and high insulin resistance in morbidly obese adolescents [58].
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50

51 Several studies suggest that these associations could involve epigenomic mechanisms. A
52 variant of adenosyl-methionine decarboxylase is associated with childhood obesity, in India
53 [161]. Studies conducted in Gambia, have found changes in methylation of metastable epi-
54 alleles [177] when comparing birth exposure to seasonal variations of food-consumption
55 patterns, which produce also significant changes in methyl-donor biomarkers [47].
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Consequences of methyl donor deficiency (MDD) on birth weight, food intake and digestive mucosa

The mother-progeny rat model of deficiency in folate, vitamin B12 and choline contributes to understand the complex links between metabolic syndrome and birth weight, according to the foetal programming hypothesis [16, 61, 89, 139]. MDD produces a dramatic injury of digestive mucosa that may participate to the patho-mechanisms of IUGR, small birth weight and abnormal food intake, but little is known on its effects on food intake [20]. Ghrelin is a gastric peptide involved in foetal growth through its dual role as growth hormone-releasing factor and appetite stimulating peptide [95]. Methyl donor deficiency affects gastric cell organization and impairs the release of Ghrelin in blood [20]. It also produces an over-expression of Cox-2, PLA2 and TNF- α pro-inflammatory pathways in gastric and intestine mucosa and alters mucosal differentiation and function, in rat pups from dams subjected to deficiency during gestation and lactation [23, 78].

The link between the one-carbon metabolism (OCM) and non-alcoholic fatty liver disease.

Vitamin B12, folate, homocysteine and genetic determinants of the one carbon metabolism are associated with NAFLD severity, in operated and non-operated obese subjects [68, 77, 97]. Hepatic steatosis is also observed in patients with genetic disorders of OCM [38, 150]

A restriction of the periconceptional diet in cobalt and sulfur in sheep produces low vitamin B12 and methionine and leads to heavier and fatter adult offspring, with insulin-resistance and elevated blood pressure that are most obvious in males. The altered methylation status of CpG islands examined by restriction landmark genome scanning in the foetal liver revealed that more than half of the affected loci are specific to males [152]. The normal mitochondrial proteome function relies on the maintenance of methylation, in rodents [5]. Impaired mitochondrial metabolism has been reported in genetically altered mice exhibiting SAM deficiency in liver [112], suggesting that SAM plays a critical role in maintaining proper mitochondrial function. Consistently, supplementation with methyl donors and SAM at concentrations that maintain methylation reactions preserves mitochondrial proteome as well as prevents ethanol-dependent defects in mitochondrial respiration [4, 6, 160]

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

In the mother-progeny rat model of MDD, fatty liver and fatty heart can be regarded as two early predisposing manifestation of metabolic syndrome, through deregulation of lipid fuel homeostasis and mitochondrial metabolism [91, 139]. The deficiency yields micro-vesicular liver steatosis in pups [16]. The steatosis results from a deficit in carnitine synthesis and epigenomic deregulations, with hypomethylation and decreased expression of PPAR- α , ERR- α , ER- α and liver specific nuclear receptor HNF-4 α , and hypo-methylation of PGC1- α co-activator through decreased activity of arginine methyltransferase 1 (PRMT1) [139]. The hypomethylation of PGC1- α in the liver participates to the epigenomic deregulation of FA β -oxidation by reducing its partnership with PPAR- α , ERR- α , and HNF-4 α (figure 2) [61, 139]. Consistently, other data show that the lack of PPAR- α enhances steatohepatitis and that PPAR- α agonist has the opposite effect, in mice fed a methionine- and choline-deficient diet [109]. Mice fed a methionine and choline deficient diet develop steatohepatitis, with an inflammatory infiltrate prominent in hepatic acinar zone [178]. Feeding mice a choline- and folate-deficient diet for 12 weeks causes NAFLD with a down-regulation of PPAR α -regulated lipid catabolic pathway genes [168]. These results have to be considered in regard to the central role of mitochondrial dysfunction in insulin resistance [109]. Methyl donor deficiency produces a decreased expression of SIRT1 [136], which is also observed in high fat diet [81]. Male inbred C57BL/6J and DBA/2J mice fed a methyl-deficient diet develop liver injury similar to NASH. The livers of DBA/2J mice had initially a lower degree of methylation of repetitive elements and lower extent of histone H3 lysine 9 (H3K9) and H3 lysine 27 (H3K27) trimethylation, compared to those in the C57BL/6J mice. They developed subsequently more prominent NASH-specific patho-morphological changes [138].

Consequences of MDD on heart.

MDD during pregnancy and lactation of rodents induces heart hypertrophy, with impaired mitochondrial fatty acid oxidation and decreased activity of complex 1 and II of the respiratory chain, in rat pups [61]. The role of the deficiency in producing the myocardium hypertrophy has been ascertained by a significant correlation of heart/body weight with folate, vitamin B12 and Hcy. The diet produces a decreased concentration of folate, a decreased SAM/SAH ratio and an increased immuno-histochemical detection of Hcy in the myocardium of the deficient animals. The decreased SAM/SAH ratio is the consequence of a trap whereby the impaired remethylation pathway and the absence of cystathionine- β -synthase produced a conversion of homocysteine into SAH by the reversible enzyme SAH hydrolase [61]. The

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

proteomic analysis of myocardium of pups from rat dams fed a methyl donor deficient shows altered abundance of proteins associated with developmental disorder, cellular compromise and lipid metabolism [111]. Concurrently, increased protein carbonylation, the major oxidative post-translational protein modification, could contribute to the decreased abundance of many myocardial proteins [111]. The main proteomic changes are observed for proteins regulated by PGC-1 α , PPARs and ERR α . These proteins, namely trifunctional enzyme subunit α -complex, short chain acylCoA dehydrogenase, acylCoA thioesterase 2, fatty acid binding protein-3, NADH dehydrogenase (ubiquinone) flavoprotein 2, NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 α -subunit 10 and Hspd1 protein, are involved in fatty acid oxidation and mitochondrial respiration. These changes are related to the decreased expression of PPAR- α and estrogen-related receptor alpha (ERR- α) and to the hypomethylation and hyperacetylation of PGC-1 α through decreased expression and activity of PRMT1 and SIRT1 and decreased SAM/SAH ratio (Fig. 2). It is noticeable that the decreased expression of SIRT1 is also a molecular hallmak of overnutrition (Fig.1) [32, 51, 61, 80].

Folate and vitamin B12-dependent pathways are needed for the proper foetal development of heart. Indeed, the c.56+781 A>C (rs326119) variant of intron-1 of methionine synthase reductase results in functionally reduced gene transcription and significantly increases the risk of congenital heart disease in the Han Chinese population [189]. The link between the one-carbon metabolism, cardiomyopathies and impaired mitochondrial fatty acid oxidation has been confirmed in two contrasted populations, patients undergoing coronarography and ambulatory elderly subjects [67]. Folate deficit was more frequent in the coronarography population than in the elderly ambulatory volunteers and produced a higher concentration of homocysteine. Homocysteine and NT-pro-BNP were positively correlated with short chain-, medium chain-, long chain-acylcarnitines and with acylcarnitine ratios indicative of decreased mitochondrial acyldehydrogenase activities. This can contribute to explain the association of homocysteine with left ventricular mass and left ventricular systolic dysfunction [66, 76].

Comparison of the tissue, metabolic, genomic and epigenomic effects of high fat/ overfeeding, protein/caloric restriction and methyl donor deficiency

The pups deprived in methyl donors had a decreased birth weight and no change in insulin concentration, as observed in the protein restriction and food restriction rat models of foetal

1 programming [24–26]. However, comparing the heart and liver manifestations in the three
2 diets and the underlying molecular mechanisms shows intriguing similarities between high
3 fat/over feeding and methyl donor deficiency. The methyl donor deficient rats have a dramatic
4 increase of plasma FFA, which is similar to that observed in high fat diet animals and
5 contrasts to the mild increased level reported in pups under protein and/or food restriction
6 [24–26]. Methyl donor deficiency produces a cardiac hypertrophy with myocardium fatty acid
7 accumulation, a phenotype, which is due to impaired fatty acid β -oxidation and possibly to an
8 increased import of free fatty acids from plasma.
9

10 Intriguingly, the deficit in methyl donors may produce a central lipodystrophy, with similar
11 molecular hallmarks than those observed following overfeeding and high fat diet. These data
12 and epidemiological data on the methyl donor status of mothers during pregnancy suggest
13 considering with particular interest the effects of methyl donor deficiency during pregnancy
14 and over nutrition in later life as part of the explanation of the links between foetal
15 programming and metabolic disorders related to obesity. It is noteworthy that several studies
16 on cell and experimental models found a strong imbalance in energy metabolism similar to
17 that observed in metabolic syndrome, with molecular hallmarks similar to those produced by
18 nutrition overload and obesity, including the decreased expression and activity of SIRT1, the
19 related hyperacetylation of PGC1- α and the subsequent disruption of mitochondrial energy
20 metabolism [65]. High fat diet and overfeeding impairs the AMPK-dependent
21 phosphorylation of PGC1- α , a change to be documented in methyl donor deficiency. AMPK
22 is a key metabolic sensor, which behaves as a control switch to maintain metabolic
23 homeostasis in function of energy supply. It is decreased by calorie restriction and increased
24 by over feeding, with a mirrored influence that depends on the cellular level of ATP and on
25 AMP/ATP ratio (Fig. 1). The expression and influence of AMPK in methyl donor deficiency
26 needs to be better evaluated, considering the possible inhibitory effect of SAM on its activity
27 [113]. PP2A, one of the four major classes of eukaryotic serine/threonine phosphoprotein
28 phosphatases, is also a metabolic sensor to be considered, since it is activated by methylation
29 and up regulated by vitamin B12 deficiency [12]. The visceral manifestations of metabolic
30 syndrome and insulin resistance are under the influence of endoplasmic reticulum stress, in
31 overnourished animal models [52]. These mechanisms should also deserve attention in the
32 foetal programming effects of methyl donor deficiency since vitamin B12 influence
33 endoplasmic reticulum stress through impaired SIRT1-deacetylation of heat shock factor
34 protein 1 (HSF1) (Fig. 3) [62].
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 The mirrored influence of methyl donor deficiency and protein restriction on heart and liver
2 manifestations of foetal programming is consistent with the reversal of the metabolic and
3 epigenomic phenotype induced by maternal nutritional restriction when supplementing the
4 mothers with folic acid, in rats [28]. Intriguingly, giving folate supplementation during the
5 juvenile-pubertal period of offspring produced opposite results, with hepatosteatosis, impaired
6 liver fatty acid β -oxidation and decreased liver expression of PPAR α through promotor
7 hypermethylation [28, 105]. As highlighted by Burdge et al, these findings may reflect the
8 fact that puberty is one of the four periods of increased instability of the epigenome [28].
9 Giving a high-fat diet to pups from mother fed a protein-restricted diet after weaning
10 exacerbates their obesity [145]. Similar studies should be performed to test the consecutive or
11 contemporary influence of methyl donor deficiency and high fat diet, in regard to the potential
12 synergic effects of the two diets at the tissue, metabolic and genomic levels.
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22

23 **Conclusion**

24
25
26
27 A limited number of population studies have evaluated the metabolic, epigenomic and
28 genomic effects of foetal programming on liver and heart manifestations. This probably
29 reflects the difficulty to design follow-up and interventional studies adapted to the tested
30 hypotheses, despite the remarkable experimental attention, which have been deserved in
31 animal models, and particularly in rodents. In contrast to over feeding and methyl donor
32 deficiency, protein and/or food restriction does not assess a situation, which reproduces the
33 more frequent causes of abnormal nutritional status of mothers during pregnancy and
34 lactation, at least in Western countries. High fat intake/over feeding and methyl donor
35 deficiency are two situations, which are frequent during pregnancy, in adolescents and in
36 elderly subjects, in countries, which are no subjected to folate fortification. Their consecutive
37 and/or contemporary influence during pregnancy and later life should be therefore
38 investigated in population studies and experimental animal models.
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48

49 In liver and heart, experimental consequences include increased influx and storage produced
50 by over feeding/high fat and impaired fatty acid β -oxidation by methyl donor deficiency.
51 Beside the influence of high fat and overfeeding on insulin resistance and metabolic
52 syndrome, several large epidemiological studies have shown that vitamin B12 deficit during
53 pregnancy is a powerful predictor for the risk of small birth weight, lipodystrophy, metabolic
54 syndrome and insulin resistance, in India and Nepal. Paradoxically, its effects are more
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 important in newborns and children from mothers supplemented in folate. Meanwhile,
2 experimental data have shown that the deficiency in Cbl and folate produces central fat
3 accumulation and epigenomic dysregulations, which lead to endoplasmic reticulum stress and
4 disruption of mitochondrial energy metabolism. Whether methyl donor status and the related
5 dysregulations are involved in the pathomechanisms of metabolic syndrome and insulin
6 resistance in humans needs further attention using integrative genomics, proteomics and
7 metabolomics approaches.
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

References

1. Aagaard-Tillery KM, Grove K, Bishop J, Ke X, Fu Q, McKnight R, Lane RH (2008) Developmental origins of disease and determinants of chromatin structure: maternal diet modifies the primate fetal epigenome. *J Mol Endocrinol* 41:91-102
2. Akchiche N, Bossenmeyer-Pourié C, Kerek R, Martin N, Pourié G, Koziel V, Helle D, Alberto JM, Ortiou S, Camadro JM, léger T, Guéant JL, Daval JL (2012) Homocysteinylation of neuronal proteins contributes to folate deficiency-associated alterations of differentiation, vesicular transport, and plasticity in hippocampal neuronal cells. *FASEB J* 26:3980-3992
3. Almén MS, Jacobsson JA, Moschonis G, Benedict C, Chrousos GP, Fredriksson R, Schiöth HB (2012) Genome wide analysis reveals association of a FTO gene variant with epigenetic changes. *Genomics* 99:132-137
4. Andringa KK, King AL, Eccleston HB, Mantena SK, Landar A, Jhala NC, Dickinson DA, Squadrito GL, Bailey SM (2010) Analysis of the liver mitochondrial proteome in response to ethanol and S-adenosylmethionine treatments: novel molecular targets of disease and hepatoprotection. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 298:G732-G745
5. Bailey SM, Landar A, Darley-Usmar V (2005) Mitochondrial proteomics in free radical research. *Free Radic Biol Med* 38:175-188
6. Bailey SM, Robinson G, Pinner A, Chamlee L, Ulasova E, Pompilius M, Page GP, Chhieng D, Jhala N, Landar A, Kharbanda KK, Ballinger S, Darley-Usmar V (2006) S-adenosylmethionine prevents chronic alcohol-induced mitochondrial dysfunction in the rat liver. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 291:G857-G867
7. Banke NH, Yan L, Pound KM, Dhar S, Reinhardt H, De Lorenzo MS, Vatner SF, Lewandowski ED (2012) Sexual dimorphism in cardiac triacylglyceride dynamics in mice on long term caloric restriction. *J Mol Cell Cardiol* 52:733-740

- 1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
8. Banks AS, Kon N, Knight C, Matsumoto M, Gutierrez-Juarez R, Rossetti L, Gu W, Accili D (2008) SirT1 gain of function increases energy efficiency and prevents diabetes in mice. *Cell Metabolism* 8:333-341
9. Barbieri M, Di Filippo C, Esposito A, Marfella R, Rizzo MR, D'Amico M, Ferraraccio F, Di Ronza C, Duan SZ, Mortensen RM, Rossi F, Paolisso G (2012) Effects of PPARs agonists on cardiac metabolism in littermate and cardiomyocyte-specific PPAR- γ -knockout (CM-PGKO) mice. *PLoS One* 7:e35999
10. Barker DJP (2004) The developmental origins of adult disease. *J Am Coll Nutr* 23 (Suppl. 6):588S–95S.
11. Barres R, Kirchner H, Rasmussen M, Yan J, Kantor FR, Krook A, Näslund E, Zierath JR (2013) Weight loss after gastric bypass surgery in human obesity remodels promoter methylation. *Cell Rep* 3:1020-1027
12. Battaglia-Hsu SF, Akchiche N, Noel N, Alberto JM, Jeannesson E, Daval JL, Gueant JL (2009) Vitamin B12 deficiency reduces proliferation and promotes differentiation of neuroblastoma cells and upregulates PP2A, proNGF and TACE. *Proc Natl Acad Sci U S A* 16:21930-21935.
13. Bell CG, Finer S, Lindgren CM, Wilson GA, Rakyan VK, Teschendorff AE, Akan P, Stupka E, Down TA, Prokopenko I, Morison IM, Mill J, Pidsley R (2010) Integrated genetic and epigenetic analysis identifies haplotype-specific methylation in the FTO type 2 diabetes and obesity susceptibility locus. *PLoS ONE* 5:e14040
14. Bergen NE, Jaddoe VW, Timmermans S, Hofman A, Lindemans J, Russcher H, Raat H, Steegers-Theunissen RP, Steegers EA (2012) Homocysteine and folate concentrations in early pregnancy and the risk of adverse pregnancy outcomes: the Generation R Study. *BJOG* 119:739-751
15. Björntorp P (1990). "Portal" adipose tissue as a generator of risk factors for cardiovascular disease and diabetes. *Arteriosclerosis* 10:493-496.

- 1
2 16. Blaise SA, Alberto JM, Audonnet-Blaise S, Guéant JL, Daval JL (2007) Influence of
3 preconditioning-like hypoxia on the liver of developing methyl-deficient rats. *Am J Physiol*
4 *Endocrinol Metab* 293:E1492-1502
5
6
7
- 8
9 17. Blüher M (2010) The distinction of metabolically 'healthy' from 'unhealthy' obese
10 individuals. *Curr Opin Lipidol* 21:38-43
11
12
- 13
14 18. Boden G, Zhang M (2006) Recent findings concerning thiazolidinediones in the
15 treatment of diabetes. *Expert Opin Investig Drugs* 15:243-250
16
17
18
- 19
20 19. Bordone L, Cohen D, Robinson A, Motta MC, van Veen E, Czopik A, Steele AD, Crowe
21 H, Marmor S, Luo J, Gu W, Guarente L (2007) SIRT1 transgenic mice show phenotypes
22 resembling calorie restriction. *Aging Cell* 6:759-767
23
24
25
- 26
27 20. Bossenmeyer-Pourie C, Blaise S, Pourie G, Tomasetto C, Audonnet S, Ortiou S, Koziel
28 V, Rio MC, Daval JL, Guéant JL, Beck B (2010) Methyl donor deficiency affects fetal
29 programming of gastric ghrelin cell organization and function in the rat. *Am J Pathol*
30 *176:270-277*
31
32
33
34
35
- 36
37 21. Bouchard C, Tremblay A, Després JP, Nadeau A, Lupien PJ, Thériault G, Dussault J,
38 Moorjani S, Pinault S, Fournier G (1990) The response to long-term overfeeding in identical
39 twins. *N Engl J Med* 322:1477-1482
40
41
42
- 43
44 22. Bouchard L, Rabasa-Lhoret R, Faraj M, Lavoie ME, Mill J, Perusse L, Vohl MC (2010)
45 Differential epigenomic and transcriptomic responses in subcutaneous adipose tissue between
46 low and high responders to caloric restriction. *American Journal of Clinical Nutrition* 91:309-
47 320
48
49
50
51
- 52
53 23. Bressenot A, Pooya S, Bossenmeyer-Pourie C, Gauchotte G, Germain A, Chevaux JB,
54 Coste F, Vignaud JM, Guéant JL, Peyrin-Biroulet L (2012) Methyl donor deficiency affects
55 small-intestinal differentiation and barrier function in rats. *Br J Nutr* 16:1-11
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

- 1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
24. Brion MJ, Ness AR, Rogers I, Emmett P, Cribb V, Smith GD, Lawlor DA (2010) Maternal macronutrient and energy intakes in pregnancy and offspring intake at 10 y: exploring parental comparisons and prenatal effects. *Am J Clin Nutr* 91:748-756
 25. Brunaud L, Alberto JM, Ayav A, Gérard P, Namour F, Antunes L, Braun M, Bronowicki JP, Bresler L, Guéant JL (2003). Vitamin B12 is a strong determinant of low methionine synthase activity and DNA hypomethylation in gastrectomized rats. *Digestion* 68:133-40.
 26. Brunet A, Sweeney LB, Sturgill JF, Chua KF, Greer PL, Lin Y, Tran H, Ross SE, Mostoslavsky R, Cohen HY, Hu LS, Cheng HL, Jedrychowski MP, Gygi SP, Sinclair DA, Alt FW, Greenberg ME (2004) Stress-dependent regulation of FOXO transcription factors by the SIRT1 deacetylase. *Science* 303:2011-2015
 27. Burdge GC, Slater-Jefferies J, Torrens C, Phillips ES, Hanson MA, Lillycrop KA (2007) Dietary protein restriction of pregnant rats in the F0 generation induces altered methylation of hepatic gene promoters in the adult male offspring in the F1 and F2 generations. *Br J Nutr* 97:435-439.
 28. Burdge GC, Lillycrop KA, Phillips ES, Slater-Jefferies JL, Jackson AA, Hanson MA. Folic acid supplementation during the juvenile-pubertal period in rats modifies the phenotype and epigenotype induced by prenatal nutrition. *J Nutr* 2009;139:1054–1060
 29. Burdge GC, Lillycrop KA (2010) Nutrition, Epigenetics, and Developmental Plasticity: Implications for Understanding Human Disease. *Annu Rev Nutr* 30:315–39
 30. Burgmaier M, Sen S, Philip F, Wilson CR, Miller 3rd CC, Young ME, Taegtmeier H (2010) Metabolic adaptation follows contractile dysfunction in the heart of obese Zucker rats fed a high-fat “Western” diet, *Obesity (Silver. Spring)* 18:1895-901
 31. Champion J, Milagro FI, Martinez JA (2009) Individuality and epigenetics in obesity. *Obes Rev* 10:383-392
 32. Cantó C, Auwerx J (2009) PGC-1 α , SIRT1 and AMPK, an energy sensing network that controls energy expenditure. *Curr Opin Lipidol* 20:98-105

- 1
2 33. Cantó C, Auwerx J (2011) Calorie restriction: is AMPK a key sensor and effector?
3
4 Physiology (Bethesda) 26:214-224
5
6
- 7 34. Cantó C, Auwerx J. Targeting sirtuin 1 to improve metabolism: all you need is NAD(+)?
8
9 (2012) Pharmacol Rev 64:166-187
10
11
- 12 35. Carone BR, Fauquier L, Habib N, Shea JM, Hart CE, Li R, Bock C, Li C, Gu H, Zamore
13 PD, Meissner A, Weng Z, Hofmann HA, Friedman N, Rando OJ (2010) Paternally induced
14 transgenerational environmental reprogramming of metabolic gene expression in mammals.
15 Cell 143:1084-1096
16
17
18
19
20
21
- 22 36. Chang GQ, Gaysinskaya V, Karatayev O, Leibowitz SF (2008) Maternal high-fat diet and
23 fetal programming: increased proliferation of hypothalamic peptide-producing neurons that
24 increase risk for overeating and obesity. J Neurosci 28:12107-12119
25
26
27
28
- 29 37. Chen H, Simar D, Lambert K, Mercier J, Morris MJ (2008) Maternal and postnatal
30 overnutrition differentially impact appetite regulators and fuel metabolism. Endocrinology
31 149:5348-5356
32
33
34
35
- 36 38. Christensen B, Rosenblatt DS (1995) Effects of folate deficiency on embryonic
37 development. Baillieres Clin Haematol 8:617-637
38
39
40
41
- 42 39. Coste A, Louet JF, Lagouge M, Lerin C, Antal MC, Meziane H, Schoonjans K,
43 Puigserver P, O'Malley BW, Auwerx J (2008) The genetic ablation of SRC-3 protects against
44 obesity and improves insulin sensitivity by reducing the acetylation of PGC-1{alpha}. Proc
45 Natl Acad Sci USA 105:17187-17192
46
47
48
49
50
- 51 40. Cota D, Proulx K, Smith KA, Kozma SC, Thomas G, Woods SC, Seeley RJ (2006)
52 Hypothalamic mTOR signaling regulates food intake. Science 312:927-930
53
54
55
- 56 41. Coupé B, Amarger V, Grit I, Benani A, Parnet P (2010) Nutritional programming affects
57 hypothalamic organization and early response to leptin. Endocrinology 151:702-713
58
59
60
61
62
63
64
65

- 1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
42. Danforth E (2000) Failure of adipocyte differentiation causes type II diabetes mellitus? Nat Genet 26:13
43. Davie JR. Inhibition of histone deacetylase activity by butyrate (2003) J Nutr 133:2485S-2493S
44. Desai M, Gayle D, Babu J, Ross MG (2007) The timing of nutrient restriction during rat pregnancy/lactation alters metabolic syndrome phenotype. Am J Obstet Gynecol 196:555, e1-7.
45. Dirkx E, Schwenk RW, Glatz JF, Luiken JJ, van Eys G (2011) High fat diet induced diabetic cardiomyopathy. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids 85:219-225
46. Dolinoy DC, Das R, Weidman JR, Jirtle RL (2007) Metastable epialleles, imprinting, and the fetal origins of adult diseases. Pediatr Res 61:30R-37R
47. Dominguez-Salas P, Moore SE, Cole D, da Costa KA, Cox SE, Dyer RA, Fulford AJ, Innis SM, Waterland RA, Zeisel SH, Prentice AM, Hennig BJ (2013) DNA methylation potential: dietary intake and blood concentrations of one-carbon metabolites and cofactors in rural African women. Am J Clin Nutr 97:1217-27
48. Drong AW, Lindgren CM, McCarthy MI (2012) The genetic and epigenetic basis of type 2 diabetes and obesity. Clin Pharmacol Ther 92:707-715
49. Dudley KJ, Sloboda DM, Connor KL, Beltrand J, Vickers MH (2011) Offspring of mothers fed a high fat diet display hepatic cell cycle inhibition and associated changes in gene expression and DNA methylation. PLoS One 6:e21662
50. Düvel K, Yecies JL, Menon S, Raman P, Lipovsky AI, Souza AL, Triantafellow E, Ma Q, Gorski R, Cleaver S, Vander Heiden MG, MacKeigan JP, Finan PM, Clish CB, Murphy LO, Manning BD (2010) Activation of a metabolic gene regulatory network downstream of mTOR complex 1. Mol Cell 39:171-183

- 1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
51. Fernandez-Marcos PJ, Auwerx J (2011) Regulation of PGC-1 α , a nodal regulator of mitochondrial biogenesis. *Am J Clin Nutr* 93:884S-990S
52. Flamment M, Hajduch E, Ferré P, Fougelle F (2013) New insights into ER stress-induced insulin resistance. *Trends Endocrinol Metab* 23:381-90
53. Fontana L, Eagon JC, Trujillo ME, Scherer PE, Klein S (2007). Visceral fat adipokine secretion is associated with systemic inflammation in obese humans. *Diabetes*. 56:1010-1003
54. Fontana L, Meyer TE, Klein S, Holloszy JO (2004) Long-term calorie restriction is highly effective in reducing the risk for atherosclerosis in humans. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:6659–6663
55. Ford D (2012) Honeybees and cell lines as models of DNA methylation and aging in response to diet. *Exp Gerontol* 48:614-619
56. Forges, T. Monnier-Barbarino P, Alberto JM, Guéant-Rodriguez RM, Daval JL, Guéant JL (2007) Impact of folate and homocysteine metabolism on human reproductive health. *Hum Reprod Update* 13:225-238
57. Fraga MF, Ballestar E, Paz MF, Ropero S, Setien F, Ballestar ML, Heine-Suñer D, Cigudosa JC, Urioste M, Benitez J, Boix-Chornet M, Sanchez-Aguilera A, Ling C, Carlsson E, Poulsen P, Vaag A, Stephan Z, Spector TD, Wu YZ, Plass C, Esteller M (2005). Epigenetic differences arise during the lifetime of monozygotic twins. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:10604-10609
58. Frelut ML, Nicolas JP, Guillard JC, de Courcy GP (2011) Methylenetetrahydrofolate reductase 677 C->T polymorphism: a link between birth weight and insulin resistance in obese adolescents. *Int J Pediatr Obes* 6:e312-317
59. Gabory A, Attig L, Junien C (2011) Developmental programming and epigenetics. *Am J Clin Nutr* 94:1943S-1952S.

- 1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
60. Gallinetti J, Harputlugil E, Mitchell JR (2013) Amino acid sensing in dietary-restriction-mediated longevity: roles of signal-transducing kinases GCN2 and TOR. *Biochem J* 449:1-10
61. Garcia MM, Guéant-Rodriguez RM, Pooya S, Brachet P, Alberto JM, Jeannesson E, Maskali F, Gueguen N, Marie PY, Lacolley P, Herrmann M, Juillièrè Y, Malthiery Y, Guéant JL (2011) Methyl donor deficiency induces cardiomyopathy through altered methylation/acetylation of PGC-1 α by PRMT1 and SIRT1. *J Pathol* 225:324-335
62. Ghemrawi R, Pooya S, Lorentz S, Gauchotte G, Arnold C, Guéant JL, Battaglia-Hsu S (2013) Decreased vitamin B12 availability induces ER stress through impaired SIRT1-deacetylation of HSF1. *Cell Death Dis* 4:e553
63. Gietzen DW, Hao S, Anthony TG. (2007) Mechanisms of food intake repression in indispensable amino acid deficiency. *Annu Rev Nutr* 27:63-78
64. Guéant JL, Caillerez-Fofou M, Battaglia-Hsu S, Alberto JM, Freund JN, Dulluc I, Adjalla C, Maury F, Merle C, Nicolas JP, Namour F, Daval JL (2013) Molecular and cellular effects of vitamin B12 in brain, myocardium and liver through its role as co-factor of methionine synthase. *Biochimie* 95:1033-40
65. Guéant JL, Namour F, Guéant-Rodriguez RM, Daval JL (2013) Folate and fetal programming: a play in epigenomics? *Trends Endocrinol Metab* 24:279-289
66. Guéant-Rodriguez RM, Juillièrè Y, Nippert M, Abdelmouttaleb I, Herbeth B, Aliot E, Danchin N, Guéant JL (2007) Left ventricular systolic dysfunction is an independent predictor of homocysteine in angiographically documented patients with or without coronary artery lesions. *J Thromb Haemost* 5:1209-1216
67. Guéant-Rodriguez RM, Spada R, Pooya S, Jeannesson E, Moreno Garcia MA, Anello G, Bosco P, Elia M, Romano A, Alberto JM, Juillièrè Y, Guéant JL (2012) Homocysteine predicts increased NT-pro-BNP through impaired fatty acid oxidation. *Int J Cardiol* Mar 27. [Epub ahead of print]

- 1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
68. Gulsen M, Yesilova Z, Bagci S, Uygun A, Ozcan A, Ercin CN, Erdil A, Sanisoglu SY, Cakir E, Ates Y, Erbil MK, Karaeren N, Dagalp K (2005) Elevated plasma homocysteine concentrations as a predictor of steatohepatitis in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *J Gastroenterol Hepatol* 20:1448-1455
69. Guo F, Cavener DR (2007) The GCN2 eIF2 α kinase regulates fatty-acid homeostasis in the liver during deprivation of an essential amino acid. *Cell Metab* 5:103-114
70. Hallows WC, Lee S, Denu JM (2006) Sirtuins deacetylate and activate mammalian acetyl-CoA synthetases. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:10230-10235
71. Hammer S, Snel M, Lamb HJ, Jazet IM, van der Meer RW, Pijl H, Meinders EA, Romijn JA, de Roos A, Smit JW (2008) Prolonged caloric restriction in obese patients with type 2 diabetes mellitus decreases myocardial triglyceride content and improves myocardial function. *J. Am. Coll. Cardiol* 52:1006–1012
72. Han X, Turdi S, Hu N, Guo R, Zhang Y, Ren J (2012) Influence of long-term caloric restriction on myocardial and cardiomyocyte contractile function and autophagy in mice. *J Nutr Biochem* 23:1592-1599
73. Hebert AS, Dittenhafer-Reed KE, Yu W, Bailey DJ, Selen ES, Boersma MD, Carson JJ, Tonelli M, Balloon AJ, Higbee AJ, Westphall MS, Pagliarini DJ, Prolla TA, Assadi-Porter F, Roy S, Denu JM, Coon JJ (2013) Calorie restriction and SIRT3 trigger global reprogramming of the mitochondrial protein acetylome. *Mol Cell* 49:186-199
74. Heijmans BT, Tobi EW, Stein AD, Putter H, Blauw GJ, Susser ES, Slagboom PE, and Lumey LH (2008) Persistent epigenetic differences associated with prenatal exposure to famine in humans. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:17046-17049
75. Herb BR, Wolschin F, Hansen KD, Aryee MJ, Langmead B, Irizarry R, Amdam GV, Feinberg AP (2012) Reversible switching between epigenetic states in honeybee behavioral subcastes. *Nat Neurosci* 15:1371-1373

- 1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
76. Herrmann WW et al. (2007) Homocysteine, brain natriuretic peptide and chronic heart failure: a critical review. *Clin Chem Lab Med* 45:1633-1644
77. Hirsch S, Poniachick J, Avendaño M, Csendes A, Burdiles P, Smok G, Diaz JC, de la Maza MP (2005) Serum folate and homocysteine levels in obese females with non-alcoholic fatty liver. *Nutrition* 21:137-141
78. Hoile SP, Lillycrop KA, Grenfell LR, Hanson MA, Burdge GC (2012) Increasing the folic acid content of maternal or postweaning diets induces differential changes in phosphoenolpyruvate carboxykinase mRNA expression and promoter methylation in rats. *Br J Nutr* 108:852-857
79. Hoile SP, Lillycrop KA, Thomas NA, Hanson MA, Burdge GC (2011) Dietary protein restriction during F0 pregnancy in rats induces transgenerational changes in the hepatic transcriptome in female offspring. *PLoS One* 6:e21668.
80. Holness MJ, Caton PW, Sugden MC (2010) Acute and long-term nutrient-led modifications of gene expression: potential role of SIRT1 as a central co-ordinator of short and longer-term programming of tissue function. *Nutrition* 26:491-501
81. Houtkooper RH, Pirinen E, Auwerx J (2012) Sirtuins as regulators of metabolism and healthspan. *Nat Rev Mol Cell Biol* 13:225-238
82. Howie GJ, Sloboda DM, Kamal T, Vickers MH (2009) Maternal nutritional history predicts obesity in adult offspring independent of postnatal diet. *J Physiol* 587:905-915
83. Ivanova E, Chen JH, Segonds-Pichon A, Ozanne SE, Kelsey G (2012) DNA methylation at differentially methylated regions of imprinted genes is resistant to developmental programming by maternal nutrition. *Epigenetics* 7:1200-1210
84. Jakubowski H, Perla-Kaján J, Finnell RH, et al. (2009) Genetic or nutritional disorders in homocysteine or folate metabolism increase protein N-homocysteinylation in mice. *FASEB J* 23:1721-1727.

- 1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
85. Jeninga EH, Schoonjans K, Auwerx J (2010) Reversible acetylation of PGC-1: connecting energy sensors and effectors to guarantee metabolic flexibility. *Oncogene* 29:4617-4624
86. Jensen MD, Haymond MW, Rizza RA, Cryer PE, Miles JM (1989). Influence of body fat distribution on free fatty acid metabolism in obesity. *J Clin Invest* 83:1168-1173
87. Jia G, Fu Y, Zhao X, Dai Q, Zheng G, Yang Y, Yi C, Lindahl T, Pan T, Yang YG, He C (2011) N6-methyladenosine in nuclear RNA is a major substrate of the obesity-associated FTO. *Nature Chem Biol* 7:885-887
88. Jiménez-Chillarón JC, Díaz R, Martínez D, Pentinat T, Ramón-Krauel M, Ribó S, Plösch T. The role of nutrition on epigenetic modifications and their implications on health (2012) *Biochimie* 94:2242-2263.
89. Joseph J (2011) Fattening by deprivation: methyl balance and perinatal cardiomyopathy. *J Pathol* 225:315-317
90. Jousse C, Parry L, Lambert-Langlais S, Maurin AC, Averous J, Bruhat A, Carraro V, Tost J, Letteron P, Chen P, Jockers R, Launay JM, Mallet J, Fafournoux P (2011) Perinatal undernutrition affects the methylation and expression of the leptin gene in adults: implication for the understanding of metabolic syndrome. *FASEB J* 25:3271-3278
91. Kawakami K, Nakamura A, Goto S (2012) Dietary restriction increases site-specific histone H3 acetylation in rat liver: possible modulation by sirtuins. *Biochem Biophys Res Commun* 418:836-840
92. Kawano Y, Cohen DE (2013) Mechanisms of hepatic triglyceride accumulation in non-alcoholic fatty liver disease. *J Gastroenterol* 48:434-441
93. Kerek R, Geoffroy A, Guéant JL, Bossenmeyer-Pourié C, Daval JL (2013) Early Methyl Donor Deficiency Associated With Alteration Of The Mir-124 And Stat3 Signaling Pathways Impairs Embryonic Brain Development. *Cell Death Dis* 4:e755

- 1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
94. Kirchner H, Osler ME, Krook A, Zierath JR (2013) Epigenetic flexibility in metabolic regulation: disease cause and prevention? *Trends Cell Biol* 23:203-209
95. Kojima M, Kangawa K (2005) Ghrelin: structure and function. *Physiol Rev* 85:495–522
96. Kong AP, Xu G, Brown N, So WY, Ma RC, Chan JC (2013) Diabetes and its comorbidities-where East meets West. *Nat Rev Endocrinol*. doi: 10.1038/nrendo.2013.102
97. Koplay M, Gulcan E, Ozkan F (2011) Association between serum vitamin B12 levels and the degree of steatosis in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *J Investig Med* 59:1137-1140
98. Kucharski R, Maleszka J, Foret S, Maleszka R (2008) Nutritional control of reproductive status in honeybees via DNA methylation. *Science* 319:1827-1830
99. Kuehnen P, Mischke M, Wiegand S, Sers C, Horsthemke B, Lau S, Keil T, Lee YA, Grueters A, Krude H (2012) An Alu element-associated hypermethylation variant of the POMC gene is associated with childhood obesity. *PLoS Genet* 8:e1002543
100. Lagouge M, Argmann C, Gerhart-Hines Z, Meziane H, Lerin C, Daussin F, Messadeq N, Milne J, Lambert P, Elliott P, Geny B, Laakso M, Puigserver P, Auwerx J (2006) Resveratrol improves mitochondrial function and protects against metabolic disease by activating SIRT1 and PGC-1alpha. *Cell* 127:1109–1122
101. Lebrun P, Van Obberghen E (2008) SOCS proteins causing trouble in insulin action. *Acta Physiol (Oxf)* 192:29-36
102. Lewis SJ, Lawlor DA, Nordestgaard BG, Tybjaerg-Hansen A, Ebrahim S, Zacho J, Ness A, Leary S, Smith GD (2008) The methylenetetrahydrofolate reductase C677T genotype and the risk of obesity in three large population-based cohorts. *Eur J Endocrinol* 159:35-40
103. Lewis SJ, Leary S, Davey Smith G, Ness A (2009) Body composition at age 9 years, maternal folate intake during pregnancy and methyltetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T genotype. *Br J Nutr* 102:493-496

1 104.Li J, Huang J, Li JS, Chen H, Huang K, Zheng L (2011) Accumulation of endoplasmic
2 reticulum stress and lipogenesis in the liver through generational effects of high fat diets. J
3 Hepatol 56:900-907
4
5
6

7
8
9 105.Lillycrop KA, Phillips ES, Jackson AA, Hanson MA, Burdge GC (2005) Dietary protein
10 restriction of pregnant rats induces and folic acid supplementation prevents epigenetic
11 modification of hepatic gene expression in the offspring. J Nutr 135:1382–86
12
13
14

15
16 106.Lillycrop KA, Phillips ES, Torrens C, Hanson MA, Jackson AA, Burdge GC (2008)
17 Feeding pregnant rats a protein-restricted diet persistently alters the methylation of specific
18 cytosines in the hepatic PPAR alpha promoter of the offspring. Br J Nutr 100:278-282
19
20
21

22
23 107.Lillycrop KA, Slater-Jefferies JL, Hanson MA, Godfrey KM, Jackson AA, Burdge GC
24 (2007) Induction of altered epigenetic regulation of the hepatic glucocorticoid receptor in the
25 offspring of rats fed a protein-restricted diet during pregnancy suggests that reduced DNA
26 methyltransferase-1 expression is involved in impaired DNA methylation and changes in
27 histone modifications. Br J Nutr 97:1064-1073
28
29
30
31

32
33
34 108.Lopes de Souza S, Orozco-Solis R, Grit I, Manhães de Castro R, Bolaños-Jiménez F
35 (2008) Perinatal protein restriction reduces the inhibitory action of serotonin on food intake.
36 Eur J Neurosci 27:1400-1408
37
38
39

40
41
42 109.Lowell BB, Shulman GI (2005) Mitochondrial dysfunction and type 2 diabetes Science
43 307: 384-387
44
45

46
47 110.Lumey LH, Stein AD, Ravelli AC (1995) Timing of prenatal starvation in women and
48 birth weight in their first and second born offspring: the Dutch Famine Birth Cohort study.
49 Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol 61:23-30
50
51

52
53
54 111.Martinez E, Gérard N, Garcia MM, Mazur A, Guéant-Rodriguez RM, Comte B, Guéant
55 JL, Brachet P (2013) Myocardium proteome remodelling after nutritional deprivation of
56 methyl donors. J Nutr Biochem 24:1241-1250
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

112. Martínez-Chantar ML, García-Trevijano ER, Latasa MU, Pérez-Mato I, Sánchez del Pino MM, Corrales FJ, Avila MA, Mato JM (2002) Importance of a deficiency in S-adenosyl-L-methionine synthesis in the pathogenesis of liver injury. *Am J Clin Nutr* 76:1177S-1182S

113. Mato JM, Martínez-Chantar ML, Lu SC (2008) Methionine metabolism and liver disease. *Annu Rev Nutr* 28:273–293.

114. McGregor RA, Choi MS (2011) MicroRNAs in the regulation of adipogenesis and obesity. *Curr Mol Med* 11: 304-316

115. Meigs JB, Cupples LA, Wilson PW (2000) Parental transmission of type 2 diabetes: the Framingham Offspring Study. *Diabetes* 49:2201–2207

116. Menendez-Castro C, Fahlbusch F, Cordasic N, Amann K, Münzel K, Plank C, Wachtveitl R, Rascher W, Hilgers KF, Hartner A (2011) Early and late postnatal myocardial and vascular changes in a protein restriction rat model of intrauterine growth restriction. *PLoS One* 6:e20369

117. Meyer TE, Kovacs SJ, Ehsani AA, Klein S, Holloszy JO, Fontana L (2006) Long-term caloric restriction ameliorates the decline in diastolic function in humans. *J Am Coll Cardiol* 47:398-402

118. Milagro FI, Campion J, Cordero P, Goyenechea E, Gomez-Uriz AM, Abete I, Zulet MA, Martinez JA (2011) A dual epigenomic approach for the search of obesity biomarkers: DNA methylation in relation to diet-induced weight loss. *The FASEB Journal* 25:1378-1389

119. Milagro FI, Campión J, García-Díaz DF, Goyenechea E, Paternain L, Martínez JA (2009) High fat diet-induced obesity modifies the methylation pattern of leptin promoter in rats. *J Physiol Biochem* 65:1-9

120. Miller BF, Robinson MM, Bruss MD, Hellerstein M, Hamilton KL (2012) A comprehensive assessment of mitochondrial protein synthesis and cellular proliferation with age and caloric restriction. *Aging Cell* 11:150-61

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

121. Miller RA, Buehner G, Chang Y, Harper JM, Sigler R, Smith-Wheelock M (2005) Methionine-deficient diet extends mouse lifespan, slows immune and lens aging, alters glucose, T4, IGF-I and insulin levels, and increases hepatocyte MIF levels and stress resistance. *Aging Cell* 4:119-125

122. Milne JC, Lambert PD, Schenk S, et al. (2007) Small molecule activators of SIRT1 as therapeutics for the treatment of type 2 diabetes. *Nature* 450:712-716

123. MK Skinner (2010) Metabolic disorders: fathers' nutritional legacy. *Nature* 467:922e923

124. Muhlhausler BS, Adam CL, Findlay PA, Duffield JA, McMillen IC (2006) Increased maternal nutrition alters development of the appetite-regulating network in the brain. *FASEB J*, 20:1257-1259

125. Mutti NS, Wang Y, Kaftanoglu O, Amdam GV (2011) Honey bee PTEN--description, developmental knockdown, and tissue-specific expression of splice-variants correlated with alternative social phenotypes. *PLoS One* 6:e22195

126. Nijland MJ, Mitsuya K, Li C, Ford S, McDonald TJ, Nathanielsz PW, Cox LA (2010) Epigenetic modification of fetal baboon hepatic phosphoenolpyruvate carboxykinase following exposure to moderately reduced nutrient availability. *J Physiol* 588:1349-1359

127. Nisoli E, Clementi E, Carruba MO, Moncada S. Defective mitochondrial biogenesis: a hallmark of the high cardiovascular risk in the metabolic syndrome? *Circ Res* 2007;100:795–806

128. Orozco-Solís R, Matos RJ, Guzmán-Quevedo O, Lopes de Souza S, Bihouée A, Houlgatte R, Manhães de Castro R, Bolaños-Jiménez F (2010) Nutritional programming in the rat is linked to long-lasting changes in nutrient sensing and energy homeostasis in the hypothalamus. *PLoS One* 5:e13537

129. Ouwens DM, Diamant M, Fodor M, Habets DD, Pelters MM, El HM, Dang ZC, van den Brom CE, Vlasblom R, Rietdijk A, Boer C, Coort SL, Glatz JF, Luiken JJ (2007) Cardiac

1 contractile dysfunction in insulin-resistant rats fed a high-fat diet is associated with elevated
2 CD36-mediated fatty acid uptake and esterification, *Diabetologia* 50:1938-1948
3

4
5 130. Palou M, Priego T, Sánchez J, Palou A, Picó C (2012) Metabolic programming of sirtuin
6 1 (SIRT1) expression by moderate energy restriction during gestation in rats may be related to
7 obesity susceptibility in later life. *Br J Nutr* 28:1-8
8
9

10
11
12 131. Parrado-Fernández C, López-Lluch G, Rodríguez-Bies E, Santa-Cruz S, Navas P,
13 Ramsey JJ, Villalba JM (2011) Calorie restriction modifies ubiquinone and COQ transcript
14 levels in mouse tissues. *Free Radic Biol Med* 50:1728-1736
15
16
17

18
19
20 132. Pellanda, H. Forges T, Bressenot A, Chango A, Bronowicki JP, Guéant JL, Namour F
21 (2012) Fumonisin FB1 treatment acts synergistically with methyl donor deficiency during rat
22 pregnancy to produce alterations of H3- and H4-histone methylation patterns in fetuses. *Mol.*
23 *Nutr. Food Res.* 56, 976-985
24
25
26
27

28
29 133. Perrone CE, Mattocks DA, Hristopoulos G, Plummer JD, Krajcik RA, Orentreich N
30 (2008) Methionine restriction effects on 11-HSD1 activity and lipogenic/lipolytic balance in
31 F344 rat adipose tissue. *J. Lipid Res* 49:12-23
32
33
34
35

36 134. Peters JM, Hennuyer N, Staels B, Fruchart JC, Fievet C, Gonzalez FJ, Auwerx J (1997)
37 Alterations in lipoprotein metabolism in peroxisome proliferator-activated receptor alpha-
38 deficient mice. *J Biol Chem* 272:27307-27312
39
40
41
42

43 135. Petrik J, Reusens B, Arany E, Remacle C, Coelho C, Hoet JJ, Hill DJ (1999) A low
44 protein diet alters the balance of islet cell replication and apoptosis in the fetal and neonatal
45 rat and is associated with a reduced pancreatic expression of insulin-like growth factor-II.
46 *Endocrinology* 140:4861-4873
47
48
49
50
51

52 136. Plagemann A, Harder T, Brunn M, Harder A, Roepke K, Wittrock-Staar M, Ziska T,
53 Schellong K, Rodekamp E, Melchior K, Dudenhausen JW (2009) Hypothalamic
54 proopiomelanocortin promoter methylation becomes altered by early overfeeding: an
55 epigenetic model of obesity and the metabolic syndrome. *J Physiol* 587:4963-4976
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

137. Plagemann A, Roepke K, Harder T, Brunn M, Harder A, Wittrock-Staar M, Ziska T, Schellong K, Rodekamp E, Melchior K, Dudenhausen JW (2010) Epigenetic malprogramming of the insulin receptor promoter due to developmental overfeeding, *J Perinat Med* 38:393-400

138. Pogribny IP, Tryndyak VP, Bagnyukova TV, Melnyk S, Montgomery B, Ross SA, Latendresse JR, Rusyn I, Beland FA (2009) Hepatic epigenetic phenotype predetermines individual susceptibility to hepatic steatosis in mice fed a lipogenic methyl-deficient diet. *J Hepatol* 51:176-186

139. Pooya S, Blaise S, Moreno Garcia M, Giudicelli J, Alberto JM, Guéant-Rodriguez RM, Jeannesson E, Gueguen N, Bressenot A, Nicolas B, Malthiery Y, Daval JL, Peyrin-Biroulet L, Bronowicki JP, Guéant JL (2012) Methyl donor deficiency impairs fatty acid oxidation through PGC-1 α hypomethylation and decreased ER- α , ERR- α , and HNF-4 α in the rat liver. *J Hepatol* 57:344-351

140. Portela, A. and Esteller, M (2010) Epigenetic modifications and human disease. *Nat. Biotechnol* 28:1057–1068.

141. Primeau V, Coderre L, Karelis AD, Brochu M, Lavoie ME, Messier V, Sladek R, Rabasa-Lhoret R (2011) Characterizing the profile of obese patients who are metabolically healthy. *Int J Obes (Lond)* 35:971-981

142. Raychaudhuri N, Raychaudhuri S, Thamotharan M, Devaskar SU (2008) Histone code modifications repress glucose transporter 4 expression in the intrauterine growth-restricted offspring. *J Biol Chem* 283:13611-13626

143. Rees WD, Hay SM, Cruickshank M, Reusens B, Remacle C, Antipatis C, Grant G (2006) Maternal protein intake in the pregnant rat programs the insulin axis and body composition in the offspring. *Metabolism* 55:642-649

144. Rees WD, Hay SM, Brown DS, Antipatis C, Palmer RM (2000) Maternal protein deficiency causes hypermethylation of DNA in the livers of rat fetuses. *J Nutr* 130:1821-1826

1 145. Relling DP, Esberg LB, Fang CX, Johnson WT, Murphy EJ, Carlson EC, Saari JT, Ren J
2 (2006) High-fat diet-induced juvenile obesity leads to cardiomyocyte dysfunction and
3 upregulation of Foxo3a transcription factor independent of lipotoxicity and apoptosis. *J*
4 *Hypertens* 24:549-561.
5
6
7

8
9
10 146. Rodgers JT, Lerin C, Haas W, Gygi SP, Spiegelman BM, Puigserver P (2005). Nutrient
11 control of glucose homeostasis through a complex of PGC-1alpha and SIRT1. *Nature*
12 434:113-118.
13
14
15
16

17 147. Roseboom T, de Rooij S, Painter R (2006) The Dutch famine and its long-term
18 consequences for adult health. *Early Hum Dev* 82:485-491
19
20
21

22 148. Roseboom TJ, van der Meulen JH, C. Osmond, Barker DJ, Ravelli AC, Schroeder-Tanka
23 JM, van Montfrans GA, Michels RP, Bleker OP (2000) Coronary heart disease after prenatal
24 exposure to the Dutch famine, 1944-1945. *Heart* 84:595-598
25
26
27
28

29 149. Russo GT, Di Benedetto A, Alessi E, Ientile R, Antico A, Nicocia G, La Scala R, Di
30 Cesare E, Raimondo G, Cucinotta D (2006) Mild hyperhomocysteinemia and the common
31 C677T polymorphism of methylene tetrahydrofolate reductase gene are not associated with
32 the metabolic syndrome in Type 2 diabetes. *J Endocrinol Invest* 29:201-207
33
34
35
36
37

38 150. Russo P, Doyon J, Sonsino E, Ogier H, Saudubray JM (1992) A congenital anomaly of
39 vitamin B12 metabolism: a study of three cases. *Hum Pathol* 23:504-512
40
41
42
43

44 151. Sack MN (2011) Caloric excess or restriction mediated modulation of metabolic enzyme
45 acetylation-proposed effects on cardiac growth and function. *Biochim Biophys Acta*
46 1813:1279-1285
47
48
49
50

51 152. Sinclair KD, Allegrucci C, Singh R, Gardner DS, Sebastian S, Bispham J, Thurston A,
52 Huntley JF, Rees WD, Maloney CA, Lea RG, Craigon J, McEvoy TG, Young LE (2007)
53 DNA methylation, insulin resistance, and blood pressure in offspring determined by maternal
54 periconceptional B vitamin and methionine status. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:19351-19356
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

153.Slater-Jefferies JL, Lillycrop KA, Townsend PA, Torrens C, Hoile SP, Hanson MA, Burdge GC (2011) Feeding a protein-restricted diet during pregnancy induces altered epigenetic regulation of peroxisomal proliferator-activated receptor- α in the heart of the offspring. *J Dev Orig Health Dis* 2:250-255

154.Sohi G, Marchand K, Revesz A, Arany E, Hardy DB (2011) Maternal protein restriction elevates cholesterol in adult rat offspring due to repressive changes in histone modifications at the cholesterol 7 α -hydroxylase promoter. *Mol Endocrinol* 25:785-798

155.Speakman JR, Mitchell SE (2011) Caloric restriction. *Mol Aspects Med* 32:159-221

156.Stewart CP et al. (2011) Low Maternal Vitamin B-12 Status Is Associated with Offspring Insulin Resistance Regardless of Antenatal Micronutrient. *J Nutr* 141:1912-1917

157.Stover PJ (2011) Polymorphisms in 1-carbon metabolism, epigenetics and folate-related pathologies. *J Nutrigenet Nutrigenomics* 4:293-305

158.Sun Z, Singh N, Mullican SE, Everett LJ, Li L, Yuan L, Liu X, Epstein JA, Lazar MA (2011) Diet-induced lethality due to deletion of the Hdac3 gene in heart and skeletal muscle. *J Biol Chem* 286:33301-3339

159.Suter MA, Chen A, Burdine MS, Choudhury M, Harris RA, Lane RH, Friedman JE, Grove KL, Tackett AJ, Aagaard KM (2012) A maternal high-fat diet modulates fetal SIRT1 histone and protein deacetylase activity in nonhuman primates. *FASEB J* 26:5106-1514

160.Sykora P, Kharbanda KK, Crumm SE, Cahill A (2009) S-adenosyl-L-methionine co-administration prevents the ethanol-elicited dissociation of hepatic mitochondrial ribosomes in male rats. *Alcohol Clin Exp Res* 33:1-9

161.Tabassum R, Jaiswal A, Chauhan G, Dwivedi OP, Ghosh S, Marwaha RK, Tandon N, Bharadwaj D (2012) Genetic variant of AMD1 is associated with obesity in urban Indian children. *PLoS One* 7:e33162.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

162. Taksali SE, Caprio S, Dziura J, Dufour S, Cali AM, Goodman TR, Papademetris X, Burgert TS, Pierpont BM, Savoye M, Shaw M, Seyal AA, Weiss R (2008) High visceral and low abdominal subcutaneous fat stores in the obese adolescent: a determinant of an adverse metabolic phenotype. *Diabetes* 57:367-371.

163. Tarry-Adkins JL, Chen JH, Jones RH, Smith NH, Ozanne SE (2010) Poor maternal nutrition leads to alterations in oxidative stress, antioxidant defense capacity, and markers of fibrosis in rat islets: potential underlying mechanisms for development of the diabetic phenotype in later life. *FASEB J* 24:2762–2771.

164. Tateishi K, Okada Y, Kallin EM, Zhang Y (2009) Role of Jhdm2a in regulating metabolic gene expression and obesity resistance. *Nature* 458: 757-761

165. Teperino R, Schoonjans K, Auwerx J (2010) Histone methyl transferases and demethylases; can they link metabolism and transcription? *Cell. Metab.* 12: 321-327

166. Timmermans S, Jaddoe VW, Hofman A, Steegers-Theunissen RP, Steegers EA (2009) Periconception folic acid supplementation, fetal growth and the risks of low birth weight and preterm birth: the Generation R Study. *Br J. Nutr* 102:777–785

167. Tobi EW, Lumey LH, Talens RP, Kremer D, Putter H, Stein AD, Slagboom PE, and Heijmans BT (2009) DNA methylation differences after exposure to prenatal famine are common and timing- and sex-specific. *Hum Mol Genet* 18:4046-4053

168. Tryndyak V, de Conti A, Kobets T, Kutanzi K, Koturbash I, Han T, Fuscoe JC, Latendresse JR, Melnyk S, Shymonyak S, Collins L, Ross SA, Rusyn I, Beland FA, Pogribny IP (2012) Interstrain differences in the severity of liver injury induced by a choline- and folate-deficient diet in mice are associated with dysregulation of genes involved in lipid metabolism. *FASEB J* 26:4592-602. doi: 10.1096/fj.12-209569

169. Tsukada Y, Fang J, Erdjument-Bromage H, Warren ME, Borchers CH, Tempst P, Zhang Y (2006) Histone demethylation by a family of JmjC domain-containing proteins. *Nature* 439:811-816

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

170. Vaiman D, Gascoin-Lachambre G, Boubred F, Mondon F, Feuerstein JM, Ligi I, Grandvuillemin I, Barbaux S, Ghigo E, Achard V, Simeoni U, Buffat C (2011) The intensity of IUGR-induced transcriptome deregulations is inversely correlated with the onset of organ function in a rat model. *PLoS One* 6:e21222.

171. Ventura-Clapier R, Garnier A, Veksler V (2008) Transcriptional control of mitochondrial biogenesis: the central role of PGC-1 α . *Cardiovasc Res* 79:208-217

172. Verwey M, Amir S (2011) Nucleus-specific effects of meal duration on daily profiles of PERIOD1 and PERIOD2 protein expression in rats housed under restricted feeding. *Neuroscience* 192:304-311

173. Vucetic Z, Kimmel J, Totoki K, Hollenbeck E, Reyes TM (2010) Maternal high-fat diet alters methylation and gene expression of dopamine and opioid-related genes. *Endocrinology*. 151:4756-4764

174. Wang J, Wu Z, Li D, Li N, Dindot SV, Satterfield MC, Bazer FW, Wu G (2012) Nutrition, epigenetics, and metabolic syndrome. *Antioxid Redox Signal* 17:282-301

175. Wang Y, Lobstein T (2006) Worldwide trends in childhood overweight and obesity. *Int J Pediatr Obes* 1:11-25

176. Watanabe K, Fujii H, Takahashi T, Kodama M, Aizawa Y, Ohta Y, Ono T, Hasegawa G, Naito M, Nakajima T, Kamijo Y, Gonzalez FJ, Aoyama T (2000) Constitutive regulation of cardiac fatty acid metabolism through peroxisome proliferator-activated receptor alpha associated with age-dependent cardiac toxicity. *J. Biol. Chem* 275:22293-22299.

177. Waterland RA, Kellermayer R, Laritsky E, Rayco-Solon P, Harris RA, Travisano M, Zhang W, Torskaya MS, Zhang J, Shen L, Manary MJ, Prentice AM (2010) Season of conception in rural gambia affects DNA methylation at putative human metastable epialleles, *PLoS Genet* 6:e1001252

178. Weltman MD, Farrell GC, Liddle C (1996) Increased hepatocyte CYP2E1 expression in a rat nutritional model of hepatic steatosis with inflammation. *Gastroenterology* 111:1645-1653

1
2 179. Wolfe D, Gong M, Han G, Magee TR, Ross MG, Desai M (2012) Nutrient sensor-
3 mediated programmed non-alcoholic fatty liver disease in low birth weight offspring. *Am J*
4 *Obstet Gynecol* 207:308.e1-6
5
6

7
8
9 180. Xiao F, Huang Z, Li H, Yu J, Wang C, Chen S, Meng Q, Cheng Y, Gao X, Li J, Liu Y,
10 Guo F (2011) Leucine deprivation increases hepatic insulin sensitivity via
11 GCN2/mTOR/S6K1 and AMPK pathways. *Diabetes* 60:746-756
12
13

14
15
16 181. Yajnik CS, Deshpande SS, Jackson AA, Refsum H, Rao S, Fisher DJ, Bhat DS, Naik SS,
17 Coyaji KJ, Joglekar CV, Joshi N, Lubree HG, Deshpande VU, Rege SS, Fall CH (2008)
18 Vitamin B12 and folate concentrations during pregnancy and insulin resistance in the
19 offspring: the Pune Maternal Nutrition Study. *Diabetologia* 51:29-38
20
21
22

23
24
25 182. Yajnik CS, Deshmukh US (2012) Fetal programming: maternal nutrition and role of one-
26 carbon metabolism. *Rev Endocr Metab Disord* 13:121-127
27
28

29
30
31 183. Yamamoto T, Sadoshima J (2011) Protection of the heart against ischemia/reperfusion by
32 silent information regulator 1. *Trends Cardiovasc Med* 21:27-32
33
34

35
36 184. Yang J, Loos RJ, Powell JE, Medland SE, Speliotes EK, Chasman DI, Rose LM,
37 Thorleifsson G, Steinthorsdottir V, Mägi R, et al (2012) FTO genotype is associated with
38 phenotypic variability of body mass index. *Nature* 490:267-272
39
40
41

42
43
44 185. Yu J, Auwerx J (2010) Protein deacetylation by SIRT1: an emerging key post-
45 translational modification in metabolic regulation. *Pharmacol Res* 62:35-41.
46
47

48
49 186. Zhang J, Zhang F, Didelot X, Bruce KD, Cagampang FR, Vatish M, Hanson M, Lehnert
50 H, Ceriello A, Byrne CD (2009) Maternal high fat diet during pregnancy and lactation alters
51 hepatic expression of insulin like growth factor-2 and key microRNAs in the adult offspring.
52 *BMC Genomics* 10:478
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

187. Zhang Y, Yuan M, Bradley KM, Dong F, Anversa P, Ren J (2012) Insulin-like growth factor 1 alleviates high-fat diet-induced myocardial contractile dysfunction: role of insulin signaling and mitochondrial function. *Hypertension* 59:680-69

188. Zhao JY, Yang XY, Gong XH, Gu ZY, Duan WY, Wang J, Ye ZZ, Shen HB, Shi KH, Hou J, Huang GY, Jin L, Qiao B, Wang HY (2012) Functional variant in methionine synthase reductase intron-1 significantly increases the risk of congenital heart disease in the Han Chinese population. *Circulation* 125:482-490

Figure legends

Figure 1: Comparison of the effects of high fat/ overfeeding and methyl donor deficiency (MDD). PGC-1 α is a master regulator of lipid metabolism and fatty acid oxidation. It is phosphorylated and acetylated under the control of AMP kinase (AMPK), GCN5 acetylase and SIRT1 deacetylase. High fat diet and over nutrition decrease activity of AMP kinase, through high intracellular ATP levels, leading to decreased phosphorylation of PGC-1 α . It produces hyperacetylation of PGC-1 α through increased expression of GCN5 and decreased expression and activity of SIRT1. MDD in rat pups born from mothers subjected to MDD during pregnancy and lactation produces similar consequences on SIRT1 expression and PGC-1 α acetylation in heart. In addition, MDD decreases the expression of PRMT1 and the level of SAM, leading to decreased methylation of PGC-1 α in heart and liver.

Figure 2: The molecular links between methyl donor deficiency and impaired fatty acid oxidation. The deficiency in folate and vitamin B12 of the rat ‘dam-progeny’ model impairs fatty acid oxidation and complexes 1 and 2 of mitochondrion respiratory chain through decreased expression of peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPAR α), estrogen-related receptor alpha (ERR α) and hepatic nuclear factor 4 (HNF-4). It impairs the co-regulation of these nuclear receptors (NRs) by peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha (PGC-1 α), through its decreased methylation and/or increased acetylation. This imbalanced methylation/acetylation is the consequence of the decreased expression of arginine methyl-transferase PRMT1, the decreased cellular ration of S-adenosyl methionine (SAM)/S-adenosyl homocysteine (SAH) ratio (which directly influence PRMT1 activity as substrate and inhibitor, respectively) and the decreased expression of deacetylase sirtuin 1 (SIRT1) (adapted from ref. 61, 63 and 68).

Figure 3: Influence of vitamin B12 on cell proliferation through SIRT1 dependent activation of ER stress. The decreased cellular availability in B12 activates ER stress pathways and apoptosis by hyperacetylation of HSF1 through decreased expression of SIRT1. The dramatic reduction in both protein expression and acetylation of HSF1 leads to critical reduction of the molecular chaperons needed for a functional proteome in normal cellular growth. In contrast, B12 supplementation protects the cells from the activation of ER stress

1 and apoptosis, in cells subjected to Thapsigargin, an ER stress inducer. Thus, B12 will favour
2 fully adapted UPR response against any downstream attacks in non deficient cells while in
3 deficient cells, activated UPR will likely be shifted from adaptive toward apoptotic
4 maladaptive endpoint. SIRT1: sirtuin (silent mating type information regulation 2 homolog) 1
5
6 HSF1: heat shock factor protein 1
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Figure 1

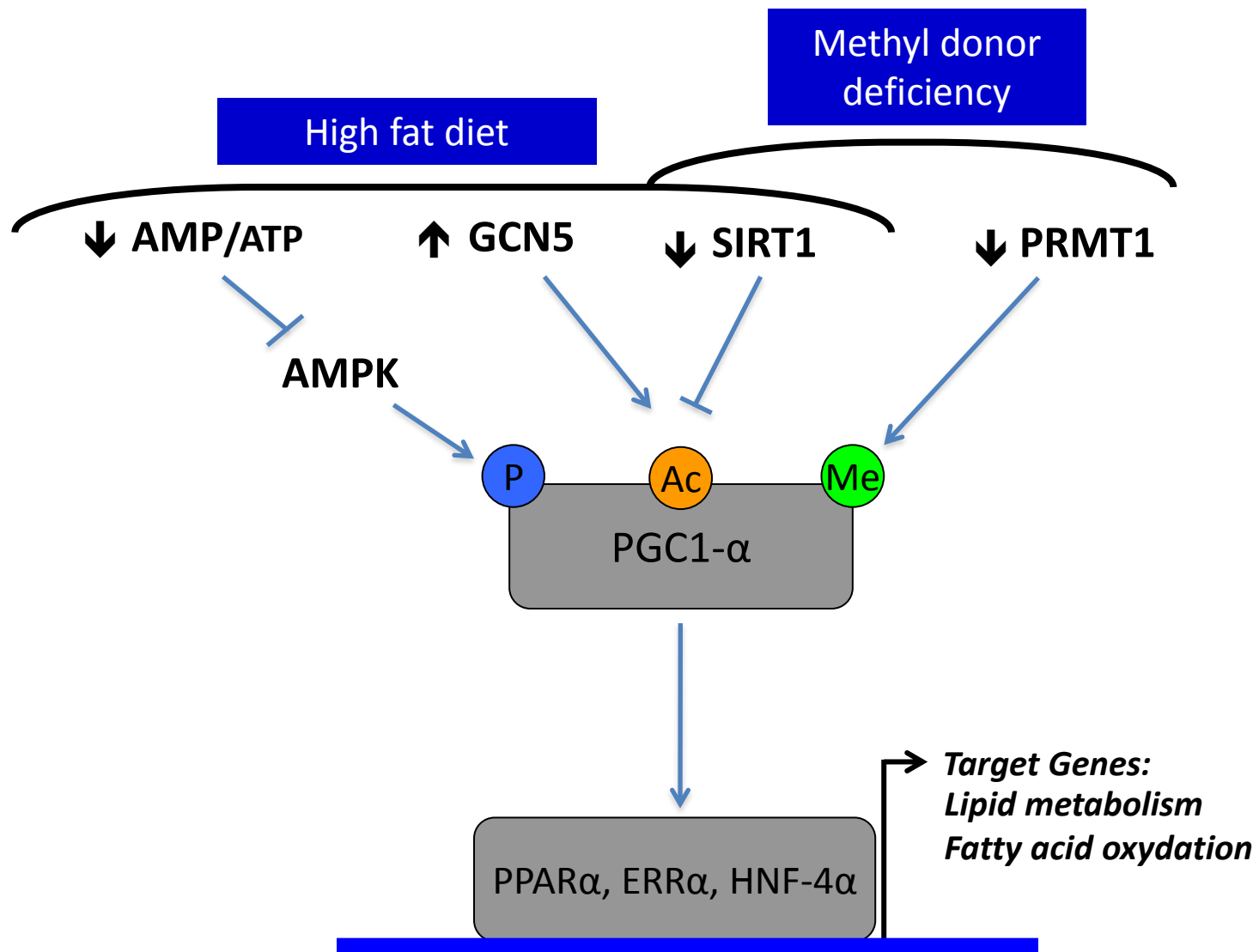


Figure 2

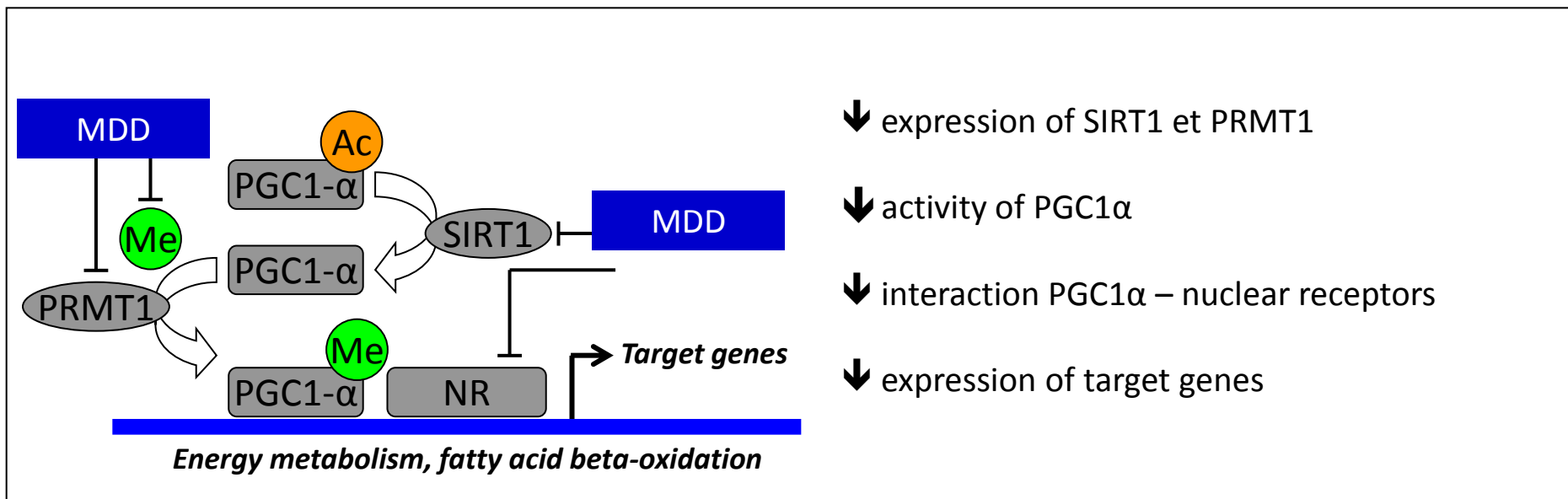
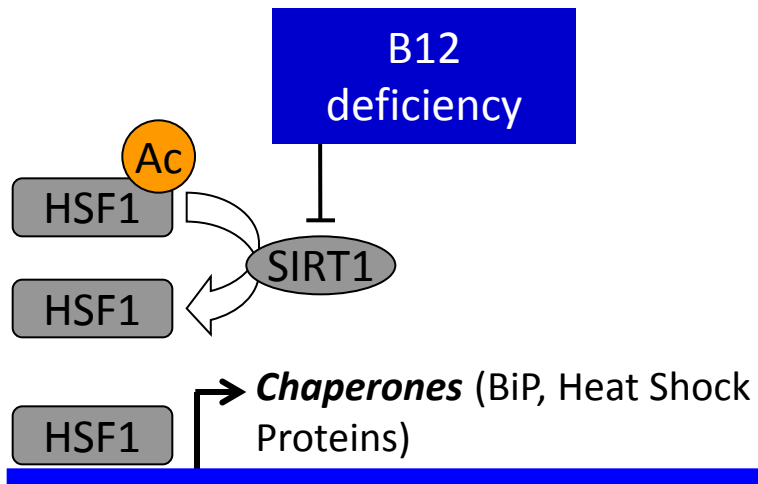


Figure 3



↓ proliferation ↑ differentiation

↓ expression de SIRT1

↓ expression and deacetylation of HSF1

↓ expression of chaperones

↑ endoplasmic reticulum stress

Dear Editor,

We thank you for accepting to consider the revised version of our review Ref Ms. No. PAEJ-D-13-00243, entitled « Nutritional models of foetal programming and nutrigenomic and epigenomic dysregulations of fatty acid metabolism in liver and heart » for publication in Pflügers Archiv - European Journal of Physiology.

We appreciate the very positive general comments and the fruitful suggestions made by the reviewer. We have prepared a point-by-point answer to the specific comments:

Point 1: *“Three figures indeed improve the understanding of the basic mechanisms. However, I recommend to remove Figure 3 because the data shown are not convincing, they show no or opposite effects in female mice - that might be due to altered estrogen levels which would make the story more complicated. I rather suggest showing a cartoon demonstrating the alterations that are induced by methyl donor deficiency.”*

We have deleted the figure 3. Since the review is focused on the deregulation of fatty acid metabolism in heart and liver, we thought that the main metabolic changes of MDD in liver and heart can be better described in the text than in a cartoon.

Point 2: *“furthermore miss a few important papers e.g. those on the epigenetic alteration of PGC1 in relatives of T2D subjects and their modifications in response to exercise and bariatric surgery as described by the Zierath group. And the paper by Kuehnen et al (PLoS Genet. 2012;8:e1002543) that demonstrates a similar epigenetic alteration of POMC in blood cells of obese subjects than in samples of the hypothalamus.”*

These references have introduced and discussed at the end of the paragraph dedicated to the influences of nutrition and metabolism on the epigenome, at the end of page 10 and beginning of page 11:

“The leptin responsive preproopiomelanocortin (POMC) gene is a hypothalamic regulator of energy balance. A hypermethylation variant targeting individual CpGs at the intron2–exon3 boundary of POMC is associated to obesity in children, in another case control study. The hypermethylation of exon3 reduces the expression of POMC through reduced binding of the transcription enhancer P300 [99]. The dynamic effect of obesity on the epigenome is also illustrated by an altered promoter methylation of peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator1 α (PGC-1 α) and pyruvate dehydrogenase kinase isozyme 4 (PDK4) in skeletal muscle from adult obese subjects, which is restored to non-obese levels after weight loss induced by by-pass surgery [11]. In this study, the genome-wide DNA methylation analysis of skeletal muscle showed also that obesity is associated with hypermethylation at CpG shores and exonic regions close to transcription start sites [11]. Consistently, sedentary lifestyle and lack of physical activity may modify epigenetic programming and predisposition to obesity and T2DM, as recently reviewed [94]. In particular, they result in decreased expression of the mitochondrial and glucoregulatory genes PGC-1 α , Hexokinase 2 (HK2), and ATP synthase subunit beta (ATPB), through epigenomic mechanisms that involve the activation of histone deacetylase (HDAC) family members in skeletal muscle [94].”

Point 3 *“The manuscript could be improved by providing a list of abbreviations used in the text.”*

We have added this list of abbreviations in the revised version

Point 4: Minor points

"Page 6 line 57: of methionine by" This has been corrected

"Page 8 line 14 (T2DM)" This has been corrected

"Page 10 line 29 POMC" pomc gene refers to rats, in this sentence. In the gene nomenclature used in our review, genes in capital letter refer to non defined or human genome.

"Page 14 line 51: please indicate the tissue in which altered GLLUT4 expression was detected" This is now indicated (skeletal muscle)

"It has to be estrogen instead of oestrogen in the entire text." This has been changed

Point 5: *"The text within the figures needs to be translated."* We apologize. We have submitted a preliminary version of our figures, instead of the final version. This is now corrected.


We hope that this revised version will satisfactorily address the very helpful remarks of the reviewer and that it will become acceptable for publication. Looking forward to hearing from you, we remain,

Yours sincerely,
Jean-Louis Guéant

Supplementary Material

[Click here to download Supplementary Material: renamed_126fd.doc](#)

AUTHOR QUERY FORM

 ELSEVIER	Journal: BIOCHI Article Number: 4340	Please e-mail or fax your responses and any corrections to: E-mail: corrections.esch@elsevier.tnq.co.in Fax: +31 2048 52789
--	---	---

Dear Author,

Please check your proof carefully and mark all corrections at the appropriate place in the proof (e.g., by using on-screen annotation in the PDF file) or compile them in a separate list. Note: if you opt to annotate the file with software other than Adobe Reader then please also highlight the appropriate place in the PDF file. To ensure fast publication of your paper please return your corrections within 48 hours.

For correction or revision of any artwork, please consult <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Any queries or remarks that have arisen during the processing of your manuscript are listed below and highlighted by flags in the proof.

Location in article	Query / Remark: Click on the Q link to find the query's location in text Please insert your reply or correction at the corresponding line in the proof
Q1	<p>Please confirm that given names and surnames have been identified correctly.</p> <div data-bbox="304 1102 895 1281" style="border: 1px solid black; padding: 5px;"> <p>Please check this box or indicate your approval if you have no corrections to make to the PDF file</p> <div style="display: inline-block; border: 1px solid black; width: 40px; height: 20px; vertical-align: middle;"></div> </div>

Thank you for your assistance.

Contents lists available at [ScienceDirect](#)

Biochimie

journal homepage: www.elsevier.com/locate/biochi

Highlights

- CARM and PRMT1 are elevated in Lung Cancer.
- CARM and PRMT1 show no hierarchical predominance of one over the other.
- CARM1 and PRMT1 correlate in healthy tissue but not tumor tissue.
- siPRMT1 and siCARM1 reduce proliferation and promotes differentiation.
- siPRMT1 and siCARM1 decrease neuromedin B receptor and increase cytokeratins.

UNCORRECTED PROOF



Contents lists available at ScienceDirect

Biochimie

journal homepage: www.elsevier.com/locate/biochi

Research paper

CARM1 and PRMT1 are dysregulated in lung cancer without hierarchical features

Q1 Rania Elakoum, Guillaume Gauchotte¹, Abderrahim Oussalah¹, Marie-Pierre Wissler, Christelle Clément-Duchêne, Jean-Michel Vignaud, Jean-Louis Guéant, Farès Namour*

INSERM NGERE UMR 954, Vandoeuvre F-54500, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 26 July 2013

Accepted 23 October 2013

Available online xxx

Keywords:

CARM1

PRMT1

Lung cancer

Proliferation

siRNA

ABSTRACT

CARM1 and PRMT1 are 2 Protein Arginine Methyl Transferases (PRMT) dysregulated in cancer. CARM1 function is contradictory and depicted as facilitating proliferation or differentiation. PRMT1 is required for cell proliferation. CARM1 and PRMT1 cooperate for gene regulation. We report that CARM1 and PRMT1 are significantly overexpressed in 60 patients with Non-Small Cell Lung Carcinomas (NSCLC). CARM1 and PRMT1 correlated in healthy but not tumor tissue. Their levels of expression in tumor tissue were proportional to their levels of expression in the counterpart healthy tissue. Only CARM1 expression was found to be correlated with tumor differentiation and neither CARM1 nor PRMT1 expression was correlated with survival. Accordingly, CARM1 and PRMT1 are overexpressed in 2 NSCLC cell lines, A549 and H1299. Targeting PRMT1 with siRNA reduced proliferation, by decreasing cell growth and inhibiting soft agar colony formation, and promoted differentiation, by increasing the epithelial markers cytokeratin 7 and 8 and decreasing Neuromedin B receptor, which binds a mitogenic factor. siCARM1 yielded similar consequences but the conditions with siCARM1 reflected inhibition of both CARM1 and PRMT1. Together these results suggest that CARM1 and PRMT1 are involved in proliferation in lung cancer with no hierarchy of one protein over the other. The fact that CARM1 targeting suppresses PRMT1 in addition to CARM1 reinforces the functional importance of CARM1/PRMT1 interaction.

© 2013 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

1. Introduction

Arginine methylation carried out by Protein Arginine Methyl Transferases (PRMTs) emerges as a regulator of protein function [1]. Both type I and type II PRMT family enzymes catalyze the formation of monomethylarginine, but type I PRMTs further catalyze the formation of asymmetric dimethylarginine while type II produce symmetric dimethylarginine. Dimer formation is a conserved characteristic in PRMTs. The monomeric structure of the PRMT core can be divided into 3 parts: a methyltransferase domain that binds S-Adenosyl-Methionine, a beta barrel and a dimerization arm [2]. Two well-studied enzymes, PRMT1 and PRMT4/CARM1, can function as secondary co-activators for nuclear receptor-mediated transcription by methylating H3R17 (Histone 3 Arginine-17) and H3R26 (Histone 3 Arginine-26), respectively. However, they have a

very wide substrate specificity and methylate, notably but not only, proteins involved in RNA processing and transport. PRMT1 and CARM1 cooperate in gene regulation [3].

Arginine methylation seems to be a general mechanism required for pluripotency. Both PRMT1 and CARM1 act to maintain pluripotency in the mouse embryo and embryonic and adult stem cells [4–9].

PRMTs functions are dysregulated in cancer. PRMT1 is significantly overexpressed in various types of cancer, notably bladder and prostate cancer [10] and was found to be required for cell proliferation [11]. CARM1 exhibits contradictory roles in cancer and is depicted as either facilitating [11–13] or inhibiting [14] proliferation. CARM1 overexpression seems to be prevalent in colorectal cancers while it is detected in only a fraction of breast and prostate tumors [15].

Mice lacking PRMT1 die in the embryonic stage and those lacking CARM1 are small and die shortly after birth [1]. Moreover, CARM1 is required for proper control of proliferation and differentiation of pulmonary epithelial cells [16].

A previous report demonstrated a widespread cooperation of PRMT1 and CARM1 in gene activation [3] and these two proteins have not yet been investigated in lung cancer. These elements

* Corresponding author. INSERM UMR 954, Faculté de Médecine de Nancy, 9 ave Forêt de Haye, BP 184, 54511 Vandoeuvre, France. Tel.: +33 03 83 68 32 92; fax: +33 03 83 68 32 79.

E-mail addresses: jean-louis.gueant@univ-lorraine.fr (J.-L. Guéant), bernard.namour@univ-lorraine.fr, b.namour@chu-nancy.fr (F. Namour).

¹ Equal contribution.

prompted us to investigate PRMT1 and CARM1 in non-small cell lung cancer (NSCLC) which accounts for 85% of all cases of lung cancer. The 5-year survival of patients with metastatic NSCLC is less than 10% because chemotherapy has reached limited therapeutic effectiveness [17].

The aim of this study was to investigate the role of PRMT1 and CARM1 in patients with NSCLC and in 2 NSCLC cell lines, A549 and H1299 cells. We report that CARM1 and PRMT1 are overexpressed in tumor tissues from 60 NSCLC patients. They correlate in healthy tissue but not in tumor tissue. Their elevation in tumor tissue is proportional to their expression level in healthy tissue. Only CARM1 correlates with differentiated tumors but neither CARM1 nor PRMT1 correlate with survival. PRMT1 and CARM1 are also found overexpressed in A549 and H1299 cells. Invalidation of PRMT1 reduces proliferation, increases epithelial markers (cytokeratins 7 and 8) and decreases a mitogenic factor (Neuromedin B Receptor). siCARM1 yield similar results but conditions with siCARM1 reflect inhibition of both CARM1 and PRMT1. Further investigation is needed to identify the mechanisms by which PRMTs act in lung neoplastic transformation and to guide eventually the development of molecules that regulate PRMTs activities in therapeutic strategies.

2. Material and methods

2.1. Tissues and cell culture

Tumor samples carefully dissected from 60 patients with NSCLC were analyzed. Each tumor sample was paired with a normal sample, derived from the same patient, resected in a region of healthy tissue surrounding the tumor. Patients' characteristics are listed in Table 1. Institutional review board was obtained to use archived material for research purposes (Authorization n° DC2008-459, Research Ethics Committee).

Human NSCLC A549 and H1299 cells (adenocarcinomas) were purchased from ATCC, maintained at 37 °C and 5% CO₂ in RPMI-1640 medium (Gibco) supplemented with 10% fetal calf serum (Eurobio) and 1% antibiotics (Penicilline, streptomycine) (Gibco)

Table 1
Non-small cell lung cancer patients' characteristics.

Characteristic	No. of patients (N = 60)	%
<i>Age, years</i>		
<70	41	68
≥70	19	32
<i>Sex</i>		
Male	57	95
Female	3	5
<i>Histology</i>		
Adenocarcinoma	30	50
Squamous cell carcinoma	30	50
<i>Differentiation grade</i>		
Well differentiated	27	45
Moderately differentiated	9	15
Poorly differentiated	24	40
<i>Tumor status</i>		
T1	15	25
T2	42	70
T3	3	5
<i>Nodal status</i>		
N0	43	72
N1	16	27
N2	1	1
<i>Stage</i>		
IA	11	18,5
IB	29	48,5
IIA	3	5
IIB	16	27
IIIA	1	1

and passaged 1:4 every 2–3 days. Normal Human Bronchial/tracheal Epithelial cells (NHBE) (Lonza) were maintained in BEBM medium supplemented with growth factors at 37 °C and 5% CO₂ and passaged 1:4 every 8–10 days.

2.2. Quantitative RT-qPCR analysis

RNA was extracted using RNeasy Plus Mini kit (Qiagen) and reverse transcribed with the Quantitect Reverse Transcription Kit (Qiagen). Quantitative PCR in real time (qPCR) was performed on the I Cycler Biorad instrument using the Quantitect SYBER Green PCR kit (Qiagen). Gene expression levels were normalized to Pol II. The oligonucleotides used for CARM1 amplification were Forward 5' GAAGCCCAGCGGAAACAT 3', Reverse 5' GGTACCA-GAAGTTGGCCTTG 3'; for PRMT1 Forward 5' TACACGCACTGGAAG-CAGA 3', Reverse 5' GGTTGTCTTGGCGTTGG 3' and for Pol II 5' CAGACCGGCTATAAGGTGGA 3', Reverse 5' GGTAGACCATGGGA-GAATGC 3'. The qPCR was performed according to the following program: 15 min at 95 °C to activate the enzyme, followed by 45 cycles at 94 °C for 10 s, 56 °C for 15 s, and 72 °C for 15 s. Melting curve analyses were performed by increasing temperature from 64 to 95 °C. Relative gene expression was calculated by the $\Delta\Delta CT$ method. RNA were extracted from 3 independent cell cultures and processed into 3 independent runs in which each RNA sample was tested in duplicate for gene expression. The averaged values were compared in statistical analyses.

2.3. Total protein extraction and Western blot analysis

Protein extracts were obtained using RIPA buffer (50 mM Tris-HCL pH 8.0, 150 mM NaCl, 1% Nonidet P-40 N, 0.5% deoxycholate, 0.1% SDS, 50 mM NaF, 1 mM sodium orthovanate) with protease inhibitor (Roche Applied Science). Proteins were separated by SDS-PAGE and transferred to 0.22 μ m nitrocellulose membranes (Bio-rad). Western Blotting was performed with the following antibodies: anti-CARM1 (1/1000, rabbit polyclonal 09.818 Millipore), anti-PRMT1 (1/700, rabbit monoclonal A33 Cell Signaling), anti-cytokeratin 7 (CK7, 1/700, mouse monoclonal OV-TL12/30 Dako), anti-cytokeratin 8 (CK8, 1/1000, mouse monoclonal Ab2530 Abcam), anti-neuromedin B receptor (NMBR, 1/1000, rabbit polyclonal SP4598P Acris). Loading control was confirmed using anti-GAPDH antibody (1/1000, chicken polyclonal Ab2302 Millipore). Images were analyzed with the Image J software and are representative of 3 independent immunoblots.

2.4. siRNA transfections

The siRNA oligonucleotide duplexes were purchased from Ambion (Applied Biosystems) for targeting the human PRMT1 and CARM1 in A549 and H1299 cells. The siRNA sequences are (sense strand indicated): siPRMT1-1: 5'-GCCUGCAAGUGAAGCGGAAAtt-3, siPRMT1-2: 5'-GCAACUCCAUGUUUCAUAAtt, siCARM1-1: 5'-GAAGGAGAUUUGCACAGGAtt-3', siCARM1-2: 5'-AGACAGAGCUAC GACAUCAtt-3' and siRNA used as control and designated siNON-targeting: 5'-UUGAUGUGUUUAGUCGCUA-3'. siRNA duplexes (10 nM final concentration) were transfected with lipofectamine (Invitrogen). Five days post-transfection, A549 and H1299 cells were harvested for RNA or protein extraction or immuno-cytochemistry.

2.5. Cell proliferation analysis

A549 and H1299 cells were plated in 6-cm dishes at 2.5×10^3 cells/dish, transfected twice with siCARM1 or siPRMT1, 12 h after seeding and at day 5. Cells were counted in triplicate in 3

independent experiments at day 2, 5, 7 and 10 using trypan blue to measure cell viability.

2.6. Colony formation in soft agar

The ability of A549 and H1299 cells to form macroscopically visible colonies was tested in soft agar, 3 days post-transfection with siNontargeting, siCARM1 or siPRMT1. Briefly, 1.5-mL underlayers of 1× RPMI containing 10% fetal calf serum and 0.5% agar (Sigma) were prepared in 35-mm dish. Cell dilution at a concentration of 2.0×10^5 cells/mL were prepared in 1× RPMI containing 20% fetal calf serum and 0.7% agarose (Eurobio) and 1.5 mL of each dilution was pipetted on the underlayers in triplicate. After 3 weeks colonies were stained with 0.005% crystal violet and counted.

2.7. Immunocytochemistry analysis

Tissues were fixed in 10% formalin. Cells were fixed with 4% paraformaldehyde 5 days post-siRNAs transfection then cell blocks were prepared with Histogel (ThermoScientific). Paraffin embedded sections from cell blocks or tissue specimens were deparaffinised by heating at 97 °C in 10 mM citrate buffer (pH 6) for 20 min for antigen retrieval. Immunocytochemical staining was performed with the Flex+ Envision kit (Dako). Primary antibodies used in immunocytochemistry were raised against Ki-67 (1/200, mouse monoclonal MIB-1, Dako), CK7 (1/50), CK8 (1/50) and NMBR (1/50) and those used in immunohistochemistry were raised against CARM1 (1/50) and PRMT1 (1/50). Slides were prepared in triplicate in 3 independent experiments and inspected by 2 independent observers. CK7, CK8, NMBR, CARM1 and PRMT1 immunoreactivities were analyzed by estimating the percentage of cells showing characteristic staining and the intensity of staining. The intensity of staining was graded 1 for weak, 2 for medium and 3 for strong. Results were scored by multiplying the percentage of positive cells (P) by the intensity (I) that is by using the quick score (Q). A Q-score between 0 and 300 is obtained where 300 is equal to 100% of cells strongly stained ($Q = P \times I$, maximum = 300). For Ki-67 only the percentage of positive cells was estimated and results were scored as the ratio of stained cells to total number of cells.

2.8. Statistical analysis

All quantitative variables are described as medians and percentiles [Interquartile range (IQR), 25–75th percentile]. All proportions are expressed as percentages with 95% confidence intervals (95% CI). The cohort of patients included in the study was divided into subgroups according to CARM1 and PRMT1 scores quartiles or *a priori* defined thresholds (<100, 100 to 200, and >200) in both normal and tumor tissues. Proportions across subgroups were compared using the chi-square test or the Fisher's exact test, as appropriate. The comparison of proportions between matched sets was carried out using the Cochran Q test. The comparison of CARM1 and PRMT1 scores was performed using the Mann-Whitney U test or Kruskal-Wallis test, as appropriate. In Kruskal-Wallis test, post-hoc analysis for pairwise comparison of subgroups was performed according to Conover, in order to avoid multiple testing problem [18]. All correlations were studied using the Spearman's rank-order correlation coefficient. Agreement between subgroup classification of patients according to their CARM1 and PRMT1 scores was carried out using weighted Kappa statistics. The cumulative probabilities of patients' survival after surgery were estimated using the Kaplan-Meier method. The duration of patients' follow-up was calculated and expressed in months. Log-rank test for trend was used to assess the probability that there was a trend in patients' survival across successive CARM1 and PRMT1

scores quartiles or patients' *a priori* defined subgroups, as they represent ordered categorical variables. Results from cell experiments are presented as mean ± standard error of the mean (s.e.m) and analyzed by ANOVA. All the reported P-values were two-sided, and P-values <0.05 were considered statistically significant. Statistical analyses were performed using MedCalc software, version 12.7.0.0 (MedCalc Software, Mariakerke, Belgium).

3. Results

3.1. CARM1 and PRMT1 are frequently strongly expressed in tumor tissues and weakly expressed in normal counterpart tissues and this distribution is statistically significant

Immunohistochemistry was carried out on 60 paired samples including a tumor tissue and its corresponding healthy tissue (Fig 1A). Table 2 reports the proportion of patients according to their CARM1 and PRMT1 scores. In normal tissue, the proportion of patients with a CARM1 score below 100 was 90% (95% CI, 82%–98%). This proportion was significantly lower when CARM1 score was calculated in tumor tissue (10%; 95% CI, 2%–18%; $P < 0.001$). Conversely, the proportions of patients with CARM1 score above 200 was significantly higher in tumor than normal tissue (38% vs. 0%; $P < 0.001$). The same observation was applicable for PRMT1 score comparison between normal and tumor tissue (Table 2 and Fig. 1B).

3.2. Median CARM1 and PRMT1 expression is significantly elevated in tumor tissues compared to that of the corresponding normal tissues

The median value of CARM1 score in tumor tissue was significantly higher than in normal tissue (180, IQR 25th–75th: 140–240 vs. 60, IQR 25th–75th: 40–80; $P < 0.0001$) (Fig. 1C). Likewise, the PRMT1 score was significantly higher in tumor than normal tissue (140, IQR 25th–75th: 90–180 vs. 60, IQR 25th–75th: 40–80; $P < 0.0001$) (Fig. 1D).

3.3. The expression of CARM1 and PRMT1 are not correlated in tumor tissue despite the fact that the higher the expression of CARM1 and PRMT1 in normal tissues, the higher their expressions in corresponding tumor tissue

Table 3 shows the correlation matrix between CARM1 and PRMT1 scores in normal and tumor tissues. Comparison between normal and tumor tissue showed that CARM1 score as well as PRMT1 score were significantly correlated ($\rho = 0.292$, $P = 0.0234$ and $\rho = 0.404$, $P = 0.0014$, respectively). However, CARM1 score and PRMT1 score were significantly correlated in normal tissue only ($\rho = 0.319$; $P = 0.0128$) but not in tumor tissue ($\rho = 0.172$; $P = 0.1880$).

3.4. Agreement between CARM1 and PRMT1 expressions is found in normal but not tumor tissue by using either *a priori* thresholds or quartile scores

When patients were classified into three subgroups by using *a priori* thresholds (<100, 100 to 200, and >200), the agreement in normal tissue between CARM1 and PRMT1 scores was moderate (weighted $\kappa = 0.419$; standard error = 0.143; 95% CI: 0.139–0.698). When quartiles were used instead of the *a priori* thresholds, the agreement between CARM1 and PRMT1 scores was fair (weighted $\kappa = 0.365$; standard error = 0.129; 95% CI: 0.112–0.618) (Supplemental Tables 1 and 2 online). In tumor tissue, the agreement between CARM1 and PRMT1 scores was fair for the *a priori* thresholds (weighted $\kappa = 0.253$; standard error = 0.103; 95% CI:

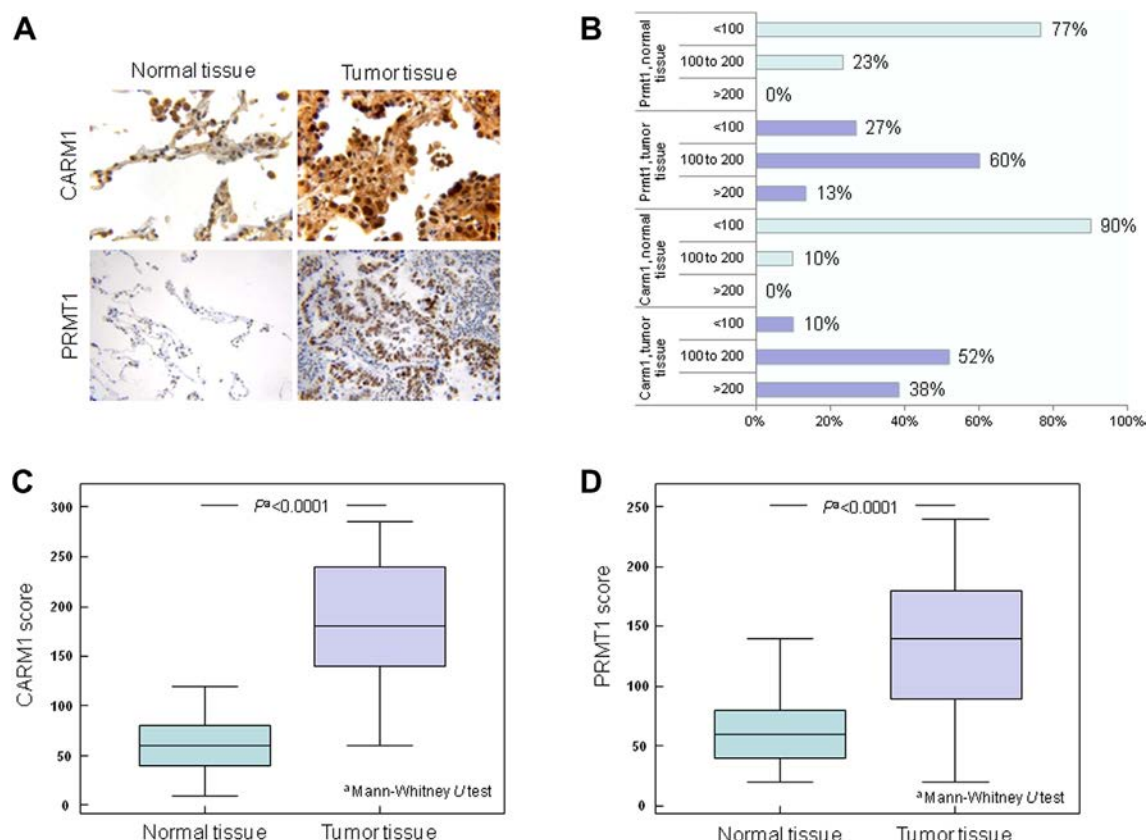


Fig. 1. CARM1 and PRMT1 are significantly elevated in tumor tissues by comparison to healthy counterparts (A) CARM1 and PRMT1 display a significantly stronger staining (brown) in tumor specimens than in their healthy counterparts ($p < 0.001$). Immunohistochemistry was carried out on formalin-fixed and paraffin-embedded tissues using antibodies against CARM1 and PRMT1. Original magnification, CARM1 X400 and PRMT1 X200. (B) Number of patients with CARM1 and PRMT1 scores above 200 is significantly higher in tumor than normal tissue ($p < 0.001$). (C, D) Median CARM1 and PRMT1 scores are significantly elevated in tumor tissue ($p < 0.0001$).

0.0502–0.455) (Supplemental Table 3 online) and poor for the quartiles (weighted $\kappa = 0.138$; standard error = 0.121; 95% CI: -0.0995–0.376) (Supplemental Table 4 online).

3.5. CARM1 expression is significantly associated with tumor differentiation

CARM1 score in tumor tissue was significantly influenced by tumor differentiation with higher median CARM1 score observed in well differentiated tumors (210; IQR, 160–240) in comparison to

Table 2

Proportion of patients' subgroups according to their CARM1 and PRMT1 scores in normal and tumor tissues.

		N	%	95% CI, %	P-value ^a
Normal tissue	CARM1 score <100	54	90	82–98	<0.001
	CARM1 score between 100 and 200	6	10	2–18	<0.001
	CARM1 score >200	0	0	–	<0.001
Tumor tissue	CARM1 score <100	6	10	2–18	–
	CARM1 score between 100 and 200	31	52	39–65	–
	CARM1 score >200	23	38	26–51	–
Normal tissue	PRMT1 score <100	46	77	66–88	<0.001
	PRMT1 score between 100 and 200	14	23	12–34	<0.001
	PRMT1 score >200	0	0	–	0.005
Tumor tissue	PRMT1 score <100	16	27	15–38	–
	PRMT1 score between 100 and 200	36	60	47–73	–
	PRMT1 score >200	8	13	4–22	–

^a Normal tissue vs. tumor tissue, Cochran Q test.

moderately (140; IQR, 110–165) and poorly differentiated tumor (170; IQR, 120–210) ($P = 0.0416$ for comparison across the 3 groups and $P = 0.0280$ for comparison between well differentiated vs. combined moderately and poorly differentiated tumors) (Supplemental Table 5 and Supplemental Figs. 1 and 2 online).

3.6. Neither CARM1 nor PRMT1 expression is correlated with survival

After a median follow-up of 43 months (95% CI: 26–60 months), 82% of patients had died. Using Kaplan–Meier method,

Table 3

Correlation matrix between CARM1 score and PRMT1 score.

		PRMT1-score, normal tissue	CARM1-score, tumor tissue	PRMT1-score, tumor tissue
CARM1-score, normal tissue	Correlation coefficient	0.319	0.292	0.030
	P-value ^a	0.0128	0.0234	0.8180
PRMT1-score, normal tissue	Number of subjects	60	60	60
	Correlation coefficient	–	0.084	0.404
CARM1-score, tumor tissue	P-value ^a	–	0.5229	0.0014
	Number of subjects	–	60	60
PRMT1-score, tumor tissue	Correlation coefficient	–	–	0.172
	P-value ^a	–	–	0.1880
	Number of subjects	–	–	60

^a Spearman rank correlation coefficient.

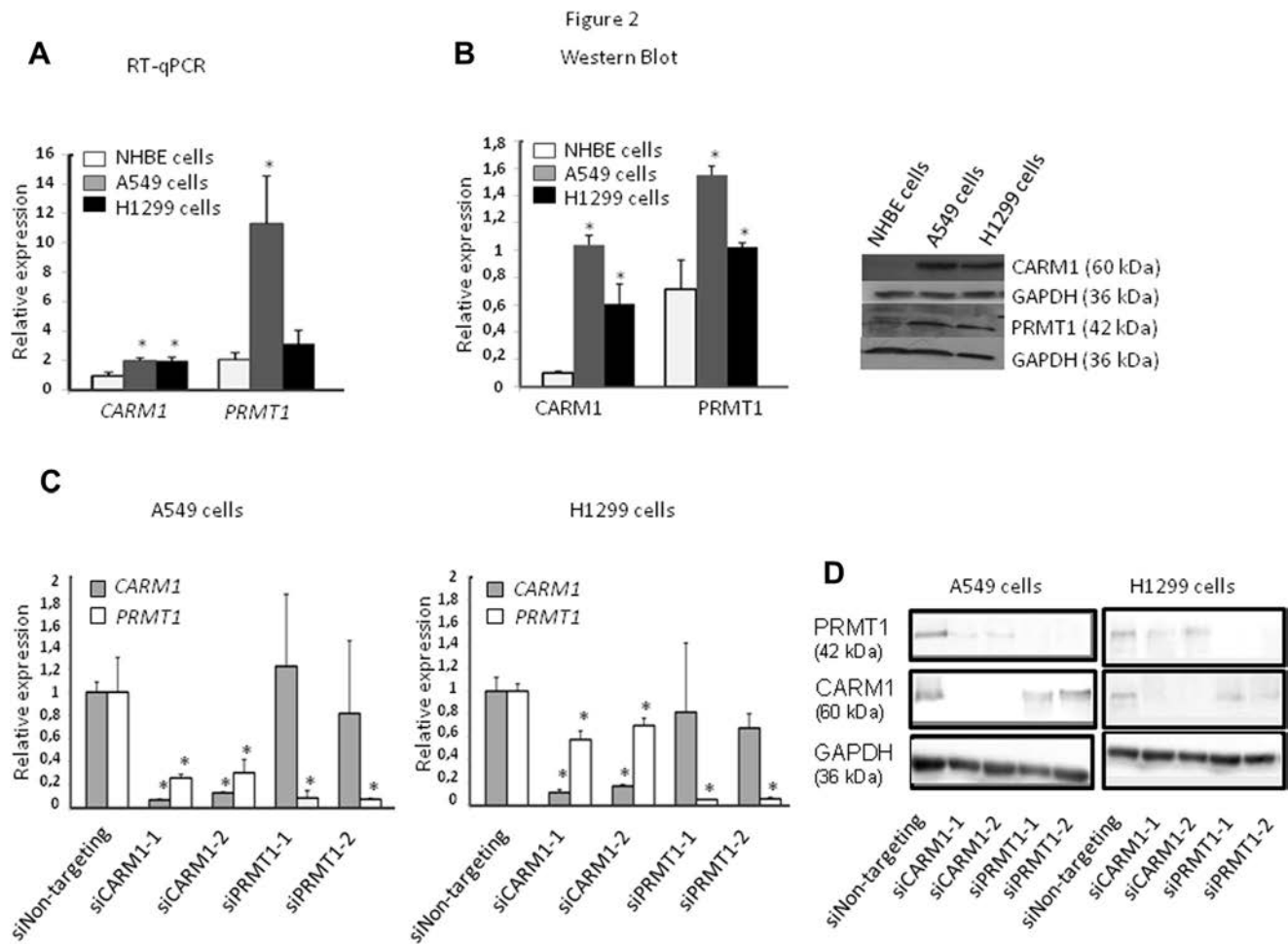


Fig. 2. CARM1 and PRMT1 are elevated in A549 and H1299 NSCLC cells compared to NHBE cells (control) (A, B) and single knock-down of either CARM1 or PRMT1 efficiently diminishes CARM1 or PRMT1 RNA and protein (C, D). (A) RNAs were extracted and CARM1 and PRMT1 concentrations measured by qRT-PCR; (B) protein extracts were separated by SDS-PAGE and immunoblotting was carried out with specific antibodies against CARM1 and PRMT1. A representative immunoblot image is shown. (C,D) A549 and H1299 cells were transfected with siNon-targeting (control) or 2 alternative siRNAs against CARM1 or PRMT1. Five days post-transfection, CARM1 and PRMT1 RNAs were measured by RT-qPCR (C) and proteins were identified by Western Blot (D). In C results are normalized to RNA polymerase II and expressed as mean and s.e.m. All results were reproduced in 3 independent experiments. * significantly different from control.

the probability of survival was 90% ($\pm 4\%$), 63% ($\pm 6\%$), 45% ($\pm 6\%$), and 35% ($\pm 6\%$) at 1, 2, 4, and 5 years respectively (Supplemental Fig. 3 online). In log-rank and log-rank for trend test, neither CARM1 nor PRMT1 quartiles scores, in either normal or tumor tissue, were associated with patients' survival (Supplemental Table 6 and Supplemental Fig. 4a–c, and d online). Consistently, neither CARM1 nor PRMT1 scores based on *a priori* thresholds (< 100 , 100 to 200, and > 200), in normal or tumor tissue, were associated with patients' survival (Supplemental Table 7 and Supplemental Fig. 5a–c, and d online).

3.7. CARM1 and PRMT1 are both elevated in A549 and H1299 cells; their independent knockdown via siRNA technique reduces tumorigenic growth

In A549 and H1299 cells, CARM1 was significantly elevated at the RNA ($p < 0.005$) and protein ($p < 0.0005$ and $p < 0.01$ respectively) levels (Fig. 2A and B) compared to NHBE cells (Fig. 2A and B). Similarly, PRMT1 was significantly elevated in A549 cells ($p < 0.0005$ and $p < 0.05$ for RNA and protein respectively) and its elevation in H1299 cells was significant at the protein level ($p < 0.05$) (Fig. 2A and B). To assess the consequences of CARM1 or

PRMT1 inactivation on NSCLC cells growth, we established single knockdown using transient transfection of soluble double-stranded siRNA to deplete each enzyme. Against each one of the 2 enzymes, we employed 2 different siRNA sequences which proved to be equally efficient in reducing CARM1 and PRMT1 RNAs ($p < 0.0001$) (Fig. 2C) and completely suppressing proteins (Fig. 2D) by comparison with siNon-targeting. It should be noted that siCARM1 in addition to abolishing CARM1 expression also diminished PRMT1 expression as previously reported [3]. Thus, in all subsequent conditions with siCARM1, the results reflect inhibitions of both CARM1 and PRMT1. Staining with blue trypan indicated that siPRMT1 or siCARM1 significantly reduced the number of viable A549 and H1299 cells from day 5 onward, that is during the differentiation phase (for example, siPRMT1 or siCARM1 vs siNon-targeting, $p < 0.005$ at day 7) (Fig. 3A). Furthermore, A549 or H1299 cells transfected with siPRMT1 or siCARM1 failed to form colonies in soft agar compared to cells transfected with siNon-targeting ($p < 0.001$) (Fig. 3B). Immunocytochemistry showed that the number of tumor cells stained positive by Ki-67, a marker of cell division, was lower in A549 and H1299 cells transfected with siPRMT1 or siCARM1 (37% and 33% respectively) than in cells transfected with siNon-targeting (47%) (Fig. 3C). Taken together,

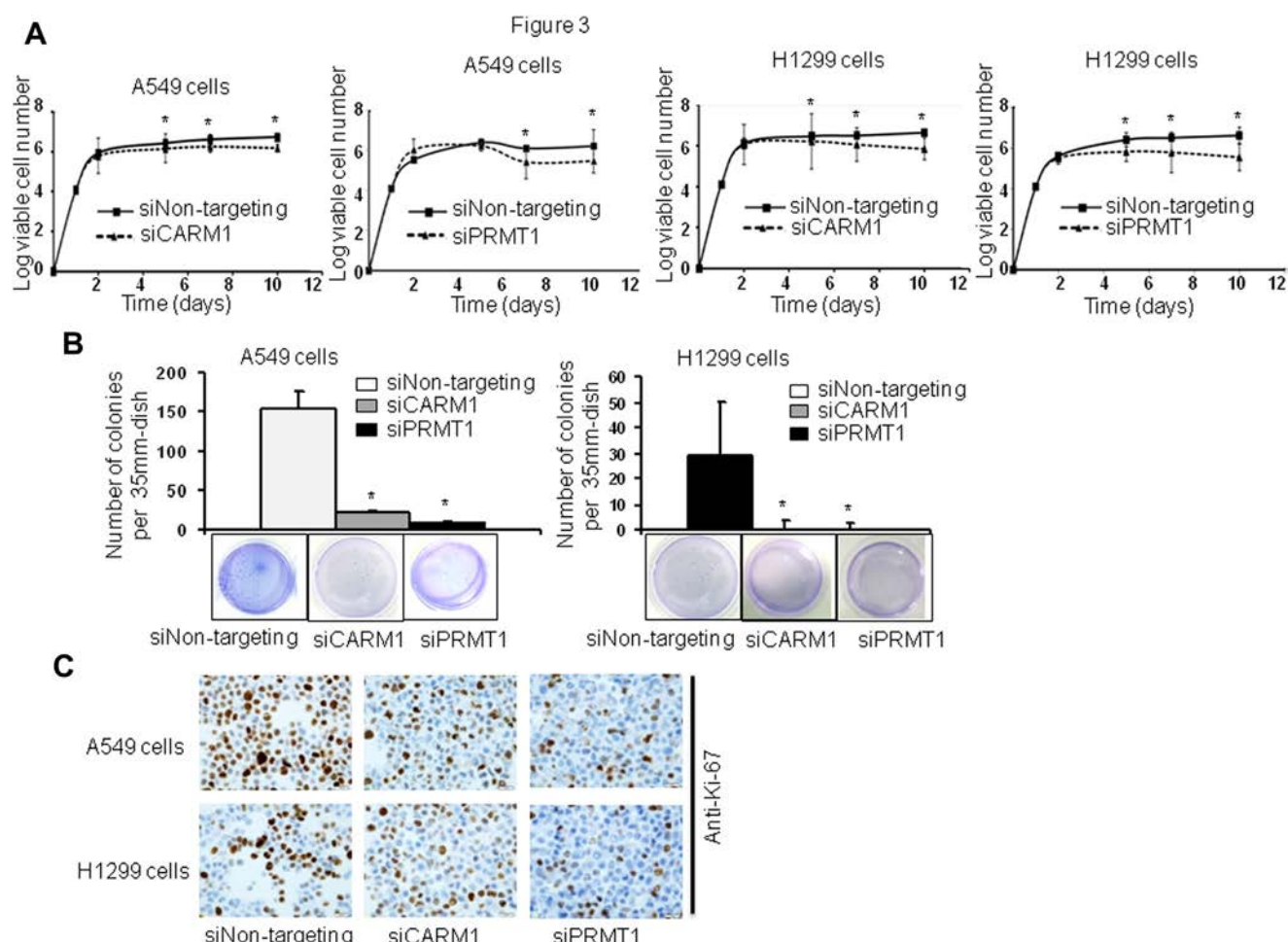


Fig. 3. Either CARM1 or PRMT1 depletion reduces proliferation in vitro and anchorage-independent growth. (A) siCARM1 or siPRMT1 reduces cell number in vitro. A549 and H1299 cells were transfected twice, 12 h after seeding and at day 5, with siNON-targeting (control), siCARM1 or siPRMT1. Cells were counted after staining with trypan blue. (B) siCARM1 or siPRMT1 inhibits colony formation in soft agar. 3 days post transfection, diluted cells were laid down on the agar underlayers. After 3 weeks colonies were fixed, stained with methylene blue and the plates were photographed. Results are expressed as mean and s.e.m. (C) siCARM1 or siPRMT1 reduces the number of A549 and H1299 cells stained positive by the brown nuclear proliferation marker Ki-67. Immunocytochemistry was carried out on formalin-fixed and paraffin-embedded cells using an antibody against Ki-67, 5 days post-transfection with siNon-targeting, siCARM1 or siPRMT1. Original magnification, X40. All results shown are representative of 3 different experiments. * significantly different from control.

these results show that siPRMT1 or siCARM1 reduces cell proliferation in A549 and H1299 cells.

3.8. Knockdown of either PRMT1 or CARM1 increases cytokeratins expression in A549 cells and reduces NMBR expression in A549 and H1299 cells

We examined the consequences of PRMT1 or CARM1 silencing on the expression of epithelial markers in the 2 NSCLC cell lines. Cytokeratins (CKs) 7 and 8 were selected because they are expressed in A549 cells [19]. The Neuromedin B receptor (NMBR) binds Neuromedin B, a mitogen and growth factor for gastrointestinal tissue and normal and neoplastic lung [20]. It was reported to be expressed in several NSCLC cell lines among which H1299 cells [21]. Preliminary Western Blot and immunocytochemistry experiments showed that CKs 7, 8 and NMBR are expressed in A549 cells whereas in H1299 cells, NMBR only is expressed (data not shown). Therefore the consequences of PRMT1 and CARM1 depletion were assessed by monitoring CKs 7, 8 and NMBR in A549 cells and NMBR only in H1299 cells. Western Blot analysis in A549 cells showed that siPRMT1 or siCARM1 increased CK7 expression in comparison with siNon-targeting ($p < 0.0001$), increased CK8

expression ($p < 0.005$) and decreased NMBR expression ($p < 0.0001$). In H1299 cells, siPRMT1 or siCARM1 decreased NMBR expression in comparison with siNon-targeting ($p < 0.0005$ and $p < 0.005$ respectively) (Fig. 4A).

These results were confirmed by immunocytochemistry (Fig. 4B). A549 cells transfected with siPRMT1 and siCARM1 showed stronger expression for CK7 ($Q = 267$ and $Q = 234$ respectively) than cells transfected with siNon-targeting ($Q = 207$). Likewise, expression of CK8 was stronger in A549 cells transfected with siPRMT1 and siCARM1 ($Q = 163$ and $Q = 180$ respectively) than in cells transfected with siNon-targeting ($Q = 131$). A549 cells transfected with siPRMT1 and siCARM1 showed weaker expression of NMBR ($Q = 176$ and $Q = 205$ respectively) than cells transfected with siNon-targeting ($Q = 224$). H1299 cells transfected with siPRMT1 and siCARM1 showed weaker expression of NMBR ($Q = 103$ and $Q = 141$ respectively) than cells transfected with siNon-targeting ($Q = 160$).

4. Discussion

In the study presented here we show that CARM1 and PRMT1 are significantly overexpressed in tumor tissue from 60 patients

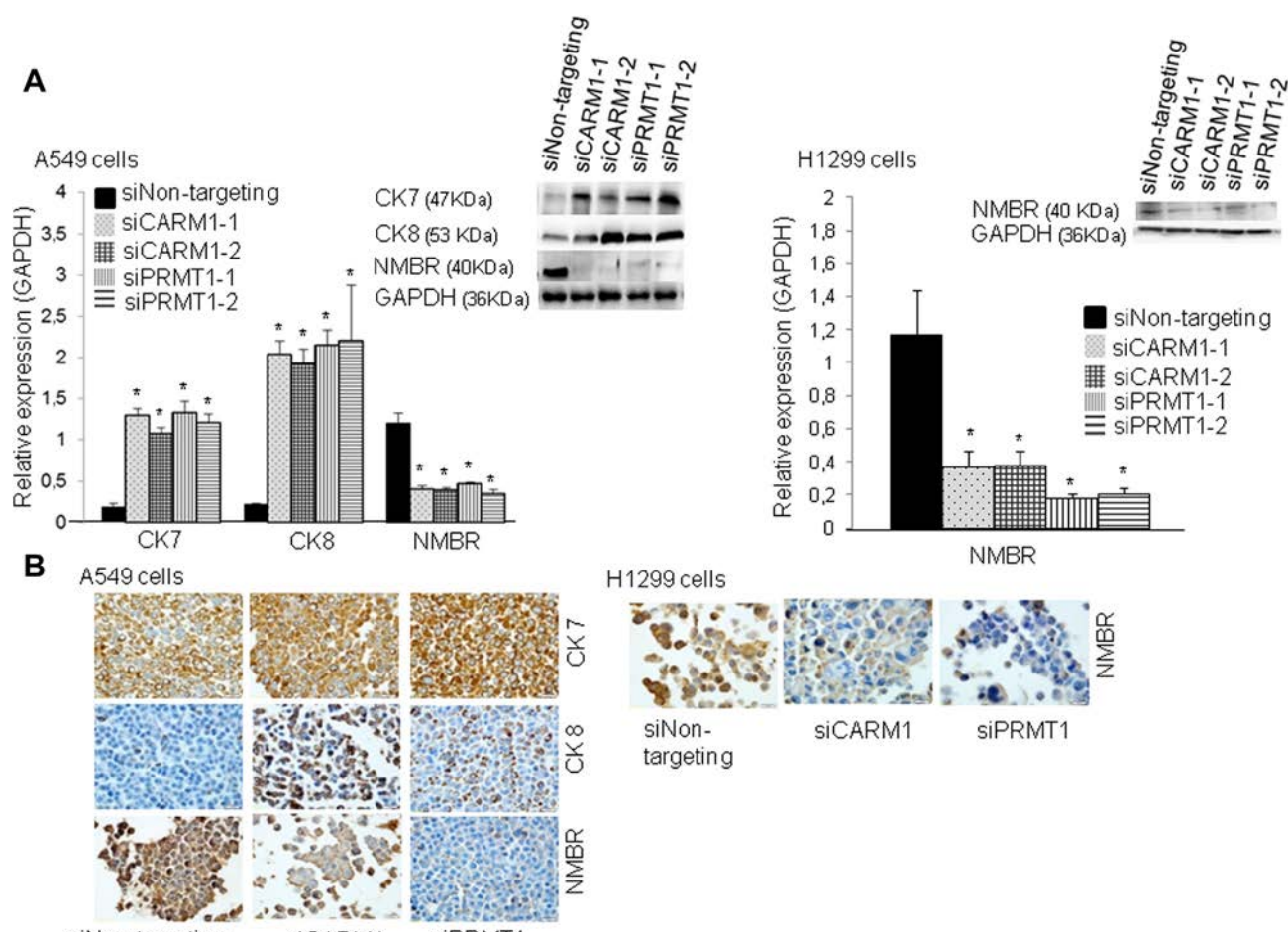


Fig. 4. Either CARM1 or PRMT1 single knock-down increases cytokeratins expression in A549 cells and reduces NMBR expression in A549 and H1299 cells. A549 and H1299 cells were transfected with siCARM1, siPRMT1 or siNontargeting (control) 12 h after plating and maintained in culture for 5 days. (A) Proteins were extracted, resolved and identified by Western Blot. Results are shown as the mean and sem. (B) Cells were fixed and immunocytochemistry carried out. The antibodies used are raised against cytokeratins 7, 8 and Neuromedin B Receptor. * significantly different from control.

with Non Small Cell Lung Cancer (NSCLC). CARM1 and PRMT1 expressions are correlated in healthy tissue but not in tumor tissue. However, there is a baseline effect: the higher CARM1 or PRMT1 are expressed in the surrounding healthy region the more they are elevated in the tumor region. Only CARM1 is associated with tumor differentiation and neither CARM1 nor PRMT1 correlate with survival. Together these data suggest that there is no hierarchy between CARM1 and PRMT1 in their involvement in proliferation.

Based on the previous observation that in mice bearing disruption of CARM1, pulmonary cell proliferation is increased and alveolar type 2 cell differentiation to alveolar type 1 is blocked [16], loss of CARM1 would be expected in lung cancer. However, our study does not confirm this prediction. It is likely that CARM1 initiates many events in the cell and these events are divergent according to the biological context and might be different during development and tumorigenesis in adult tissues. It is worth noting that the role of CARM1 in cancer is controversial and seems to be context dependent. CARM1 is specifically required for the estrogen-induced expression of the critical cell cycle transcriptional regulator E2F1 in the MCF-7 breast cancer cell line [13]. However, CARM1 was found to inhibit breast cancer progression in estrogen receptor-alpha positive tumors by activating p21^{cip1} and p27^{kip}, which are negative cell-cycle regulators, instead of E2F1 [14]. Likewise, PRMT1 activity is dysregulated in many cancers [22] and it has been suggested that PRMT1 has a critical role in cell growth

regulation [10,11] and genome integrity [11]. The knock-down of PRMT1, or its substrate Sam68, suppressed mixed lineage leukemia mediated transformation [23].

That neither CARM1 nor PRMT1 correlate with survival suggests that they cannot be considered as predictors of outcome. However, we found that CARM1 correlates with tumor differentiation with the limitation that the statistical significance did not reach a high level ($p = 0.028$). Investigation on a larger number of samples is needed in order to determine if CARM1 identifies a clinically relevant group or if CARM1 can potentially guide the administration of a combination of chemotherapy with drugs interfering with histone modifications.

We also report that PRMT1 and CARM1 are elevated in 2 NSCLC cell lines A549 and H1299. PRMT1 knockdown by siRNA was found to reduce cell number and inhibit colony formation in soft agar. siPRMT1 also increased cytokeratins 7 and 8 (epithelial markers) and decreased neuromedin B receptor (binds a mitogenic factor) expressions. These results are in agreement with the findings in tumor biopsies and indicate that PRMT1 acts to facilitate proliferation and inhibit differentiation. Similar results were obtained by invalidating CARM1, even though we have to emphasize one limitation. As this was previously reported [3], siCARM1 inhibited PRMT1 in addition to CARM1. Thus, the results obtained in conditions with siCARM1 reflect inhibition of both CARM1 and PRMT1. This phenomenon deserves to be further investigated because it

might predict the functional importance of CARM1/PRMT1 interaction. PRMTs are known to form homo or heterodimers [1,2] and it is of interest to determine if dimers formation is a way of regulating PRMT activities.

In the conditions with siPRMT1 or siCARM1, elevation of cytokeratins expression suggests that invasiveness of lung cancer cells is reduced. This is supported by a recent report showing that cytokeratins negatively regulate the invasive potential of lung cancer cell lines [19]. In this report, the invasive cell sublines derived by repeated selection from 2 lung adenocarcinomas cells, A549 and H1017, showed lower expression levels of cytokeratins compared with the parental cells. Reduction of Neuromedin B receptor (NMBR) also contributes to inhibit proliferation. The NMBR is part of the bombesin receptor family known to bind regulatory neuropeptides, such as gastrin-releasing peptide (GRP) and neuromedin B, that function as autocrine and/or paracrine growth factors in human lung carcinomas [24–28].

The mechanisms by which PRMTs can contribute to carcinogenesis include notably activation of Wnt/beta-catenin signaling and elevation of key pluripotency genes levels. In colon cancer, beta-catenin recruits CARM1 on the promoters of Wnt/beta catenin target genes [29]. PRMT1 is involved in different ways in Wnt/beta catenin pathway regulation. Wnt stimulation activates PRMT1 which stimulates G3BP1 (a dishevelled-associated protein) provoking accumulation of beta-catenin mRNA and activation of the canonical Wnt pathway [30]. In contrast, methylation by PRMT1 increases stability of axin, a negative regulator of Wnt signaling [31]. Arginine methylation seems to be a general mechanism required for pluripotency since CARM1, PRMT1 and PRMT5 act to maintain pluripotency in embryonic stem cells [4,6–9]. It is reasonable to believe that these PRMTs may serve the same function in adult stem cells. They might hijack self-renewal and pluripotency pathways in normal adult stem cells which then gain the ability to proliferate and initiate cancerogenesis.

In conclusion, CARM1 and PRMT1 were found to be overexpressed in 60 tumor specimens from NSCLC patients and in 2 NSCLC cell lines. Our study did not identify a hierarchical role of one protein over the other. Neither protein correlated with survival but analysis of a larger number of samples is required to determine if they provide prognostic information. siPRMT1 diminishes proliferation, and promotes differentiation. siCARM1 leads to similar results. However since the results with siCARM1 reflect inhibition of both CARM1 and PRMT1, it underscores the functional importance of CARM1/PRMT1 interaction. Further investigation is needed in order to assess a therapeutic strategy that either specifically target CARM1 or PRMT1 in lung cancer, or as an alternative develops agents that regulate arginine methylation.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Financial support

Financial support was provided by INSERM UMR954.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at <http://dx.doi.org/10.1016/j.biochi.2013.10.021>.

References

- [1] M.T. Bedford, S.G. Clarke, Protein arginine methylation in mammals: who, what, and why, *Mol. Cell* 33 (2009) 1–13.
- [2] X. Cheng, R.E. Collins, X. Zhang, Structural and sequence motifs of protein (histone) methylation enzymes, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 34 (2005) 267–294.
- [3] M.A. Kleinschmidt, G. Streubel, B. Samans, M. Krause, U.M. Bauer, The protein arginine methyltransferases CARM1 and PRMT1 cooperate in gene regulation, *Nucleic Acids Res.* 36 (2008) 3202–3213.
- [4] J. Kim, J. Chu, X. Shen, J. Wang, S.H. Orkin, An extended transcriptional network for pluripotency of embryonic stem cells, *Cell* 132 (2008) 1049–1061.
- [5] H. Matsuda, Y.B. Shi, An essential and evolutionarily conserved role of protein arginine methyltransferase 1 for adult intestinal stem cells during post-embryonic development, *Stem Cells* 28 (2010) 2073–2083.
- [6] W.W. Tee, M. Pardo, T.W. Theunissen, L. Yu, J.S. Choudhary, P. Hajkova, M.A. Surani, Prmt5 is essential for early mouse development and acts in the cytoplasm to maintain ES cell pluripotency, *Genes Dev.* 24 (2010) 2772–2777.
- [7] M.E. Torres-Padilla, D.E. Parfitt, T. Kouzarides, M. Zernicka-Goetz, Histone arginine methylation regulates pluripotency in the early mouse embryo, *Nature* 445 (2007) 214–218.
- [8] J. Wang, S. Rao, J. Chu, X. Shen, D.N. Levasseur, T.W. Theunissen, S.H. Orkin, A protein interaction network for pluripotency of embryonic stem cells, *Nature* 444 (2006) 364–368.
- [9] Q. Wu, A.W. Bruce, A. Jedrusik, P.D. Ellis, R.M. Andrews, C.F. Langford, D.M. Glover, M. Zernicka-Goetz, CARM1 is required in embryonic stem cells to maintain pluripotency and resist differentiation, *Stem Cells* 27 (2009) 2637–2645.
- [10] M. Yoshimatsu, G. Toyokawa, S. Hayami, M. Unoki, T. Tsunoda, H.I. Field, J.D. Kelly, D.E. Neal, Y. Maehara, B.A. Ponder, Y. Nakamura, R. Hamamoto, Dysregulation of PRMT1 and PRMT6, Type I arginine methyltransferases, is involved in various types of human cancers, *Int. J. Cancer* 128 (2011) 562–573.
- [11] Z. Yu, T. Chen, J. Hebert, E. Li, S. Richard, A mouse PRMT1 null allele defines an essential role for arginine methylation in genome maintenance and cell proliferation, *Mol. Cell. Biol.* 29 (2009) 2982–2996.
- [12] S. El Messaoudi, E. Fabbriozzi, C. Rodriguez, P. Chuchana, L. Fauquier, D. Cheng, C. Theillet, L. Vandel, M.T. Bedford, C. Sardet, Coactivator-associated arginine methyltransferase 1 (CARM1) is a positive regulator of the Cyclin E1 gene, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 103 (2006) 13351–13356.
- [13] S. Frieztze, M. Lupien, P.A. Silver, M. Brown, CARM1 regulates estrogen-stimulated breast cancer growth through up-regulation of E2F1, *Cancer Res.* 68 (2008) 301–306.
- [14] M. Al-Dhaheri, J. Wu, G.P. Skliris, J. Li, K. Higashimoto, Y. Wang, K.P. White, P. Lambert, Y. Zhu, L. Murphy, W. Xu, CARM1 is an important determinant of ERalpha-dependent breast cancer cell differentiation and proliferation in breast cancer cells, *Cancer Res.* 71 (2011) 2118–2128.
- [15] Y.R. Kim, B.K. Lee, R.Y. Park, N.T. Nguyen, J.A. Bae, D.D. Kwon, C. Jung, Differential CARM1 expression in prostate and colorectal cancers, *BMC Cancer* 10 (2010) 197.
- [16] K.B. O'Brien, M. Alberich-Jorda, N. Yadav, O. Kocher, A. Diruscio, A. Ebralidze, E. Levantini, N.J. Sng, M. Bhasin, T. Caron, D. Kim, U. Steidl, G. Huang, B. Halmos, S.J. Rodig, M.T. Bedford, D.G. Tenen, S. Kobayashi, CARM1 is required for proper control of proliferation and differentiation of pulmonary epithelial cells, *Development* 137 (2010) 2147–2156.
- [17] M. Li, Q. Zhang, P. Fu, P. Li, A. Peng, G. Zhang, X. Song, M. Tan, X. Li, Y. Liu, Y. Wu, S. Fan, C. Wang, Pemetrexed plus platinum as the first-line treatment option for advanced non-small cell lung cancer: a meta-analysis of randomized controlled trials, *PLoS One* 7 (2012) e37229.
- [18] W.J. Conover, *Practical Nonparametric Statistics*, viii, John Wiley, New York; Chichester, 1999, p. 584.
- [19] N. Kanaji, S. Bando, T. Ishii, J. Fujita, T. Ishida, T. Matsunaga, A. Kubo, Cytokeratins negatively regulate the invasive potential of lung cancer cell lines, *Oncol. Rep.* 26 (2011) 763–768.
- [20] N. Gonzalez, T.W. Moody, H. Igarashi, T. Ito, R.T. Jensen, Bombesin-related peptides and their receptors: recent advances in their role in physiology and disease states, *Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes Obes.* 15 (2008) 58–64.
- [21] M.H. Corjay, D.J. Dobrzanski, J.M. Way, J. Viallet, H. Shapira, P. Worland, E.A. Sausville, J.F. Battey, Two distinct bombesin receptor subtypes are expressed and functional in human lung carcinoma cells, *J. Biol. Chem.* 266 (1991) 18771–18779.
- [22] M.T. Bedford, S. Richard, Arginine methylation an emerging regulator of protein function, *Mol. Cell* 18 (2005) 263–272.
- [23] N. Cheung, L.C. Chan, A. Thompson, M.L. Cleary, C.W. So, Protein arginine-methyltransferase-dependent oncogenesis, *Nat. Cell Biol.* 9 (2007) 1208–1215.
- [24] R.T. Jensen, J.F. Battey, E.R. Spindel, R.V. Benya, International Union of Pharmacology. LXVIII. Mammalian bombesin receptors: nomenclature, distribution, pharmacology, signaling, and functions in normal and disease states, *Pharmacol. Rev.* 60 (2008) 1–42.
- [25] V.P. Makarenkova, G.V. Shurin, I.L. Tourkova, L. Balkir, G. Pirtskhalaishvili, L. Perez, V. Gerein, J.M. Siegfried, M.R. Shurin, Lung cancer-derived bombesin-like peptides down-regulate the generation and function of human dendritic cells, *J. Neuroimmunol.* 145 (2003) 55–67.
- [26] T.W. Moody, M.J. Berna, S. Mantey, V. Sancho, L. Ridnour, D.A. Wink, D. Chan, G. Giaccone, R.T. Jensen, Neuromedin B receptors regulate EGF receptor tyrosine phosphorylation in lung cancer cells, *Eur. J. Pharmacol.* 637 (2010) 38–45.

- 1 [27] T.W. Moody, J. Staley, F. Zia, D.H. Coy, R.T. Jensen, Neuromedin B binds with
2 high affinity, elevates cytosolic calcium and stimulates the growth of small-
3 cell lung cancer cell lines, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 263 (1992) 311–317.
- 4 [28] J.M. Siegfried, N. Krishnamachary, A. Gaither Davis, C. Gubish, J.D. Hunt,
5 S.P. Shriver, Evidence for autocrine actions of neuromedin B and gastrin-
6 releasing peptide in non-small cell lung cancer, *Pulm. Pharmacol. Ther.* 12
7 (1999) 291–302.
- 8 [29] C.Y. Ou, M.J. LaBonte, P.C. Manegold, A.Y. So, I. Ianculescu, D.S. Gerke,
K.R. Yamamoto, R.D. Ladner, M. Kahn, J.H. Kim, M.R. Stallcup, A coactivator
role of CARM1 in the dysregulation of beta-catenin activity in colorectal
cancer cell growth and gene expression, *Mol. Cancer Res.* 9 (2011) 660–
670.
- [30] R.K. Bikkavilli, C.C. Malbon, Arginine methylation of G3BP1 in response to
Wnt3a regulates beta-catenin mRNA, *J. Cell Sci.* 124 (2011) 2310–2320.
- [31] B. Cha, W. Kim, Y.K. Kim, B.N. Hwang, S.Y. Park, J.W. Yoon, W.S. Park, J.W. Cho,
M.T. Bedford, E.H. Jho, Methylation by protein arginine methyltransferase 1
increases stability of Axin, a negative regulator of Wnt signaling, *Oncogene* 30
(2011) 2379–2389.

UNCORRECTED PROOF