



HAL
open science

Rôle de la lysine déméthylase KDM6B et de l'histone méthyltransférase EZH2 au cours de la transition Epithélio-Mésenchymateuse (TEM)

Camille Lachat

► **To cite this version:**

Camille Lachat. Rôle de la lysine déméthylase KDM6B et de l'histone méthyltransférase EZH2 au cours de la transition Epithélio-Mésenchymateuse (TEM). Biologie cellulaire. Université Bourgogne Franche-Comté, 2020. Français. NNT : 2020UBFCE010 . tel-03327365

HAL Id: tel-03327365

<https://theses.hal.science/tel-03327365v1>

Submitted on 27 Aug 2021

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

**THESE DE DOCTORAT DE L'ETABLISSEMENT UNIVERSITE BOURGOGNE FRANCHE-COMTE
PREPAREE A L'UMR INSERM 1098 RIGHT**

Ecole doctorale n°554

Ecole doctorale Environnements-Santé

Doctorat de Biologie Cellulaire

Par

M. Lachat Camille

**Rôle de la lysine déméthylase KDM6B et de l'histone méthyltransférase EZH2
au cours de la transition Epithélio-Mésenchymateuse (TEM)**

Thèse présentée et soutenue à Besançon, le 7 Décembre 2020

Composition du Jury :

Dr. Baugé Catherine	MCU, Université de Caen	Rapporteur
Dr. Gilles Christine	Maître de recherche, Université de Liège	Rapporteur
Dr. David Marie-Hélène	CRCN, UMR CanTher INSERM S1277	Examinatrice
Dr. Sérandour Aurélien	MCU, Ecole centrale Nantes	Examinateur
Pr. Godet Yann	PU, Université de Franche-Comté	Examinateur – Président du jury
Pr. Chatton Bruno	PU, Université de Strasbourg	Examinateur
Pr. Feugeas Jean-Paul	PU-PH, Université de Franche-Comté	Examinateur
Dr. Hervouet Eric	MCU, Université de Franche-Comté	Directeur de thèse
Dr. Peixoto Paul	MCU, Université de Franche-Comté	Invité - Co-Directeur de thèse

Remerciements

Même si mon nom figure en très bonne place sur la page de garde de ce manuscrit, j'aimerais profiter de cet espace un peu plus libre que le reste de ma thèse pour remercier ceux dont le nom y figure en plus petit, et ceux dont le nom n'y figure pas mais sans qui ce manuscrit ne serait pas ce qu'il est aujourd'hui.

Je souhaite d'abord remercier le Dr. Catherine Baugé et le Dr. Christine Gilles d'avoir pris de votre temps pour juger ces travaux de thèse.

Je souhaite remercier le Dr. Marie-Hélène David pour avoir accepté de participer à mon jury ainsi qu'à mon comité de suivi de thèse (pour lequel je remercie de la même manière son deuxième membre, le Dr. Denis Mottet) qui m'aura permis d'éclaircir de nombreux horizons et le Dr. Aurélien Sérandour pour avoir également accepté de faire partie de mon jury. Je remercie d'autant plus le Pr. Yann Godet, le Pr. Bruno Chatton et le Pr. Jean-Paul Feugeas d'avoir accepté d'y participer en dernière minute !

Un immense merci à mes directeurs de thèse, Éric et Paul, pour m'avoir donné ma chance dès le Master 2 puis en me proposant cette thèse. J'ai eu la chance d'avoir des directeurs très présents au quotidien, toujours prêts à donner un coup de main (et même plus !) pour les manips et je pense que je ne mesure pas pleinement cette chance car je l'ai toujours connu ! Cela aura été compliqué jusque dans les derniers moments de la rédaction mais je vous suis infiniment reconnaissant de m'avoir épaulé durant ces trois années faites de hauts et de bas.

Ensuite je pense que j'ai été très chanceux de tomber dans un laboratoire comme celui-là ! Une ambiance toujours super, des grands moments de convivialité et chacun qui tire les autres vers le haut. Cette thèse fut difficile mais elle l'aurait été encore plus dans un autre laboratoire. Merci donc à tous mes professeurs de licence et master aujourd'hui devenus collègues : Michaël, Régis, Pascale, Annick, Gilles, Karine, Jean, Saïd, Audrey ; et à tous ceux qui n'ont pas été mes professeurs mais qui sont quand même de super collègues ! Aurélie, Marie-Odile, Martine, Anne et Anne.

La cerise sur le labo, ce sont bien sûr les collègues de bureau, ceux « de l'autre côté », au frais l'été et au chaud l'hiver près des congélateurs ! D'abord Valérie, qui est là pour nous faciliter la vie au quotidien et ça c'est vraiment indispensable, et surtout toujours de bonne humeur. Merci Dom pour les discussions... endiablées dès 7h le matin et pour le nombre incalculable de boîte de cônes que tu as dû remplir. Et bien sûr je veux remercier infiniment les meilleures d'entre nous, mes collègues de bureaux qui m'ont accompagné pendant toute la durée de cette thèse : Marine et Leïla. Les meilleurs moments passés au labo, ils l'ont été avec vous, et les pires, peut-être aussi ! Je pense qu'on a fait une belle équipe pendant 3 ans, à discuter un peu de manips et beaucoup de conneries, vous avez toujours été d'un grand secours pour accueillir le petit nouveau perdu que j'étais en arrivant. J'espère qu'on

gardera le contact pendant très longtemps. Un grand merci également aux plus jeunes doctorants arrivés par la suite, Elodie, Céline et Timothée, c'est un grand plaisir de partager ce bureau avec vous, prenez bien soin de lui quand on sera tous partis, je sais que vous en êtes capable, il n'a pas fini d'entendre des éclats de rires ! Je vous fais totalement confiance pour perpétuer la bonne humeur dans les labos avec DJ Timothée. Merci aussi aux stagiaires du laboratoire qui auront également contribué à cette thèse, Jules, Alexia et Bérénice.

Je tiens aussi à remercier les collègues doctorants hors labo, Audrey, Daniel, Phillipe, Charles, Cécile et les autres, merci pour les quelques moments de boulot, les formations, le FJC, et surtout les nombreux moments de détente ! Sans vous cette thèse aurait peut-être avancé plus vite par moment, mais elle ne serait peut-être jamais terminée... Qui veut aller loin, ménage sa monture !

Merci à tous les copains, du collège, du lycée, de Besac, de France et de Navarre, je ne peux pas tous vous citer alors je n'en citerai aucun mais vous êtes tous importants pour moi, et il me tarde d'avoir un peu plus de temps désormais pour tous vous voir un peu plus, autour d'une bonne bouffe, d'un bon match de foot, d'un tour de vélo, bref, d'une bonne tranche de vie !

Un grand merci enfin à ma famille, mes parents qui m'ont tout donné et que j'aime plus que tout même si je pense ne leur avoir jamais dit, mes grands-parents toujours là pour moi, ma belle-famille qui me soutient (presque) au quotidien. Mon frère et ma sœur, je vous aime, je suis vraiment content qu'on se voie si souvent et qu'on aime passer du temps ensemble, j'espère que ce n'est pas près de s'arrêter. Et comme ça commence à être difficile d'écrire, j'ai gardé les meilleures pour la fin :

Celle sans qui rien ne serait possible aujourd'hui et tout serait un peu plus fade. Ludivine, je t'aime, cette thèse est pour toi si je l'obtiens, c'est grâce à toi autant qu'à moi. Merci Olena d'avoir bousculé toutes mes habitudes et de me faire fondre de bonheur tous les matins au réveil. Je t'aime.

Table des matières

Remerciements	4
Table des matières	8
Table des Figures	12
Table des Tableaux	13
Liste des abréviations	14
Préambule	20
Etat de l'art	28
Chapitre I : Aspects physiologiques et pathologiques de la TEM, et ses conséquences dans les cancers	30
I- Contexte et mécanismes généraux de la TEM	30
1- Historique de la TEM	30
2- Transition entre un phénotype épithélial et un phénotype mésenchymateux	32
II- Les mécanismes moléculaires de la TEM	40
1- Induction de la TEM par le TGF- β	40
2- Autres modes d'induction de la TEM	51
III- TEM et pathologies	54
1- La fibrose	54
2- Les cancers	55
Chapitre II : La régulation Epigénétique de la TEM	62
I- Généralités sur les régulations épigénétiques	62
1- Contexte et premières études épigénétiques	62
2- Compaction de la chromatine et expression des gènes	63
3- Les différents mécanismes de régulation épigénétique	65
II- Epigénétique et plasticité cellulaire	75
1- La plasticité cellulaire	75
2- Réorganisation épigénétique au cours des changements de phénotypes	76
III- TEM et plasticité épigénétique	77
1- Méthylation de l'ADN pendant la TEM	77
2- Régulation de la TEM par les ARN non-codants	78
3- Modifications post-traductionnelles des histones au cours de la TEM	78
Chapitre III : EZH2 et KDM6B sont des régulateurs majeurs de la TEM	82
I- Contexte et rôles physiologiques de la méthylation de H3K27	82
1- H3K27me3	82
2- Méthylation de H3K27 : le complexe PRC2	83
3- Déméthylation de H3K27	88
4- Acétylation et méthylation de H3K27	88

II-	EZH2, TEM et agressivité des cancers	89
1-	Expression d'EZH2 dans les tissus sains et tumeurs.....	89
2-	Modulation de la TEM par EZH2	91
3-	Modulation de la TEM par EZH2 indépendante de son activité catalytique.....	95
4-	Nouvelles stratégies de thérapies anti-cancéreuses ciblant EZH2.....	95
III-	KDM6B, TEM et agressivité des cancers	97
1-	Différences d'expression de KDM6B entre tissus sains et tissus cancéreux.....	97
2-	KDM6B module la TEM en ciblant des gènes spécifiques.....	98
3-	Nouvelles perspectives de stratégies anti-cancéreuses ciblant KDM6B.....	102
	Objectifs.....	104
	Travaux de recherche.....	106
	Matériel et méthodes	108
1-	RT-qPCR.....	109
2-	Culture cellulaire, transfections et inhibiteurs chimiques	109
3-	Tests de migration et d'invasion cellulaire.....	110
4-	ChIP/ChIP-seq.....	110
5-	Western Blotting	111
6-	Microscopie Confocale.....	112
7-	Immunohistochimie	113
8-	Statistiques.....	113
	Résultats.....	114
1-	Niveau d'expression de KDM6B et EZH2 dans des cancers du poumon.....	116
2-	Modulation du niveau d'expression d'EZH2 ou de KDM6B au cours de la TEM.....	119
3-	Inhibition de l'activité catalytique d'EZH2 et KDM6B au cours de la TEM.....	127
4-	Gènes cibles d'EZH2 et KDM6B au cours de la TEM.....	133
	Discussion et perspectives	146
1-	Modèles d'étude de la TEM	148
2-	Corrélation entre les expressions d'EZH2 et de KDM6B	148
3-	Surexpression d'EZH2 et KDM6B.....	149
4-	L'inhibition d'EZH2 ou de KDM6B a les mêmes effets sur la TEM que leur surexpression	151
5-	Identification de gènes cibles d'EZH2 et KDM6B au cours de la TEM dans les cellules A549	156
6-	Effets de la modulation de l'expression d' <i>INHBB</i> , <i>WNT5B</i> ou <i>ADAMTS6</i> sur la TEM dans les cellules A549	157
7-	Implications d' <i>INHBB</i> , <i>WNT5B</i> et <i>ADAMTS6</i> au cours de la TEM.....	158
8-	Effet de la modulation d'EZH2 et KDM6B sur l'expression des nouveaux gènes cibles.....	162
	Annexes.....	164
	Annexe 1 : Publication 1 publiée dans <i>cell death and disease</i>	166
	Annexe 2 : Publication 2, revue publiée dans <i>Epigenomes</i>	184
	Annexe 3 : Liste des communications orales.....	206
	Annexe 4 : Liste des communications affichées	229
	Références Bibliographiques.....	233

Table des Figures

Figure 1 : Evolution de l'incidence, de la mortalité et de la survie après pronostic des cancers en France	23
Figure 2 : Evolution du nombre d'occurrences pour la recherche « Epithelial-Mesenchymal Transition » dans la base de données PubMed	32
Figure 3 : Organisation schématique d'une cellule épithéliale	33
Figure 4 : Organisation schématique d'une cellule mésenchymateuse	38
Figure 5 : Représentation schématique de la plasticité cellulaire au cours de la TEM	40
Figure 6 : Schéma de l'activation de la voie SMAD par le TGF- β	42
Figure 7 : Activation des voies MAPK, RHO-GTPase et PI3K/AKT par le TGF- β	45
Figure 8 : Signalisation cellulaire de la TEM	54
Figure 9 : Différentes structures de la chromatine	64
Figure 10 : Mécanismes de méthylation de l'ADN	68
Figure 11 : Méthylation des arginines et des lysines des histones	70
Figure 12 : Acétylation des histones	72
Figure 13 : Modifications post-traductionnelles des histones	74
Figure 14 : Structure du complexe PRC2	85
Figure 15 : Corrélation entre les niveaux d'expression d'EZH2 et KDM6B et la TEM dans les NSCLC	117
Figure 16 : Données KM-Plotter d'EZH2 et KDM6B dans les cancers du poumon	118
Figure 17 : Surexpression transitoire d'EZH2 et KDM6B	120
Figure 18 : Surexpression stable d'EZH2 et KDM6B dans les cellules A549 et étude moléculaire	122
Figure 19 : Surexpression stable d'EZH2 et KDM6B dans les cellules A549 et étude fonctionnelle	123
Figure 20 : Extinction d'EZH2 et KDM6B dans les cellules A549 par CRISPR/Cas9	124
Figure 21 : Extinction d'EZH2 et KDM6B par siRNA dans les cellules A549 et étude moléculaire de la TEM	126
Figure 22 : Extinction d'EZH2 et KDM6B par siRNA dans les cellules A549 et étude fonctionnelle de la TEM	127
Figure 23 : Inhibition d'EZH2 et KDM6B au cours de la TEM	129
Figure 24 : Inhibition d'EZH1/2 et étude du phénotype morphologique et moléculaire des cellules A549	130
Figure 25 : Inhibition chimique d'EZH2 et KDM6B dans les cellules A549 et étude fonctionnelle	131
Figure 26 : Surexpression et inhibition chimique d'EZH2 et KDM6B dans les cellules MDA-MB-468	132
Figure 27 : Identification des gènes cibles d'EZH2 et KDM6B au cours de la TEM dans les cellules A549	135
Figure 28 : INHBB, WNT5B et ADAMTS6 sont régulées par EZH2 et KDM6B via H3K27me3 au cours de la TEM	138
Figure 29 : Acétylation et méthylation de H3K27 au cours de la TEM	139
Figure 30 : Expression de WNT5B, ADAMTS6 et INHBB dans une cohorte de NSCLC en TEM ou non	140
Figure 31 : Etude du phénotype mésenchymateux lors de l'extinction d'INHBB, WNT5B ou ADAMTS6 au cours de la TEM	142
Figure 32 : Régulation d'INHBB, WNT5B et ADAMTS6 au cours de la TEM par H3K27me3	143
Figure 33 : Régulation de l'expression d'INHBB, WNT5B et ADAMTS6 lors de l'extinction d'EZH2 ou KDM6B par siRNA	144

Figure 34 : H3K27me3 sur les promoteurs d'INHBB, WNT5B et ADAMTS6 au cours de l'induction de la TEM dans les cellules A549	145
Figure 35 : Schéma descriptif de l'étude de la dissémination tumorale des cellules A549 in vivo	151
Figure 36 : Structure chimique de l'inhibiteur d'EZH2 (GSK343) et de l'inhibiteur de KDM6B (GSKJ4/GSKJ1)	154
Figure 37 : Schéma simplifié de l'implication de KDM6B et EZH2 dans l'augmentation des capacités d'invasion des cellules A549 au cours de la TEM	158
Figure 38 : Schéma des gènes codant pour les différentes sous-unités des ACTIVINES et INHIBINES	159
Figure 39 : Schéma très simplifié de la voie WNT non canonique induite par WNT5B	160

Table des Tableaux

Tableau 1 : taux de survie à 5 ans post-diagnostic de certains cancers en fonction du grade	24
Tableau 2 : Les gènes induisant la Transformation Epithélio-Mésenchymateuse ou la Transformation Mesenchymo-Epithéliale	31
Tableau 3 : Résumé des essais cliniques en cours basés sur la combinaison d'une thérapie anti-TEM et d'une thérapie ciblant les inhibiteurs de checkpoint immunitaires	61
Tableau 4 : Expression d'EZH2 dans différents types de cancers et corrélation avec les paramètres cliniques	90
Tableau 5 : gènes cibles d'EZH2 dans différentes lignées cellulaires cancéreuses	93
Tableau 6 : Résumé des essais cliniques ciblant EZH2 dans les cancers	96
Tableau 7 : Expression de KDM6B dans différents types cancéreux	98
Tableau 8 : Les gènes cibles de KDM6B dans différentes lignées cancéreuses	101
Tableau 9 : amorces utilisées pour la RT-qPCR et la ChIP	109
Tableau 10 : Liste des anticorps utilisés	112
Tableau 11 : Liste des 40 gènes les plus sous-exprimés au cours de la TEM au niveau desquels EZH2 et H3K27me3 sont retrouvés en ChIP-seq	136
Tableau 12 : Liste des 40 gènes les plus surexprimés au cours de la TEM au niveau desquels on retrouve KDM6B seul en ChIP seq	137
Tableau 13 : Récapitulatif des effets de la modification de l'activité d'EZH2 ou KDM6B sur la TEM dans les cellules A549	155

Liste des abréviations

3PK : *MAPK-activated Protein Kinase 3*

A

ABC : *Adenosine triphosphate Binding Cassette*

ADAM19 : *A Disintegrin And Metalloproteinase 19*

ADAMTS6 : *A Disintegrin And Metalloproteinase with Thrombospondin motifs 6*

ADN : *Acide DéoxyriboNucléique*

ADP : *Adenosine DiPhosphate*

AEBP2 : *Adipocyte Enhancer Binding Protein 2*

AETIC : *Autophagie, Epigénétique et Immunité antiCancéreuse liée aux cellules T*

AKT : *Protéine kinase B*

ALDH1 : *ALdehyde DeHydrogenase 1*

AMD1 : *AdenosylMethionine Decarboxylase 1*

AMPc : *Adénosyl MonoPhosphate cyclique*

APC : *Adenomatous Polypsis Coli*

ARN : *Acide RiboNucléique*

ARNm : *ARN messenger*

B

bHLH : *basic Helix-Loop-Helix*

BMP : *Bone Morphogenetic Protein*

BVES : *Blood Vessel Epicardial Substance*

C

C-SMAD : *Common SMAD*

Ca²⁺ : *ion Calcium 2+*

CBP : *CREB Binding Protein*

CCFSE : *CarboxydiChloroFluorescein diacetate Succinimidyl Ester*

CD24 : *Cluster of differentiation 24*

CD44 : *Cluster of Differentiation 44*

CDC42 : *Cell Division Control protein 42 homolog*

CDH1 : *Cadherin 1*

CDK : *Cyclin Dependant Kinase*

CDKN1B : *Cyclin Dependant Kinase iNhibitor 1B*

CDKN2A : *Cyclin Dependant Kinase iNhibitor 2A*

CEBPA : *CCAAT Enhancer Binding Protein Alpha*

ceRNA : *Competing Endogenous RNA*

ChIP : *Chromatin ImmunoPrecipitation*

CREB : *cAMP Response Element Binding Protein*

CSC : *Cellules Souches Cancéreuses*

CTBP : *C-Terminal Binding Protein*

CTC : *Cellule Tumorale Circulante*

D

DLG-1 : *Discs LarGe 1*

DNA : *Desoxyribonucleic acid*

DNMT1 : *DNA MethylTransferase 1*

DNMT3 : *DNA MethylTransferase 3*

DOT1L : *Disruptor Of Telomeric 1-Like*

DUB : *DeUBiquinating enzymes*

E

EED : *Embryonic Ectoderm Development*

EGF : *Epidermal Growth Factor*

EGR1 : *Early Growth Response 1*

ELK1 : *ETS LiKe gene 1*

ELO B/C : *Elongin B/C*

EPCAM : *Epithelial Cell Adhesion Molecule*

EPOP : *Elonging BC and POlycomb repressive complex 2 associated Protein*

ESRP : *Epithelial Splicing Regulator Protein*

ETS1 : *Avin Erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 1*

EZH1 : *Enhancer of Zeste Homolog 1*

EZH2 : *Enhancer of Zeste Homolog 2*

EZH2i : *inhibiteurs d'EZH2*

F

FAK : *Focal Adhesion Kinase*

FGF : *Fibroblast Growth Factor*

FGFR : *Fibroblast Growth Factor Receptor*

FOS : *FBJ murine OsteoSarcoma viral oncogene homolog*

FSH : *Follicle Stimulating Hormone*

G

GAG : *GlycosAminoGlycanes*

GLI1 : *GLIoma associated oncogene 1*

7GRB2 : *Growth factor Receptor-Bounded protein 2*

GSK3 β : *Glycogen Synthase Kinase 3 β*

GTPase : Guanosine TriPhosphate hydrolase

GUK : Guanylate kinase

H

H2A : Histone 2A

H2B : Histone 2B

H3 : Histone H3

H4 : Histone H4

H3K4 : Lysine 4 de l'histone H3

H3K9 : Lysine 9 de l'histone H3

H3K27 : Lysine 27 de l'histone H3

H3K27me3 : Triméthylation de la lysine 27 de l'histone H3

H3K36 : Lysine 36 de l'histone H3

H3K79 : Lysine 79 de l'histone H3

H4K20 : Lysine 20 de l'histone H4

HDAC : Histone DéACétylase

HDM : Histone DéMéthylase

HIF1 α : *Hypoxia Inducible Factor 1 α*

HMT : Histone MéthylTransférase

HOTAIR : *Hox transcript antisense RNA*

I

IHC : ImmunoHistoChimie

I-SMAD : *Inhibitory SMAD*

ID : *Inhibitor of differentiation*

IFNG : Interféron γ

Ig : Immunoglobuline

IGF1 : *Insulin like Growth Factor 1*

IL : InterLeukine

IP₃ : Inositol triphosphate

IPSC : *Induced Pluripotent Stem Cell*

J

JAM : *Junction Adhesion Molecule*

JARID2 : *Jumonji and AT-Rich Interaction Domain containing 2*

JMJD3 : *JuMoNji Domain Containing 3*

JNK : *JUN N-terminal Kinase*

JUB1 : *Transcription factor JUnBrunnen 1*

K

KDM : Lysine DéMéthylase

KDM5A : Lysine DéMéthylase 5A

KDM5B : Lysine DéMéthylase 5B

KDM6A : Lysine DéMéthylase 6A

KDM6B : Lysine DéMéthylase 6B

KDM7A : Lysine DéMéthylase 7A

KMT : Lysine MéthylTransférase

KRAS : *Kirsten Rat Sarcoma viral oncogene homolog*

L

LATS2 : *Large Tumour Suppressor 2*

LCOR : *Ligand dependent nuclear receptor CO-Repressor*

LEF1 : *Lymphoid Enhancer Binding Factor 1*

LIM : *LIM domain kinase 1*

lncRNA : *Long non-coding RNA*

lncRNA-ROR : *long non coding RNA Regulator Of Reprogramming*

LOXL2 : *Lysine Oxydase-Like 2*

LOXL3 : *Lysine Oxydase-Like 3*

LTC : Lymphocytes T Cytotoxique

LT_{reg} : Lymphocytes T Régulateur

M

MAL : *Myelin And Lymphocyte*

MALAT1 : *Metastasis Associated Lung Adenocarcinoma Transcript 1*

MAPK : *Mitogen-Activated Protein Kinase*

MAPKK2 : *Mitogen Activated Protein Kinase Kinase 2*

MARVEL : *MAL and related proteins for vesicle trafficking and membrane link*

MBD : *Methyl CpG Binding Domain protein*

MDCK : *Madin-Darby Canin Kidney cells*

MDM2 : *Murine Double Minute 2*

MEC : Matrice Extra-Cellulaire

MEK : MAPK/ERK Kinase

miR : *micro RNA*

MMP : *Matrix MetalloProtease*

MMP2 : *Matrix Metalloprotease 2*

MMP9 : *Matrix Metalloprotease 9*

MTF2 : *Metal response element binding Transcription Factor 2*

MTOR : *Mechanistic Target Of Rapamycin*

MYOD : *MYOgenic Differentiation*

N

ncRNA : *Non-coding RNA*

NEDD4-2 : *Neural precursor cell Expressed Developmentally Downregulated protein 4-2*

NK : *Natural Killer*

NuRD : *Nucleosome Remodeling and Deacetylation complex*

O

OCT4 : *OCTamer binding protein 4*

P

p-SMAD2 : *Mothers Against Decapentaplegic homolog 2 Phosphorylée*

PADI4 : *Peptidyl Arginine Deiminase 4*

PAK1 : *p21 Activated Kinase 1*

PALS1 : *Protein Associated with Lin Seven 1*

PARP : *Poly-ADP-Ribose Polymerase*

PATJ : *PALS1-Associated Tight Junction protein*

PCAF : *p300/CBP Associated Factor*

PCL : *PolyComb Like*

PD1 : *Programmed death 1*

PDGF : *Platelet Derived Growth Factor*

PDGFR α : *Platelet Derived Growth Factor Receptor α*

PDK1 : *Phosphoinositide-Dependant Kinase 1*

PD-L1 : *Programmed Death Ligand 1*

PDZ : *PSD-95 – DLG-1 – ZO1*

PI3K : *Phosphoinositide-3-kinase*

PIN1 : *Peptidyl-prolyl cis-trans Isomerase NIMA-interacting 1*

PIP2 : *Phosphatidylinositol-4,5-DiPhosphate*

PIP3 : *Phosphatidylinositol-3,4,5-TriPhosphate*

PHF1 : *PHd Finger protein 1*

PHF19 : *PHd Finger protein 19*

PKD1 : *Protein Kinase D1*

POPDC : *Popeye Domain Containing protein family*

PP1 : *Protéine Phosphatase 1*

PP1C : *Protéine Phosphatase 1C*

PP2A : *Protéine Phosphatase 2A*

PPM1A : *Protéine Phosphatase 1A*

PRC1 : *Polycomb Repressive Complex 1*

PRC2 : *Polycomb Repressive Complex 2*

PRMT : *Protein Arginine MethylTransferase*

PSD-95 : *PostSynaptic Density 95*

PTEN : *Phosphatase and TENsin homolog*

R

R-SMAD : *Receptor activated SMAD*

RAC1 : *Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1*

RAF : *RAF proto-oncogene serine/threonine-protein kinase*

RAS : *Rat Sarcoma*

RBBP : *RetinoBlastoma Binding Protein*

RHOA : *Ras HOMolog family member A*

RIGHT : *Relations et Interactions Greffon-Hôte-Tumeur*

RIME : *Rapid Immunoprecipitation Mass spectrometry of Endogenous protein*

Rme1 : *Arginine Mono-méthylée*

Rme2a : *Arginine Di-méthylée asymétrique*

Rme2s : *Arginine Di-méthylée symétrique*

RNA POLII : *RNA POLYmerase II*

ROCK : *RhO-associated Coiled-coil-containing protein Kinase 1*

ROS : *Reactive Oxygen Species*

RPS6KB1 : *Ribosomal Protein S6 Kinase B1*

RT-qPCR : *Reverse Transcription-quantitative Polymerase Chain Reaction*

S

SAH : *S-Adénosyl-L-Homocystéine*

SAHA : *SuberoylAnilid Hydroxamic Acid*

SAM : *S-Adénosyl-L-Méthionine*

SET : *Su(var) 3-9, Enhancer of zeste and Trithorax*

SET8 : *SET domain containing protein 8*

SH3 : *SRC homology 3*

SHC : *SRC homology 2 domain-Containing protein 1*

siRNA : *Small Interfering RNA*

SIRT1 : *NAD-dependent protein deacetylase SIRTuin 1*

SMAD : *Mothers Against Decapentaplegic homolog*

SMAD4 : *Mothers against Decapentaplegic homolog 4*

SMARCA4 : *SWI/SNF related, Matrix associated, Actin dependent Regulator of Chromatin A4*

SMURF : *SMAD Ubiquitination Regulatory Factor*

SNAG : *SNAIL/Gfi*

SOS : *Son Of Sevenless*

SOX2 : *SRY-bOX transcription factor 2*

SP1 : *Specificity protein 1*

STAT3 : *Signal Transducer and Activator of Transcription 3*

SUMO : *Small Ubiquitin like Modifier 1*

SUZ12 : *Suppressor of Zeste 12*

SWI/SNF : *SWItch/Sucrose Non-Fermentable*

T

TEM : *Transition Epithélio-Mésenchymateuse*

TGF- β : *Transforming Growth Factor β*

TGF- β R : *Transforming Growth Factor β Receptor*

TIM-C : *Thérapeutiques Immuno-Moléculaires des Cancers*

TME : *Transition Mésenchymo-Epithéliale*

TNF : *Tumor Necrosis Factor*

TRAF6 : *TNF Receptor-Associated Factor 6*

TSM : *Taux Standardisé Monde*

U

UHRF1 : *Ubiquitine like with pHd and Ring Finger Domains 1*

UTR : *UnTranslated Region*

UTX : *Ubiquitously Transcribed X chromosome tetratricopeptide repeat protein*

V

VEGF : *Vascular Endothelial Growth Factor*

W

WB : *Western Blotting*

WNT : *Wingless iNTegration site*

WWP1 : *WW domain containing E3 ubiquitine Protein ligase 1*

Z

ZEB : *Zinc finger E-box-Binding homeobox*

ZO-1 : *Zona Occludens 1*

ZO-2 : *Zona Occludens 2*

ZO-3 : *Zona Occludens 3*

Préambule

Au sein de l'équipe TIM-C (Thérapeutiques Immuno-Moléculaires et cellulaires des Cancers) intégrée dans le laboratoire INSERM RIGHT (Relations et Interactions Greffon-Hôte-Tumeur, UMR 1098), notre groupe Autophagie, Epigénétique et Immunité liée aux cellules T dans les Cancers (AETIC) s'intéresse notamment à la régulation épigénétique de plusieurs phénotypes liés aux cancers. Ce projet de thèse s'inscrit dans cette thématique en ayant pour but d'étudier la régulation épigénétique de la Transition Epithélio-Mésenchymateuse (TEM). En effet, la TEM est un phénomène décrit comme étant impliqué dans l'agressivité des tumeurs, *via* de multiples mécanismes, qui seront décrits ci-après.

L'étude des cancers est un domaine de spécialisation de notre équipe, et un sujet d'enjeux mondial pour la santé, les cancers étant une des premières cause de décès prématurés (30-69 ans) dans le monde¹. La recherche de nouveaux traitements pour les patients atteints de ces pathologies est très active à travers le monde, et de nouvelles autorisations de mise sur le marché (AMM) sont délivrées régulièrement, ce qui a eu pour effet d'augmenter les pourcentages de guérisons des patients, pour de nombreux types de cancers. (Le taux d'incidence des cancers a légèrement diminué pour les hommes en France ces dernières années (-1,4 % par an entre 2010 et 2018 (**Figure 1.A**)), il a légèrement augmenté pour les Femmes (+0,7 % par an entre 2010 et 2018, (**Figure 1.A**)) (TSM : Taux Standardisé Monde)². Cependant, le taux de mortalité diminue de 0,7 % par an pour les femmes entre 2010 et 2018 et de 2 % pour les hommes sur la même période, en France (**Figure 1.B**)² (TSM). De plus, le taux de survie à 5 ans après diagnostic est en hausse pour de nombreux cancers entre le début des années 1990 et 2010 (**Figure 1.C**). Ainsi, on observe une augmentation de la prévalence totale en France (nombre total de personnes vivantes ayant ou ayant eu un cancer au cours de leur vie) pour atteindre 3,8M en 2017³, en conséquence de l'augmentation du taux de survie principalement.

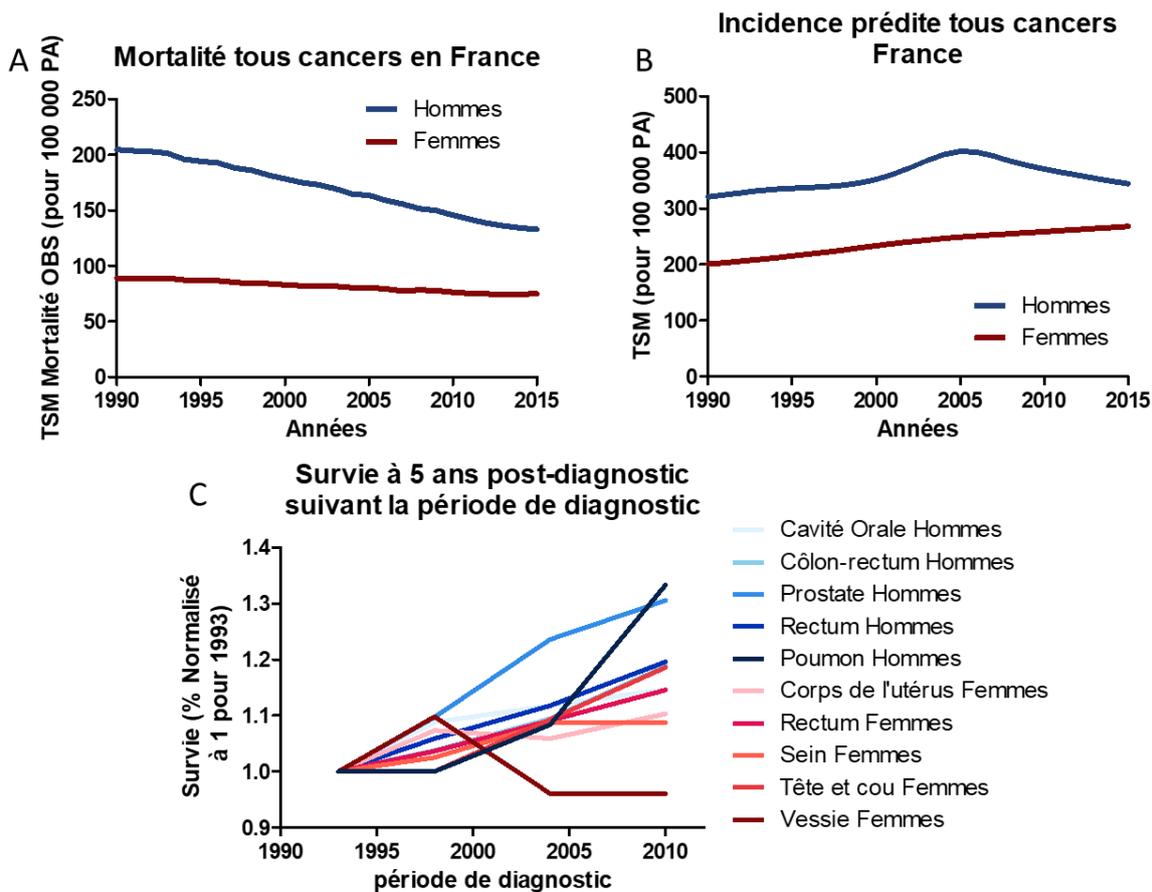


Figure 1 : Evolution de l'incidence, de la mortalité et de la survie après pronostic des cancers en France entre 1990 et 2015.

A. Evolution du taux de mortalité en France tous cancers confondus de 1990 à 2015. Taux de mortalité exprimé en Taux Standardisé sur la population Mondiale (TSM) observé pour 100 000 Personnes-Année (PA). **B.** Evolution de l'incidence prédite tous cancers confondus en France entre 1990 et 2015. Incidence exprimée en Taux Standardisé sur la population Mondiale (TSM) pour 100 000 Personnes-Année (PA) **C.** Taux de survie à 5 ans post-diagnostic en fonction de la période de diagnostic pour différents cancers en France. Le taux de survie est exprimé en pourcentage de patients vivants 5 ans après le diagnostic de leur cancer, normalisé à 1 pour le pourcentage de la première période de diagnostic qui sert de référence (1989-1993). Les 4 points représentent les périodes suivantes : 1989-1993 ; 1994-1998 ; 1999-2004 et 2005-2010.

TSM : Le taux d'incidence (ou de mortalité) est standardisé sur une population de référence (ici la population mondiale). C'est-à-dire que l'on considère que l'on corrige le taux afin de prendre en compte les différences de structure d'âge entre la population étudiée (France) et la population de référence (Monde). Il est alors possible de comparer les TSM de différentes populations sans que ceux-ci soient biaisés par une différence de structure d'âge des populations.

L'apparition de métastases est le principal facteur de mauvais pronostic pour les patients atteints de cancers⁴⁻⁶ (**Tableau 1**) ce qui nous a amené à nous intéresser à la TEM, qui participe notamment à la formation de métastases, mais aussi à d'autres facteurs d'agressivité des cancers comme la résistance aux traitements et l'échappement au système immunitaire.

Localisation (incidence France 2005)	Données Françaises (étude PETRI, sauf Cancer du sein et du pancréas)			Données Américaines (étude SEER)		
	Stade	Survie Relative à 5 ans (%)	Répartition des diagnostics (%)	Stade	Survie relative à 5ans (%)	Répartition des diagnostics (%)
Prostate (62 245)	I	100	27,9	Local	100	80
	II	92	29,5	Régional	100	12
	III	74	17,2			
	IV	60	16,4	Métastatique	30,6	4
Sein (49 814)	T1N0M0	100	39,4	Local	98,3	60
	T2-3N0M0	93,7	16,4	Régional	83,5	33
	T1-3N+M0	80,1	31,8			
	T4NxM0	60,5	3,4			
	M1	8,1	5,6	Métastatique	23,3	5
Côlon- Rectum (37 413)	I	87	25,7	Local	90,8	39
	II	82	21,3			
	III	66	20,6	Régional	69,5	37
	IV	19	26,5	Métastatique	11,3	19
Rein (7 949)	I	100	25	Local	90,4	58
	II	-	-			
	III	71	38,5	Régional	62,3	18
	IV	19	21,6	Métastatique	10,4	19
Poumon (31 557)	I	47	15,5	Local	52,6	39
	II	32	13,6			
	III	22	20	Régional	23,7	37
	IV	5	39,4	Métastatique	3,5	19
Pancréas (7 218)	I-II	24,7	8,8	Local	22,2	7
	III	12,7	5,7	Régional	8,7	26
	IV	2	85,5	Métastatique	1,8	53

Tableau 1 : Taux de survie à 5 ans post-diagnostic de certains cancers en fonction du grade.

Données françaises (étude PETRI⁴, sauf cancer du sein⁵ et du pancréas⁶) et américaines (étude SEER). Les stades métastatiques sont indiqués en bleu.

La TEM est un phénomène qui permet à une cellule de phénotype épithélial (plus ou moins marqué), d'acquérir progressivement, de manière réversible (et plus ou moins marquée) un phénotype mésenchymateux. De nombreuses études décrivent aujourd'hui la TEM comme étant un spectre continu d'état cellulaires intermédiaires, plus ou moins stables entre le phénotype épithélial et le phénotype mésenchymateux^{7,8}. C'est donc un phénomène très plastique, et cette plasticité est due à une régulation fine et très sensible de l'expression de gènes clés, impliquant principalement une régulation épigénétique. L'épigénétique étant un domaine de compétence de notre groupe, nous avons naturellement décidé d'étudier la régulation de la TEM.

Une précédente étude menée au laboratoire a montré le rôle de l'épigénétique et plus particulièrement de la méthylation de l'histone H3 sur sa lysine 27 sur la TEM⁹. La marque épigénétique H3K27me3 (triméthylation de la lysine 27 de l'histone H3) est régulée directement par au moins 4 enzymes méthylant ou déméthylant la lysine 27 de H3 (histone

H3). EZH2 (*Enhancer of Zeste Homolog 2*) et EZH1 (*Enhancer of Zeste Homolog 1*) sont des méthyltransférases capables de méthyler H3K27 (Lysine 27 de l'histone H3), jusqu'à la triméthylation et KDM6B (Lysine déméthylase 6B) et KDM6A (Lysine déméthylase 6A) sont des déméthylases spécifiques de H3K27me³¹⁰.

Les aspects physiologiques et pathologiques de la TEM ainsi que ses implications et conséquences dans les cancers seront développés dans un premier temps avant de mettre en avant l'importance des régulations épigénétiques de la TEM. Nous présenterons enfin dans cette introduction la marque épigénétique H3K27me³ et sa régulation directe par EZH2 et KDM6B. Nous détaillerons dans cette partie les rôles connus jusqu'ici d'EZH2 et KDM6B dans l'agressivité des cancers et leurs potentielles implications en thérapeutique. Une revue de la littérature a d'ailleurs été publiée dans le journal *Epigenomes* sur ce sujet au cours de la thèse¹¹ (**Annexe 1**).

Nous présenterons ensuite nos résultats précisant les rôles d'EZH2 et de KDM6B au cours de la TEM. Enfin, ces résultats seront discutés et mis en perspective.

Etat de l'art

Chapitre I : Aspects physiologiques et pathologiques de la TEM, et ses conséquences dans les cancers

La Transition Epithélio-Mésenchymateuse est un phénomène cellulaire complexe, qui peut avoir lieu dans différents contextes physiologiques ou pathologiques. La TEM peut être régie par une multitude de mécanismes moléculaires, qui ne sont pas spécifiques à un contexte cellulaire donné, et qui aboutissent tous à un phénotype mésenchymateux plus ou moins marqué. C'est pourquoi la TEM est classifiée en fonction du contexte cellulaire plus qu'en fonction des mécanismes moléculaires mis en jeu. Cependant, nous utiliserons plutôt le terme « une TEM » que « la TEM », tant ce terme peut décrire des phénomènes différents. En effet, bien que toutes les TEM aient des caractéristiques communes (qui permettent de les appeler TEM) comme la perte de jonctions serrées et adhérentes, de la polarisation apico-basale ainsi que l'apparition de prolongements cytoplasmiques par exemple, elles peuvent différer en bien des points : au niveau des mécanismes moléculaires sous-jacents aux changements phénotypiques, ou encore au niveau du contexte physiologique ou pathologique dans lequel la cellule subit une TEM. Notons que ces deux caractéristiques peuvent être liées mais ne le sont pas forcément.

Trois types de TEM sont fréquemment décrits, tenant compte uniquement du contexte physiologique ou pathologique dans lequel a lieu la TEM : Le type I concerne le développement embryonnaire ; le type II concerne la cicatrisation et la fibrose ; et le type III concerne les cancers.

I- Contexte et mécanismes généraux de la TEM

1- Historique de la TEM

Elizabeth Dexter « Betty » Hay (1927-2007, Harvard Medical School) est sans doute la première à décrire la TEM dans ses travaux et à utiliser ce terme. En 1968, elle participe au 18^{ème} Hahnemann symposium à Baltimore sur les interactions entre épithéliums et mésenchymes (*Epithelial Mesenchymal interactions*). Elle décrit lors de son intervention des tissus mésenchymateux qui sont originaires de cellules épithéliales, comme lors de la migration des cellules des crêtes neurales lors de la formation du tube neural au cours du

développement¹². Elle décrit alors un phénomène que l'on appelle aujourd'hui TEM sans l'appeler encore ainsi.

Hay et son équipe utilisent pour la première fois le terme « Transformation épithélio-mésenchymateuse » en 1982, dans un article où elle décrit pour la première fois une TEM sur des cellules épithéliales adultes¹³.

Dès 1990, certaines équipes ont montré l'importance des protéines de la famille du TGF (TGF- α , TGF- β_{1-3}) dans la TEM. Une équipe a d'abord montré que l'expression de TGF- α dans des cellules de tumeur de la prostate de rat induisait un phénotype mésenchymateux et invasif chez celles-ci¹⁴. En 1991, Potts *et al.* montrent quant à eux l'importance du TGF- β_3 dans la TEM de cellules endothéliales cardiaques embryonnaires¹⁵ et, en 1994, il est montré que des cellules épithéliales mammaires peuvent subir une TEM sous l'effet du TGF- β ¹⁶.

Hay et son équipe écrivent en 1995 une revue de la littérature s'intitulant « *An Overview of Epithelio-Mesenchymal Transformation* » dans laquelle elle aborde les mécanismes moléculaires d'induction de la TEM, quelques gènes régulés par ce phénomène ou régulateurs de celui-ci, ainsi que l'implication de la TEM en pathologies, notamment dans la formation de métastases. Elle évoque de manière intéressante la possibilité d'inverser la TEM et sa possible utilisation en thérapeutique¹⁷. Dans une autre revue parue la même année, ils s'attardent sur les gènes impliqués dans la TEM et évoquent pour la première fois la Transition Mésenchymo-Epithéliale (TME). Elle y publie un tableau des gènes potentiellement impliqués dans la TEM et TME (**Tableau 2**). Elle évoque le rôle de la TEM dans la formation de métastases, notamment dans le cas de cancers du rein¹⁸.

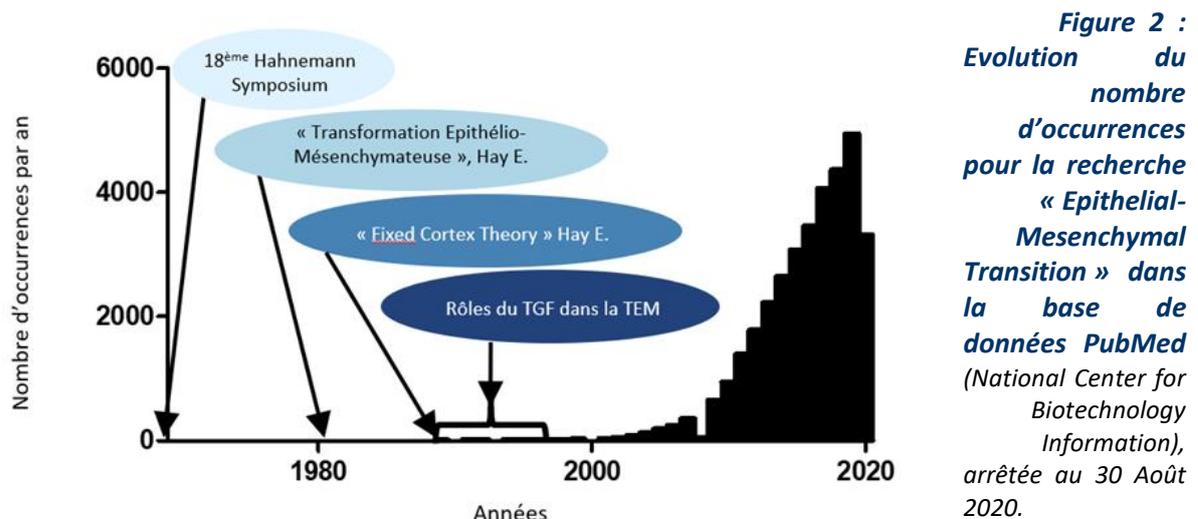
	Gènes induisant la Transformation	
	Epithélium vers Mésenchyme	Mésenchyme vers Epithélium
1. Programmes de surface cellulaire	$\alpha 5\beta 1$ INTÉGRINE	$\alpha 6$ INTEGRINE, SYNDECAN 1, LAMININE/NIDOGEN
2. Oncogènes	V-SRC ; C-FOS ; V-RAS ; V-MOS	C-MET
3. Facteurs de croissance	TGF- β_{1-3} ; MIF ; TGF α ; α FGF	HGF/SF
4. Autres gènes		WNT-1 ; WNT-4 ; PAX2 ; E1A

Tableau 2 : Les gènes induisant la Transformation Epithélio-Mésenchymateuse ou la Transformation Mésenchymo-Epithéliale (Traduit d'après Hay ED et Zuk A, 1995)¹⁸.

L'équipe de Hay met même en lumière l'implication des protéines SMAD (*Mothers Against Decapentaplegic homolog*) dans l'induction de la TEM par le TGF- β_3 ¹⁹. Elle va plus loin en détaillant ensuite les voies moléculaires impliquées²⁰. Elle travaille enfin en 2008 sur des

lignées de cellules cancéreuses ou elle montre notamment que les facteurs de transcription liés à la TEM de la famille SNAIL (SNAIL1 et SNAIL2) induisent l'expression du TGF- β_3 via différents mécanismes qui seront décrits plus tard²¹.

Le nombre d'occurrences pour la recherche « Epithelial-Mesenchymal Transition » est passé de 30 en 2000 à 182 en 2005, puis 942 en 2010 et 4938 en 2019 (**Figure 2**) montrant ainsi l'importance de ces processus dans un grand nombre de phénomènes physiologiques et pathologiques.



2- Transition entre un phénotype épithélial et un phénotype mésenchymateux

La TEM, comme son nom l'indique, consiste en le passage d'une cellule différenciée épithéliale vers une cellule mésenchymateuse. Cette transition est permise par la perte progressive de caractères épithéliaux et le gain progressif de caractères mésenchymateux. Nous allons alors décrire précisément quels en sont les marqueurs, en commençant par les marqueurs épithéliaux.

2.1- Le phénotype épithélial

Les épithéliums sont des organisations cellulaires qui permettent de contrôler et de limiter le passage de molécules entre deux compartiments ou avec l'extérieur du corps. Ce contrôle est permis par la présence de structures spécifiques : la continuité tissulaire et l'imperméabilité entre les différentes cellules de l'épithélium est assurée par plusieurs types de jonctions qui seront décrites ci-dessous. Certaines cellules étant en contact avec deux compartiments différents, elles sont polarisées, et possèdent donc des structures différentes au niveau du pôle apical et au niveau du pôle basolatéral. Enfin, les cellules épithéliales

reposent sur une lame basale, MEC (Matrice extra cellulaire) spécifique des épithéliums (Figure 3).

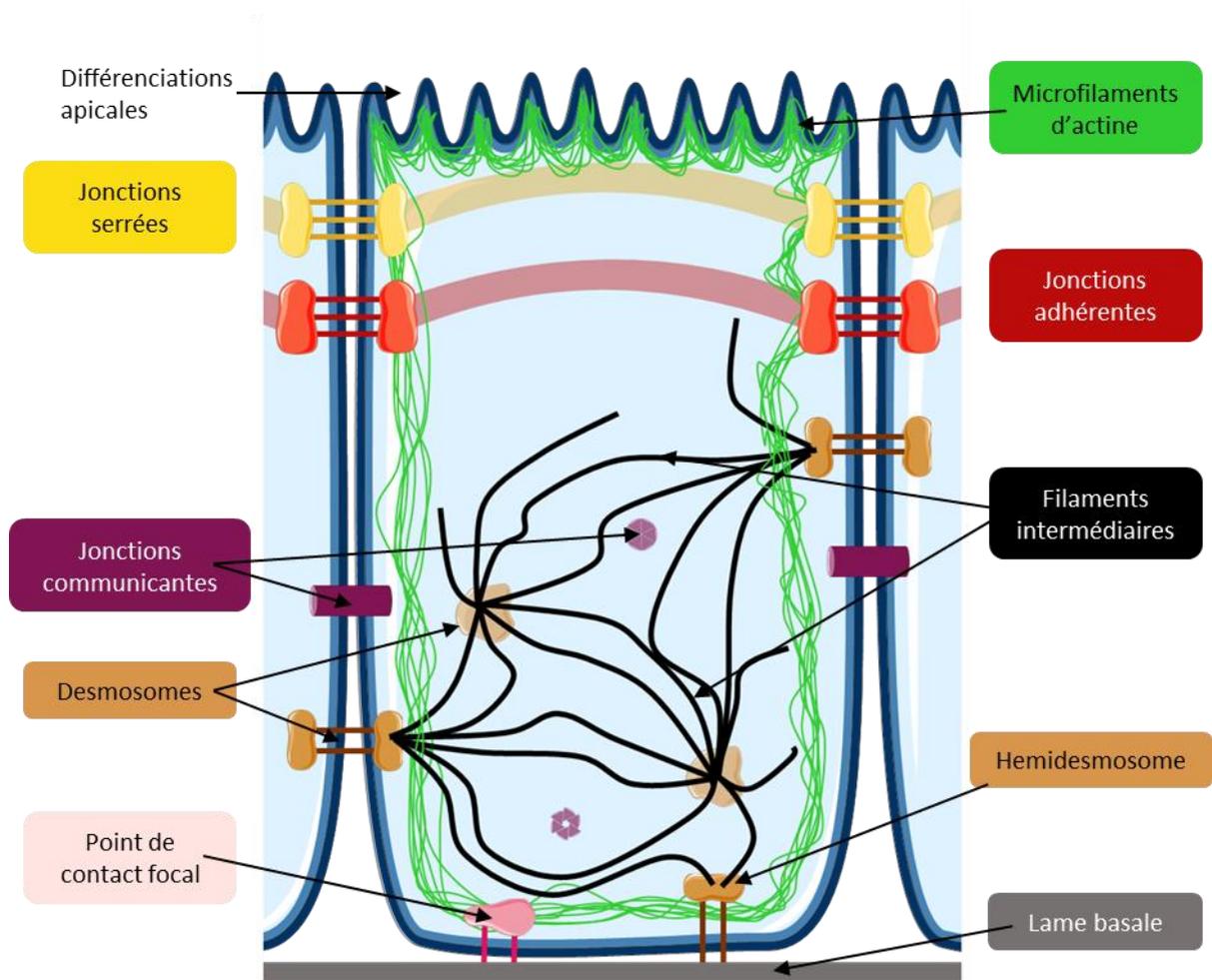


Figure 3 : Organisation schématique d'une cellule épithéliale.

Les caractéristiques communes des cellules épithéliales sont représentées sur ce schéma. Une spécialisation apicale de la membrane plasmique (microvillosités, cils vibratoires, etc.), différents types de jonctions, les plus apicales étant les jonctions serrées, puis juste en dessous les jonctions adhérentes qui forment toutes deux des ceintures sur le pourtour de la cellule et sont reliées aux microfilaments d'ACTINE. Des jonctions ponctuelles, les desmosomes, sont reliés aux filaments intermédiaires, et les jonctions communicantes participent à la continuité tissulaire des épithéliums. Les cellules épithéliales reposent sur une MEC particulière, la lame basale sur lesquelles elles sont ancrées via des hémidesmosomes reliés aux filaments intermédiaires et des points de contact focaux reliés aux microfilaments.

2.1.1- Continuité tissulaire

Le tissu épithélial possède une continuité physique et mécanique qui lui permet de jouer le rôle de barrière entre deux compartiments ou espaces distincts, et une continuité moléculaire et électrique qui lui permet de synchroniser les signaux reçus entre toutes les cellules de l'épithélium. Cette continuité est possible grâce à différentes structures.

Au plus près du pôle apical des cellules épithéliales se trouvent les jonctions serrées (ou *zona occludens*). Elles permettent de séparer physiquement les compartiments qui se trouvent de part et d'autre de l'épithélium et d'empêcher le passage des fluides et de la plupart des molécules par les zones intercellulaires. Au moins 40 protéines différentes interviennent dans ces jonctions²².

A proximité des jonctions serrées, mais plus du côté basal, se trouvent les jonctions adhérentes. Ces jonctions sont continues et forment avec les microfilaments d'ACTINE une structure en forme de ceinture²³. Elles sont constituées également de protéines transmembranaires et de protéines cytoplasmiques associées. Au niveau des épithéliums, on trouve principalement deux types de protéines transmembranaires : la E-CADHERINE et les NECTINES²³⁻²⁵.

Situées encore plus du côté basal se trouvent des jonctions ponctuelles : les desmosomes. Ces derniers sont dispersés sur toute la membrane latérale des cellules épithéliales, participant à la continuité et à la cohésion des tissus. Ils sont assez similaires aux jonctions adhérentes dans leur structure : les protéines transmembranaires qui les composent sont également de la famille des CADHERINES. Ces jonctions sont, contrairement aux jonctions adhérentes, liées aux filaments intermédiaires²⁶⁻²⁸. Ce sont des jonctions très fortes²⁹, souvent considérées comme les plus résistantes parmi les jonctions intercellulaires.

Les jonctions communicantes sont très différentes de celles décrites précédemment. Elles sont ponctuelles et réparties sur la membrane latérale des cellules épithéliales. Elles ne participent pas à l'adhérence intercellulaire, mais à la continuité tissulaire en permettant une continuité électrique et biochimique entre les différentes cellules d'un tissu. Elles permettent notamment la transduction d'un signal reçu par une cellule à ses cellules adjacentes sans que ces dernières ne l'aient reçu, en permettant aux signaux secondaires (Ca^{2+} , IP3 (Inositol triphosphate) ou AMPc (Adénosyl monophosphate cyclique) par exemple) activés dans une cellule de passer dans les cellules adjacentes³⁰. Ces jonctions sont donc à l'origine de la synchronisation entre cellules au sein d'un épithélium.

2.1.2- Polarité apico-basale

Les différentes jonctions intercellulaires décrites ci-avant participent à l'instauration d'une polarité apico-basale dans les cellules épithéliales, en plus de la continuité tissulaire.

Cela signifie qu'il y a une asymétrie d'organisation membranaire et cytosolique entre le pôle apical, situé au-dessus des jonctions serrées et en contact avec une cavité ou l'extérieur du corps et le pôle basal situé en dessous de celles-ci et en contact avec la MEC (**Figure 3**). En effet, les jonctions serrées sont essentielles à la mise en place et au maintien de la polarité^{31,32}. Celle-ci se traduit par différentes structures mises en place au niveau basal et apical, sur la membrane plasmique ou au niveau intra-cellulaire. Au niveau du pôle apical, les voies de différenciation membranaire varient selon l'épithélium, faisant intervenir les filaments d'ACTINE : des microvillosités, des cils vibratoires ou des stéréocils par exemple^{33,34}. L'épithélium respiratoire retrouvé dans les poumons est constitué de cellules ciliées, sur lesquelles les cils vibratoires forment une bordure en brosse, et de cellules caliciformes qui sécrètent du mucus dans les cavités respiratoires. Au niveau cytoplasmique, on trouve dans les épithéliums dits glandulaires, une accumulation de vésicules sécrétoires.

La ceinture de jonctions serrées est considérée comme la délimitation entre pôle basal et pôle apical. Au niveau du pôle basal se trouve le noyau, le réticulum endoplasmique ainsi que l'appareil de golgi notamment. La membrane plasmique du pôle basal peut former des cavités dans lesquelles se trouvent des mitochondries. Entre ces cavités, il y a des prolongements de membrane plasmique de cellules voisines dans lesquels on trouve également des mitochondries. Cette membrane plasmique, contrairement à celle du pôle apical qui donne sur une cavité ou sur les cellules des couches supérieures des épithéliums pluristratifiés, est en contact avec une MEC particulière : la lame basale.

2.1.3- Lame basale

La lame basale est une caractéristique à part entière des épithéliums. C'est une MEC particulière, sous la forme d'un feuillet dense, composé de glycoprotéines : principalement des filaments de COLLAGENE IV et de LAMININES, reliés par du NIDOGENE et du PERLECAN³⁵⁻³⁷. En résumé, la lame basale est importante dans la régulation de la prolifération des cellules épithéliales, leur différenciation et l'angiogenèse ainsi que de nombreux phénomènes de signalisation. Elle est également très importante dans l'adhésion cellulaire³⁵⁻³⁷. Il faut pour cela qu'il y ait interaction entre la cellule et la lame basale, qui peut être assurée par deux types de structures principalement : les hémidesmosomes et les points de contacts focaux (**Figure 3**).

2.2- Le phénotype mésenchymateux

Les cellules mésenchymateuses étaient d'abord définies dans le développement comme les cellules qui n'étaient pas épithéliales. Cela révèle qu'elles n'ont pas des caractéristiques aussi précises que les cellules épithéliales et représentent une population de cellules beaucoup plus hétérogènes. Devant cette grande diversité, nous décrivons ici le phénotype des cellules cancéreuses qui ont subi une TEM (TEM de type III ; cf. Introduction Chapitre I) : ces cellules acquièrent un phénotype leur permettant de se détacher de l'épithélium, envahir localement la MEC puis rejoindre la circulation sanguine ou lymphatique et se disperser ensuite dans le corps.

2.2.1- Perte de l'adhérence tissulaire

Les cellules mésenchymateuses sont caractérisées par le fait qu'elles forment très peu de contacts intercellulaires, et les contacts formés sont plus lâches que ceux des cellules épithéliales. L'adhérence à la matrice en revanche est conservée et leur confère des capacités de migration accrues, notamment *via* les points de contact focaux^{38,39}. Les cellules mésenchymateuses vont également sécréter de la FIBRONECTINE, permettant à ces points de contact d'adhérer à la MEC^{21,40}. L'un des phénomènes les plus précoces dans la TEM est la perte des jonctions serrées⁴¹. Puis, la perte de l'expression de E-CADHERINE⁴² entraîne la dissociation des jonctions adhérentes. Ces pertes d'expression aboutissent à la dissociation des desmosomes⁴³ dans les cellules mésenchymateuses qui semble être nécessaire à la perte d'adhérence intercellulaire permettant à ces cellules d'envahir la MEC à proximité directe de l'épithélium.

L'expression de la E-CADHERINE est en quelque sorte remplacée par l'expression de la N-CADHERINE, qui permet aux cellules de gagner en mobilité et en invasion⁴⁴⁻⁴⁷. On parle d'un « *switch* » des CADHERINES.

2.2.2- Remodelage du cytosquelette

Le remodelage du cytosquelette d'ACTINE est un cycle de polymérisation et dépolymérisation permettant le *turnover* de ce cytosquelette. Cette succession de réactions est possible notamment grâce à la consommation d'ATP, qui fait intervenir ici une consommation d'oxygène⁴⁸. Le remodelage du cytosquelette d'ACTINE est considéré comme étant une conséquence de la TEM⁴⁹, mais il peut également être à l'origine de la TEM, ou au moins responsable du maintien du phénotype mésenchymateux. En effet, la consommation

d'oxygène qu'il engendre peut induire une augmentation de l'état d'hypoxie de la cellule, ce qui peut induire la TEM⁵⁰. Nous reviendrons sur les mécanismes d'induction de la TEM (cf. Chapitre 1- II- Les mécanismes moléculaires de la TEM).

En plus du remodelage du cytosquelette d'ACTINE, les cellules mésenchymateuses expriment la VIMENTINE, un filament intermédiaire qui n'est pas présent dans les cellules épithéliales^{40,51-54}.

2.2.3- Polarisation avant-arrière

Nous avons vu plus tôt que la polarisation apico-basale des cellules épithéliales est dépendante de leurs jonctions intercellulaires et notamment des jonctions serrées. En perdant celles-ci, les cellules mésenchymateuses perdent leur polarisation apico-basale et acquièrent ensuite une polarisation avant-arrière.

La polarisation avant-arrière des cellules mésenchymateuses est due en grande partie à l'organisation du cytosquelette d'ACTINE. Au niveau du pôle avant, ces microfilaments polymérisent pour former des structures spécialisées de type lamellipodes et filopodes, ainsi que des nouveaux points de contact focaux. Au niveau du pôle arrière, ces microfilaments se dépolymérisent afin de libérer les points de contacts focaux et ainsi rompre l'adhérence. De plus, au niveau de ce pôle, des fibres de MYOSINE II sont associées aux microfilaments d'ACTINE et permettent la contraction de ces derniers, facilitant le mouvement du pôle arrière de la cellule en direction du pôle avant⁵⁵. Les INTEGRINES des points de contact focaux sont donc en permanence recyclées du pôle arrière vers le pôle avant. Les microtubules sont également polarisés : leur pôle positif polymérise rapidement au niveau du pôle avant de la cellule, et leur pôle négatif dépolymérise rapidement au niveau du pôle arrière de la cellule, permettant le transport des organites dans le sens de migration de la cellule^{56,57} (**Figure 4**).

2.2.4- Migration et invasion

Grâce à la polarisation avant-arrière des cellules mésenchymateuses, ces cellules possèdent des capacités de migration et d'invasion, ce qui leur donne la possibilité de traverser la lame basale et d'envahir les tissus adjacents, notamment la circulation sanguine et lymphatique (**Figure 4**).

La TEM s'accompagne de l'augmentation de l'expression de nombreuses protéases sécrétées capables de dégrader la MEC pour permettre aux cellules mésenchymateuses de la

traverser (**Figure 4**). Parmi elles, les protéines de la famille des MMP (matrix métalloprotéases) sont parmi les plus caractéristiques de la TEM. MMP2 et MMP9, qui sont des gélatinases, sont les plus couramment surexprimées et sécrétées au cours de la TEM, mais il existe de très nombreuses MMP pouvant participer à l'invasion des cellules mésenchymateuses⁵⁸. D'autres métalloprotéases sont également surexprimées dans les cellules mésenchymateuses comme ADAM19 (*A dysintegrin and metalloproteinase 19*)^{9,59}.

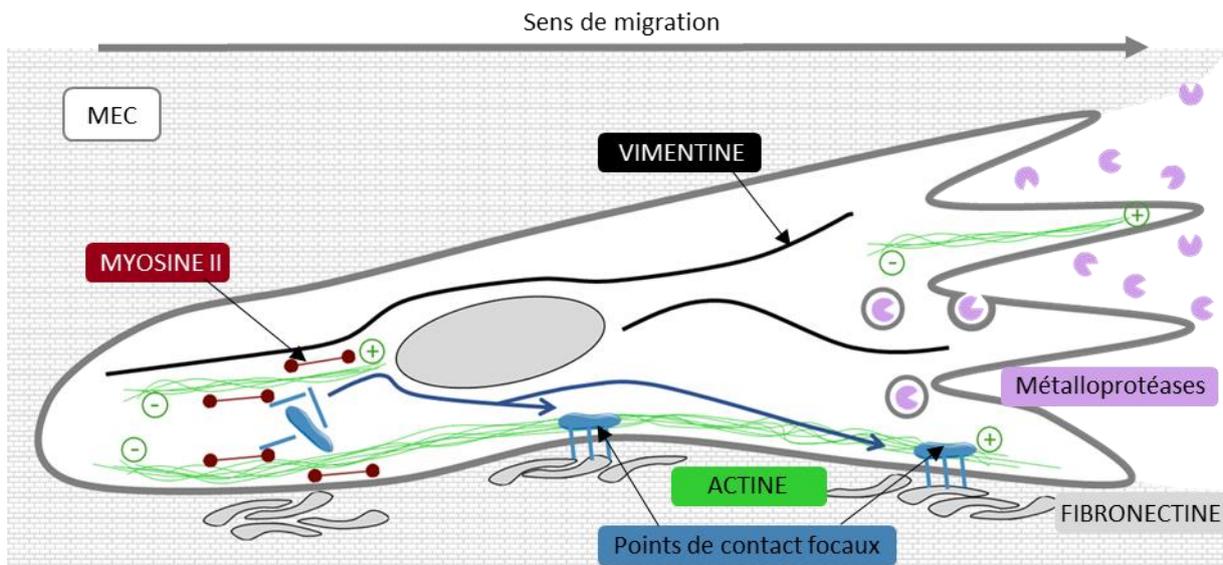


Figure 4 : Organisation schématique d'une cellule mésenchymateuse.

Au pôle arrière : Les microfilaments d'ACTINE sont liés à des filaments de MYOSINE II, ce qui permet une contraction de ces fibres afin de ramener le pôle arrière dans le sens de migration. Cela est accompagné par une dépolymérisation au niveau du pôle négatif des microfilaments d'ACTINE. Les points de contacts focaux sont recyclés pour être reformés au pôle avant. Au pôle avant : les microfilaments d'ACTINE polymérisent rapidement au niveau de leur pôle positif. L'ACTINE est impliquée dans la formation des pseudopodes. Les points de contact focaux sont nouvellement formés afin de faciliter la migration. Enfin, au niveau de ce pôle, il y a une sécrétion de métalloprotéases qui dégradent la membrane basale pour permettre l'invasion locale.

2.2.5- Caractéristiques souches

Les cellules souches sont des cellules indifférenciées, capable d'engendrer différentes populations de cellules. Au sein des tumeurs, on parle de cellule(s) souche(s) cancéreuse(s) (CSCs) pour décrire la (ou les) cellule(s) qui serai(en)t à l'origine du (ou des) clone(s) constituant la tumeur. Par analogie, on parle également de cellule souche cancéreuse pour décrire une cellule qui est capable de se renouveler et de reformer toutes les populations cellulaires d'une tumeur lorsqu'elle est greffée à un organisme. A ce titre, les cellules cancéreuses mésenchymateuses acquièrent des caractéristiques de cellules souches cancéreuses⁶⁰⁻⁶⁴.

De manière générale, les cellules mésenchymateuses cancéreuses ont des capacités de propagation tumorale plus importante (c'est-à-dire leurs capacités à engendrer en se divisant toutes les sous populations de la tumeur primaire) que les cellules épithéliales. Cependant, il semble que seulement les cellules qui ont subi une TEM intermédiaire, avec donc un phénotype mésenchymateux intermédiaire en soient capables^{7,63,65}.

Les cellules épithéliales ont donc la capacité d'acquérir des caractéristiques souches en subissant une TEM. Par définition, les cellules souches sont ensuite capables d'engendrer des cellules épithéliales, en subissant le phénomène inverse de la TEM, la TME⁶⁶. Ce phénomène est témoin de la grande plasticité des cellules en TEM.

2.3- Plasticité cellulaire : la TEM est un spectre continu

La TEM a été considérée comme un phénomène permettant le passage d'une cellule épithéliale à une cellule totalement mésenchymateuse, si bien qu'elle était appelée « Transformation Epithélio-Mésenchymateuse »¹³. Il est maintenant accepté que la TEM désigne plutôt l'activation d'un programme qui peut entraîner l'expression d'un grand panel de gènes. Cependant, l'ensemble de ce panel n'est pas exprimé dans tous les cas, ce qui engendre des phénotypes cellulaires très variés, de l'hybride entre épithélial et mésenchymateux au phénotype le plus mésenchymateux⁷. Le phénotype de ces cellules peut rapidement varier en fonction des *stimuli* auxquels elles sont confrontées : elles possèdent une grande plasticité. Un score global de TEM a alors été mis en place permettant de quantifier le phénotype plus ou moins épithélial ou mésenchymateux d'une population de cellules (lignée cellulaire ou tumeur), basé sur l'expression de nombreux gènes (218 pour une lignée cellulaire et 315 pour une tumeur) représentatifs de la TEM dans de nombreux modèles⁶⁷.

Pour résumer, la TEM et la TME ne sont pas des processus interrupteurs qui transformeraient une cellule épithéliale en une cellule mésenchymateuse et inversement. Le grand nombre de gènes mis en jeu dans ces phénomènes entraîne l'existence d'une multitude de phénotypes intermédiaires plus ou moins stables. Les cellules sont très plastiques et peuvent donc facilement passer d'un état intermédiaire à un autre, et même d'un état stable à un autre sous l'influence de différents stimuli qui seront détaillés ci-après⁸ (**Figure 5**).

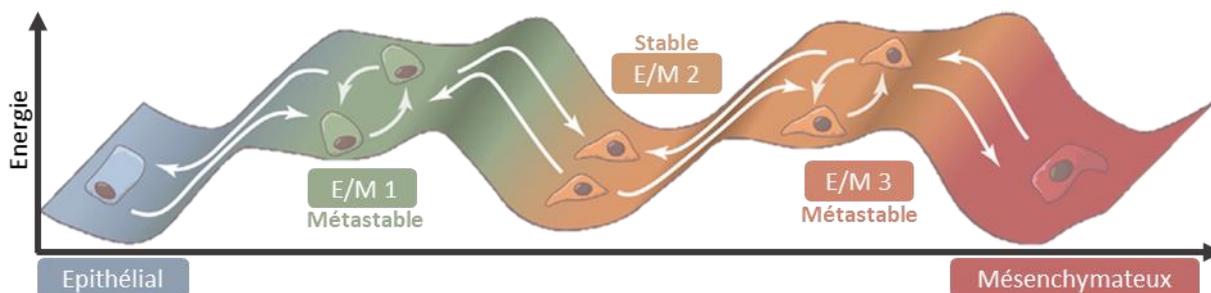


Figure 5 : Représentation Schématique de la plasticité cellulaire au cours de la TEM.

Les cellules à gauche représentent les cellules épithéliales. Le bandeau représente l'infinité de phénotypes mixtes épithélio-mésenchymateux différents que peuvent acquérir les cellules au cours de la TEM, représentant des états plus ou moins stables. Une multitude d'états intermédiaires stables et métastables peuvent exister. Les cellules à droite représentent les cellules les plus mésenchymateuses. N'importe quelle cellule de n'importe quel phénotype pourrait acquérir n'importe quel autre phénotype en réponse au stimulus adéquat. Adapté de Nieto et al.⁸.

II- Les mécanismes moléculaires de la TEM

La TEM peut être induite par différents facteurs ou signaux, dans un contexte physiologique ou pathologique. Parmi eux, de nombreux facteurs de croissance (TGF, EGF (*Epidermal growth factor*), etc.), l'hypoxie, des voies moléculaires comme la voie WNT par exemple. Le TGF- β est un des principaux inducteurs de TEM, durant le développement embryonnaire^{20,68}, en pathologies ou *in vitro*^{41,69,70}. Cette partie du développement a pour but de recenser l'ensemble des mécanismes mis en jeu au cours d'une TEM dans différents modèles d'études physiologiques ou pathologiques, *in vivo* ou *in vitro* afin d'en faire une synthèse.

1- Induction de la TEM par le TGF- β

Les protéines TGF- β sont une sous-famille de petites protéines, des cytokines, qui comporte 3 isoformes : TGF- β 1, TGF- β 2 et TGF- β 3. Ces trois formes sont toutes les trois capables d'interagir avec les récepteurs du TGF- β (TGF- β R) et donc d'induire une TEM⁷¹.

1.1- Mécanismes généraux d'induction de la TEM par le TGF- β

Le TGF- β se lie à la surface de la cellule sur les récepteurs au TGF- β , de classe I (TGF- β RI) et de classe II (TGF- β RII). Les récepteurs forment un hétérotétramère, composé de 2 TGF- β RI et 2 TGF- β RII. Ces deux classes de récepteurs sont des sérine/thréonine kinases. Lorsque le ligand se lie au niveau de la partie extracellulaire de l'hétérotétramère, les TGF- β RII phosphorylent les TGF- β RI, qui sont alors capables de phosphoryler d'autres substrats et

d'activer différentes voies de signalisation. Parmi ces voies, la voie SMAD est la voie canonique et principale dans l'activation de la TEM par le TGF- β ⁷².

1.1.1- La voie SMAD

Il existe 8 protéines dans la famille SMAD, classées en 3 sous-catégories : les SMADs stimulés par le récepteur (R-SMAD) : SMAD1/2/3/5/8 ; SMAD4 (appelée SMAD commun ou C-SMAD) et les SMAD inhibiteurs (I-SMAD) : SMAD6 et 7⁷³. Le type de réponse cellulaire induite par le TGF- β dépend de la paire de récepteurs activés et du R-SMAD phosphorylé. Seuls SMAD2/3/4 sont activés par le TGF- β associé aux TGF- β RI et TGF- β RII⁷².

Le TGF- β RI peut phosphoryler SMAD2 et SMAD3, qui vont alors se lier à SMAD4. Le complexe SMAD2/3/4 se relocalise (ou délocalise) dans le noyau et joue le rôle de facteur de transcription^{41,71}. SMAD3 et SMAD4 semblent essentiels dans l'induction de la TEM par le TGF- β dans de nombreux modèles physiologiques et pathologiques^{41,71,74-78}. La stimulation de la voie SMAD entraîne la transcription de nombreux gènes dont les facteurs de transcription de la TEM (*cf* paragraphe 1.2- Régulation transcriptionnelle).

En revanche, certaines études réalisées *in vivo*, montrent que l'expression de SMAD2 semble empêcher le complexe SMAD3/4 de se lier au promoteur de *SNAIL* lors de l'induction de tumeurs de la peau chez des souris⁷⁹, quand d'autres travaux montrent que SMAD2 est lui aussi favorable à la TEM dans des cellules de cancers du sein et de la peau^{41,71,80} (**Figure 6**).

La voie SMAD peut activer la transcription de SMAD7⁸¹, un multi-inhibiteur de la voie SMAD. En tant qu'inhibiteur antagoniste du TGF- β RI, SMAD7 peut prendre la place de SMAD2/3 au niveau du TGF- β RI et ainsi empêcher leur phosphorylation⁸². SMAD7 est également capable de recruter un complexe protéique au niveau du TGF- β RI comprenant notamment PP1C (protéine phosphatase 1C) qui est la sous unité catalytique de PP1 (protéine phosphatase 1), capable d'inactiver TGF- β RI en le déphosphorylant⁸². Enfin, SMAD7 peut induire la dégradation par le protéasome de TGF- β RI en recrutant différentes E3 ubiquitine ligases (SMURF1/2, WWP1 ou NEDD4-2). Il a également été montré que, dans le noyau, SMAD7 peut jouer le rôle de corépresseur en se liant à l'ADN au niveau des sites de fixation de SMAD4, empêchant l'activation de la transcription par cette dernière. SMAD7 peut aussi se lier directement à SMAD4, sur son site de liaison de l'ADN^{72,81,83-86}. SMAD7 est donc au cœur d'une boucle de rétrocontrôle de l'activité des TGF- β R (**Figure 6**).

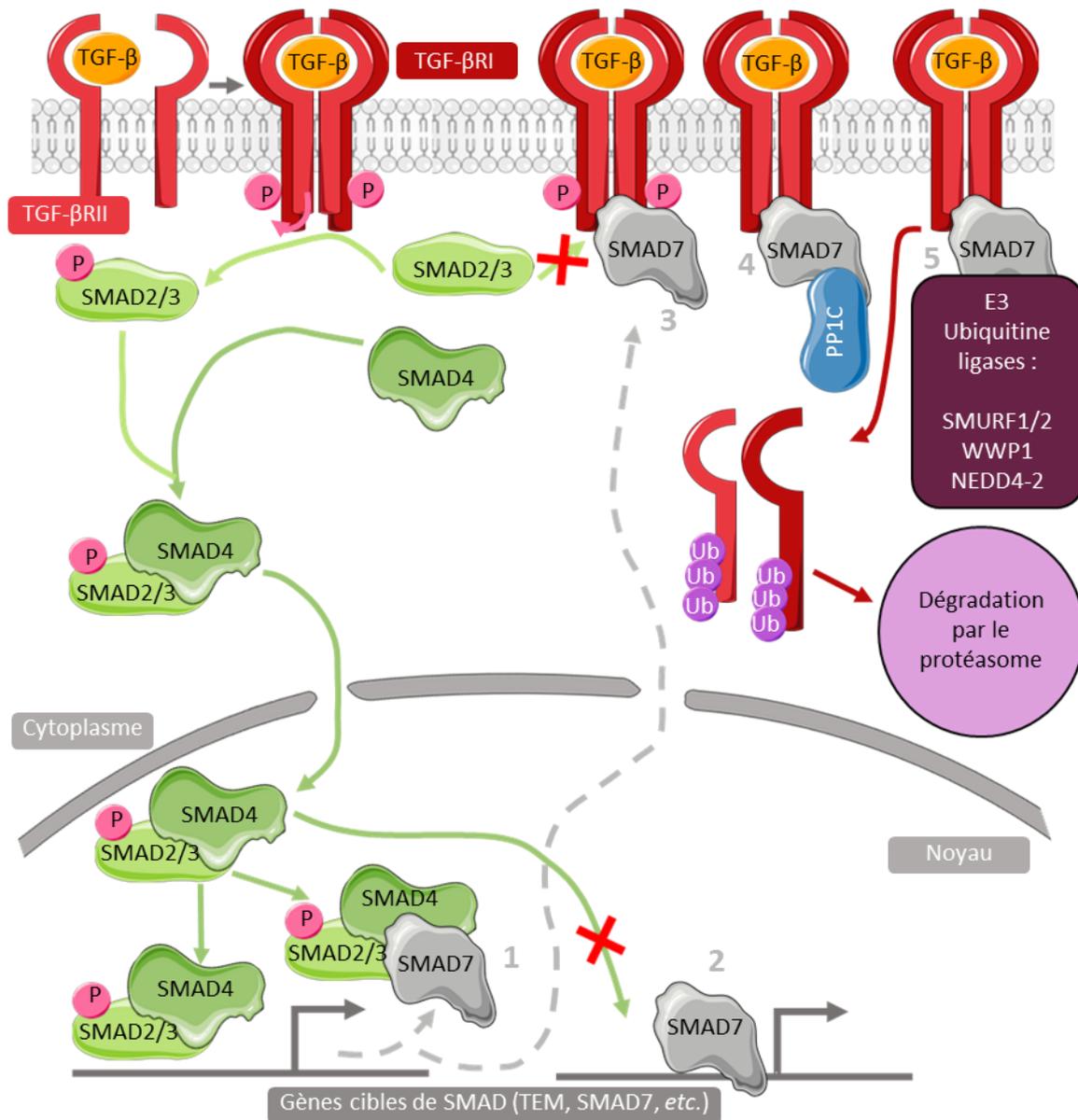


Figure 6 : Schéma de l'activation de la voie SMAD par le TGF-β.

Le TGF-β en se liant sur son récepteur TGF-βRII entraîne la tétramérisation de 2 TGF-βRI avec 2 TGF-βRII. TGF-βRII phosphoryle TGF-βRI, qui va lui-même phosphoryler SMAD2/3. SMAD 2/3 vont pouvoir interagir avec SMAD4 et rentrer dans le noyau pour activer la transcription des gènes cibles. Parmi ces derniers se trouve SMAD7. SMAD7 peut inhiber la voie SMAD de plusieurs manières : 1- SMAD7 se lie au complexe SMAD2/3/4 et empêche leur fixation à l'ADN ; 2- SMAD7 se lie à l'ADN et empêche le complexe SMAD2/3/4 de s'y lier ; 3- SMAD7 se lie aux TGF-βR et empêche la phosphorylation de SMAD2/3 ; 4- SMAD7 recrute des phosphatases (PP2A et PP1C) et déphosphoryle TGF-βRI ce qui le désactive ; 5- SMAD7 recrute des E3 Ubiquitine ligases (SMURF1/2, WWP1 ou NEDD4-2) et entraîne l'ubiquitination et la dégradation des TGF-βR.

1.1.2- Autres voies d'activation de la TEM par le TGF- β

Outre la voie SMAD, les voies des MAPK (*Mitogen activated protein kinase*), de la PI3K/AKT (Phosphoinositide-3-kinase/Protéine kinase B) et des Rho GTPases sont également activées lors de l'induction de la TEM par le TGF- β . Le blocage de chacune de ces voies peut affecter le phénotype mésenchymateux, ce qui suggère qu'elles complètent et peuvent remplacer la voie SMAD lors de l'induction de la TEM par le TGF- β ⁴¹.

1.1.1.1- Activation de la voie des MAPK par le TGF- β

La protéine SRC peut phosphoryler TGF- β RII au niveau de la tyrosine 284, ce qui entraîne le recrutement de GRB2 (*Growth factor receptor-bound protein 2*), SHC (*SRC homology 2 domain-containing transforming protein 1*) et SOS (*Son of sevenless*) au niveau de ces récepteurs. La localisation de SOS (facteur d'échange de nucléotide pouvant fournir du GTP à RAS) à la membrane est alors suffisante pour stimuler RAS (*Rat sarcoma*), qui initie les voies des MAPK, aboutissant à l'activation de ERK (*Extracellular signal-regulated kinase*)⁸⁷⁻⁸⁹. L'activation constitutive de cette voie par la surexpression de RAF (*Rapidly accelerated fibrosarcoma*), induit la TEM dans des cellules MDCK (*Madin-Darby canine kidney cells*) et induit une signalisation autocrine du TGF- β ⁹⁰. De plus, l'inhibition de MEK1/2 (MAPK/ERK kinase 1/2) dans des cellules NMuMG (*Normal murine mammary gland epithelial cells*) empêche l'induction de la TEM par le TGF- β , ce qui montre l'importance de la voie MAPK dans cette induction⁹¹ (**Figure 7**).

D'autres MAPK sont activées par le TGF- β et peuvent participer à l'induction de la TEM. Dans des cellules NmuMG notamment, la MAPK kinase P38 est phosphorylée de manière indirecte après activation des TGF- β R^{92,93}. Le TGF- β peut également induire le recrutement de TRAF6 (*TNF (Tumor necrosis factor) receptor-associated factor 6*) au niveau des TGF- β R. Cette dernière va s'auto-ubiquitinyler entraînant son interaction avec la kinase TAK1 (*TGF- β activated kinase 1*) qu'elle va ubiquitinyler à son tour. Une cascade de phosphorylations aboutissant à l'activation de la MAPK JNK (JUN N-terminal kinase) sera alors mise en place⁹⁴⁻⁹⁶ (**Figure 7**). L'activation de la voie des MAPK va induire la transcription d'un panel de gènes spécifiques (*cf* paragraphe 1.2- Régulation transcriptionnelle).

L'activation de la voie des MAPK par le TGF- β peut aussi inhiber la translocation nucléaire des R-SMADs. Ainsi, ERK est capable de phosphoryler SMAD2 et SMAD3 au niveau d'une

région qui empêche leur translocation nucléaire, ce qui diminue la transcription des gènes cibles de la voie SMAD⁹⁷ (**Figure 7**).

1.1.1.2- Activation de la voie Rho-GTPases par le TGF- β

La liaison du TGF- β sur ses récepteurs peut également induire l'activation de RHO-like GTPases, notamment RHOA. Le mécanisme par lequel les TGF- β R stimulent RHOA n'est pas connu⁹⁸. Il a été montré que durant le développement, l'activation de RHOA est nécessaire à l'induction de la TEM^{41,99,100}. Celle-ci entraîne l'activation de la kinase ROCK (*Rho-associated coiled-coil-containing protein kinase 1*), qui va phosphoryler la kinase LIM (*LIM domain kinase 1*), qui elle-même va phosphoryler la COFILINE. Cette dernière est alors inactivée favorisant ainsi la polymérisation des filaments d'ACTINE^{101,102} (**Figure 7**).

1.1.1.3- Activation de la voie PI3K/AKT par le TGF- β

L'importance de cette voie dans l'induction de la TEM a été mise en évidence car l'utilisation d'inhibiteur de PI3K, ou d'un mutant dominant négatif d'AKT peut supprimer l'induction de la TEM par le TGF- β ^{103,104}. De plus, la voie PI3K a des interconnexions avec la voie SMAD. En effet, il a été montré que l'activation de la voie SMAD est nécessaire pour l'activation de AKT par PI3K dans des cellules épithéliales de cristallin¹⁰⁵. A l'inverse, le blocage de la voie PI3K/AKT empêche la phosphorylation de SMAD2 par le TGF- β RI dans des cellules épithéliales mammaires. De plus, RHOA est impliquée dans l'activation de la voie PI3K puisque l'expression d'un dominant négatif de RHOA entraîne une diminution de la phosphorylation de AKT¹⁰⁴. Cela montre de nombreuses connexions entre les différentes voies d'induction de la TEM par le TGF- β .

L'activité kinase de PI3K est augmentée dans des cellules stimulées par le TGF- β ¹⁰⁶. En effet, PI3K, *via* sa sous unité régulatrice est capable d'interagir avec les TGF- β RI et II. L'activation de PI3K entraîne la phosphorylation du PIP2 (Phosphatidylinositol-4,5-diphosphate) en PIP3 (Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate). PIP3 peut alors recruter AKT au niveau de la membrane plasmique où elle va être phosphorylée et ainsi activée par PDK1 (*Phosphoinositide-dependant kinase 1*). AKT peut alors phosphoryler de nombreuses protéines cibles et activer ainsi différentes voies de signalisation : parmi elles, la voie NF κ B, (*cf* Chapitre I, II, 2.1- Induction de la TEM par le TNF- α) et MTOR (*Mechanistic target of rapamycin*)¹⁰⁷. MTOR activée peut participer à deux complexes dont MTORC1 qui est important dans l'induction de la TEM. En effet, dans ce complexe MTOR peut phosphoryler

RPS6KB1 (*Ribosomal protein S6 kinase B1*), ce qui induit notamment l'augmentation de la synthèse protéique et de la taille cellulaire^{41,108} (Figure 7).

Comme les autres voies induites par le TGF- β , cette voie aboutira à la transcription de gènes activateurs de la TEM. Notamment RPS6KB1 est nécessaire pour l'activation de la transcription de SNAIL1 dans des cellules de cancer de l'ovaire¹⁰⁹ (Figure 7).

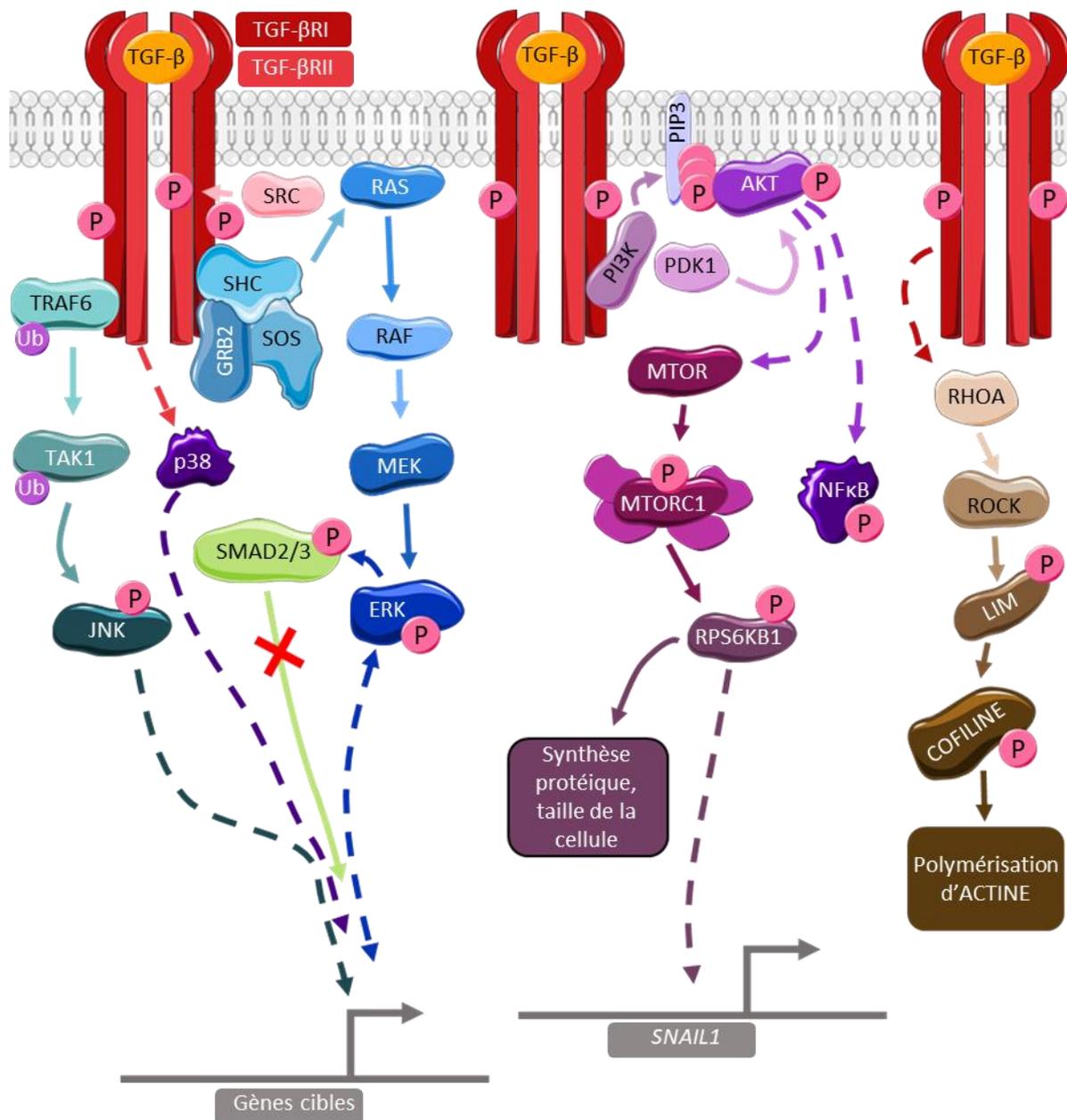


Figure 7 : Activation des voies MAPK, RHO-GTPase et PI3K/AKT par le TGF- β .

A gauche, la liaison du TGF β à son récepteur entraîne l'activation des MAPK JNK, p38 et ERK. Au centre, elle entraîne l'activation de la voie PI3K/AKT/MTOR, participant à l'induction de la TEM. A droite, l'activation des TGF- β R entraîne l'activation de RHOA, ce qui aboutit à la polymérisation des microfilaments d'ACTINE.

1.2- Régulation transcriptionnelle

La stimulation des voies précédemment décrites par le TGF- β entraîne la régulation directe ou indirecte de la transcription de nombreux gènes épithéliaux ou mésenchymateux. Les facteurs de transcription des familles SNAIL, ZEB et TWIST sont responsables de la majorité des changements transcriptionnels et sont appelés EMT-ATFs (Epithelial to mesenchymal transition-activated transcription factors).

1.2.1- Famille SNAIL

La famille SNAIL est constituée de 3 membres chez l'homme, SNAIL1-3 (SNAIL2 est aussi connu sous le nom de SLUG). Deux domaines sont conservés entre ces trois protéines : elles possèdent toutes 4 à 6 domaines en doigt de zinc (permettant de se lier à l'ADN au niveau de séquences particulières appelées *E-Box* (CAGGTG)) et un domaine N-terminal SNAG (SNAIL/Gfi). Les protéines SNAIL peuvent réprimer ou activer la transcription¹¹⁰⁻¹¹³.

SNAIL1 est probablement le facteur de transcription le plus souvent surexprimé au cours de la TEM⁴¹. Il est montré que l'extinction de SNAIL1 suffit à empêcher l'induction de la TEM dans des lignées de cellules cancéreuses^{114,115}, et que l'expression de SNAIL1 exogène en revanche est suffisante à induire une TEM¹¹⁶⁻¹¹⁸. Par exemple, des embryons de souris n'exprimant pas SNAIL1 ne sont pas viables, incapables de former le mésoderme lors de la gastrulation. L'extinction de SNAIL2 entraîne des malformations de la crête neurale et du mésoderme^{119,120}. La stimulation par le TGF- β entraîne, dans de nombreux modèles, l'expression des gènes codant pour les protéines SNAIL, par l'intermédiaire de la voie SMAD⁷⁴ (activation directe de la transcription de *SNAI1* et *SNAI2* par le complexe SMAD2/3/4¹²¹) ainsi que la voie des MAPK¹²² ou PI3K/AKT/MTOR¹⁰⁹.

SNAIL1 et 2 vont réprimer l'expression de nombreux gènes responsables du phénotype mésenchymateux. D'abord, SNAIL1 et 2 sont tous les deux capables de se lier au promoteur du gène *CDH1* codant pour la E-CADHERINE et de réprimer son expression en recrutant de nombreux répresseurs épigénétiques afin de créer un environnement localement répressif^{123,124} (cf. Chapitre II). SNAIL1 et 2 répriment également l'expression des protéines essentielles des jonctions serrées CLAUDINES et OCCLUDINES¹²⁵, ainsi que des desmosomes, la DESMOPLAKINE et la PLAKOPHILINE, entraînant la désorganisation de ces jonctions et la relocalisation de certaines protéines de la plaque cytosolique associées à celles-ci. SNAIL1

participe également à la perte de la polarité apico-basale¹²⁶, et au remodelage du cytosquelette en réprimant directement l'expression de CYTOKERATINES épithéliales^{127,128}.

D'autre part, SNAIL1 active également l'expression de plusieurs gènes mésenchymateux, de manière directe ou indirecte. Une surexpression de VIMENTINE, de FIBRONECTINE, N-CADHERINE et MMPs est observée dans des cellules MDCK qui surexpriment SNAIL1 par exemple^{129,130}, ainsi qu'une diminution de leur expression dans des cellules cancéreuses de souris dans lesquelles SNAIL1 est éteint¹²⁹. De plus, SNAIL1 active l'expression de MMP2 *via* l'activation de la transcription d'un autre facteur de transcription, ETS1 (*Avian erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 1*)¹³¹ et l'expression de MMP9 de manière indirecte *via* la liaison des facteurs SP1 (*Specificity protein 1*) et ETS1 au niveau du promoteur de *MMP9* dans des cellules MDCK¹³², et de manière directe en recrutant SP1 et EGR1 (Early growth response 1) sur le promoteur de *MMP9* dans des cellules de carcinome hépatocellulaire¹¹³. SNAIL1 est également capable d'induire la transcription d'autres EMT-ATFs, des familles TWIST, ID et ZEB^{128,130,131,133}.

Notons que SNAIL1 est capable de se lier à son propre promoteur et de réprimer la transcription de son propre gène, formant une boucle d'autorégulation¹³⁴.

1.2.2- Famille ZEB

Il existe deux membres dans la famille des facteurs de transcription ZEB (*Zinc finger E-Box-binding homeobox*) : ZEB1 et ZEB2. Ils possèdent deux structures en doigt de zinc à chaque extrémité qui leur permettent de se lier à l'ADN au niveau d'E-Box bipartites^{41,135,136}. Les ZEB sont également des répresseurs de la transcription, grâce à leur domaine répresseur situé entre les domaines en doigts de zinc, et leur capacité à recruter des corépresseurs comme CTBP (*C-terminal binding protein*)¹³⁵ ou, dans des cellules d'adénocarcinome colorectal, SMARCA4 (*SWI/SNF (switch/sucrose non-fermentable) related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin A4*)¹³⁷. ZEB1, comme SNAIL1 est également capable de participer à la modification épigénétique des promoteurs auxquels elle se lie en recrutant LSD1 (*Lysine specific histone demethylase 1*)¹³⁸ ou SIRT1 (*NAD-dependent protein deacetylase sirtuin-1*)¹³⁹. ZEB1 peut également être un activateur de la transcription, en se liant à PCAF (*P300/CBP-associated factor*) ou P300¹³⁶. ZEB1 et ZEB2 peuvent également toutes les deux se lier à SMAD2/3. ZEB1 agit en synergie avec les SMAD au niveau des promoteurs des gènes

possédant un site de fixation aux SMADs et aux ZEBs, alors que ZEB2 agit en répresseur au niveau de ces mêmes gènes¹⁴⁰.

Les protéines ZEB sont, tout comme les protéines SNAIL des répresseurs de l'expression de la E-CADHERINE^{141,142} et d'autres gènes des jonctions cellule-cellule¹⁴³. ZEB1 est également impliqué dans la perte de la polarité apico-basale¹⁴⁴. D'autre part les deux protéines ZEB participent à la migration et l'invasion des cellules, et à l'activation de la transcription de la VIMENTINE, N-CADHERINE et MMP2 de manière indirecte¹⁴³⁻¹⁴⁵.

ZEB1 est impliqué dans le maintien de la TEM, ou dans l'induction d'une TEM plus mésenchymateuse. En effet, les événements précoces de la TEM comprennent une dissociation des jonctions adhérentes^{41,123}, la β -CATENINE se relocalise dans le noyau, forme un complexe avec TCF4 (*Transcription factor 4*) et induit la transcription de ZEB1¹⁴⁶. Enfin, SNAIL1 et ZEB2 semblent avoir plus d'affinité pour les E-Box que SNAIL2 et ZEB1¹³⁵.

1.2.3- Famille bHLH (TWIST)

La famille bHLH (*Basic helix-loop-helix*) est une famille de facteurs de transcription. Les protéines de classe I (E12 et E47), de classe II (TWIST1 et TWIST2) et de classe V (ID1-4, *inhibitors of differentiation*) sont impliqués dans la TEM induite par le TGF- β ^{123,124,135,147}. Les protéines de classe I et II agissent en homodimères ou en hétérodimère (classe I et II dimérisés), alors que celles de classe V sont incapable de se lier à l'ADN, et agissent en tant que dominant négatif des protéines de classe I et II en se dimérisant avec elles^{123,147,148}.

Les bHLH de classe I (E12 et E47) sont codés par le même gène (*E2A*)¹⁴⁷, et répriment l'expression de *CDH1* en se liant sur les E-Box. Une surexpression de E12 ou E47 entraîne une diminution de l'expression de E-CADHERINE ainsi qu'une augmentation de l'expression de la VIMENTINE et de la FIBRONECTINE et promeut l'invasion et la migration^{148,149}. Dans des cellules MDCK, la surexpression de E47 entraîne la diminution de l'expression de protéines des desmosomes, et induit celle de N-CADHERINE et d'INTEGRINE α 5, sans qu'on en connaisse le mécanisme¹³⁰.

En ce qui concerne les bHLH de classe II, TWIST1 est impliquée dans la TEM dans de nombreux modèles^{41,123,124,135}. Il a été montré notamment au cours du développement embryonnaire qu'elle est essentielle à la TEM dans la formation du tube neural chez la drosophile¹⁵⁰ et qu'une mutation du gène *TWIST1* est impliquée dans une malformation du

palais, due à une absence de TEM au cours du développement¹⁵¹. De plus, une surexpression de TWIST1 ou 2 entraîne une diminution de l'expression de E-CADHERINE, OCCLUDINE et CLAUDINE7 chez la souris⁵². Une expression ectopique de TWIST1 peut induire une TEM dans des cellules épithéliales mammaires immortalisées (HMLE)¹⁵², et une TEM partielle dans des cellules mammaires épithéliales primaires⁵², alors que TWIST1 ou 2 coopèrent avec RAS (voie MAPK) pour induire une TEM très avancée dans des cellules épithéliales mammaires MCF10A¹⁵³. TWIST1 peut induire l'expression de N-CADHERINE dans des cellules de cancer de la prostate¹⁵⁴, et l'expression directe de PDGFR α (*Platelet derived growth factor receptor α*) ce qui permet ensuite la formation de spécialisations membranaires impliquées dans l'invasion appelées invadopodes, dans des cellules de tumeurs mammaires murines¹⁵⁵. TWIST1 peut également modifier le contexte épigénétique (*cf.* Chapitre 2) des promoteurs auxquels elle se lie : elle peut ainsi réprimer l'expression de *CDH1* et activer l'expression de *CDH2* (gène codant pour la N-CADHERINE)¹⁵⁶. TWIST1 peut également induire l'expression de BMI1 (B lymphoma Mo-MLV insert region 1 homolog) puis coopérer avec PRC1 (*Polycomb repressive complex 1*) (*via* BMI1) et PRC2 (*Polycomb repressive complex 2*) pour réprimer l'expression de *CDH1* dans des cellules de cancer de la tête et du cou¹⁵⁷.

Enfin, les bHLH de classe V sont des inhibiteurs des classe I et II. L'expression ectopique de ID2 ou ID3 empêche en partie la TEM induite par le TGF- β ¹⁴⁸. Leur expression est inhibée par le TGF- β *via* la voie SMAD. Cette voie induit d'abord l'expression de *ATF3*, puis *ATF3* se lie au complexe SMAD3/SMAD4 pour inhiber l'expression des *ID1-4*¹⁵⁸.

1.2.4- Autres facteurs de transcription inducteurs de la TEM

La stimulation cellulaire par le TGF- β entraîne également l'expression du facteur de transcription HMGA2 (*High mobility group A2*), *via* la voie SMAD. Ce dernier est ensuite capable d'activer la transcription de *SNAI1*, *SNAI2* et *TWIST1*^{121,159,160}.

Le facteur de transcription BRACHYURY a également été associé à la TEM dans des cellules cancéreuses humaines, sa surexpression entraînant un phénotype mésenchymateux et son extinction un phénotype épithélial¹⁶¹.

1.3- Régulation par épissage alternatif et post-transcriptionnelle de la TEM induite par le TGF- β

La TEM est largement régulée par épissage alternatif. La stimulation cellulaire par le TGF- β entraîne l'extinction des protéines ESRP 1 et 2 (*Epithelial splicing regulatory factor*), qui sont des régulateurs de l'épissage exprimés spécifiquement dans les cellules épithéliales, par l'intermédiaire de ZEB1¹⁶². L'extinction des ESRP entraîne un changement d'épissage de certaines protéines régulant la TEM¹⁶³⁻¹⁶⁵. La forme épithéliale du FGFR2 (*Fibroblast growth factor receptor 2*) (IIIb) devient la forme mésenchymateuse (IIIc), ce qui rend les cellules sensibles au FGF2 (*Fibroblast growth factor 2*) qui potentialise l'induction de la TEM par le TGF- β ¹⁶³⁻¹⁶⁵. La rho GTPase RAC1 va se trouver sous l'isoforme RAC1B qui est une forme plus active et augmente ainsi la mobilité des cellules tumorales^{122,166-168}. SCRIB, protéine impliquée dans les jonctions adhérentes, est également régulée par ce mécanisme. Son isoforme mésenchymateuse n'est plus localisée au niveau de la membrane¹⁶⁹. Enfin, il y a également un changement d'épissage de CD44 (*Cluster of differentiation 44*), qui passe de CD44V à CD44S. Ce dernier est capable d'activer la voie AKT, et est nécessaire à la TEM dans des tumeurs mammaires chez la souris¹⁷⁰.

Au niveau post-transcriptionnel, les ARN messagers (ARNm) des gènes *ZEB* et *SNAI1/2* sont post-transcriptionnellement réprimés par des ARN non codants : la famille des micros RNA (*miR*)-200 et *miR*-205. Ainsi, l'expression forcée de *miR*-200 suffit à empêcher la TEM induite par le TGF- β ¹⁷¹⁻¹⁷³. Il existe une boucle de rétrocontrôle négatif entre les protéines ZEB et *miR*-200 puisque le promoteur de *miR*-200 contient des E-Box et son expression est donc réprimée par les protéines ZEB et SNAIL^{163,174}. Les ARNm de *SNAI1/2* sont aussi ciblés par le *miR*-34, empêchant l'expression des protéines SNAIL1/2. Il existe également une boucle de rétrocontrôle négatif puisque SNAIL1/2 peuvent réprimer la transcription de ce miR⁸.

L'expression de *HMGA2* est inhibée par l'expression du miR *LET-7* dans des cellules de carcinome du pancréas et par le *miR*-365 dans des cellules d'adénocarcinome du poumon¹²³.

1.4- Régulation post- traductionnelle de la TEM induite par le TGF- β

La TEM est un phénomène finement régulé, et de nombreux mécanismes interviennent au niveau post-traductionnel notamment sur les EMT-ATFs.

SNAIL1 peut être régulé par phosphorylation par GSK3 β (*glycogen synthase kinase 3 β*) au niveau des Sérines (S) 97 ou 101, ce qui facilite sa relocalisation cytosolique, ou des S108, 112, 116 ou 120 ce qui va entraîner son ubiquitination et sa dégradation par le protéasome¹⁷⁵. L'interaction de SNAIL1 avec GSK3 β est empêchée par son interaction avec LOXL2 et LOXL3 (*lysyl oxidase-like 2 et 3*), ces deux protéines augmentent donc la stabilité de SNAIL1^{176,177}. Cette dernière peut également être phosphorylée au niveau de la S11 par PKD1 (*protein kinase D1*)¹⁷⁸, ce qui facilite sa relocalisation cytosolique, ou par PAK1 (*p21 activated kinase 1*) sur la S246 ou par LATS2 (*large tumour suppressor 2*) sur sa Thréonine (T) 203 ce qui entraîne son maintien dans le noyau et augmente donc son activité^{179,180}. SNAIL1 peut également être dégradé par une E3 ubiquitine ligase FBXO11 (*F-box only protein 11*), qui est activée lorsque SNAIL1 est phosphorylée sur sa S11 par PKD1¹⁸¹. Cette protéine peut aussi être stabilisée, dans des conditions d'hyperglycémie, par O-N-acétylglucosaminylation (O-GlcNac)¹⁸². En ce qui concerne SNAIL2, P53 peut induire sa dégradation en le recrutant avec une E3 ubiquitine ligase : MDM2 (*murine double minute 2*)¹⁸³.

L'activité de répression de la transcription de ZEB2 peut être atténuée par une sumoylation par PC2 (*Proprotein convertase 2*)¹⁸⁴.

Le bHLH de classe I E47 peut, lui, être régulé par phosphorylation. Sa phosphorylation par 3PK (*MAPK-activated protein kinase 3*) ou MAPKK2 (*Mitogen-activated protein kinase kinase 2*) entraîne une diminution de son activité transcriptionnelle¹⁸⁵ alors que sa phosphorylation par la MAPK p38 entraîne sa dimérisation avec MYOD (*Myogenic differentiation 1*) et l'activation de la transcription de gènes spécifiques¹⁸⁶. E47 peut également être phosphorylée par ERK induisant son ubiquitination et sa dégradation¹⁸⁷.

2- Autres modes d'induction de la TEM

Il existe d'autres modes d'induction de la TEM, par d'autres stimulations cellulaires. Les mécanismes d'induction qui en découlent peuvent être similaires à ceux induits par le TGF- β , ou différents. Lorsque les voies de signalisation induites sont différentes de celles induites par le TGF- β , elles peuvent néanmoins coopérer avec ces dernières pour induire l'expression des mêmes gènes.

2.1- Le TNF- α

La stimulation cellulaire par le TNF- α peut participer à la TEM, en coopération avec d'autres stimulations comme avec le TGF- β par exemple. Il a été montré en effet que le TNF-

α permet la stabilisation et le maintien de la localisation nucléaire de SNAIL1 en limitant son interaction avec GSK3 β , car cette dernière est phosphorylée par AKT, dans des cellules de cancer colorectal¹⁸⁸. L'importance de GSK3 β et de la β -CATENIN a également été montrée dans l'induction de la TEM par le TNF- α dans des cellules de carcinome hépatocellulaire¹⁸⁹. Le TNF- α entraîne la phosphorylation de GSK3 β également en activant la voie NF κ B¹⁹⁰.

De plus, le TNF- α coopère avec le TGF- β pour l'induction de la TEM *via* l'activation de la protéine TAK1. Les deux cytokines sont capables, de manière dépendante de cette protéine d'entraîner différentes voies de signalisations aboutissant à la TEM comme JNK, P38 MAPK, ERK, NF κ B et SMAD¹⁹¹.

2.2- Induction de la TEM par l'EGF

L'EGF est à l'origine de la TEM dans différents modèles de cellules cancéreuses, le plus souvent dans des cancers mammaires où il est montré qu'il entraîne l'expression des EMT-ATFs¹⁹²⁻¹⁹⁴. Les récepteurs à l'EGF sont capables d'induire de nombreuses voies de signalisations impliquées dans la TEM. Dans différentes lignées de cancer du sein, l'EGF active les voies PI3K/AKT ou ERK¹⁹⁵ ; il active également la voie SMAD dans la lignée de cancer du sein MCF7 (*Michigan cancer foundation 7*)¹⁹⁶. Ce facteur de croissance coopère également avec le TGF- β en augmentant l'activité de SHP2 (*SRC homology 2 domain containing phosphatase 2*), une protéine similaire à la protéine SHC qui peut activer ERK¹⁹⁷.

2.3- Induction de la TEM par d'autres facteurs de croissance

D'autres facteurs de croissance que le TGF- β sont capables d'induire la TEM, dans différents contextes, souvent *via* la voie PI3K/AKT et la voie ERK après activation d'un RTK (Récepteur tyrosine kinase)¹²³, mais aussi par d'autres mécanismes.

Le FGF est nécessaire à l'induction de la TEM au cours du développement, pendant la gastrulation et la formation de la crête neurale notamment¹⁹⁸⁻²⁰⁰. Il est également possible d'induire une TEM par un traitement au FGF dans des cellules de carcinome de la prostate. On observe notamment une expression de SNAIL2 et MMP13 ainsi qu'une déstabilisation des desmosomes^{43,201}.

L'HGF (*Hepatocyte growth factor*) agit à travers la voie MAPK/ERK et induit la transcription de *SNAI1* ou *SNAI2* suivant le type cellulaire, en permettant la fixation du facteur de

transcription EGR1 sur leur promoteur^{123,202}. Il induit également la dissociation des desmosomes⁴³.

IGF1 (*Insuline growth factor 1*) peut induire la TEM dans différentes lignées cellulaires, comme des cellules épithéliales mammaires ou des cellules de cancer de la prostate^{203,204}. L'induction de la TEM dans ces cellules s'accompagne de l'activation des voies MAPK/ERK, PI3K/AKT et NFκB, qui entraînent l'expression de SNAIL1 et ZEB1. On remarque également que le récepteur à l'IGF1 forme un complexe avec la E-CADHERINE. Ce complexe se dissocie lors de la liaison avec son ligand IGF1 ce qui entraîne une augmentation de la mobilité des cellules de cancer du colon²⁰⁵.

De manière similaire et *via* l'activation de RTK, le PDGF (*Platelet derived growth factor*) et le VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) sont également capables d'induire la TEM dans différentes lignées cellulaires cancéreuses ou non^{206,207}.

2.4- Autres signaux extracellulaires d'induction de la TEM

Lorsqu'une protéine de la famille WNT se lie à son récepteur FRIZZLED, cela résulte en l'inhibition de la GSK3β par la voie WNT canonique, et donc la stabilisation et l'accumulation nucléaire de SNAIL1 notamment. La voie WNT coopère donc avec d'autres voies d'induction pour induire et maintenir une TEM²⁰⁸⁻²¹⁰.

La signalisation de HEDGEHOG induit l'expression de SNAIL1 et la perte de la E-CADHERINE *via* l'expression du facteur de transcription GLI1 (*Glioma associated oncogene 1*) dans des cellules épithéliales de rein de rat^{211,212}. De la même manière, l'activation du récepteur NOTCH par ses ligands DELTA-LIKE ou JAGGED participe à l'induction de la TEM notamment en induisant l'expression de SNAIL2^{213,214}. Le blocage de la voie NOTCH dans des cellules d'adénocarcinome de poumon permet à ces cellules en TEM de redevenir plus épithéliales et moins invasives²¹⁵.

D'autres facteurs présents notamment dans le contexte tumoral, induits par la tumeur ou le microenvironnement tumoral sont impliqués dans l'induction d'une TEM, comme l'hypoxie et son facteur de transcription associé HIF1α (*hypoxia inducible factor 1α*), ou les interleukines 6 ou 8 (cf III- TEM et pathologies 2.1- Induction des cellules cancéreuses en TEM)²¹⁶⁻²¹⁸.

Les mécanismes d'induction de la TEM sont résumés dans la **Figure 8**.

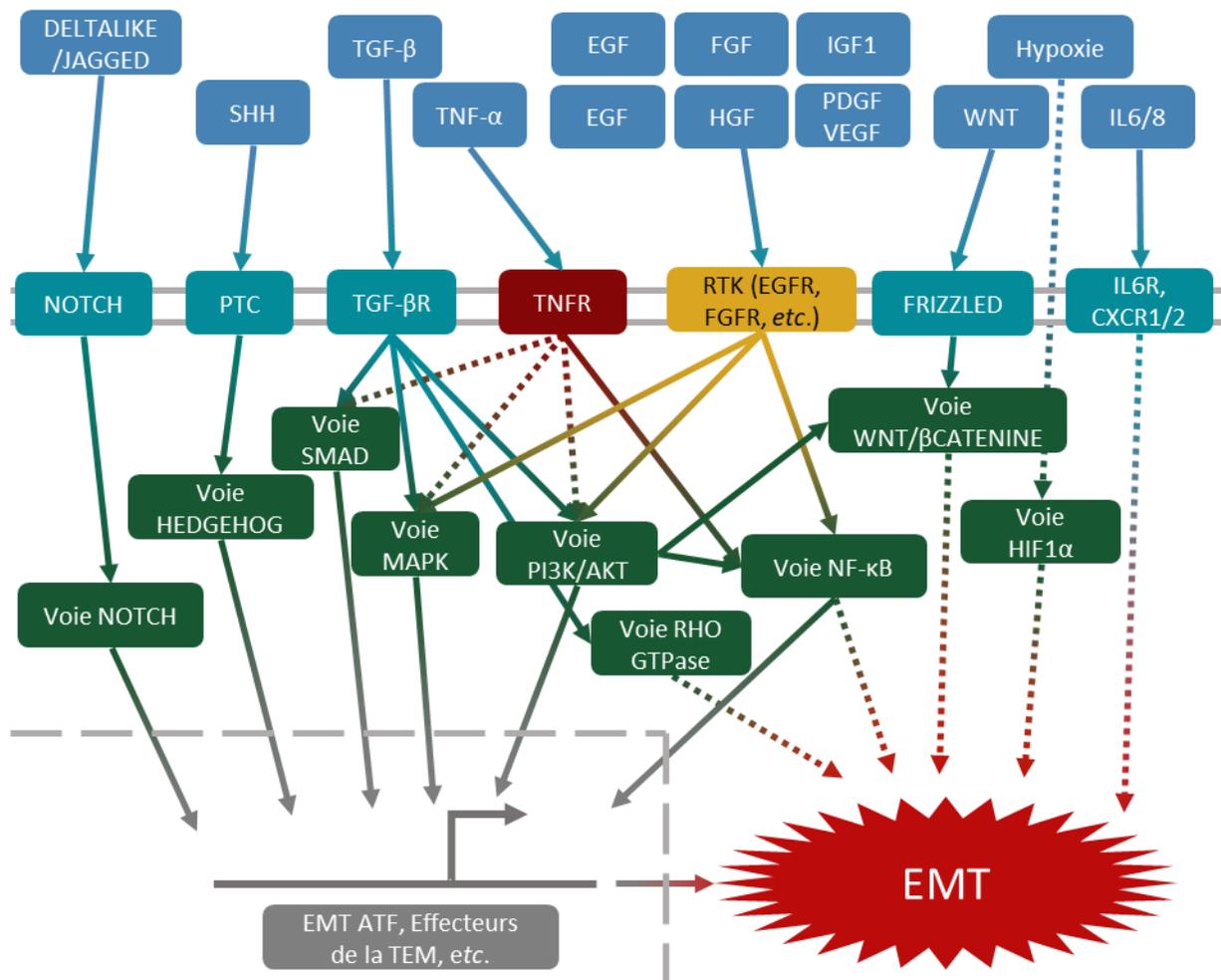


Figure 8 : Signalisation cellulaire de la TEM.

L'activation de la TEM peut résulter de l'activation simultanée ou non de nombreuses voies de signalisations cellulaires (NOTCH, HEDGEHOG, SMAD, MAPK, PI3K/AKT, RHO GTPase, NF-κB, WNT/βCATENINE, HIF1α). Ces voies de signalisation sont activées par la liaison de récepteurs cellulaires par leurs ligands spécifiques, ou par un environnement pauvre en oxygène. Il en résulte l'induction d'un phénotype mésenchymateux, en passant éventuellement par la régulation transcriptionnelle d'EMT ATFs ou d'effecteurs de la TEM.

III- TEM et pathologies

En plus de son rôle fondamental au cours du développement, la TEM est également au cœur de plusieurs pathologies, principalement les fibroses (TEM de type II) et les cancers (TEM de type III).

1- La fibrose

Les fibroses sont des maladies dégénératives chroniques qui aboutissent à la perte de fonction d'un organe jusqu'à son dysfonctionnement total, car le tissu de ce dernier n'est plus fonctionnel et devient fibreux : les cellules le constituant sécrètent trop de collagène pour que le tissu soit fonctionnel⁸.

Il y a débat sur l'implication de la TEM dans la fibrose du rein. En effet, d'une part SMAD3 est nécessaire à l'induction de cette fibrose^{219,220}, mais d'autre part, rien ne montre que ce sont bien les cellules épithéliales du rein qui sécrètent le collagène responsable de celle-ci, et il est montré que ces cellules ne gagnent pas en capacités migratoires^{221,222}. Il est montré finalement que les cellules épithéliales de rein subissent bien une TEM partielle qui est nécessaire pour le recrutement des cellules mésenchymateuses dérivées de la moelle osseuse et des fibroblastes qui vont eux sécréter le collagène responsable de la fibrose²²³⁻²²⁵.

Les principales stratégies de traitement des fibroses sont alors dirigées contre l'induction de la TEM, en essayant de bloquer principalement la voie du TGF- β qui est l'une des principales causes de ces pathologies⁸.

2- Les cancers

L'implication de la TEM dans les cancers a été beaucoup controversée, mais il semble de plus en plus évident que son rôle est central, non pas dans le développement des tumeurs mais dans l'agressivité de celles-ci. C'est pourquoi la TEM est un axe important de recherche de traitements anti-cancéreux aujourd'hui, l'agressivité étant le principal facteur de mauvais pronostic. Cette agressivité peut se manifester sous plusieurs formes : la résistance aux traitements, l'échappement au système immunitaire et la formation de cellules souches cancéreuses et de métastases notamment. L'implication de la TEM dans les cancers a été décrite dans de nombreuses revues récemment²²⁶⁻²²⁸.

L'analyse des cellules tumorales circulantes (CTCs) est un bon moyen de montrer l'importance de la TEM dans les cancers : les CTCs de cancer du sein expriment des gènes épithéliaux et mésenchymateux, elles sont engagées dans la TEM à des degrés très variés²²⁹.

2.1- Induction des cellules cancéreuses en TEM

De nombreux facteurs extra-cellulaires capables d'induire les cellules cancéreuses en TEM sont présents dans le microenvironnement tumoral. Ils ont deux origines principales : l'inflammation²³⁰ et l'hypoxie²³¹.

L'inflammation au niveau de la tumeur se caractérise par la présence de cellules immunitaires comme des MDSC (*Myeloid-derived suppressor cells*) et des macrophages qui sécrètent des facteurs de croissance (TGF- β , HGF²³⁰) et des cytokines (TNF- α , IL(*Interleukin*)-1, IL-6 et IL-8) capables d'induire les cellules cancéreuses en TEM²³²⁻²³⁴. Il existe une boucle

de rétrocontrôle positif car SNAIL1 est capable d'induire l'expression de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-1, IL-6 et IL-8²³⁵. De manière intéressante, il a été montré dans des tumeurs spontanées de la peau chez la souris que l'on retrouve un fort infiltrat de macrophages au niveau des zones les plus mésenchymateuses de la tumeur⁷.

Lorsque la tumeur grossit, l'oxygène est moins accessible pour les cellules tumorales, et certaines se trouvent transitoirement en hypoxie. Il a été montré que le FT HIF1- α , associé à l'hypoxie, peut induire directement l'expression de *SNAIL1*²³⁶. L'induction de la TEM par hypoxie dans les tumeurs semble également dépendante du TGF- β et de la formation de ROS (*Reactive oxygen species*)²³⁷.

2.2- Résistance aux traitements

Des patientes atteintes de cancers du sein résistants aux chimiothérapies présentent un nombre de CTCs plus important et plus mésenchymateuses que les patientes qui ont bien répondu aux traitements. Cela permet de mettre en évidence l'implication de la TEM dans la résistance aux traitements anti-cancéreux²³⁸. D'autres équipes ont montré une implication de la TEM dans des résistances aux chimiothérapies dans des cancers du pancréas et du sein^{239,240}.

Au niveau mécanistique, les EMT-ATFs sont capables d'induire l'expression de gènes des systèmes de réponse aux dommages de l'ADN qui peuvent compenser les effets des chimio- et radiothérapies^{241,242}. SNAIL1 et TWIST1 entraînent également une surexpression des transporteurs ABC (*Adenosine triphosphate binding cassette*), qui sont responsables de résistances multiples aux chimiothérapies. Il a été montré que TWIST1 se fixe directement sur le promoteur des gènes des transporteurs *ABCC4* et *C5* dans un modèle de cancer du sein²⁴³. Enfin, dans des cancers du sein HER2 (*Human EGF receptor 2*) positif, la surexpression de *miR-21* entraîne une résistance aux chimiothérapies et immunothérapies dirigées contre HER2 *via* l'activation de la voie PI3K/AKT et l'induction de la TEM²⁴⁴.

2.3- Echappement au système immunitaire

L'échappement au système immunitaire pendant la TEM a été détaillé récemment par Terry *et al.* dans une revue²⁴⁵.

Des cellules de mélanome de souris, exprimant SNAIL, sont responsables de l'émergence de LT_{reg} (Lymphocytes T régulateurs) exprimant FOXP3, protéine immunosuppressive,

lorsqu'elles sont co-cultivées avec des cellules de rate. L'émergence de ces LT_{reg} est due à la sécrétion de TGF- β par les cellules cancéreuses. L'extinction de SNAIL dans ces cellules a réduit la prolifération de LT_{reg} en co-culture et l'invasion des cellules de mélanome²⁴⁶.

La TEM dans les cellules cancéreuses peut être à l'origine d'une inhibition de la formation de la synapse immunologique entre ces dernières et les cellules immunitaires comme les LTC (Lymphocytes T cytotoxiques) et les cellules NK (*Natural killer*) due en partie à une diminution de l'expression du CMH (Complexe majeur d'histocompatibilité) de classe I^{247,248}. De même, l'induction de la TEM dans des cellules MCF-7 de cancer du sein entraîne la diminution de la lyse de ces cellules cancéreuses par les LTC²⁴⁷. La voie du TGF- β est impliquée dans ce mécanisme, car l'inhibition des TGF- β RI dans ces cellules les sensibilise aux LTC²⁴⁹. La TEM peut aussi rendre les cellules cancéreuses résistantes à la mort induite par les cellules NK en modulant notamment la formation de la synapse immunologique, bien que les mécanismes ne soient pas encore bien compris. Dans certains modèles (cellules de cancer du côlon), la TEM semble rendre les cellules plus sensibles à la mort induite par les cellules NK²⁴⁵.

La TEM permet également aux cellules cancéreuses de surexprimer PD-L1 (*Programmed-death ligand 1*), qui permet aux cellules cancéreuses d'inactiver les cellules immunitaires qui possèdent le récepteur associé PD1 (*Programmed death 1*). En effet, l'induction de la TEM par un co-traitement TGF- β et TNF- α dans des cellules de cancer du poumon non à petites cellules entraîne une surexpression de PD-L1 qui permet aux cellules tumorales d'inactiver les lymphocytes T et d'échapper au système immunitaire²⁵⁰. ZEB1 participe et est nécessaire à l'expression de PD-L1 dans des cellules MCF7 de cancer du sein et dans un modèle murin d'adénocarcinome pulmonaire^{251,252}.

2.4- Formation de métastases

Il existe de nombreuses études montrant l'importance de la TEM dans la formation de métastases, basées sur des xénogreffes de lignées cellulaires dans des souris immunodéficientes et/ou la surexpression non physiologique de protéines induisant la TEM comme les EMT-ATF²⁵³. Deux études utilisent un modèle physiologique d'expression inductible et traçable de *SNAI1* ou *SNAI2* dans des souris développant spontanément des tumeurs mammaires. Ils ont montré que SNAIL1/2 sont surexprimés au niveau de la tumeur primaire mais pas dans les cellules cancéreuses disséminées dans la moelle osseuse. SNAIL1/2 semblent donc importantes dans l'invasion des tissus locaux et des vaisseaux, mais pas dans

la colonisation métastatique. Ils ont mis en évidence que SNAIL1/2 sont nécessaires à la formation de métastases pulmonaires par inhibition de l'expression de ces protéines dans les tissus mammaires^{115,254}.

Cependant, l'implication de la TEM dans la formation de métastases reste un sujet controversé. Deux études dans les cancers du sein et du pancréas proposent que la TEM n'est pas nécessaire à la formation de métastases en montrant, entre autre, d'une part que les cellules métastatiques de cancer du sein n'expriment pas la VIMENTINE²³⁹ et d'autre part que la perte d'expression de *SNAIL1/2* n'empêche pas la formation de métastases dans les cancers de la prostate²⁴⁰. Seulement, d'autres facteurs de transcription peuvent prendre le relais des protéines SNAIL (famille ZEB, bHLH) dans les cancers de la prostate. L'absence d'expression de la VIMENTINE dans les cellules métastatiques de cancer du sein peut également montrer que les cellules sont dans un état de TEM intermédiaire ou ont subi une TME. En somme, ces travaux ne suffisent pas à exclure totalement la TEM du processus métastatique⁸. Ainsi, il a été montré dans un modèle murin de tumeurs mammaires spontanées, que quelques cellules subissent une TEM, envahissent les tissus environnants, envahissent ensuite les vaisseaux sanguins puis s'établissent dans d'autres organes : poumons, nœuds lymphatiques et foie. Une fois dans cet organe, les cellules subissent une TME pour réacquies un phénotype plus épithélial avant de pouvoir former une métastase²⁵⁵.

Comme dit précédemment, une TEM partielle, procurant aux cellules un mélange de caractéristiques épithéliales et mésenchymateuses semble faciliter l'apparition de métastases, en promouvant la migration collective de cellules alors que les cellules très mésenchymateuses migrent plutôt de manière solitaire^{7,63}. Ainsi la co-expression de marqueurs épithéliaux et mésenchymateux est de mauvais pronostic dans de nombreux cancers (notamment sein, foie et cerveau)²⁵⁶⁻²⁵⁸.

2.5- Cellules souches cancéreuses

Les cellules souches cancéreuses (CSC) sont des cellules cancéreuses aux caractéristiques souches, donc au fort pouvoir clonogénique⁶³. Elles sont par définition à l'origine d'une tumeur et/ou capables d'en former une, caractérisée par un phénotype CD44^{high}/CD24^{low}, ou par une forte expression d'ALDH1 (*Aldehyde dehydrogenase 1*). Ces caractéristiques sont générées lors de la TEM dans des cellules de cancer du sein^{253,259,260}. Les facteurs de transcription exprimés dans les cellules souches sont également fréquemment exprimés dans

les cellules en TEM (OCT4 et NANOG notamment), les deux phénotypes sont donc liés mécaniquement²⁶¹. Dans des cancers du pancréas, la TEM est liée à des caractéristiques de cellules souches car ZEB1 réprime l'expression de miRs inhibiteurs du phénotype souche, entraînant le maintien du phénotype souche dans ces cancers²⁶². SNAIL1 est également responsable de la division symétrique des cellules souches de cancer colorectal, augmentant ainsi le pool de ces cellules souches²⁶³.

Cependant, des cellules tumorales épithéliales, peuvent aussi avoir des capacités tumorigéniques, la TEM n'est donc pas toujours impliquée dans la formation de CSC^{63,264}. Cela explique également pourquoi les cellules les plus mésenchymateuses ne sont pas toujours capables de former des métastases. Enfin, dans un modèle de tumeurs spontanées de la peau chez la souris, les cellules tumorales ayant un phénotype mixte épithélial/mésenchymateux sont les plus à même de reformer l'ensemble des différentes cellules tumorales de la première tumeur lorsqu'elles sont réinjectées en sous-cutanée, comparé aux cellules les plus épithéliales ou les plus mésenchymateuses⁷.

2.6- Thérapeutiques anti-cancéreuses ciblant la TEM

La TEM étant un phénomène pouvant être induit par de multiples voies parallèles, parfois redondantes et souvent induites en même temps, le ciblage thérapeutique de ce phénomène doit s'effectuer à plusieurs niveaux. Ainsi, le ciblage des stimuli extracellulaires, des EMT-ATF, et des effecteurs de la TEM semble être une bonne stratégie²⁶⁵.

Concernant le ciblage des stimuli extracellulaires, il existe des essais cliniques testant l'efficacité d'une molécule inhibitrice du TGF- β RI (LY2157299) dans des cancers du pancréas, des hépatocarcinomes cellulaires, des gliomes et des glioblastomes²⁶⁵⁻²⁶⁸ ainsi qu'un anticorps anti-TGF- β (fresolimumab) en combinaison avec la radiothérapie dans des cancers du sein métastatiques²⁶⁹. De plus, un inhibiteur du récepteur à l'EGF (Erlotinib) est approuvé pour le traitement de cancers du poumon avancés²⁷⁰. L'induction de la TEM par hypoxie a également été ciblée, au niveau préclinique seulement. Une molécule inhibitrice indirecte de l'activité de HIF1 α permet de diminuer la formation de métastases dans un modèle de dissémination tumorale chez la souris²⁷¹.

Les deuxièmes cibles pour empêcher la TEM sont les EMT-ATFs. L'inhibition directe de ceux-ci semble compliquée, et il manque d'études à ce sujet. Cependant, plusieurs molécules

sont capables de les inhiber indirectement, comme un inhibiteur de CDK4/6 ou un inhibiteur de STAT3^{265,272-274}.

Les facteurs de transcription de la TEM sont régulés épigénétiquement (*cf.* Chapitre II), ainsi des thérapies épigénétiques sont développées pour empêcher la TEM dans les cellules cancéreuses, ciblant la méthylation du promoteur de *miR-200* par exemple, ou les nombreuses enzymes méthyltransférases ou déméthylases d'histones recrutées en même temps que les EMT-ATFs au niveau des promoteurs des gènes cibles²⁶⁵. Enfin, des immunothérapies sont en développement dirigées contre les EMT-ATFs. Il a été montré qu'un vaccin anti-TWIST1 est efficace chez la souris et empêche la croissance tumorale ainsi que la formation de métastases dans un modèle de tumeurs mammaires 4T1²⁷⁵. Un vaccin dirigé contre le facteur de transcription BRACHYURY (FT impliqué dans la TEM) est en tests cliniques de phase I et II, dans des cancers avancés et notamment dans des chordomes (NCT02383498)²⁷⁶.

Les troisièmes cibles pour bloquer la TEM sont les protéines mésenchymateuses effectrices de la TEM. De nombreuses stratégies pré-cliniques visent à réexprimer la E-CADHERINE dans les cellules cancéreuses. C'est une stratégie compliquée à mettre en place puisque cette protéine épithéliale a aussi été associée à la croissance plus rapide de certaines tumeurs²⁶⁵. La E-CADHERINE peut être réexprimée dans des lignées cellulaires cancéreuses en ciblant la méthylation de son promoteur ou les modifications des histones au niveau de celui-ci. Notamment, le butyrate de sodium, un inhibiteur de HDAC est en test cliniques et le SAHA (*Suberoylanilide hydroxamic acid*) a été approuvé par l'agence américaine du médicament en 2006 (sous le nom de Vorinostat) pour les traitement de lymphomes cutanés à cellules T^{265,277}. Quelques composés ont également montré un effet anti-invasif et anti-migratoire en ciblant l'expression de VIMENTINE ou de N-CADHERINE dans des modèles cellulaires ou murins²⁶⁵.

Le blocage de la TEM dans les cellules cancéreuses permet de les sensibiliser aux immunothérapies, c'est pourquoi l'association de ces deux stratégies est prometteuse et fait l'objet de nombreux essais cliniques actuellement, avec la combinaison de thérapies anti-TEM et ciblée contre les checkpoint immunitaires (**Tableau 3**). On y trouve des inhibiteurs des TGF- β RI et des anticorps anti TGF- β (dont un anticorps de fusion anti PD-L1 et anti TGF- β)²⁷⁸.

Inhibiteur de Checkpoint	Agent modificateur de la plasticité	Thérapie additionnelle	Type de Cancer	Numero d'essai clinique	Phase
Nivolumab	Galunisertib (Inhibiteur du TGF-βRI)		Tumeurs solides	NCT02423343	I/II
Pembrolizumab	LY3200882 (inhibiteur du TGF-βRI)		Cancers avancés	NCT04158700	I/II
PDR001	NIS793 (α-TGF-β)		Cancers avancés	NCT02947165	I/IB
Durvalumab	Vactosertib (inhibiteur du TGF-βRI)		Tumeurs urothéliales	NCT04064190	II
LY3300054	LY3200882 (inhibiteur du TGF-βRI)	Chimiothérapie, radiothérapie	Tumeurs solides	NCT02937272	I
Bintrafusp alfa (α-PD-L1/TGF-βRII fusion protein)		Gemcitabine, cisplatine	cancers du canal biliaire	NCT04066491	II/III
			cancers du canal biliaire	NCT03833661	II
			cancers du sein HER2+	NCT03620201	I
		Radiations	Cancers du sein HER2- HR+	NCT03524170	I
		Mésylate d'éribuline	Cancers du sein triple négatifs	NCT03579472	IB
			Tumeurs colorectales solides avec instabilité des microsatellites	NCT03436563	IB/II
		Topotecan ou temozolomide	cancers du poumon à petites cellules en rechute	NCT03554473	I/II

Tableau 3 : Résumé des essais cliniques en cours basés sur la combinaison d'une thérapie anti-TEM et d'une thérapie ciblant les inhibiteurs de checkpoint immunitaires. Traduit de Horn et al. ²⁷⁸.

Chapitre II : La régulation Epigénétique de la TEM

Après avoir décrit les principaux mécanismes moléculaires qui régissent la TEM, ce chapitre a pour but de montrer que la régulation épigénétique de ces mécanismes est à l'origine de la plasticité des cellules en TEM.

I- Généralités sur les régulations épigénétiques

La définition de l'épigénétique (littéralement « au-dessus de la génétique ») est souvent sujette à débats. La plus communément proposée étant : Modifications, transmissibles par hérédité, de l'expression des gènes sans altération de la séquence nucléotidique de l'ADN. A cette définition peut être ajouté le caractère réversible des modifications épigénétiques. Plus récemment le fait qu'une modification épigénétique doit avoir un facteur d'initiation du signal et un facteur de maintien de ce signal qui doivent être différents l'un de l'autre est également pris en compte²⁷⁹.

1- Contexte et premières études épigénétiques

L'étude du domaine de l'épigénétique est apparue par la nécessité d'expliquer l'influence de l'acquis sur l'inné, car la génétique classique n'était pas capable d'expliquer les différences de phénotypes à partir du même génotype : cela est flagrant dans la différenciation cellulaire, qui aboutit à des cellules dotées du même génotype mais de phénotypes totalement différents au sein d'un même individu.

Ainsi, la première utilisation moderne du terme épigénétique est attribuée à Conrad Hal Waddington, un embryologiste et généticien britannique, en 1942. Pour lui, l'épigénétique est alors l'étude de l'ensemble des phénomènes permettant d'aboutir à un phénotype à partir d'un génotype²⁸⁰.

L'histoire de l'épigénétique a été résumée dans une revue de la littérature en 2014²⁸¹. Le modèle de l'inactivation du chromosome X chez la souris a été l'un des premiers mécanismes épigénétique mis en évidence. En 1975, deux équipes proposent que des méthylations de l'ADN puissent réprimer l'expression des gènes du chromosome X

inactivé^{282,283}. De plus, l'importance des histones dans la régulation de l'expression des gènes est questionnée depuis 1950 au moins²⁸⁴. L'auteur décrit alors les histones comme étant répresseurs de l'expression des gènes, et que les cellules, possédant des histones différents, auraient un panel d'expression de gènes différents²⁸¹. On est en mesure de dire aujourd'hui que ces conclusions sont inexactes, mais ces travaux sont très en avance sur l'époque. En effet, la découverte plus précise du rôle des modifications post-traductionnelles des histones dans l'expression des gènes se fit de manière progressive, une modification après l'autre depuis 1964 jusqu'à nos jours²⁸¹. D'autres mécanismes de régulation épigénétique ont été décrits beaucoup plus tard. L'activité des ARN non codants a en effet été reliée à l'épigénétique seulement à partir de 2014^{285,286} même si leur implication dans les autres mécanismes épigénétiques a été discutée quelques années avant²⁸⁷.

2- Compaction de la chromatine et expression des gènes

La chromatine est la structure de compaction de l'ADN, ce qui lui permet d'occuper un espace très réduit dans le noyau alors que la longueur de l'ADN décompacté de chaque cellule est d'environ 2 mètres. Cette structure associe alors ADN et protéines notamment au sein d'une unité de base : le nucléosome. Ce dernier est composé de 8 protéines histones, 2 H2A, 2 H2B, 2 H3 et 2 H4 et de 146 paires de bases enroulées autour de ces dernières²⁸⁸. Les histones sont des petites protéines entre 13 et 17kDa environ, qui sont très basiques (entre 20 et 30% d'acides aminés basiques). Leurs charges négatives à pH physiologique leur permettent d'interagir avec les charges positives des groupements phosphates de l'ADN. L'histone H1 est située entre les nucléosomes et se lie à ceux-ci au niveau des sites « d'entrée » et de « sortie » de l'ADN participant à leur stabilité²⁸⁹. La chromatine a donc une structure primaire rappelant celle d'un collier de perle, qui correspond à une fibre de 11 nm de diamètre. Elle est ensuite organisée en structures secondaires plus ou moins compactées : elle peut s'organiser en fibre de 30 nm, correspondant à un enroulement en solénoïde ou en zigzag de la fibre de 11 nm, puis en structure tertiaire, en interagissant avec d'autres fibres de chromatine²⁹⁰ (**Figure 9**).

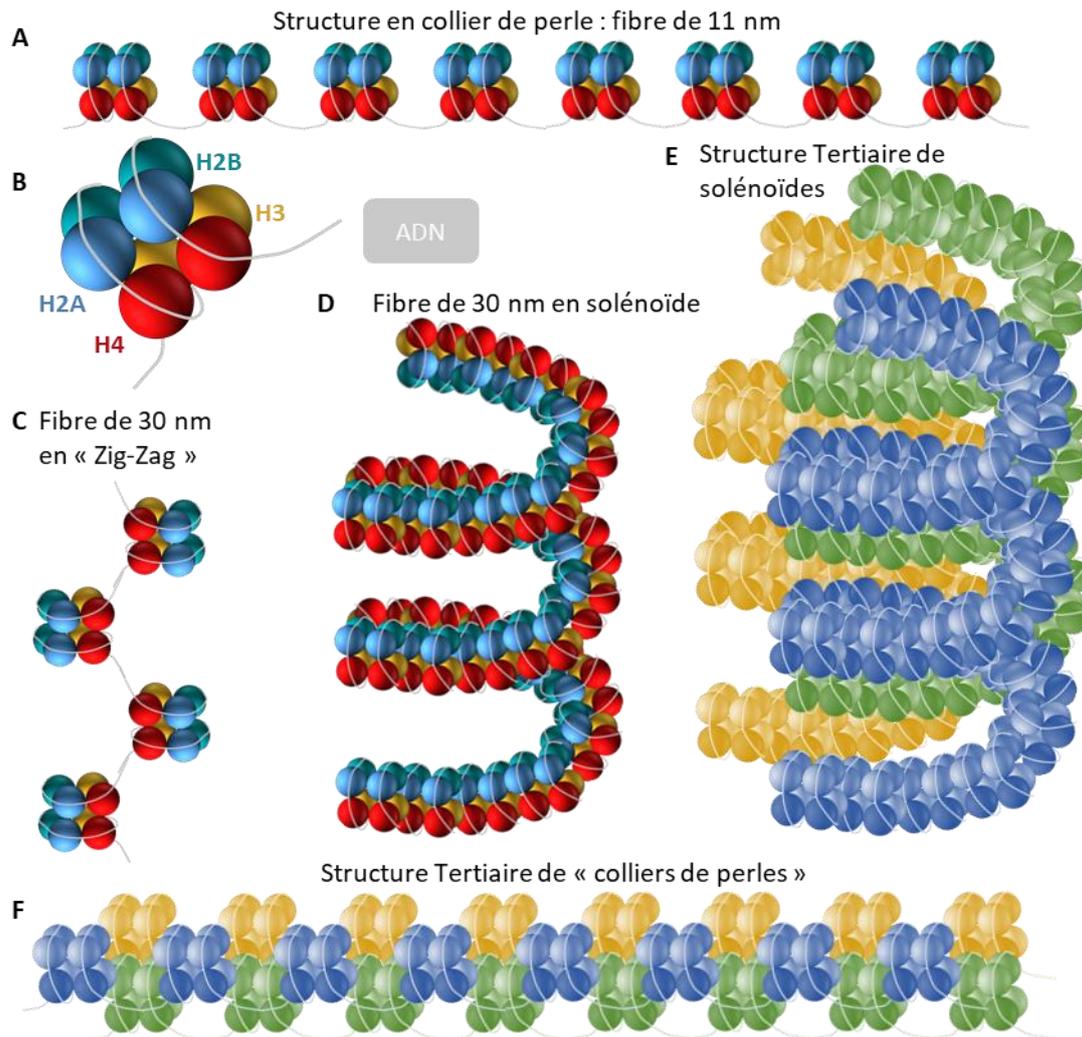


Figure 9 : Différentes structures de la chromatine.

A. Structure de la chromatine en « collier de perle », ou fibre de 11 nm. **B.** Structure schématique du nucléosome. **C.** Fibre de 30 nm de chromatine en « zig-zag ». **D.** Fibre de 30 nm de chromatine en solénoïde. **E.** Structure tertiaire de chromatine, plusieurs molécules d'ADN en solénoïde associées. **F.** Structure tertiaire de la chromatine, plusieurs molécules d'ADN en fibre de 11 nm associées²⁹⁰.

L'état de compaction de l'ADN par le nucléosome influence grandement l'activité d'expression des gènes. Plus l'ADN est compacté, moins il est physiquement accessible par des facteurs de transcription et la machinerie transcriptionnelle. Au contraire, lorsque l'ADN est décompacté, l'expression des gènes est accentuée. Il a été montré notamment que l'ADN décompacté représente 2 à 3% de l'ADN d'une cellule, mais que cela représente environ 90% des séquences liées à des facteurs de transcription²⁹¹. On parle d'euchromatine pour décrire de l'ADN décompacté, qui contient des gènes activement transcrits, et d'hétérochromatine

pour décrire de l'ADN très compacté même en interphase, composé de régions non codantes (hétérochromatine constitutive) et ou de gènes inactifs (hétérochromatine facultative)^{289,292}.

Cette compaction de l'ADN est régulée par la densité de nucléosomes liés à l'ADN, leur stabilité, et leur conformation. Plus il y a de densité de nucléosomes et plus ceux-ci sont stables (et ont donc un *turnover* lent) et moins la chromatine est accessible²⁸⁸. La conformation des différentes protéines histones, en fonction de leurs différentes modifications post-traductionnelles (cf. 3.2- Modifications post-traductionnelles des histones) peut ainsi réguler leur densité et leur stabilité. Les facteurs de transcription jouent également un rôle très important dans l'accessibilité de l'ADN, en pouvant modifier la densité et la stabilité des nucléosomes aux alentours de leurs régions de fixation, *via* notamment le recrutement de modificateurs des histones, ou simplement en interagissant physiquement avec le nucléosome²⁸⁸.

L'accessibilité de l'ADN n'est pas le seul mécanisme qui permet d'induire l'expression des gènes. Par exemple, dans certains cas comme dans l'hématopoïèse, l'expression des gènes peut-être corrélée avec des modifications d'histones habituellement associées avec des gènes inactifs²⁹³.

3- Les différents mécanismes de régulation épigénétique

En plus de modifications des protéines histones et de l'état de compaction de l'ADN, d'autres mécanismes épigénétiques régulent l'expression des gènes : la méthylation de l'ADN et les ARN non codants.

En ce qui concerne la méthylation de l'ADN et les modifications post-traductionnelles des histones, les protéines qui participent à ces modifications sont généralement catégorisées en trois groupes : les protéines « écrivaines » qui installent les modifications (méthylations de l'ADN ou des histones, acétylations, phosphorylations, *etc.*), les protéines « lectrices » qui sont capables de se lier à des modifications spécifiques et de modifier l'expression des gènes au niveau de celles-ci et les protéines « effaceuses » qui suppriment ces modifications (déméthylases, désacétylases, *etc.*). L'ensemble de ces marques à un moment donné constitue alors le paysage épigénétique. On parle également de « code histone » plus localement afin de décrire l'ensemble des modifications des histones au niveau d'un locus qui définissent l'état d'activation de la transcription de ce dernier. Les différentes marques

interagissent entre elles, notamment par le jeu des protéines « lectrices » qui peuvent recruter des protéines « écrivaines » d'autres marques, et participent à l'élaboration de ce code très complexe.

L'histone H3 possède plusieurs variants, H3.1, H3.2 et H3.3, qui, bien que très proches en séquence d'acide aminés, ne sont pas incorporés indifféremment aux nucléosomes. H3.1 et H3.2 sont les variants canoniques de H3, et sont distribués assez uniformément dans le génome. Ils sont incorporés surtout pendant la réplication de l'ADN. En revanche, H3.3 semble incorporé durant tout le cycle cellulaire et est plutôt situé au niveau des zones de transcription actives, mais également au niveau des télomères et du centrosome²⁹⁴. L'accumulation de H3.3 à la place de H3 semble suffisant à maintenir une transcription active^{281,295}.

3.1- Méthylations de l'ADN

L'ADN humain peut-être méthylé sur le carbone 5 des cytosines, au sein des îlots « CpG » (Cytosine, phosphate, Guanosine) (**Figure 10A**). Il a été montré qu'un fort niveau de méthylation au niveau du promoteur d'un gène entraîne généralement une répression de l'expression de ce gène^{296,297}. Ces modifications sont considérées comme plus stables que les modifications des histones et donc généralement peu plastiques, bien que des cycles de méthylation/déméthylation rapides aient déjà été montrés²⁹⁸. Il existe trois niveaux de régulation de la méthylation de l'ADN : la méthylation *de novo*, la maintenance de la méthylation et la déméthylation.

Chez l'homme, deux enzymes sont principalement responsables de la méthylation *de novo* de l'ADN : DNMT3A et DNMT3B (*DNA (Desoxyribonucleic acid) methyltransferase 3 A et B*) (**Figure 10B**). Ces enzymes sont donc capables de méthyler l'ADN au niveau de n'importe quel îlot CpG. Elles peuvent également méthyler l'ADN au niveau du corps des gènes, ce qui est plutôt retrouvé au niveau des gènes activement transcrits, bien que la relation entre méthylation de ces zones et expression de ces gènes ne soit pas expliquée^{296,299}.

Le maintien de la méthylation est en revanche assuré principalement par la méthyltransférase DNMT1 (*DNA methyltransferase 1*). Lors de la mitose, les deux brins d'ADN sont séparés dans les deux cellules filles différentes, si bien que chaque cellule fille se retrouve avec un brin d'ADN méthylé comme dans la cellule mère et un brin d'ADN nouvellement formé non méthylé : on parle d'ADN hémi-méthylé. Ainsi, DNMT1 est capable de méthyler par

symétrie le brin d'ADN nouvellement synthétisé pour maintenir le niveau de méthylation de l'ADN de la cellule mère dans les cellules filles (**Figure 10B**). DNMT1 existe sous une forme auto-inhibitrice. Pour s'activer, l'enzyme a besoin d'un partenaire, une E3 ubiquitine ligase UHRF1 (*Ubiquitin like with PHD and ring finger domains 1*) qui va se lier spécifiquement aux cytosines hémi-méthylées³⁰⁰. Elle peut ubiquitiner l'histone H3 sur la lysine 23, et ainsi entraîner le recrutement de DNMT1, qui méthyle alors le brin d'ADN nouvellement synthétisé³⁰¹⁻³⁰³.

Enfin, la déméthylation active des cytosines de l'ADN est réalisée par les enzymes TET (*Ten-eleven translocation*). Elles vont progressivement oxyder les 5-méthylcytosines (5-mC) en 5-hydroxyméthylcytosines (5-hmC) puis 5-formylcytosine (5-fC) et 5-Carboxylcytosine (5-CaC)²⁹⁶. La 5-fC et la 5-CaC sont ensuite reconnues comme bases anormales et seront remplacées par une cytosine normale par les systèmes de réparation de l'ADN par excision de base (**Figure 10A**). De nombreux travaux montrent que la 5-hmC pourrait avoir un rôle beaucoup plus important dans la régulation de l'expression des gènes qu'un simple intermédiaire de déméthylation des cytosines. En effet, il a été montré que la 5-hmC peut être considérée comme une modification de l'ADN à part entière, avec ses propres rôles, par sa grande stabilité. Cette marque est plutôt associée à des promoteurs actifs, pouvant protéger ceux-ci d'une hyperméthylation notamment³⁰⁴⁻³⁰⁷. La déméthylation de l'ADN peut également être passive, par absence de méthylation de maintien au cours des divisions cellulaires.

La méthylation de l'ADN peut réprimer l'expression des gènes en empêchant la fixation de facteurs de transcription, mais également en recrutant des enzymes qui modifient de manière post-traductionnelle les histones *via* les DNMT ou *via* d'autres protéines qui sont dites « liseuses » des méthylations : les MBD (*Methyl CpG binding domain proteins*)²⁹⁶. La répression de l'expression de gènes par méthylation du promoteur est particulièrement observée dans l'inactivation du chromosome X, les gènes d'empreinte, les gènes spécifiques des lignées germinales et l'extinction de séquences répétées des transposons qui occupent environ la moitié du génome²⁹⁶.

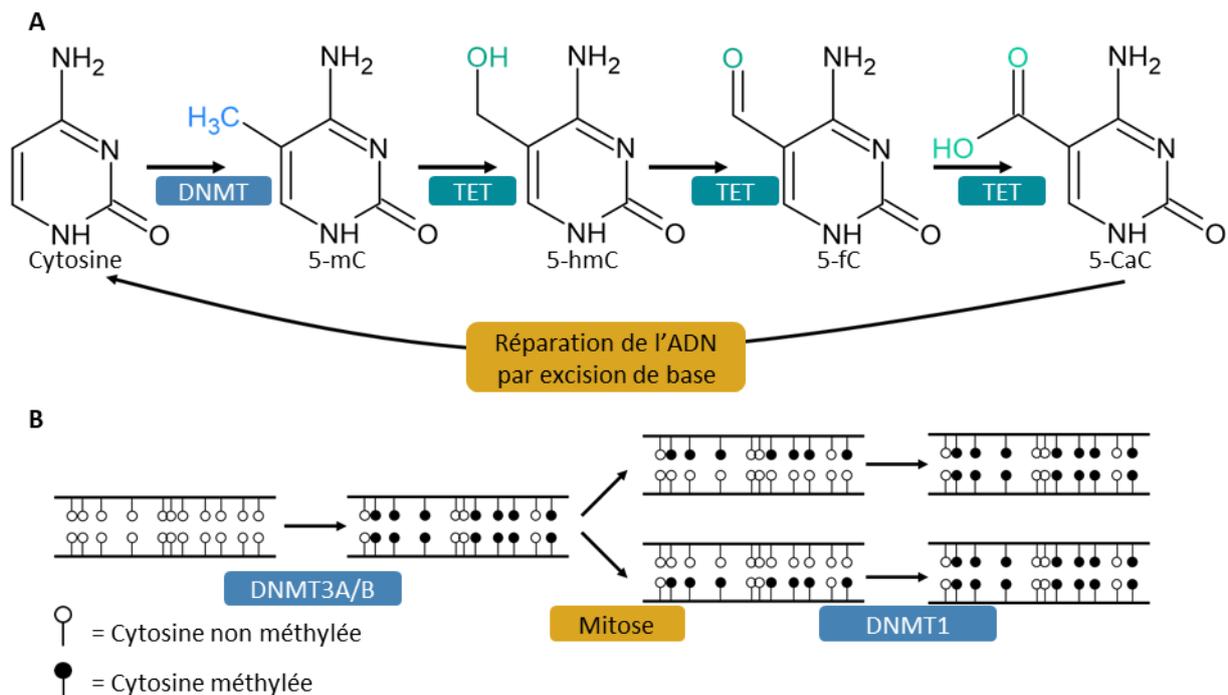


Figure 10 : Mécanismes de méthylation de l'ADN.

A. Mécanismes de méthylation et de déméthylation active de l'ADN par les enzymes DNMT et TET. **B.** Méthylation « de novo » ou méthylation de maintien au cours de divisions cellulaires par les différentes enzymes DNMT.

3.2- Modifications post-traductionnelles des histones

Les modifications post-traductionnelles des histones sont des régulations épigénétiques plus plastiques que la méthylation de l'ADN, les changements d'expression des gènes occasionnés par ces modifications sont donc plus facilement réversibles et adaptables à l'environnement de la cellule. Chaque histone possède une queue N-Terminale, qui n'est pas située à l'intérieur du nucléosome mais plutôt libre vers l'extérieur. C'est principalement au niveau de cette queue que les histones subissent des modifications post-traductionnelles³⁰⁸. Ces modifications peuvent créer des sites d'interaction pour d'autres protéines (facteurs de transcription, DNMT, etc...) ou directement modifier la conformation du nucléosome et donc la compaction de la chromatine, régulant ainsi l'expression des gènes³⁰⁸. Elles apportent une régulation plus complexe que la méthylation de l'ADN, à 5 niveaux : 1) elle fait intervenir les histones et pas seulement la molécule d'ADN, 2) il existe plusieurs types de modifications, 3) la localisation de la modification sur la queue d'histone est importante, 4) le degré de modification (notamment pour la méthylation) l'est également et 5) il existe des interactions entre les différentes modifications post-traductionnelles d'histones¹⁰.

Il existe de nombreuses modifications post traductionnelles des histones, nous allons ici brièvement en faire la liste sans entrer dans toute la complexité qu'elles engendrent dans la régulation de l'expression des gènes.

3.2.1- Méthylations

Nous détaillerons ici un peu plus le rôle des méthylations des histones que les autres modifications, puisque c'est la modification qui concerne les travaux de cette thèse. Ces méthylations interviennent le plus souvent sur les lysines. Elles ne changent pas la charge électrique de l'acide aminé mais sont importantes pour la reconnaissance par d'autres enzymes³⁰⁹, qui sont capables de reconnaître spécifiquement des régions d'histones en fonction de l'état de méthylation de certaines lysines et de la séquence d'acides aminés environnante³¹⁰.

Signalons également que quelques méthylations peuvent intervenir au niveau d'arginines (Arginines 2, 8, 17 et 26 de H3, Arginine 3 de H4 par exemple). Ces méthylations peuvent être simple (Rme1) ou double, et lorsqu'elles sont double symétriques (Rme2s) (méthylation sur les deux atomes d'azote différents) ou asymétrique (Rme2a) (deux méthylations sur le même atome d'azote). L'effet de ces méthylations sur la transcription des gènes est dépendant du résidu méthylié et du type de méthylation (simple, symétrique, asymétrique)^{311,312} (**Figure 11A**).

La méthylation des lysines des histones peut activer ou réprimer la transcription des gènes en aval. Cela dépend de la position et de l'état de méthylation de l'acide aminé : en effet celles-ci peuvent être méthylées une fois (me1) deux fois (me2) ou trois fois (me3) (**Figure 11B**). Parmi les méthylations activatrices de la transcription, on retrouve H3K4, H3K36 et H3K79 alors que dans les méthylations répressives de l'expression, on retrouve H3K9, H3K27 et H4K20 lorsqu'elles sont triméthylées^{313,314}. La présence de méthylations activatrices et répressives sur le promoteur d'un même gène peut permettre une régulation rapide et réversible de l'expression de ce gène, en modifiant l'une ou l'autre de ces marques afin de faire passer rapidement le promoteur d'inactif à actif et inversement³¹⁴. Les méthylations des histones, en plus de la régulation de la transcription, peuvent être impliquées dans l'épissage des ARN ou la réplication, la recombinaison ou la réparation de l'ADN³¹⁰

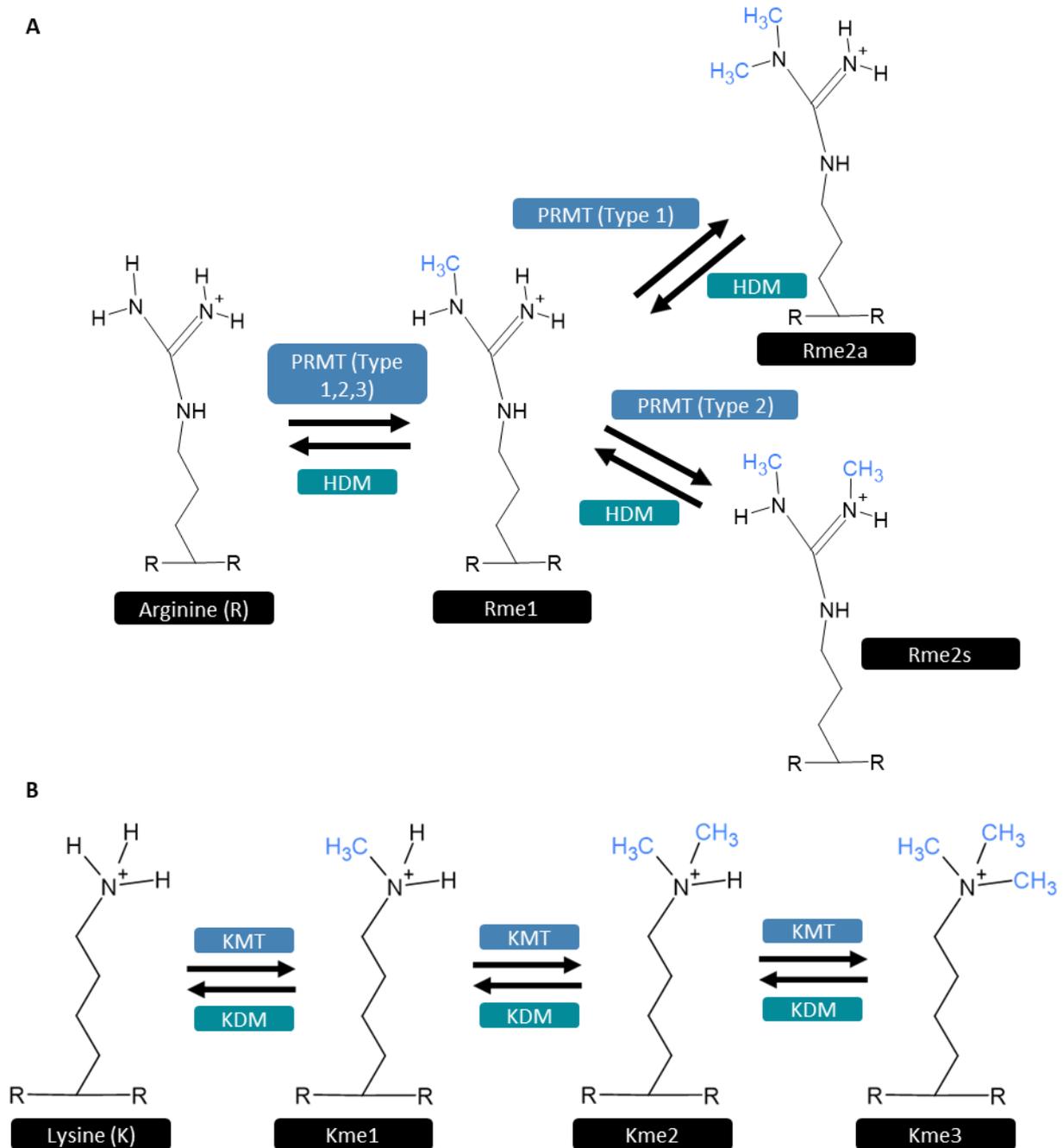


Figure 11 : Méthylation des arginines et des lysines des histones.

A. Schéma de méthylation des arginines des histones. **B.** Schéma de méthylation des lysines des histones.

Les méthylation de lysine d'histones sont catalysées par des enzymes appelées HMT (*Histone methyltransferase*) ou KMT (*Lysine methyltransferase*) car certaines de ces enzymes ne sont pas uniquement spécifiques des histones. Les enzymes catalysant la réaction inverse sont appelées HDM (*Histone demethylase*) ou KDM (*Lysine demethylase*) (**Figure 11B**). Ces enzymes sont en général spécifiques d'une ou quelques lysines données, et d'un niveau de méthylation donné³¹⁴. Les méthylation d'arginine des histones sont, elles, catalysées par des

enzymes appelées PRMT (*Protein arginine methyltransferase*) qui sont de trois types : les type 1 catalysent la méthylation d'arginine mono-méthylées et di-méthylées asymétriques, les type 2 catalysent la méthylation d'arginine mono-méthylées et di-méthylées symétriques et les type 3 qui catalysent la méthylation d'arginine mono-méthylées uniquement³¹⁵ (**Figure 11A**).

La méthylation qui nous intéresse particulièrement dans cette thèse est la méthylation de la lysine 27 de l'histone H3 : H3K27me1, me2 ou me3. De manière générale, plus cette lysine est méthylée et plus la transcription des gènes est réprimée (cf : Chapitre III).

3.2.2- Acylations

L'acylation des histones se fait au niveau des lysines. Cela consiste en l'ajout d'un groupement acyl (il en existe de nombreux, le mieux décrit étant le groupement acétyl^{316,317}) à partir d'un donneur acyl-CoA (acyl-Coenzyme A) sur le groupement amine la chaîne latérale d'une lysine. De manière générale, cette modification entraîne la neutralisation de la charge positive de la lysine et ainsi diminue les interactions entre le nucléosome et l'ADN et entre les nucléosomes entraînant donc la décompaction de la chromatine. L'acylation des lysines des histones est donc globalement favorable à la transcription, bien qu'il existe des mécanismes différents selon le groupement acyle ajouté.^{308,316,317}

Les enzymes catalysant la réaction d'acylation des histones sont appelées HAT (*Histone acetyl transferase*) et celles catalysant le retrait des groupements acyle sont appelées HDAC (*Histone deacetylase*). Elles portent ce nom car elles ont été d'abord identifiées comme étant responsables d'ajout ou de retrait des groupements acétyle (**Figure 12**). Les HAT et les HDAC ne sont en général pas spécifiques d'une lysine particulière mais sont capables d'agir au niveau de plusieurs résidus lysines, de plusieurs histones différentes. De plus, l'acétylation d'une lysine peut parfois être remplacée par l'acétylation d'une autre lysine sans changer vraiment les effets de cette acétylation, ce qui en fait une marque très différente de la méthylation des histones. Ces deux dernières sont d'ailleurs en compétition sur les résidus lysine, la méthylation pouvant favoriser ou non l'expression du gène selon le résidu alors que l'acétylation favorise l'expression, quel que soit le résidu.

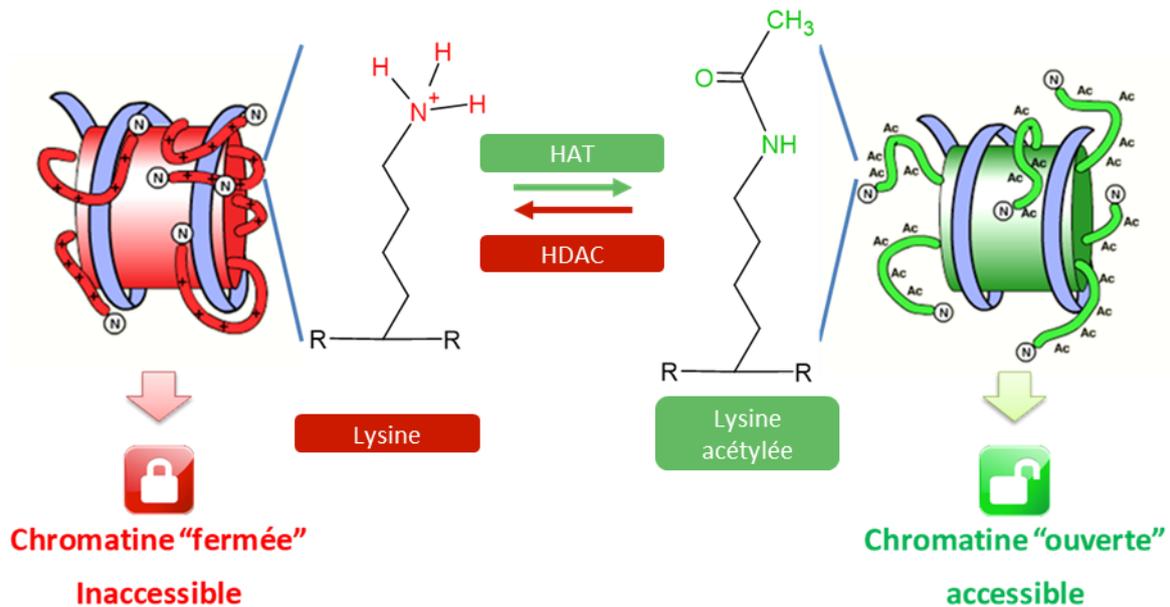


Figure 12 : Acétylation des histones.

Schéma descriptif du mécanisme d'acétylation des histones. Les HAT acétylent les lysines des histones, ce qui engendre une ouverture de la chromatine alors que les HDAC les désacétylent et engendrent donc une fermeture de la chromatine.

3.2.3- Ubiquitylations

Les histones H2A et H2B sont les histones les plus fréquemment ubiquitynés, bien que tous peuvent l'être. La mono-ubiquitylation de H2A est plus fréquemment associée à la répression de la transcription alors que la mono-ubiquitylation de H2B est plus fréquemment associée à des gènes actifs³¹⁸. La réaction d'ubiquitylation des histones est catalysée par des histones ubiquityne ligases, alors que le retrait de l'ubiquityne est catalysé par des histones « *deubiquitynating enzymes* » (DUB)³¹⁸.

Les ubiquitylations des histones sont également impliquées dans les systèmes de réparation de l'ADN, l'inactivation du chromosome X ou la ségrégation des chromosomes durant la mitose³¹⁸⁻³²⁰.

3.2.4- Phosphorylations

Les histones peuvent être phosphorylés au niveau de sérines, thréonines ou tyrosines par une variété de kinases, certaines spécifiques d'un acide aminé donné, d'autre pouvant en phosphoryler plusieurs³²¹. Les phosphorylations sont impliquées dans les systèmes de réparation de l'ADN (phosphorylation de l'histone H2AX), dans la compaction de la chromatine au cours des divisions cellulaires ou de l'apoptose, et également dans la régulation de la transcription. Différentes phosphorylations peuvent en effet faciliter l'acétylation de

lysines voisines, ce qui entraîne l'activation de la transcription des gènes^{321,322}. Les histones sont déphosphorylées par plusieurs phosphatases différentes^{311,323}. Les Sérines et Thréonines pouvant être phosphorylées sont indiquées sur la **figure 13**.

3.2.5- SUMOylation

La SUMOylation est l'ajout de la protéine SUMO (*Small ubiquitine like modifier 1*), un analogue de l'ubiquitine, au niveau des lysines des histones. Elle est ajoutée et retirée par les mêmes enzymes. Cette modification entre en compétition avec les autres modifications des lysines et a été associée jusqu'ici à la répression de la transcription^{311,324}.

3.2.6- ADP Ribosylation

Les histones peuvent être ADP ribosylées au niveau des résidus arginine ou glutamate. L'ajout de ces groupements est catalysé par les enzymes de la famille PARP (*Poly-ADP (Adenosine diphosphate)-ribose-polymerase*) et leur retrait par les enzymes de la famille *Poly-ADP-ribose glycohydrolase*. La ribosylation est plutôt associée à l'activation de la transcription. Le niveau de cette modification est également largement augmenté lorsque les systèmes de réparation de l'ADN sont activés^{311,325}.

3.2.7- Arginine citrullination

Le retrait du groupement amine d'une arginine par l'enzyme PADI4 (*Peptidyl arginine deiminase 4*) la transforme en citrulline. Cette modification empêche alors la méthylation de l'arginine et est plutôt favorable à une décompaction de la chromatine^{311,326}.

3.2.8- Proline isomérisation

L'isomérisation de proline d'une conformation trans vers une conformation cis est catalysée par des proline isomérases. Cette modification au niveau des histones peut avoir une incidence sur d'autres modifications d'acides aminés proches de la proline en question^{311,327}.

Les principales modifications des histones répertoriées sont présentées **figure 13**.

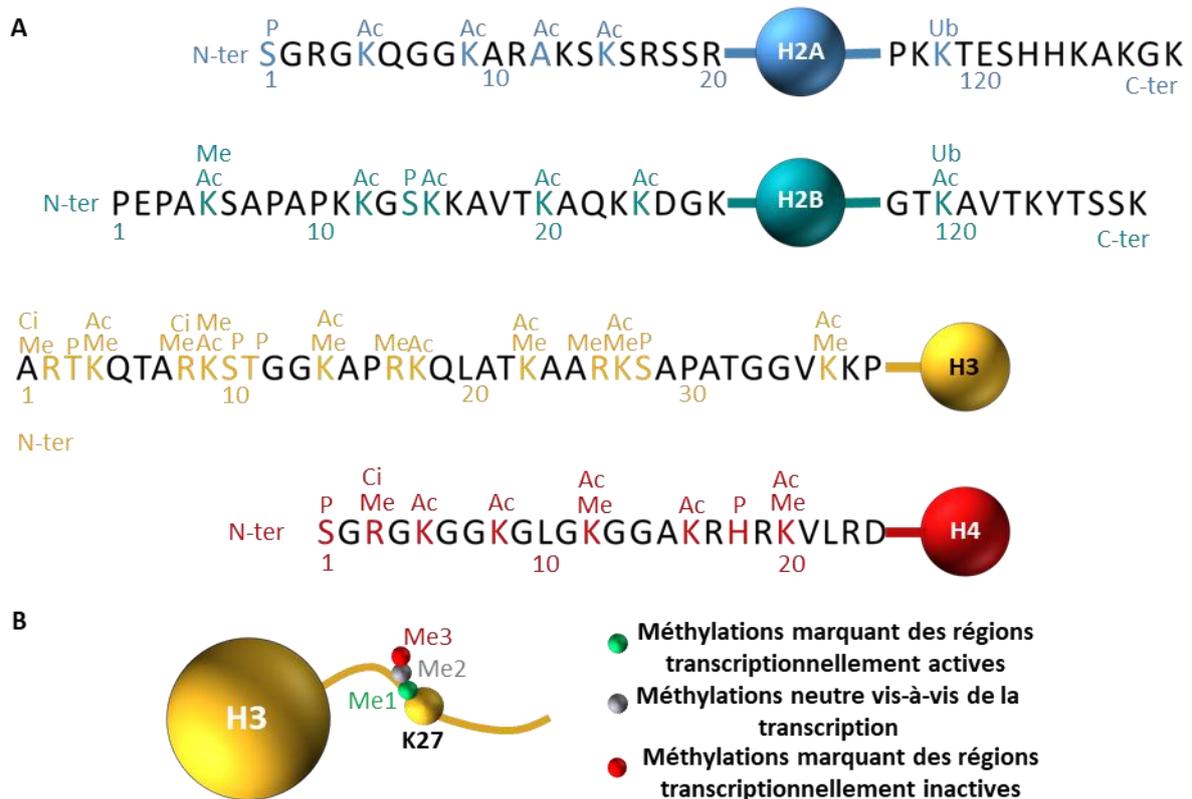


Figure 13 : Modifications post-traductionnelles des histones.

A. Principales modifications post-traductionnelles des queues d'histones répertoriées (adapté de Rodriguez-Paredes et Esteller, *Nature Med*, 2011³²⁸). **B.** Méthylations de H3K27 et régulation de la transcription des gènes. Me = méthylation ; Ac = Acétylation ; P = Phosphorylation ; Ci = Citrullination ; Ub = Ubiquitination.

3.3- ARN non codants

Les ARN non codants sont des ARN qui ne sont pas traduits en protéines. Leur diversité est grande et ils sont classés en plusieurs catégories en fonction de leur taille, de leur origine ou de leur structure. Ils sont également considérés comme des facteurs épigénétiques de la régulation de l'expression des gènes bien qu'ils ne soient pas transmissibles, on parle désormais d'épitranscriptomique. Ces ARN sont classés en deux grands groupes en fonction de leur taille : les longs ARN non codants (lncRNA (*Long non-codants RNA*)) et les ARN non-codants courts (*Short ncRNA(Non-codants RNA)*) selon qu'ils soient constitués de plus ou moins 200 nucléotides. Ces ARN peuvent se lier à des séquences spécifiques du génome par complémentarité de séquence et réguler l'expression des gènes par différents mécanismes.

Les lncRNA peuvent réprimer ou parfois activer l'expression de gènes en recrutant au niveau de leur promoteur des enzymes modifiant la méthylation de l'ADN ou les histones (DNMT, KMT, KDM, etc.). Ils sont capables de réguler l'expression de gènes en *cis* (c'est-à-dire

sur le *locus* qui code pour ces ARN) ou en *trans* (au niveau d'autres *locus*). Il existe de nombreuses catégories de lncRNA que nous ne détaillerons pas ici.

Les ncRNA courts sont classés en plusieurs groupes selon leur origine (miRNA (*micro RNA*), siRNA (*small interfering RNA*), etc.). Ils sont capables de réguler directement la transcription des gènes ou la stabilité des ARNm (ARN messagers) par affinité de séquence de quelques nucléotides^{286,329}. Ils peuvent alors se fixer aux 3' ou 5' UTR (*Untranslated regions*) des ARNm et induire leur dégradation. Ces petits ARN sont également capables, comme les lncRNA de recruter des facteurs épigénétiques et ainsi modifier la méthylation de l'ADN ou les histones entraînant la régulation de l'expression des gènes. Enfin, notons que l'expression de ces ARNncs est souvent la cible elle-même de régulations épigénétiques par modification de la méthylation de l'ADN ou modification des histones, ce qui génère des boucles de d'amplification et l'installation de marques épigénétiques qui peuvent s'étendre à une région du génome²⁸⁶.

L'ensemble de ces régulations épigénétiques constitue un mécanisme de régulation des gènes dynamique et adaptable au contexte cellulaire. Ces caractéristiques en font un mécanisme privilégié pour induire des changements rapides du phénotype de la cellule en réponse à un changement des conditions de l'environnement de celle-ci.

II- Epigénétique et plasticité cellulaire

1- La plasticité cellulaire

La plasticité cellulaire est la capacité des cellules à changer de phénotype de manière dynamique en réponse à un contexte physiologique, pathologique ou environnemental. On peut parler alors de capacité d'adaptation aux changements de signaux extérieurs à la cellule. Plus une cellule est capable de changer rapidement de phénotype, de manière réversible, et plus on peut parler de cellule plastique.

Le premier phénomène mettant en évidence la plasticité des cellules est la capacité des cellules souches à se différencier. Plusieurs autres phénomènes, moins fréquents, impliquant une plasticité cellulaire ont été caractérisés : 1) une cellule différenciée peut se dédifférencier et acquérir les caractéristiques d'une cellule souche, 2) une cellule différenciée peut se transdifférencier en un autre type de cellules bien différenciées, avec un phénotype

totallement différent, et 3) une cellule souche peut acquérir les capacités de différenciation d'une cellule souche différente^{330,331}.

Cette capacité des cellules à changer de phénotype de manière dynamique et réversible est contrôlée par des changements tout aussi dynamiques de l'état de la chromatine au niveau de gènes clés dans la pluripotence et les caractéristiques souches par exemple.

2- Réorganisation épigénétique au cours des changements de phénotypes

La différenciation cellulaire est un bon exemple de régulation épigénétique de la plasticité. Il a été montré que l'état de la chromatine, ce qu'on pourrait appeler le paysage épigénétique, est très différent entre une cellule différenciée et une cellule souche pluripotente³³². On estime qu'un tiers de la chromatine est structurée différemment entre des cellules souches embryonnaires et des cellules différenciées (fibroblastes)³³³. Il est montré notamment que la différenciation cellulaire s'accompagne d'une augmentation de la part du génome comportant H3K27me3 d'environ 8% dans les cellules souches embryonnaires et jusqu'à environ 40% dans les cellules différenciées^{332,334}. Il existe alors une coordination des marques épigénétiques. Par exemple, la perte de la méthylation de H3K4 s'accompagne en général d'une augmentation de la méthylation de l'ADN³³⁵.

On trouve, dans les cellules non différenciées, de nombreux promoteurs dits bivalents, qui possèdent des marques épigénétiques activatrices et inhibitrices de la transcription. Ces promoteurs vont alors garder uniquement les marques activatrices ou inhibitrices après différenciation, de manière dépendante du type cellulaire³³².

Toutes ces modifications épigénétiques étant réversibles, on peut raisonnablement penser que la dédifférenciation cellulaire est médiée par un retour au paysage épigénétique caractéristique des cellules souches. Il a été montré, notamment lors de la reprogrammation de cellules différenciées en cellules pluripotentes appelées IPSC (*Induced pluripotent stem cells*), qu'on retrouve des marqueurs épigénétiques des cellules souches (promoteurs bivalents avec H3K4me3 et H3K27me3)³³⁶. On sait que si la marque H3K9me3 ne peut pas être enlevée au niveau de certains gènes, la reprogrammation en IPSC ne peut pas aboutir³³⁷. Si cela ne fait aucun doute que la dédifférenciation cellulaire implique des changements épigénétiques, cette reprogrammation étant causée par la réexpression de facteurs de

transcription, les données ne permettent pas de savoir si la reprogrammation épigénétique peut-être à l'origine de la dédifférenciation cellulaire physiologique³³⁸⁻³⁴⁰.

La TEM est un processus pouvant conférer des caractéristiques souches aux cellules, ce qui pourrait se rapprocher d'une dédifférenciation. La TEM peut ainsi être considérée comme une dédifférenciation particulière et impliquer quelques mécanismes similaires. Ainsi, une reprogrammation épigénétique peut également être à l'origine de la TEM, et donc non seulement de la formation de cellules cancéreuses, mais également de l'agressivité des tumeurs en promouvant la résistance aux traitements, la formation de métastases et l'échappement au système immunitaire notamment³⁴¹.

III-TEM et plasticité épigénétique

1- Méthylation de l'ADN pendant la TEM

L'induction de la TEM dans des hépatocytes de souris, par traitement au TGF- β , n'induit pas de changement global de la méthylation de l'ADN³⁴¹. En revanche il a été montré que de nombreux changements de méthylation interviennent au niveau de promoteurs de gènes régulés au cours de la TEM. D'abord, le promoteur de *CDH1* est hyperméthylé au cours de la TEM, après le recrutement de DNMT1 et DNMT3A à son niveau par les facteurs de transcription de la TEM SNAI1 et ZEB1³⁴²⁻³⁴⁴.

Les protéines « liseuses » des méthylations de l'ADN sont également très importantes dans l'extinction de l'expression de certains gènes au cours de la TEM. Ces protéines peuvent être recrutées au niveau du promoteur de *CDH1* par des facteurs de transcription de la TEM, comme TWIST1 dans des cellules de cancer du pancréas³⁴⁵. L'expression et la localisation nucléaire de ces protéines est corrélée avec la méthylation du promoteur de *CDH1* dans des cancers colorectaux, du sein et de la prostate³⁴³.

La méthylation du promoteur de *CDH1* est un processus essentiel à l'instauration de la TEM, à tel point qu'un inhibiteur de la méthylation globale de l'ADN, le 5-Aza-dC (5-Aza-deoxycytidine) est capable de restaurer un phénotype épithélial dans différentes lignées de cellules cancéreuses n'exprimant plus la E-CADHERINE³⁴⁶.

2- Régulation de la TEM par les ARN non-codants

Comme décrit précédemment (*cf.* chapitre I, II-, 1.3-), plusieurs miRs inhibent l'expression de facteurs de transcription de la TEM, comme les *miR-200* et *miR-205*. Notons que l'expression de ces miRs est régulée épigénétiquement au cours de la TEM par des changements de méthylation de l'ADN ainsi que des changements dans les modifications post-traductionnelles des histones sur leurs promoteurs^{347,348}. De nombreux miRs ont été décrits comme inhibant la TEM en ciblant l'ARNm de gènes essentiels à ce processus. Citons simplement les *miR-1* et *miR-204* qui ciblent *SNAI2*, *miR-29b*, *miR-30a* et *miR34* qui ciblent *SNAI1* et le *miR-203* qui cible *SNAI1* et *SNAI2*³⁴⁹.

En ce qui concerne les lncRNA, quelques-uns sont associés à la TEM ou à l'invasion dans les cancers. *HOTAIR (Hox transcript antisens RNA)* peut induire la TEM en interagissant avec des enzymes modificatrices des histones alors que le *lncRNA-ROR (Regulator of reprogramming)* lui favorise la TEM en inhibant *miR-295*^{343,350}. Les *ncRNA-a7* et *lncRNA-HIT* sont également impliqués dans la TEM *via* la répression de l'expression du gène *CDH1*^{343,350}.

Le lncRNA *MALAT-1* déjà décrit dans la régulation de la voie SMAD peut inhiber certains miRs dont *miR-200* en étant un ceRNA (*Competing endogenous RNA*), c'est-à-dire qu'il va se lier à ces miRs et ainsi les empêcher de se lier à d'autres cibles. *MALAT-1* peut aussi promouvoir la TEM en recrutant EZH2 au niveau du promoteur de *CDH1*^{349,351}.

De nombreux autres lncRNA modulent la TEM. Cela a été largement décrit dans la revue de Heery *et al.*³⁴⁹.

3- Modifications post-traductionnelles des histones au cours de la TEM

3.1- Acétylation

Nous développerons plus en détail le rôle des modifications des histones, qui nous intéressera plus particulièrement dans cette thèse. Elles ont été détaillées récemment dans la littérature³⁴³.

Les HAT p300, CBP (*CREB (cAMP response element binding protein) binding protein*) et PCAF (*p300/CBP associated factor*) ont un rôle décrit au cours de la TEM. P300 et CBP sont recrutés au niveau des promoteurs de certains gènes activés lors de la TEM dépendante de la voie WNT et de la β -CATENINE³⁵². De manière intéressante, p300 et PCAF sont également capables de se lier directement à ZEB1, de l'acétyler et d'inhiber son interaction avec le

promoteur du *miR-200*, induisant sa transcription et inhibant la TEM. Cela montre que les HAT peuvent également acétyler des protéines non-histones³⁵³. Dans des cellules de cancer du sein MCF-7, l'activation de l'expression du TGF- β 2, par la surexpression de SNAIL 1/2, est corrélée à l'augmentation de l'acétylation de H3K9 sur le promoteur de son gène³⁵⁴.

Les HDAC peuvent également être recrutées au niveau des promoteurs des gènes cibles des EMT-ATFs. L'exemple le plus connu est le promoteur de *CDH1* au niveau duquel sont recrutés plusieurs HDAC (1/2). L'inhibition du recrutement de ces enzymes au niveau du promoteur de *CDH1* dans des cellules de cancer du sein triple négatif est suffisante pour entraîner la réexpression de la E-CADHERINE et diminue les capacités d'invasion et de formation de métastases *in vivo* de ces cellules³⁵⁵. ZEB1 est également capable de recruter différentes HDAC au niveau du promoteur de *CDH1* dans des cellules de cancer de la prostate et du pancréas^{139,356}. De plus, la mise en place de la TEM par l'induction de l'expression de ZEB1 entraîne une perte d'acétylation de H3K9 et H3K27 au niveau des promoteurs de plusieurs gènes épithéliaux (*ESRP1* et *EPCAM* (*Epithelial cell adhesion molecule*) notamment) et une désacétylation globale de H3K27 dans ces cellules³⁵⁷.

Basé sur le fait que les HDAC sont essentielles à la répression de ces gènes au cours de la TEM, des approches thérapeutiques utilisant des inhibiteurs de HDAC ont été testées en clinique. Cependant, malgré un succès pour les traitements des cancers hématologiques³⁵⁸, il a été montré qu'ils peuvent également induire la TEM dans certaines tumeurs solides^{359,360}

3.2- Méthylations

La déméthylase LSD1, spécifique de la marque H3K4me1/2 est importante dans l'activation de la TEM. Elle est surexprimée dans de nombreux cancers et est associée à la répression de l'expression de *CDH1* et *ZO1* dans des cellules de cancers de la prostate. Elle est associée aux EMT-ATFs SNAIL1 et ZEB1/2 dans des complexes répresseurs de la transcription des gènes épithéliaux^{361,362}. D'autres déméthylases de H3K4 régulent la TEM. KDM5A (*Lysine demethylase 5A*) est associée à la TEM et aux métastases dans des cancers du poumon, du sein et gastriques³⁶³⁻³⁶⁵. KDM5B peut induire la TEM en supprimant l'expression de *miR200* ou *PTEN*, mais peut inhiber la migration et la formation de métastases dans des cancers du sein³⁴³. La modulation du niveau de méthylation de H3K4 peut pousser la cellule vers un phénotype plus épithélial ou plus mésenchymateux suivant le contexte cellulaire et les promoteurs ciblés.

DOT1L (*Disruptor of telomeric 1-like*), une HMT spécifique de H3K79, est associée au pouvoir métastatique des cancers du sein. Elle se trouve au niveau des promoteurs de *SNAIL1* et *ZEB1/2* et active leur transcription *via* la méthylation de H3K79^{366,367}.

L'induction de la TEM par le TGF- β dans des hépatocytes de souris entraîne une diminution globale de H3K9me2 (marque répressive de la transcription), et une augmentation de H3K4me3 et H3K36me3 (marques activatrices de la transcription). Ces modifications au niveau de la chromatine ont lieu surtout dans des domaines spécifiques appelés LOCKs (*Large organized heterochromatin K9-modifications*). Des travaux réalisés sur plusieurs modèles cellulaires induits en TEM par un co-traitement TGF- β /TNF- α (cancer du sein, du rein et cellules épithéliales mammaires) montrent une augmentation globale de H3K4me3, H3K9me3 et H3K27me3. Plus précisément, il a été montré que la surexpression de métalloprotéases (MMP9, ADAM19) au cours de la TEM est corrélée à une diminution des marques d'histones répressives et une augmentation des marques d'histones activatrices de la transcription au niveau des promoteurs de ces gènes⁹.

Par exemple dans les carcinomes basaux mammaires : la présence du promoteur ZEB1 en état « *poised* », c'est-à-dire facilement réversible entre actif et inactif, rend les cellules sensibles au TGF- β . Elles peuvent alors facilement passer d'un phénotype CD44^{lo} (exprimant faiblement CD44) non tumorigénique à un phénotype CD44^{hi} (exprimant fortement CD44) de cellules souches cancéreuses. En revanche si le promoteur est « fermé », compacté (car portant des marques épigénétiques répressives), les cellules ne sont pas sensibles au TGF- β ^{368,369}.

La méthylation, inhibitrice de la transcription, de H3K9 est impliquée dans la répression de l'expression de *CDH1* médiée par SNAIL1. SNAIL1 peut recruter G9A, HMT spécifique de H3K9, au niveau des promoteurs qu'il réprime³⁷⁰.

La désacétylation de H3K27 au cours de la TEM induite par ZEB1 s'accompagne également d'une tri-méthylation de cette lysine, alors que la marque activatrice de la transcription H3K4me2 ne varie pas. Cela crée des promoteurs bivalents pouvant rapidement passer d'un statut actif à un statut inactif rendant possible l'inversement rapide de la TEM en TME^{351,357}. La méthylation des histones est également importante pour la régulation de l'expression des gènes au cours de la TEM.

Finalement, la marque d'histone H3K27me3 est essentielle à la TEM, en participant à la répression de *CDH1* également. Cette marque semble être une des marques qui varie le plus au cours de la TEM⁹. Lors d'une TEM induite par TWIST1, on observe une diminution de H3K4me3 au profit de H3K27me3 au niveau du promoteur de 102 gènes épithéliaux, incluant *CDH1* alors qu'on observe le changement inverse au niveau des promoteurs de gènes mésenchymateux surexprimés, parmi lesquels *ZEB2*, *CDH2* et *ESRP1*³⁷¹. H3K27me3 est régulée par plusieurs HMT et KDM : EZH2 et EZH1 sont des HMT capables de méthyle cette marque, alors que KDM6A et KDM6B sont capables de la déméthyle. De manière intrigante, EZH2 et KDM6B sont toutes deux surexprimées et associées à l'agressivité dans différents cancers. D'abord EZH2 est surexprimée dans des métastases de cancers du sein³⁷² et associée à l'agressivité de très nombreux types de cancers¹¹. De manière surprenante, KDM6B est également associée à l'agressivité ou la formation de métastases dans différents types de cancers¹¹, ce qui nous a amené à nous intéresser plus particulièrement à ces deux enzymes, et à leur fonction au cours de la TEM (*cf.* Chapitre III), ces deux enzymes n'ayant été que très rarement étudiées en même temps.

Ce paragraphe montre qu'une large palette de régulateurs épigénétiques accompagnent ou sont à l'origine de la TEM dans différents contextes cellulaires, notamment dans les cancers. Il n'est pas exhaustif, et de nombreux autres modifications impliquées dans la TEM ont été énumérées dans la revue de Sun et Fang³⁴³.

Chapitre III : EZH2 et KDM6B sont des régulateurs majeurs de la TEM

I- Contexte et rôles physiologiques de la méthylation de H3K27

Parmi les modifications connues de H3, nous nous intéresserons particulièrement ici aux modifications de la lysine 27, et notamment à sa méthylation. Les mécanismes et les enzymes par lesquels cette méthylation est modulée ainsi que son implication dans l'expression des gènes et dans les cancers seront ainsi détaillés par la suite.

1- H3K27me3

La lysine 27 de l'histone H3 est située sur la queue N-terminale de cette histone. Elle peut subir deux principales modifications post-traductionnelles : la méthylation et l'acétylation. L'acétylation est toujours unique, alors que la méthylation peut être simple (me1), double (me2) ou triple (me3)¹⁰.

Comme décrit précédemment, H3K27me3 est défavorable à la transcription des gènes situés en aval de cette marque. Elle ne suffit pas à elle seule à réprimer l'expression d'un gène, si le code histone environnant n'y est pas favorable, mais sa présence est en général corrélée à un promoteur peu actif, ou inactif. Elle est notamment présente sur le promoteur de gènes bivalents, dont la transcription peut être rapidement activée ou désactivée, au côté de marques activatrices de la transcription (*ZEB1* ou *CDH1* notamment au cours de la TEM). H3K27me3 est présente sur 5 à 10% des régions du génome. En revanche, la monométhylation H3K27me1 est plutôt présente sur des promoteurs et régions codantes de gènes actifs (5 à 10% du génome) et la double méthylation est beaucoup plus présente, recouvrant 50 à 70% du génome, au niveau des promoteurs et régions codantes de gènes actifs ou non³⁷³. Les rôles des différents degrés de méthylation de H3K27 restent mal compris, mais il semble que de manière générale et simplifiée, plus cette lysine est méthylée au niveau du promoteur d'un gène et moins sa transcription est active.

2- Méthylation de H3K27 : le complexe PRC2

2.1- Généralités et structure

Les complexes protéiques responsable de la méthylation (« *writers* ») et de la déméthylation (« *erasers* ») de cette lysine ont été identifiés. Le complexe PRC2 est le principal, ou peut-être le seul, capable de méthyler H3K27 chez les mammifères. Une autre méthyltransférase, EHMT2 (*Euchromatic histone methyltransferase 2*), initialement décrite comme étant spécifique de H3K9, est capable de la méthyler *in vitro*, mais cela est toujours sujet à discussion *in vivo*. Le complexe PRC2 a été identifié chez la drosophile, comme étant un complexe nécessaire à la répression de l'expression de gènes du développement. Le nom de *polycomb repressor complex* vient du fait que son inactivation entraîne notamment le développement de structures multiples en forme de peigne (*comb* en anglais) au niveau des pattes de l'animal dû à une dérégulation de gènes homéotiques³⁷⁴. PRC2 est un complexe protéique dont la composition peut varier. Il comprend cependant toujours des protéines qui sont dites essentielles au nombre de 3 ou 4 chez l'homme selon les auteurs, et sont nécessaires à l'activité méthyltransférase de PRC2. EZH2 ou EZH1 (qui est un paralogue d'EZH2, mais moins actif) qui portent l'activité méthyltransférase, EED (*Embryonic ectoderm development*) et SUZ12 (*Suppressor of zeste 12 protein homolog*). La quatrième protéine RBBP4 ou 7 (*Retinoblastoma binding protein 4/7*) est toujours retrouvée dans le complexe, mais sa présence, bien qu'augmentant l'activité méthyltransférase du complexe n'y est pas requise (**Figure 14**)³⁷⁵.

2.2- Sous-unités essentielles de PRC2

2.2.1- EZH2/EZH1

L'activité catalytique méthyltransférase de PRC2 est portée par la sous unité EZH2 (Également appelée ENX1 ou KMT6A) ou EZH1 (Également appelée ENX2 ou KMT6B), qui portent cette activité *via* leur domaine SET (*Su(var) 3-9, Enhancer of zeste and trithorax*). Elles possèdent également un domaine CXC riche en cystéines qui précède directement le domaine SET dans le sens N-ter vers C-ter. Ces deux protéines utilisent le S-adénosyl-S-méthionine (SAM) comme donneur de groupement méthyle, qu'elles relarguent sous forme de SAH (S-adénosyl-S-homocystéine)³⁷⁶.

2.2.2- EED

EED possède un domaine de répétitions de motifs WD40, qui lui permet d'interagir avec EZH2³⁷⁷, et également de reconnaître la modification H3K27me3, ce qui lui permet de diriger le recrutement du complexe PRC2 (cf. 1.2.3- Mécanismes d'action de PRC2).

2.2.3- SUZ12

SUZ12 est capable de se lier à l'ADN³⁷⁴ grâce notamment à un domaine en doigt de zinc³⁷⁸. Elle possède également un domaine appelé VEFS (du nom des 4 protéines dans lesquelles on retrouve ce domaine, S pour SUZ12) qui est nécessaire pour la liaison aux autres protéines de PRC2 et pour l'activation de l'activité méthyltransférase³⁷⁹. Structurellement, SUZ12 est donc nécessaire à la stabilisation du complexe et permet une liaison à l'ADN ainsi qu'une augmentation de l'activité méthyltransférase de la sous-unité catalytique.

2.2.4- RBBP4/7

Les protéines RBBP4/7 sont capables de se lier aux histones. Elles sont parfois considérées comme protéines essentielles de PRC2, et parfois comme protéines additionnelles ou accessoires. Le fait que son classement dans les sous unités essentielles soit discuté vient du fait qu'il n'est pas nécessaire à l'activité méthyltransférase, mais toujours présent, quel que soit le sous type de PRC2, PRC2.1 ou PRC2.2.

2.3- Sous-unités accessoires de PRC2

PRC2 existe sous plusieurs formes, avec toujours les 4 sous-unités essentielles, et selon ce qu'on appelle la forme PRC2.1 ou PRC2.2, différents partenaires qui sont dits accessoires car ils ne sont pas nécessaires à l'activité catalytique du complexe, mais sont présents au sein de celui-ci dans certaines circonstances, apportant des caractéristiques particulières^{375,380}. Ce sujet a été détaillé dans une revue récemment (**Figure 14**)³⁷⁵.

2.3.1- PRC2.1

PRC2.1 comporte, en plus des 4 protéines essentielles, 2 protéines supplémentaires accessoires: une parmi EPOP (*Elonging bc and polycomb repressive complex 2 associated protein*) et LCOR (*Ligand dependant nuclear receptor corepressor*) et une parmi PHF1 (*Phd finger protein 1*), MTF2 (*Metal response element binding transcription factor 2*) ou PHF19 (*Phd finger protein 19*) les trois dernières étant appelées protéines PCL (*Polycomb like*)³⁷⁵. MTF2 et EPOP sont les plus fréquemment retrouvées au niveau du complexe. Ces

protéines peuvent jouer un rôle dans le recrutement de PRC2. Il a été montré notamment que MTF2 peut lier les îlots CpG non-méthylés³⁸¹. Les protéines PHF1 et PHF19 quant à elles, reconnaissent spécifiquement la tri-méthylation de H3K36, qui est exclusive vis-à-vis la tri-méthylation de H3K27. Elles peuvent recruter une déméthylase spécifique de H3K36 afin de retirer cette méthylation, en même temps que le complexe PRC2 afin de méthyler H3K27 au cours de la différenciation de cellules souches embryonnaires de souris^{375,382}. EPOP participe au maintien d'une activité minimale des promoteurs cibles de PRC2 dans des cellules souches pluripotentes, en recrutant ELO B/C (*Elongin B/C*) ce qui va favoriser l'action de la RNA POLII (RNA polymérase II)³⁸³. Le gène *LCOR1* peut coder deux protéines paralogues PALI1 et PALI2, qui sont présentes de manière exclusives avec EPOP au sein de PRC2, mais EPOP est présent beaucoup plus fréquemment³⁷⁵.

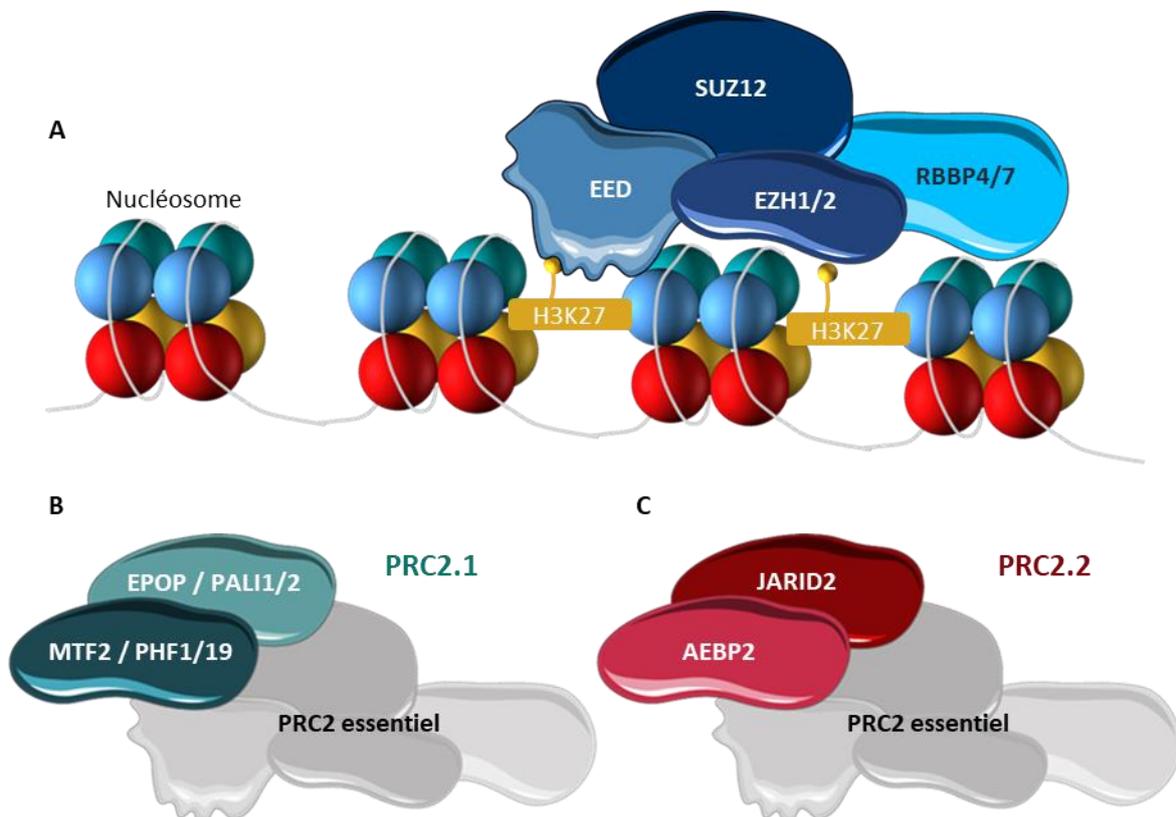


Figure 14 : Structure du complexe PRC2.

A. Structure des sous unités essentielles de PRC2, et son mécanisme d'action via la reconnaissance de H3K27me3 par EED. **B.** Sous-unités accessoires du complexe PRC2.1 **C.** Sous-unités accessoires du complexe PRC2.2

2.3.1- PRC2.2

Le complexe PRC2.2 est composé, en plus des 4 sous unités essentielles, de AEBP2 (*Adipocyte enhancer-binding protein 2*) et JARID2 (*Jumonji and AT-rich interaction domain containing 2*)³⁷⁵. Ces deux protéines permettent d'augmenter l'activité catalytique de PRC2 d'environ 25

fois. JARID2 peut être méthylé sur sa lysine 116 par EZH2, et cette méthylation peut être reconnue par EED selon le même mécanisme de reconnaissance que H3K27me3 par cette protéine, et ainsi favoriser l'activité méthyltransférase du complexe^{375,384}. Les mécanismes moléculaires induits par AEPB2 ne sont pas connus, même s'il est proposé que cette sous-unité puisse participer à la stabilité du complexe, au recrutement et au maintien de PRC2 au niveau de ses gènes cibles, et changer la conformation du site catalytique d'EZH2^{375,385,386}.

2.4- Mécanismes d'action de PRC2

Le complexe PRC2 a d'abord été décrit comme uniquement capable d'entraîner la diméthylation ou la tri-méthylation sur H3K27³⁸⁷. Une étude plus récente a cependant montré que le complexe peut méthyler H3K27 de 1 à 3 fois, et installer toutes les marques de manière organisée et spécifique à la cellule dans des cellules souches embryonnaires de souris³⁸⁸.

La méthylation de H3K27 se fait majoritairement selon deux voies : la méthylation *de novo* qui consiste à méthyler H3K27 dans des régions de l'ADN où elle n'est pas encore méthylée, et la méthylation de H3K27 ciblée sur des régions où H3K27 est déjà tri-méthylée. La première voie est médiée notamment par SUZ12. Dans des cellules souches embryonnaires de souris, PRC2(EZH2) est capable d'instaurer tous les niveaux de méthylation de H3K27, notamment parce que SUZ12 est capable de se lier aux îlots CpG indépendamment de la méthylation de H3K27. PRC2 est en effet capable d'instaurer une méthylation *de novo* alors que toute la méthylation a été supprimée par un KO combiné de EZH1 et EZH2³⁸⁸. Le domaine VEFS de SUZ12 est nécessaire au recrutement d'EZH2 et EED, mais c'est un autre domaine plus en N-ter qui lui permet d'avoir un recrutement au niveau de régions spécifiques de l'ADN (les auteurs supposent que le domaine en doigt de zinc en fait partie), et qui permet de retrouver un motif de méthylation de H3K27 au niveau du génome, qui est spécifique aux cellules. Le domaine VEFS seul permet de restaurer un niveau global de méthylation mais les méthylation ne sont pas spécifiques au type cellulaire et sont réparties aléatoirement le long du génome³⁸⁸.

La seconde voie consistant à méthyler H3K27 au niveau de régions de l'ADN où H3K27me3 est déjà présente, est dépendante d'EED. EED est nécessaire à l'activité catalytique d'EZH2 au sein du complexe PRC2³⁷³. Il a été montré que cette protéine est capable de se lier à H3K27me3, et ainsi activer EZH2. Elle est donc importante dans la propagation de cette marque de proche en proche, permettant notamment de la maintenir au cours des divisions cellulaires mais surtout de l'étendre au niveau d'une région donnée afin d'asseoir la

répression d'un gène³⁸⁹. Le recrutement de PRC2 de manière indépendante de la séquence de l'ADN, *via* EED et H3K27me3 n'est pas suffisant pour maintenir la répression de gènes au cours des divisions cellulaires chez la drosophile³⁹⁰.

En ce qui concerne les différentes sous unités catalytiques, EZH1 est un paralogue d'EZH2³⁷⁵ et EZH2 a une activité méthyltransférase plus importante que EZH1. Cette dernière est en revanche capable d'induire la compaction de la chromatine indépendamment de la méthylation de H3K27³⁸⁷. Seulement, EZH2 (ou EZH1) ne sont pas actifs si tous les éléments essentiels du complexe PRC2 ne sont pas réunis. Il y a auto-inhibition de ces sous unités.

MTF2 et JARID2 sont essentielles au recrutement de PRC2 au niveau de la chromatine : un KO pour ces deux protéines entraîne une absence totale de recrutement de PRC2 au niveau de ses gènes cibles dans des cellules souches embryonnaires de souris³⁹¹. De plus, PRC2.1 et PRC2.2 agissent en coopération. L'extinction de l'une ou l'autre de JARID2 et MTF2 entraîne une diminution du recrutement de l'autre protéine au niveau des gènes cibles³⁹². La découverte de ces différents complexes PRC2.1 et PRC2.2 est récente, et de nombreux points restent donc à établir sur le fonctionnement de ces différents complexes. En ce qui concerne le recrutement de PRC2 au niveau de régions spécifique de l'ADN, il existe chez la drosophile un PRE (*Polycomb response element*), séquence spécifique de reconnaissance de PRC2. Chez les mammifères, une telle séquence a été montrée dans le cadre du développement mais ne suffit pas à expliquer la spécificité cellulaire du recrutement de PRC2³⁹³. Les mécanismes par lesquels PRC2 pourrait être recruté au niveau de séquences spécifiques de l'ADN alors qu'aucun de ses constituants ne semble posséder cette capacité restent à déterminer et devraient faire l'objet de travaux à la suite de cette thèse.

2.5- Autres répresseurs transcriptionnels associés à PRC2

Le recrutement de PRC2 au niveau des promoteurs de ses gènes cibles est souvent associé à d'autres répresseurs épigénétiques. La méthylation de l'ADN a notamment été reliée à PRC2. Ce complexe pourrait recruter DNMT1 au niveau de ses gènes cibles *via* une interaction directe^{394,395}. Il a été montré également que les HDAC 1 et 2 peuvent être associés à ce complexe et donc que la désacétylation des histones peut également être un mécanisme associé à la répression de gènes par PRC2³⁹⁴.

3- Déméthylation de H3K27

Les mécanismes et les enzymes responsables de la déméthylation de H3K27 sont beaucoup moins décrits que ceux entraînant sa méthylation. Il a même été d'abord accepté que cette méthylation n'était pas réversible ou que sa déméthylation était passive, au cours des divisions cellulaires, diluant cette marque dans les nucléosomes nouvellement formés³⁹⁶. En effet, KDM6B (également appelée JMJD3 (*Jumonji domain containing 3*) et KDM6A (également appelée UTX (*Ubiquitously transcribed X chromosome tetratricopeptide repeat protein*)) ont été identifiées comme les enzymes responsables de la déméthylation de H3K27me2 et me3³⁹⁷⁻³⁹⁹. KDM6A et KDM6B sont capables de déméthyliser H3K27me1 *in vitro* mais cela n'a pas été montré *in vivo* alors que KDM7A (Lysine déméthylase 7A) de *C. elegans* semble être capable de déméthyliser H3K27me1 *in vivo*⁴⁰⁰, et l'équivalente de cette enzyme chez le poisson zèbre est capable de déméthyliser H3K27me1 et H3K27me2^{396,401}.

KDM6B et KDM6A font partie de la famille des protéines possédant un domaine Jumonji-C, qui contient l'activité histone déméthylase⁴⁰².

Il a été montré dans un modèle de macrophages murins que KDM6B n'est pas vraiment un activateur de la transcription des gènes, c'est-à-dire que les promoteurs où KDM6B se lie ne sont pas automatiquement actifs, cependant, cela semble faciliter la transcription en empêchant une méthylation répressive de H3K27. L'inactivation de KDM6B n'entraîne pas de hausse globale de la méthylation de H3K27 dans ce modèle, ce qui confirme que la fonction de cette enzyme soit plutôt d'empêcher une méthylation aberrante de H3K27⁴⁰³.

KDM6B et KDM6A sont tous les deux capables d'activer la transcription de gènes *via* un remodelage de la chromatine, mais de manière indépendante de leur activité déméthylase. En effet, il a été montré que KDM6B et KDM6A privées de leur fonction déméthylase par mutation sont nécessaires et suffisantes pour rendre accessible le promoteur de l'*IFNG* (Interféron γ) dans des lymphocytes T⁴⁰⁴.

4- Acétylation et méthylation de H3K27

H3K27 peut être méthylée, ou acétylée : cette réaction est catalysée par la lysine acétyltransférase CBP⁴⁰⁵ alors que la désacétylation est catalysée par le complexe NURD (*Nucleosome remodeling and deacetylation complex*)⁴⁰⁶.

L'acétylation et la méthylation de H3K27 sont mutuellement exclusives. Il a été montré que les sites non méthylés de H3K27 vont être acétylés (ce qui est aussi vrai pour les autres lysines)⁴⁰⁷. Au niveau des promoteurs classiques, les sites non-occupés par H3K27me1 ou H3K27me3 sont occupés « par défaut » par H3K27me2, qui semble être une marque plutôt neutre vis-à-vis de l'activité du gène, mais qui est également présenté comme protégeant certains gènes d'une suractivation en prévenant une acétylation de K27⁴⁰⁸. Ainsi, un défaut de di-méthylation au niveau d'un promoteur entraîne une hyperactivation par hyperacétylation⁴⁰⁷.

II- EZH2, TEM et agressivité des cancers

1- Expression d'EZH2 dans les tissus sains et tumeurs

De nombreuses études se sont intéressées à l'expression d'EZH2 dans différents types de tumeurs, à l'aide de techniques variées. Ces travaux ont été résumés dans le **Tableau 4**. Dans des carcinomes cellulaires rénaux à cellules claires (ccRCC), une forte expression d'EZH2 est corrélée avec un mauvais pronostic, des métastases et un stade tumoral avancé^{409,410}. Des observations similaires ont été collectées dans des carcinomes de l'œsophage à cellules squameuses, dans lesquels le niveau d'expression d'EZH2 est plus haut dans les tumeurs que dans les tissus adjacents, et ce niveau est corrélé à l'apparition de métastases, à un mauvais pronostic, à la taille de la tumeur et à la profondeur d'invasion des cellules tumorales⁴¹¹. Des données semblables ont été obtenues dans des carcinomes urothéliaux de la vessie, des mélanomes cutanés murins et humains, des cancers de la prostate réfractaires aux hormones et métastatiques, des cancers gastriques, mammaires, pulmonaires et ovariens, ainsi que dans des tumeurs pédiatriques du cerveau. Il est donc évident qu'un haut niveau d'expression d'EZH2 est fréquemment corrélé à un stade de tumeur avancé, un mauvais pronostic et une agressivité importante des tumeurs⁴¹²⁻⁴²¹.

Type de cancer	Expression d'EZH2	Technique utilisée	Ref.
Carcinome rénal à cellules claires	Surexprimé dans les métastases	IHC	409
Carcinome rénal à cellules claires	Surexprimé dans les carcinomes agressifs et invasifs	IHC	410
Carcinome de l'œsophage à cellules squameuses	Surexprimé	IHC	411
Carcinome urothéliale de la vessie	Surexprimé dans les carcinomes agressifs et invasifs	RT-qPCR sur tissus et lignées cellulaires	420
Carcinome urothélial	Surexprimé	IHC et puces sur tissus	419
Mélanomes cutanés et cancers de l'endomètre, de la prostate et du sein	Surexprimé	IHC et puces sur tissus	412
Mélanomes humains et murins	Surexprimé	IF	421
Cancers de la prostate métastatiques et réfractaires aux hormones	Surexprimé	Profilage de l'expression génique	418
Cancers gastriques	Surexprimé et corrélée avec l'invasion et l'agressivité	IHC	416
Cancers du sein	Surexprimé dans les tumeurs invasives	Puces à tissus	415
Cancers des ovaires	Surexprimé	IHC	417
Adénocarcinomes du poumon	Surexprimé dans les tumeurs de mauvais pronostic	IHC	413
Tumeurs au cerveau chez l'adulte et chez l'enfant	Surexprimé	IHC	414
Adénocarcinomes du poumon	Mutations inactivatrices chez 14% des patients de la cohorte	Séquençage	419
Syndromes myélodysplasiques/ Néoypes myéloprolifératifs	Mutations inactivatrices	Analyse des mutations	422

Tableau 4 : Expression d'EZH2 dans différents types de cancers et corrélation avec les paramètres cliniques.

EZH2 est souvent surexprimé dans les cancers (en vert), mais dans quelques cas comme l'adénocarcinome du poumon ou le syndrome myélodysplasique, on peut trouver des mutations inactivatrices au niveau du gène d'EZH2 (en rouge). IHC = Immunohistochimie ; IF = Immunofluorescence.

Malgré le fait qu'EZH2 semble associée à l'agressivité des tumeurs, on trouve quelques mutations inactivatrices ou délétions du gène dans certains cancers, ce qui laisse penser qu'EZH2 peut avoir un rôle ambigu dans ces pathologies. Dans des adénocarcinomes de poumon, la mutation de *KRAS* (*Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*) est un événement oncogénique majeur, fréquemment associé avec une mutation d'EZH2. Des mutations inactivatrices d'EZH2 ont été retrouvées dans 14% de ces tumeurs. Un KO conditionnel d'EZH2

chez la souris a permis de montrer que l'inactivation de ce gène entraîne l'augmentation de l'agressivité de l'adénocarcinome de poumon, dans des souris chez lesquelles *KRAS* est muté⁴²³. De plus, une étude réalisée sur 119 patients atteints de syndromes myélodysplasiques et de néoplasmes myéloprolifératifs a montré que 8,4% de ces patients possèdent une mutation inactivatrice d'*EZH2* et 3,4% ont une délétion de ce même gène. Il est également montré qu'une délétion d'*EZH2* chez la souris est suffisante pour induire une dysplasie myéloïde⁴²².

2- Modulation de la TEM par EZH2

Puisqu'*EZH2* est surexprimée dans de nombreuses tumeurs agressives, il est proposé qu'elle joue un rôle important dans la régulation de l'expression des EMT ATFs. Cependant, dans des lignées cellulaires de carcinomes à cellules squameuses de la tête et du cou, (FaDu et SNU1041) *EZH2* ne régule pas l'expression de *SNAI1* ou *SNAI2*. De plus, l'extinction d'*EZH2* par siRNA entraîne l'augmentation du niveau de E-CADHERINE et la diminution du niveau de N-CADHERINE et de VIMENTINE, aboutissant à l'inhibition de la migration et de l'invasion de ces cellules sans altérer l'expression des EMT ATFs⁴²⁴. De manière surprenante, dans les cellules de cancer des ovaires SKOV3, des expériences de ChIP (*Chromatin immunoprecipitation*) ont montré qu'*EZH2* peut directement réprimer l'expression de *ZEB2* lorsque la TEM est induite par un traitement au TGF- β ⁴²⁵, ce qui suggère qu'*EZH2* inhibe la TEM dans ces cellules. Dans les lignées cellulaires de carcinome hépatocellulaire MHCC97H et MHCC97L, l'ARN non codant *CARLO5* se lie à *EZH2* et recrute cette protéine au niveau du promoteur de *miR-200*, ce qui en réprime l'expression. Il a été montré que le *miR-200b* est associé au phénotype épithélial en bloquant la TEM, *via* l'inhibition de la signalisation de *ZEB1* et *ZEB2* notamment. La répression de l'expression de *miR-200b* par le complexe *CARLO5-EZH2* favorise donc la TEM¹⁷¹. Dans des cellules de cancer du poumon non à petites cellules, la surexpression de *miR-21* entraîne aussi l'augmentation de l'expression d'*EZH2* de manière inconnue, et entraîne une augmentation de l'invasion et de la migration de ces cellules⁴²⁶.

Bien que l'implication d'*EZH2* dans la régulation de l'expression des EMT ATFs n'est pas clairement définie, quelques interactions entre ces protéines ont été décrites. En effet, la surexpression de *TWIST1* dans des cellules squameuses de moelle osseuse entraîne la surexpression d'*EZH2*, sans que le mécanisme ne soit décrit. Cela est accompagné d'une diminution de la prolifération cellulaire et l'addition de la marque H3K27me3 sur le promoteur

de *CDKN2A* (*Cyclin dependnt kinase inhibitor 2A*)⁴²⁷. Dans des cellules de carcinome de la langue à cellules squameuses, SNAI1 et SNAI2 induisent la répression du *miR-101* et en conséquence augmentent le niveau d'EZH2 dans ces cellules⁴²⁸. Enfin, dans des cellules de carcinome nasopharyngé, SNAI1 peut se lier aux HDAC1/2 ainsi qu'à EZH2 afin de créer un complexe répresseur, capable de tri-méthyliser H3K27 et de désacétyler les histones, qui réprime notamment l'expression de *CDH1*⁴²⁹.

EZH2 ne régule pas seulement la TEM par ses interactions avec les EMT-ATF, mais également en régulant directement l'expression de gènes impliqués dans la régulation de la TEM dans de nombreux types cellulaires (**Tableau 5**). En effet, l'extinction de *CDH1* peut être directement médiée par EZH2. Il a été montré dans des cellules de cancer du côlon HT-29-M6 que SNAI1 et EZH2 sont requis pour le recrutement de PRC2 sur le promoteur de *CDH1*, et que ces deux protéines se stabilisent mutuellement au niveau de ce promoteur⁴³⁰. D'autres études montrent qu'EZH2 réprime directement l'expression de *CDH1* en tri-méthylant H3K27 au niveau de son promoteur⁴³¹. De la même façon, il a été montré, dans des cellules de cancer des ovaires HO-8910, qu'EZH2 réprime l'expression de *CDH1*. En effet, l'extinction de l'expression d'EZH2 par siRNA entraîne une augmentation du niveau de E-CADHERINE et une diminution de l'invasion et de la migration de ces cellules⁴¹⁷. Dans la lignée cellulaire de cancer de la prostate PC3, le potentiel traitement anti-cancéreux Triptolide (ces mécanismes ne sont pas bien décrits mais impliqueraient les caspases, la voie NF-κB, les protéines de choc thermique et des mécanismes de réparation à l'ADN⁴³²) entraîne la diminution d'ARNm d'EZH2, et aboutit à une augmentation de l'expression de *CDH1*⁴³³.

Origine de la lignée cellulaire	Nom de la lignée	Gènes régulés	Direct/Indirect	Ref.
Cancer squameux de la tête et du cou	FaDu et SNU1041	Répression de <i>CDH2</i> et <i>VIM</i> Activation de <i>CDH1</i>	Inconnu	424
Cancer des ovaires	SKOV3 et Kuramochi	Répression de <i>ZEB2</i> , <i>VIM</i> et <i>CDH2</i>	Direct	425
Cancer du colon	HT-29 M6	Répression de <i>CDH1</i>	Direct	430
Cancer du poumon non à petites cellules	A549	Répression de <i>CDH1</i>	Direct	431
Cancers des ovaires	HO-8910	Répression de <i>CDH1</i> et activation de <i>TGFB1</i>	Inconnu	417
Cancer de la prostate	PC3	Répression de <i>ADRB2</i> , <i>DAB2IP</i> , <i>CDH1</i> et <i>CDKN2A</i>	Inconnu	433
Cancers de la prostate et du sein	LnCAP, MCF7, DU-145 et LSHAR	Répression de <i>RKIP</i>	Direct	434
Mélanomes humains et murins	XB2, Melan-a, HEK293T, B16F1 et B16F10	Répression de <i>AMD1</i> , <i>DCK</i> et <i>WDR19</i>	Direct	421
Cancer du poumon à petites cellules	DMS53, Lul30 et H209	Répression de <i>JUB</i>	Direct	435
Cancer du pancréas	MIA-PaCa2 et Panc04.03	Répression de <i>CDKN1B</i>	Direct	436
Carcinome hépatocellulaire du foie	huh-7 et Hep-3B	Répression de <i>APC</i>	Direct	437
Carcinome du poumon non à petites cellules	H358 et A549	Répression de <i>IGF1</i>	Inconnu	423
		Répression de <i>AKT</i> et <i>ERK</i> (via <i>IGF-1</i>)	Indirect	423
Cancer du sein ER-négatif	MDA-MB-231	Répression des gènes cibles de <i>NF-κB</i>	Inconnu	438
Cancer du sein de type luminal ER-positif	MCF7	Activation des gènes cibles de <i>NF-κB</i> par liaison avec <i>RELA</i> et <i>RELB</i>	Direct	438
Cancer du sein	MCF7	Activation de <i>MYC</i> et <i>CCND1</i>	Direct	439

Tableau 5 : Gènes cibles d'EZH2 dans différentes lignées cellulaires cancéreuses.

EZH2 réprime l'expression (en rouge) de plusieurs gènes dans différentes lignées, mais elle peut parfois directement ou indirectement activer (en vert) la transcription de certains gènes, notamment des gènes cibles de la voie *NF-κB*.

RKIP (*Raf-1 kinase protein inhibitor*) inhibe la formation de métastases dans différents types de cancers comme les cancers du sein, de la prostate, de l'estomac et du col de l'utérus⁴⁴⁰⁻⁴⁴² en inhibant la protéine RAF, de la voie RAS/MAPK (cf. Chapitre I, II- 1.1.2.1- Activation de la voie des MAPK par le TGF- β). Dans des lignées cellulaires de cancer du sein (MCF-7, T47-D et MDA-MB-231) et de la prostate (LNCaP, DU145 et PC3), EZH2 réprime directement la transcription de *RKIP* en tri-méthylant H3K27 au niveau de son promoteur, ce qui induit l'augmentation de la formation de métastases⁴³⁴. De plus, dans des mélanomes, EZH2 réprime l'expression de *AMD1* (*Adenosylmethionine decarboxylase 1*, impliquée dans la synthèse de polyamine), induisant une augmentation des niveaux de SNAI1, ZEB1 et TWIST1 et une augmentation de l'invasion et la formation de métastases, *in vitro* et *in vivo*⁴²¹. Dans des cancers du poumon à petite cellules, la surexpression d'EZH2 est liée à un mauvais pronostic et à la répression de *JUB1* (*Transcription factor JUNGBRUNNEN 1*) dépendante de H3K27me3, *JUB1* ayant un rôle antiprolifératif dans ces modèles (DMS53, Lu130 et H209)⁴³⁵. Enfin, l'expression de *CDKN1B* (*Cyclin dependant kinase inhibitor 1B*) codant pour le suppresseur de tumeur P27KIP, impliquée dans l'arrêt du cycle cellulaire *via* l'inhibition de protéines CDK, est réprimée de manière dépendante d'EZH2 dans des cellules de cancer du pancréas MIA-PaCa2 et Panc04.03, conduisant à une prolifération incontrôlée et à une agressivité de ces cellules⁴³⁶.

EZH2 induit également la TEM et l'agressivité des cancers *via* la répression de gènes impliqués dans différentes voies moléculaires liées à la TEM. En effet, dans des cancers du foie, EZH2 est recruté par le ncRNA *IncAPC* sur le promoteur du gène *APC* (*Adenomatous polyposis coli*) où il réprime sa transcription en méthylant H3K27. APC participe à la séquestration cytosolique de la β -CATENINE et donc à sa dégradation. La surexpression d'EZH2 aboutit donc à l'activation de la voie WNT/ β -CATENINE ce qui induit le renouvellement des cellules initiatrices de tumeur du foie et l'agressivité⁴³⁷. Dans les lignées cellulaires d'adénocarcinome du poumon non à petites cellules A549 et H358, l'inhibition chimique d'EZH2 (à l'aide de la molécule chimique GSK126) entraîne une augmentation du niveau de l'ARNm d'*IGF1* (*Insulin like growth factor 1*), associée à une diminution globale du niveau de H3K27me3. Parmi les gènes cibles d'*IGF1*, *AKT* et *ERK* ont été associés à l'induction de la TEM et à la prolifération cellulaire⁴²³.

Des données obtenues dans les cancers du sein illustrent également un rôle ambigu d'EZH2 dans l'agressivité des cancers. Dans la lignée MDA-MB-231, ER (*Estrogen receptor*) - négative, EZH2 active la transcription des gènes cibles de NF-κB de manière indépendante de son activité méthyltransférase, ce qui contribue à l'agressivité de ces cellules cancéreuses. Au contraire, dans la lignée cellulaire ER-positif MCF-7, EZH2 interagit avec ER et active le recrutement du complexe PRC2 sur le promoteur des gènes cibles de NF-κB, ce qui induit la répression de leur transcription⁴³⁸.

Toutes ces études mettent en évidence qu'EZH2 peut être considéré comme un inducteur de la TEM et de l'agressivité des cancers dans un grand nombre de types différents. Mais de manière surprenante, dans de plus rares cas, une inactivation d'EZH2 est associée à un phénotype cancéreux invasif (**Tableau 4**). EZH2 a un rôle paradoxal et ambigu dans la régulation de la TEM.

3- Modulation de la TEM par EZH2 indépendante de son activité catalytique

Dans des cellules surexprimant EZH2 active ou mutante, sans expression d'EZH2 endogène, l'expression des gènes cibles de NF-κB est augmentée *via* la liaison d'EZH2 aux sous unités de NF-κB. Cela montre qu'EZH2 induit l'expression des gènes cibles de NF-κB de manière indépendante de son activité catalytique. L'interaction d'EZH2 avec NF-κB est exclusive de son interaction avec PRC2⁴³⁸.

De la même manière, dans des lignées cellulaires de cancer du sein MCF-7 et T47D, des expériences de *GST-pulldown* et de co-IP ont montré qu'EZH2 interagit avec ERα et la β-CATENINE et induit l'activation de la transcription de leurs gènes cibles. Cette activation est observée également avec un mutant d'EZH2 ne comportant pas le domaine méthyltransférase. Ces interactions contribuent, dans ces modèles, à la progression du cycle cellulaire et l'agressivité des tumeurs⁴³⁹. Ces exemples montrent qu'EZH2 est capable d'activer la transcription de certains gènes cibles indépendamment de son interaction avec le complexe PRC2.

4- Nouvelles stratégies de thérapies anti-cancéreuses ciblant EZH2

Plus de 10 essais cliniques en cours évaluent les effets d'inhibiteurs d'EZH2 (EZH2i) dans de multiples cancers. Par exemple, une étude de phase I utilisant l'EZH2i GSK2816126 dans des lymphomes diffus à large cellules B réfractaires ou en rechute, d'autres lymphomes non-

hodgkiniens, des lymphomes folliculaires transformés, tumeurs solides et myélomes multiples a montré un effet antitumoral évident de la molécule. Quelques autres EZH2i sont testés comme le tazemetostat (dans environ 15 études), MK683, CPI-1205 et SHR2554. Ces composés sont bien sûr toujours en développement, mais il semble bien que l'inhibition d'EZH2 est une thérapeutique prometteuse dans de nombreux types de cancer différents, solides ou non (**Tableau 6**).

Titre	Phase	Inhibiteur	Cancer
<i>A phase 1 study of SHR2554 in subjects with relapsed or refractory mature lymphoid neoplasms</i>	Phase 1	SHR2554	Néoplasmes lymphoïdes matures réfractaires ou en rechute
<i>A phase 1 study of the EZH2 inhibitor tazemetostat in pediatric subjects with relapsed or refractory INI1-negative tumors or synovial sarcoma</i>	Phase 1	Tazemetostat	Tumeurs rhabdoïdes, Tumeurs INI-1 négatives, Sarcomes synoviaux et tumeurs rhabdoïdes malignes des ovaires.
<i>A phase II, multicenter study of the EZH2 inhibitor tazemetostat in adult subjects with INI-1-negative tumors or relapsed/refractory synovial sarcoma</i>	Phase 2	Tazemetostat	Tumeurs rhabdoïdes malignes, Tumeurs rhabdoïdes du rein, Tumeurs rhabdoïdes et térétoïdes atypiques (t 8 autres)
<i>ProSTAR: a study evaluating CPI-1205 in patients with metastatic castration resistant prostate cancer</i>	Phase 1/2	CPI-1205	Cancers de la prostate métastatiques résistants à la castration
<i>ORION-E: A study evaluating CPI-1205 in patients with advanced solid tumors</i>	Phase 1/2	CPI-1205	Tumeurs solides avancées
<i>Study of the EZH2 inhibitor Tazemetostat in malignant mesothelioma</i>	Phase 2	Tazemetostat	Mésothéliomes, perte de fonction de BAP1
<i>Open-label, multicenter, phase 1/2 study of tazemetostat (EZH2 histone methyl transferase (HMT) inhibitor as a single agent in subjects with advanced solid tumors or with B-cell lymphomas and Tazemetostat in combination with Prednisolone in subjects with DLBCL</i>	Phase 1/2	Tazemetostat	Lymphomes à cellules B, tumeurs solides avancées, Lymphomes diffus à grande cellules B (et 3 autres)
<i>A study evaluating CPI-1205 in patients with B-cell lymphomas</i>	Phase 1	C-1205	Lymphomes à cellule B
<i>Tazemetostat in treating patients with relapsed or refractory advanced solid tumors, non-Hodgkin lymphoma, or histiocytic disorders with EZH2, SMARCB1, or SMARCA4 gene mutations (a pediatric match treatment trial)</i>	Phase 2	Tazemetostat	Néoplasmes solides malins avancés, lymphomes de Hodgkin de l'enfant de stage II (et 47 autres)
<i>A study to investigate the safety, pharmacokinetics, pharmacodynamics and clinical activity of GSK2816126 in subjects with relapsed/refractory diffuse large B-cell lymphoma, transformed follicular lymphoma, other non-Hodgkin's lymphomas, solid tumors, and multiple myeloma</i>	Phase 1	GSK2816126	Cancers
<i>Safety and efficacy of MAK683 in adult patients with advanced malignancies</i>	Phase 1/2	MAK683	Lymphomes diffus à grandes cellules B

Tableau 6 : Résumé des essais cliniques ciblant EZH2 dans les cancers.

Composés inhibant l'activité d'EZH2 utilisées en essais cliniques dans différents types de cancers, tumeurs solides et tumeurs liquides.

III-KDM6B, TEM et agressivité des cancers

1- Différences d'expression de KDM6B entre tissus sains et tissus cancéreux

KDM6B est différentiellement exprimée entre les tissus cancéreux et les tissus sains adjacents (**Tableau 7**). Par exemple, dans des carcinomes hépatocellulaires, des analyses en WB et RT-qPCR (*Reverse transcriptase-quantitative polymerase chain reaction*) ont montré que *KDM6B* est surexprimée dans la tumeur par rapport aux tissus adjacents. De plus, l'expression de *KDM6B* est corrélée avec l'existence de métastases et l'expression de *SNAI2*⁴⁴³. Dans des carcinomes rénaux à cellules claires, l'expression de *KDM6B* est également plus élevée dans les tissus tumoraux comparé aux tissus normaux (RT-qPCR sur tissus, WB et IHC (Immunohistochimie)), et la surexpression de *KDM6B* est liée à l'augmentation de la taille de la tumeur, à la présence de métastases et à un mauvais pronostic⁴⁴⁴. Des résultats similaires ont été observés dans les myélomes multiples⁴⁴⁵, et dans des lymphomes de Hodgkin d'après des analyses IHC⁴⁴⁶. Une analyse de données *Oncomine* a également confirmé que *KDM6B* est surexprimé dans les cancers du sein invasifs et métastatiques, comparé aux cancers moins invasifs⁴⁴⁷. De la même manière, des données de RT-qPCR ont montré que l'ARNm de *KDM6B* est surexprimé dans des mésothéliomes pleuraux malins comparés à des lésions bénignes de la plèvre⁴⁴⁸. De plus, *KDM6B* est également surexprimée dans des cancers des ovaires au niveau protéique et ARNm, et son expression est associée avec l'invasion, les métastases et une diminution du taux de survie⁴⁴⁹. Toutes ces études montrent que *KDM6B* peut-être classée parmi les oncogènes, et que son expression est corrélée à la TEM et à l'agressivité des cancers. Cependant, des résultats contradictoires et intrigants ont également été rapportés. Par exemple, même si *KDM6B* est surexprimée dans les adénocarcinomes ductiles du pancréas comparé aux tissus sains adjacents, son expression est d'autant plus faible que le stade de la tumeur est élevé⁴⁵⁰. De plus, *KDM6B* est sous-exprimée dans des cancers du côlon peu différenciés (phénotype mésenchymateux), dans une cohorte de 96 patients, par rapport à des tumeurs plus différenciées⁴⁵¹. Chez des patients atteints de cancer colorectal, *KDM6B* était sous-exprimée comparé aux tissus normaux, et une expression élevée de *KDM6B* était corrélée avec un bon taux de survie dans une cohorte de 151 patients atteints de cancers colorectaux⁴⁵². Enfin, dans des cancers du poumon non à petites cellules, *KDM6B* est surexprimée dans les tissus sains par rapport aux tumeurs et dans les tumeurs les moins invasives comparé aux plus invasives⁴⁵³. Ensemble, ces données suggèrent que l'expression

de KDM6B peut-être corrélée ou inversement corrélée avec l'invasion et l'agressivité des cancers, suivant le modèle de cancer. Ces données sont compilées dans le **Tableau 7**.

Type de cancer	Expression de KDM6B	Technique utilisée	Ref.
Carcinome hépatocellulaire	Surexprimée	RT-qPCR sur tissus et Western Blotting (WB)	443
Carcinome rénal à cellules claires	Surexprimée	RT-qPCR sur tissus, WB et IHC	444
Myélome multiple	Surexprimée	étude de données publiques	445
Lymphome de Hodgkin	Surexprimée	IHC	446
Cancers du sein	Surexprimée	Analyse des données <i>Oncomine</i>	447
Mésothéliome pleural malin	Surexprimée	RT-qPCR sur tissus	448
Cancer des ovaires	Surexprimée	RT-qPCR sur tissus et IHC	449
Adénocarcinome canalaire du pancréas	Sous-exprimée dans les tumeurs invasives comparées aux tumeurs de bas grade	puces à ARN sur tissus	450
Cancer du colon	Sous-exprimée dans les tumeurs peu différenciées	RT-qPCR sur tissus	451
Cancer colorectal	Sous-exprimée	IHC	452
Cancer du poumon non à petites cellules	Sous exprimée par rapport aux volontaires sains, et dans les tumeurs les moins invasives par rapport aux plus invasives	qRT-PCR	453

Tableau 7 : Expression de KDM6B dans différents types cancéreux.

KDM6B est souvent surexprimé (vert) dans les cancers, mais est parfois sous-exprimé (en rouge) dans des carcinomes invasifs canaux du pancréas et des cancers du côlon peu différenciés.

2- KDM6B module la TEM en ciblant des gènes spécifiques

2.1- Lié à l'activité catalytique déméthylase

Il a été décrit que KDM6B module l'expression des EMT-ATFs au cours de la TEM dans différentes lignées de cellules cancéreuses (**Tableau 8**). En effet, l'expression de *SNAI1* est directement activée par KDM6B. Par exemple, dans la lignée mammaire de souris NmuMG, H3K27 est déméthylée par KDM6B au niveau du promoteur de *SNAI1* lorsque KDM6B est surexprimée, entraînant l'expression de gènes mésenchymateux⁴⁴⁷. Dans la lignée cellulaire de carcinome hépatocellulaire HepG2, KDM6B active directement la transcription de *SNAI2*, et la surexpression de KDM6B induit la TEM, la migration, l'invasion et des caractéristiques de cellules souches (formation d'holoclones et capacités clonogéniques)⁴⁴³. Dans la lignée cellulaire de carcinome cellulaire du rein à cellules claires Caki-2, KDM6B active directement

la transcription de *SNAI2* ce qui augmente l'expression de marqueurs mésenchymateux, diminue l'expression de protéines épithéliales et augmente les capacités d'invasion de ces cellules⁴⁴⁴. Dans la lignée de carcinome cellulaire du rein ACHN, l'extinction par siRNA du lncRNA *HOTAIR* entraîne une diminution des niveaux de *KDM6B* et de sa cible *SNAI1*, et une diminution de l'invasion et de la migration de ces cellules, suggérant que l'expression de *KDM6B* est régulée au niveau de l'ARNm⁴⁵⁴.

Au contraire, l'extinction ou l'inhibition de l'activité de *KDM6B* dans la lignée cellulaire de cancer du côlon SW-480 induit augmentation de l'expression des EMT-ATFs *SNAI1*, *ZEB1* et *ZEB2*, et conduit ensuite à une diminution de l'expression de *CDH1*, *CLDN1* et *CLDN7* (codant respectivement pour la E-CADHERINE, la CLAUDINE 1 et la CLAUDINE 7)⁴⁵¹. Ces données suggèrent que l'activité déméthylase de *KDM6B* est généralement associée à la TEM, mais dans certains modèles comme les cellules de cancer du côlon, *KDM6B* peut être associée à un phénomène épithélial.

Il a été décrit que *KDM6B* module l'expression de nombreux gènes impliqués dans l'induction ou le maintien d'un phénotype épithélial ou mésenchymateux. En effet, dans la lignée cellulaire de carcinome colorectal HCT116, *KDM6B* active directement l'expression du gène épithélial *EPCAM* par son activité déméthylase, et conduit à une augmentation de la taille de la tumeur, de la prolifération cellulaire et de manière surprenante de la migration et de l'invasion des cellules⁴⁵⁵. L'expression de *EPCAM* et des gènes impliqués dans la voie WNT/ β -CATENINE sont inversement corrélés à la survie des patients atteints de cancer du côlon⁴⁵⁶. Dans des cancers des ovaires, les expressions de *HER2* (*Human epidermal growth factor receptor 2*) et de *KDM6B* sont corrélées à un mauvais pronostic et à un faible taux de survie. *KDM6B* active directement l'expression de *HER2* dans la lignée cellulaire de cancer des ovaires SKOV-3. Le traitement des cancers des ovaires par une combinaison de Paclitaxel (qui bloque la dépolymérisation des microtubules associée à la formation du fuseau mitotique) et de Carboplatine (qui provoque l'alkylation de l'ADN) fait diminuer le niveau de *KDM6B* et est associé à une augmentation de la marque H3K27me3 au niveau du promoteur du gène *HER2*, ce qui aboutit à une diminution de son expression et une diminution des capacités d'invasion et de migration des cellules⁴⁵⁷. Dans les lignées cellulaires de cancer du sein MDA-MB-231 et MCF-7, l'inhibition de l'activité déméthylase de *KDM6B*, à l'aide du composé GSKJ4, entraîne une répression de l'expression des gènes impliqués dans la pluripotence *SOX2* (*SRY-box*

transcription factor 2), *NANOG* et *OCT4* (*Octamer binding protein 4*) et est associé à une augmentation de la marque H3K27me3 au niveau de leurs promoteurs. Cela montre que KDM6B régule la différenciation des cellules de cancer du sein, induisant une dédifférenciation de celles-ci qui peut être liée à la TEM⁴⁵⁸. Il a été montré que KDM6B peut également agir en faveur d'un phénotype épithélial dans d'autres cancers. Dans la lignée cellulaire de peau normale humaine BJ, KDM6B est recrutée au niveau de gènes cibles de P53 *via* son interaction directe avec cette protéine, ou elle peut déméthyle H3K27me3. Il est proposé que KDM6B participe à l'augmentation de l'expression des gènes cibles de p53, activant ainsi l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose, diminuant ainsi l'agressivité des cellules cancéreuses⁴⁵⁹. KDM6B induit un phénotype de type épithélial dans des cellules BxPC3 d'adénocarcinome canalaire du pancréas en provoquant directement l'expression du gène *CEBPA* en déméthylant H3K27me3 au niveau de son promoteur. De plus, l'extinction de *KDM6B* ou de *CEBPA* (*CCAAT Enhancer binding protein alpha*) entraîne dans les deux cas l'apparition d'un phénotype mésenchymateux et augmente les capacités invasives de ces cellules⁴⁵⁰.

Il a été montré que certaines voies de signalisation liées à la TEM sont également régulées par KDM6B. Dans la lignée cellulaire de mélanome A375-LM3, KDM6B déméthyle H3K27me3 au niveau des promoteurs de gènes participant aux voies NF-κB et BMP (*Bone morphogenetic protein*) (notamment *BMP4*) entraînant l'activation de l'expression des gènes cibles de ces voies et l'apparition de caractéristiques malignes de ces cellules. De plus, la voie de signalisation du BMP active la transcription de *KDM6B* dans une boucle de rétrocontrôle positive⁴⁶⁰. Dans des cellules de myélomes multiples, l'expression de *KDM6B* est induite par la voie NF-κB, puis KDM6B active la voie des MAPK par son recrutement direct sur les promoteurs des gènes *ELK1* (*ETS like gene 1*) et *FOS* (*FBJ murine OsteoSarcoma viral oncogene homolog*), ce qui induit la croissance cellulaire, la prolifération et l'agressivité⁴⁴⁵. Au contraire, dans des fibroblastes humains, KDM6B active directement la transcription du gène *CDK2NA* par la déméthylation de H3K27me3 sur son promoteur entraînant un arrêt du cycle cellulaire^{461,462}. Des résultats similaires ont été obtenus dans des fibroblastes du poumon TIG-3. Après l'induction de l'expression de *KDM6B* par l'activation de RAF (voie des MAPK), KDM6B entraîne le blocage de la prolifération *via* l'induction de l'expression de *CDKN2A* en se fixant sur son promoteur⁴⁶³. Ces données sont compilées dans le **Tableau 8**.

Origine de la lignée cellulaire	Nom de la lignée	Gènes régulés	Direct/Indirect	Ref.
Mamelles de souris	NmuMG	Surexpression de <i>SNAI1</i>	Direct	447
Carcinome hépatique	HepG2	Surexpression de <i>SNAI2</i>	Direct	443
Carcinome de rein à cellules claires	Caki-2	Surexpression de <i>SNAI2</i>	Direct	444
Carcinome de rein	ACHN	Surexpression de <i>SNAI1</i>	Inconnu	454
Carcinome du colon	SW-480	Sous expression de <i>SNAI1</i> , <i>ZEB1</i> , et <i>ZEB2</i>	Inconnu	451
Carcinome colorectal	HCT116	Surexpression de <i>EpCAM</i>	Direct	455
Cancer des ovaires	SKOV-3	Surexpression de <i>HER2</i>	Direct	457
Cancer du sein	MCF-7 et MDA-MB-231	Surexpression de <i>NANOG</i> , <i>SOX2</i> et <i>OCT3</i>	Inconnu	458
Adénocarcinome du pancréas	BxPC3	Surexpression de <i>CEBPA</i>	Direct	450
Peau	BJ	Surexpression de gènes cibles de P53	Direct (<i>via</i> liaison à P53)	459
Mélanome	A375-LM3	Surexpression de <i>BMP2</i> , <i>BMP4</i> , <i>CCL2</i> , <i>STC1</i> , <i>TFPI2</i> , <i>PTGS2</i> et <i>TGM2</i>	Direct	460
Myélome multiple	MM-1S	Surexpression de <i>ELK1</i> et <i>FOS</i>	Direct	445
Poumon	IMR-90	Surexpression de <i>INK4A</i>	Direct	461
Fibroblastes de poumon	TIG-3	Surexpression de <i>INK4A</i>	Direct	463
Cellules de rein humain embryonnaire immortalisées	HEK-293	Stabilisation nucléaire de P53	Direct	464
Cancer du poumon non à petites cellules	H460 et A549	Stabilisation de <i>FOXO1</i> dans le noyau	Direct	465

Tableau 8 : Les gènes cibles de KDM6B dans différentes lignées cancéreuses.

KDM6B active (en vert) directement la transcription de gènes liés à la TEM dans de multiples lignées cellulaires cancéreuses. Elle réprime également (en rouge) l'expression d'EMT ATFs probablement de manière indirecte.

2.2- Fonction indépendante de son activité catalytique déméthylase

KDM6B peut également moduler l'agressivité de manière indépendante de son activité déméthylase. Dans la lignée cellulaire de rein embryonnaire humain immortalisée HEK293, KDM6B induit l'expression des gènes cibles de P53 sans être recrutée au niveau de leurs promoteurs, mais plutôt en augmentant la localisation nucléaire de P53, et donc le recrutement de P53 au niveau des promoteurs de ses gènes cibles. Ces données sont en faveur d'un rôle suppresseur de tumeur de KDM6B en contrôlant l'expression des gènes cibles de P53⁴⁶⁴. Ce mécanisme a également été observé dans la stabilisation du facteur de transcription FOXO1 (*Forkhead box protein O1*, un inducteur de gènes pro-apoptotiques) par

KDM6B, dans le noyau des cellules de cancer du poumon non à petites cellules A549 et H460. Cette interaction conduit à augmenter l'apoptose et diminuer la migration et l'invasion de ces cellules⁴⁶⁵.

3- Nouvelles perspectives de stratégies anti-cancéreuses ciblant KDM6B

Quelques études précliniques se sont portées sur les inhibiteurs de KDM6B, GSKJ4/GSKJ1, pour cibler les cancers. GSKJ4 est une prodrogue pour une utilisation cellulaire de l'inhibiteur GSKJ1, *in vitro*. Cet inhibiteur a été identifié par Kruidenier et son équipe en 2012⁴⁶⁶. Dans la lignée cellulaire de leucémie aiguë lymphoblastique (LAL) CUTLL1, un traitement par GSKJ4 induit un arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose. Ceci représente ainsi une approche thérapeutique prometteuse, car il n'affecte pas les cellules stromales ou les progéniteurs hématopoïétiques. Cependant ce traitement semblerait spécifique aux leucémies lymphoblastiques aiguë car il n'affecte pas les cellules de leucémies myéloïdes⁴⁶⁷. Un traitement GSKJ4 fait diminuer la croissance tumorale de xénogreffes de cellules SF7761 et SF8628 de gliomes pédiatriques chez la souris. Ces cellules présentent une mutation hétérozygote de H3K27 (H3K27S), et la moitié des histones H3 ne peuvent donc pas être méthylés sur la lysine 27. En revanche, les histones portant la mutation séquestrent le complexe PRC2 et induisent un effet dominant négatif et réduisent le niveau de méthylation de H3K27 non muté. Le traitement par GSKJ4 a permis de restaurer le niveau de méthylation normal sur les histones non mutées. GSKJ4 ne présente pas les mêmes effets sur d'autres lignées de gliomes pédiatriques qui ne contiennent pas la mutation⁴⁶⁸.

Objectifs

Cette dernière partie de l'introduction montre assez clairement que le statut de méthylation de H3K27 a une place prépondérante dans la régulation de la TEM, à plusieurs niveaux. Cette marque régule l'activation des voies de signalisation responsables de l'induction de la TEM, elle régule également l'expression des EMT ATFs, et directement l'expression de protéines effectrices de la TEM qui vont directement agir sur le phénotype épithélial ou mésenchymateux de la cellule.

Bien que cette régulation de la TEM par H3K27me3 dans les cancers soit bien documentée, il est impossible de définir cette marque comme favorable à l'établissement d'un phénotype épithélial ou d'un phénotype mésenchymateux, tant ses effets sont dépendants du modèle de cancer et des gènes sur lesquels on retrouvera cette marque. De plus, les principales enzymes responsables de l'instauration de cette marque (EZH2) et sa suppression (KDM6B) ont également un rôle ambigu dans différents cancers. Souvent, l'expression de chacune de ces enzymes est associée à la TEM et à l'agressivité des cancers, elles sont parfois associées au phénomène inverse. De plus, bien qu'étant antagonistes, KDM6B et EZH2 sont parfois toutes deux surexprimées et associées à la TEM dans les mêmes types de cancers, comme les cancers des ovaires^{417,449} ou des carcinomes cellulaires rénaux à cellules claires^{409,410,444} mais ces études ont été réalisées séparément pour EZH2 et KDM6B. Une seule équipe a étudié simultanément ces enzymes dans un modèle cancéreux⁴⁶⁹, et aucune étude n'a vu le jour jusqu'ici étudiant KDM6B et EZH2 au cours de la TEM, ce qui rajoute à l'intérêt de cette thèse.

L'expression et l'activité d'EZH2 et KDM6B ont donc une relation complexe avec l'induction ou le maintien de la TEM dans les cellules cancéreuses, qui semble être dépendant du type de cancer mais pas uniquement. Le sujet des mécanismes par lesquels EZH2 et KDM6B régulent la TEM est encore mal connu. C'est pourquoi les travaux de cette thèse ont eu pour objectif d'étudier les effets d'EZH2 et de KDM6B dans un modèle de cellules cancéreuses épithéliales facilement inductible en TEM par un co-traitement TGF- β /TNF- α . La visée finale de cette étude est de comprendre les mécanismes mis en jeu lors de la régulation de la mise en place d'un phénotype épithélial ou mésenchymateux par la triméthylation de H3K27 dans

ce modèle. Enfin, à long terme, ces travaux pourraient permettre de mettre en place une stratégie thérapeutique visant à empêcher la TEM *via* la modulation de H3K27me3 au cours dans les cellules cancéreuses.

Travaux de recherche

Matériel et méthodes

1- RT-qPCR

Les ARNs ont été extraits des cellules à l'aide du réactif Tri Reagent (TR118, Molecular Research Center) selon les indications du fabricant. La transcription inverse a été réalisée à l'aide de 12 U de l'enzyme M-MLV (M-1302, Sigma-Aldrich), 0,25 μ M d'oligo dT (Eurogentec), 1,25 μ M d'hexamères aléatoires (C118A, Promega) et 0,5 μ g d'ARN totaux, selon les recommandations du fabricant (Sigma-Aldrich). La PCR quantitative (qPCR) a été réalisée en duplicat en utilisant le système *Step-One plus real-time PCR system* (Applied Biosystems), le réactif *TB Green Premix Ex Taq (Tli RNase H Plus)* (R420L, Takara) et des amorces spécifiques dessinées à l'aide du logiciel *Primer 3*, selon les recommandations du fabricant (Takara). Les amorces sont répertoriées dans le **Tableau 9**.

Cibles	Application	Sens 5'-3'	Antisens 5'-3'
ADAM19	cDNA	CTGCGAAGGAGAGGTTCTGT	AAAATTCACATTGCCCTGGA
ADAMTS6	cDNA	ATGGGGGTGGCTACAGAGTA	CAGCCACGCACAGAATGTAA
	ChIP	CAAAGGCAGCATCTCAGAGT	TTTGCAAAGCCACACCAGC
CDH1	cDNA	CGGGAATGCAGTTGAGGATC	AGGATGGTGTAAAGCGATGGC
CDH2	cDNA	GGCATCGAAAGAGAAATGGA	AAGGCAGCTGTTTCAGAGGA
EZH2	cDNA	GGCATCGAAAGAGAAATGGA	AAGGCAGCTGTTTCAGAGGA
INHBB	cDNA	AGGTGGACGTTCTGAGCAGT	TCTGGGTGTGTAAGGATGGA
	ChIP	TCGAGGACACCTGTACGTC	CAAGATGTGCCGCTTACC
KDM6B	cDNA	ACGAGCCAGCCTACTACTGC	GCTGCCATTCTCACTTGTC
MMP9	cDNA	GAGTTCCCGAGTGAGTTGA	GTGGGGATTTACATGGCACT
SNAI1	cDNA	CGCGCTCTTTCCTCGTCAG	TCCCAGATGAGCATTGGCAG
VIM	cDNA	TTTGAAGAACTCCACGAAGACGA	CCACATCGATTTGGACATGCT
WNT5B	cDNA	CCTCGATGTCTTCAGGGTCT	GAGCCGTTCTGTAAACTGC
	ChIP	AGTGACCATTAGCAGGCACC	CTCTGTCACCCGTCCATCAG
ZEB1	cDNA	AGCAGTGAAAGAGAAGGGAATGC	GGTCCTCTTCAGGTGCCCTCAG

Tableau 9 : Amorces utilisées pour la RT-qPCR et la ChIP

2- Culture cellulaire, transfections et inhibiteurs chimiques

La lignée cellulaire A549 (Cancer du poumon non à petites cellules) a été cultivée dans du DMEM avec Glucose 1 g/L (L0066, Dominique Dutscher) à 37°C, 5% CO₂ et utilisées à 70-80% de confluence. Le milieu de culture a été supplémenté avec 5% de sérum de veau fœtal (S1810, Dominique Dutscher), 50 U/mL de pénicilline-streptomycine (L0018, Dominique Dutscher) et 1,25 μ g/mL d'amphotéricine B (P11-001, PAA). Lorsque c'est indiqué, elles ont été traitées pendant 3 jours par du TGF β à 4 ng/mL (100-21, Peprotech) et du TNF α à 20 ng/mL (300-01A, Peprotech), et/ou par du GSKJ4 (SML0701, Sigma-Aldrich) ou du GSK343 (SML0766, Sigma Aldrich) à 10 μ M ou du UNC1999 (46080, Cell Signaling) à 5 μ M. Les transfections par des plasmides ont été réalisées à l'aide du réactif JetPrime (114, Polyplus) ou le kit *cell line*

Nucleofector™ kit T (VCA-1002, Lonza) à l'aide du dispositif *Nucleofector™ 2b Device* (AAB-1001, Lonza) suivant les recommandations du fournisseur. Les plasmides pCMV-HA-EZH2 (#24230), pCMV-HA-KDM6B (#24167), pMSCV-EZH2 (#75125), pMSCV-JMJD3 (#21212) et pMSCV-JMJD3 H1390A (#21214) ont été obtenus par Addgene. Les différents siRNA ciblant INHBB (sc43861, Santa Cruz), ADAMTS6 (L-005776-00-005, Dharmacon) et WNT5B, EZH2 et KDM6B (Eurogentec) ont été transfectés avec de l'Interferin (409-10, Polyplus). Les lignées cellulaires stables surexprimant EZH2 sauvage, KDM6B sauvage ou KDM6B H1390A ont été obtenues par transduction de la lignée A549 par des particules lentivirales suivant Warda et col.⁴⁷⁰.

3- Tests de migration et d'invasion cellulaire

Les capacités de migration des cellules ont été mesurées par des tests de blessure-cicatrisation à l'aide d'inserts de culture composés de 2 puits dans des microplaques de 35mm de diamètre (81176, ibidi). Après avoir été pré-traitées, 18 000 cellules ont étéensemencées dans chaque puits de l'insert de culture, et l'insert a été retiré 16 h plus tard. La migration des cellules a ensuite été suivie pendant 8 h, et l'aire de la blessure recouverte par les cellules après 8h de migration a été mesurée.

Pour les tests d'invasion, 50 µL de matrigel (E1270, Sigma-Aldrich) dilués 8 fois dans du milieu de culture sans sérum ont été ajoutés à la partie supérieure d'une chambre de Boyden (140629, Thermo Scientific) positionnée dans une plaque 24 puits, et placée à 37°C pendant 4h afin que le matrigel polymérise. Ensuite, 50 000 cellules prétraitées ont étéensemencées dans la partie haute de la chambre de Boyden sur le matrigel, en présence du traitement, dans du milieu de culture sans sérum. La partie de basse de la chambre a été remplie avec 500µL de milieu de culture complet contenant le traitement. La chambre de Boyden a ensuite été retirée après 24h, le puits a été lavé au PBS et les cellules adhérentes au fond du puits ont été fixées dans de l'éthanol pendant 5 min, et colorées au cristal violet pendant 10 min. Elles ont enfin été photographiées puis comptées au microscope.

4- ChIP/ChIP-seq

Après traitement, les cellules ont été décollées de leur contenant à l'aide de trypsine, lavées au PBS puis fixées dans du formaldéhyde 1% à température ambiante pendant 8min sous agitation lente. La fixation a été stoppée par ajout de glycine à 125 mM pendant 5 min

toujours sous agitation lente. Les cellules ont alors été centrifugées pendant 5 min à 500 *g* et lavées 2 fois dans du PBS froid. La chromatine a été préparée en utilisant le kit *truChIP™ Chromatin Shearing kit* (520154, Covaris) suivant les recommandations du fabricant. Les noyaux ont été soniqués pendant 10 min à l'aide du sonicateur M220 (Covaris). Les ChIP ont été réalisés à l'aide de l'automate *IP-Star compact* (Diagenode) avec le kit *Auto iDeal ChIP-seq kit* pour histones (C01010171, Diagenode) et 1,5 µg d'anticorps « *ChIP-grade* » ou 1,5 µg d'IgG (C15410206, Diagenode) selon les recommandations du fabricant. Un cocktail d'inhibiteurs de protéases a été ajouté dans tous les tampons (AEBSF 104 mM, pepstatine A 1,5 mM, E-64 1,4 mM, bestatine 4 mM, leupeptine 2 mM et aprotinine 80 µM). L'ADN des inputs et des produits de ChIP a été purifié à l'aide du kit *Auto Ipure kit V2* (C03010010, Diagenode) et de l'automate *IP-Star compact* (Diagenode). Les banques pour le ChIP-seq ont été préparées à partir de 5 ng d'ADN purifié à l'aide du kit *NEBNext® Ultra™ DNA Library Prep Kit fir Illumina* (E7370S, New England Biolabs), suivant les recommandations du fabricant. A partir de chaque banque, des séquences de 50 paires de bases ont été séquencées à l'aide du dispositif Illumina HiSeq 1500 (Illumina). Les séquences lues ont été filtrées suivant leur qualité (Q score ≥ 30) et les séquences adaptatrices ont été retirées à l'aide de « *cutadapt* ». Les lectures ont été adaptées au génome humain (hg19) à l'aide du logiciel BWA (version 0.7.10). Les régions enrichies en H3K27me3, EZH2 ou KDM6B ont été identifiées en utilisant SICER-df ($g=w=200$ paires de bases). Les amorces utilisées pour la ChIP classique ont été dessinées à l'aide du logiciel *primer 3* et sont listées dans le **Tableau 9**. Les anticorps utilisés pour les ChIP sont listés dans le **Tableau 10**.

5- Western Blotting

Pour extraire les protéines totales, les cellules ont été grattées, puis lysées dans le tampon de lyse suivant : Tris 10mM, EDTA 1mM, PMSF 1 mM, NA-Vanadate 1mM, DOCA 1% et inhibiteurs de protéases (AEBSF 104 mM, pepstatine A 1,5 mM, E-64 1,4 mM, bestatine 4 mM, leupeptine 2 mM et aprotinine 80 µM) pendant 30 min sur glace avant d'être soniquées 15 s. Les protéines ont ensuite été dosées suivant la méthode de Bradford, et du SDS 1% et du Triton 0,2% ont été ajoutés à la solution. Ensuite, 20 à 40 µg de protéines ont été déposées dans un gel de polyacrylamide *TGX Stain free* (1610172, Biorad) (7,5, 10 ou 12 % d'acrylamide) pendant 35 min à 300 V à l'aide du system *Protean 3* (Biorad) et transférées sur une membrane en PVDF à l'aide du système *Transblot turbo* (1704150, Biorad) et suivant les indications du

fabricant. Les membranes ont été saturées dans du TBS 0,1% Tween 20 et 5% lait ou BSA suivant l'anticorps utilisé pendant 1h, puis incubées avec l'anticorps primaire sur la nuit à 4°C dans la solution de saturation. Les anticorps utilisés sont listés dans le **Tableau 10**. Elles ont ensuite été lavées 3 fois 10 min dans du TBS-Tween 20 0,1% puis incubées avec l'anticorps secondaire (anti-Lapin (BI 2407, Abliance) ou anti-Souris (BI 2413C, Abliance) couplé à la HRP) dilué au 1/10 000 dans du TBS-Tween 20 0,1% et lait 5% selon les recommandations du fabricant. Les membranes ont été lavées 3 fois 5 min dans du TBS-Tween 20 0,1% et incubées 5 min avec le substrat *Clarity Western ECL substrate* (1705051, Biorad) et la luminescence a été photographiée à l'aide du dispositif ChemiDoc™XRS+ (1708265, Biorad).

Cible	Application	Référence
ACTINE	WB	#A5060 Sigma-Aldrich
ADAMTS6	IHC	#PA5-60365 ThermoFisher
E-CADHERINE	IF	#610182 BD Transduction laboratories
EZH2	IF/ChIP/WB	#C1540039 Diagenode
	IHC	#5246 Cell Signaling
	WB	#ab133793 Abcam
HA	IF	#ab18181 Abcam
IgG	ChIP	#C15410206 Diagenode
INHBB	IHC	#PA5-81202 ThermoFisher
H3K27ac	ChIP	#C15410174 Diagenode
H3K27me3	IF/ChIP	#C15410069 Diagenode
	IF/WB	#ab6002 Abcam
KDM6B	IHC	#ab38113 Abcam
	IF	#ab38112 Abcam
	WB	#ab154985 Abcam
N-CADHERINE	WB/IF	#4215 Cell Signaling
VIMENTINE	IHC	#790917 Ventana medical Systems
	WB/IF/Cytométrie	#3932 Cell Signaling
WNT5B	IHC	#ab94914 Abcam

Tableau 10 : Liste des Anticorps utilisés

6- Microscopie Confocale

Les cellules ont été cultivées 24h sur lamelles de verre, puis fixées pendant 20 min dans du méthanol froid à -20°C et rincées 4 fois avec du PBS. La saturation a ensuite été réalisée avec de la BSA 1% dans du PBS pendant 1h à 37°C. Les cellules ont ensuite été incubées avec l'anticorps primaire dilué dans du PBS-BSA 1% sur la nuit à 4°C puis lavées 3 fois 3 min avec du TBS-Tween 0,1% sous agitation. Elles ont alors été incubées avec l'anticorps secondaire dilué au 1000^{ème} dans du PBS-BSA 1% pendant 1h à 37°C (Anti-lapin ou Anti-souris, couplé avec le fluorochrome Alexa Fluor 488 ou Alexa Fluor 555 (A11008, A21428, A11001, A21422, Life Technologies)) puis colorées avec du DAPI (4'-6'-diamidino-2-phénylindole) dilué au 1/6000^{ème} dans du TBS-Tween 20 0,1% pendant 10 min sous agitation. Les lamelles ont enfin été lavées

3 fois 3 min dans du TBS-Tween 20 0,1%, et montées sur lames à l'aide du milieu de montage *Fuoromount Aqueous Mounting Medium* (F4680, Sigma Aldrich). L'actine a été colorée avec de la Phalloïdine-Rhodamine (P1951, Sigma-Aldrich). Les images ont été collectées à l'aide d'un microscope confocal à balayage laser Olympus FV1000 ou Zeiss LSM 800 AiryScan.

7- Immunohistochimie

Les biopsies FFPE de cancer du poumon non à petites cellules ont été collectées (en collaboration avec la bio banque de tissus de l'Université de Liège (Liège, Belgique)) et marqués avec les anticorps (**Tableau 10**). Le protocole a été approuvé par le comité d'éthique de l'Hôpital Universitaire de Liège et le diagnostic de chaque tissu a été confirmé par des histopathologistes expérimentés. L'analyse des IHC a été réalisée à l'aide d'un protocole standard décrit précédemment⁴⁷¹. Les échantillons ont été classés en deux groupes : les TEM positifs et les TEM négatifs selon le marquage de la VIMENTINE. Selon Hubert et col.⁴⁷², le score des marquages IHC a été calculé en multipliant un score d'intensité de marquage (0-3) et un score d'étendue du marquage (0-3) et un score global compris entre 0 et 9 a été obtenu. Tous les tissus marqués ont été évalués par deux histopathologistes expérimentés différents.

8- Statistiques

La comparaison des moyennes a été analysée à l'aide du test T de Student grâce au logiciel GraphPad Prism5. Les indexes de corrélation ont été mesurés à l'aide d'un test de Pearson à l'aide du logiciel GraphPad Prism5.

Résultats

1- Niveau d'expression de KDM6B et EZH2 dans des cancers du poumon

Il a été montré précédemment que KDM6B et EZH2 sont toutes les deux liées à la TEM, dans différents cancers ou modèles cancéreux. Nous avons donc d'abord analysé l'expression de ces protéines dans une cohorte de carcinomes du poumon non à petites cellules (NSCLC : *Non small cell lung carcinoma*). Les coupes de tumeurs incluses en paraffine (39 échantillons) (FFPE : *Formalin-Fixed Paraffin-Embedded*) ont été divisées en groupes TEM+ (n=19) et TEM- (n=20) en fonction de l'expression de la VIMENTINE (**Figure 15A**) selon Asgarova et col. ²⁵⁰. Une augmentation de l'expression d'EZH2 et de KDM6B sont observées dans les tumeurs TEM+ par rapport aux TEM- (**Figure 15B-C**). Par la suite nous avons voulu analyser la corrélation potentielle des expressions de ces protéines. En effet, ces expressions sont corrélées entre elles, indépendamment du niveau d'expression de la VIMENTINE (**Figure 15D-F**). Ces données montrent que bien que ces deux enzymes aient une activité opposée, elles sont toutes les deux surexprimées durant la TEM, dans notre cohorte de NSCLC, et nous montrent également que l'expression de ces protéines est corrélée dans ces cancers.

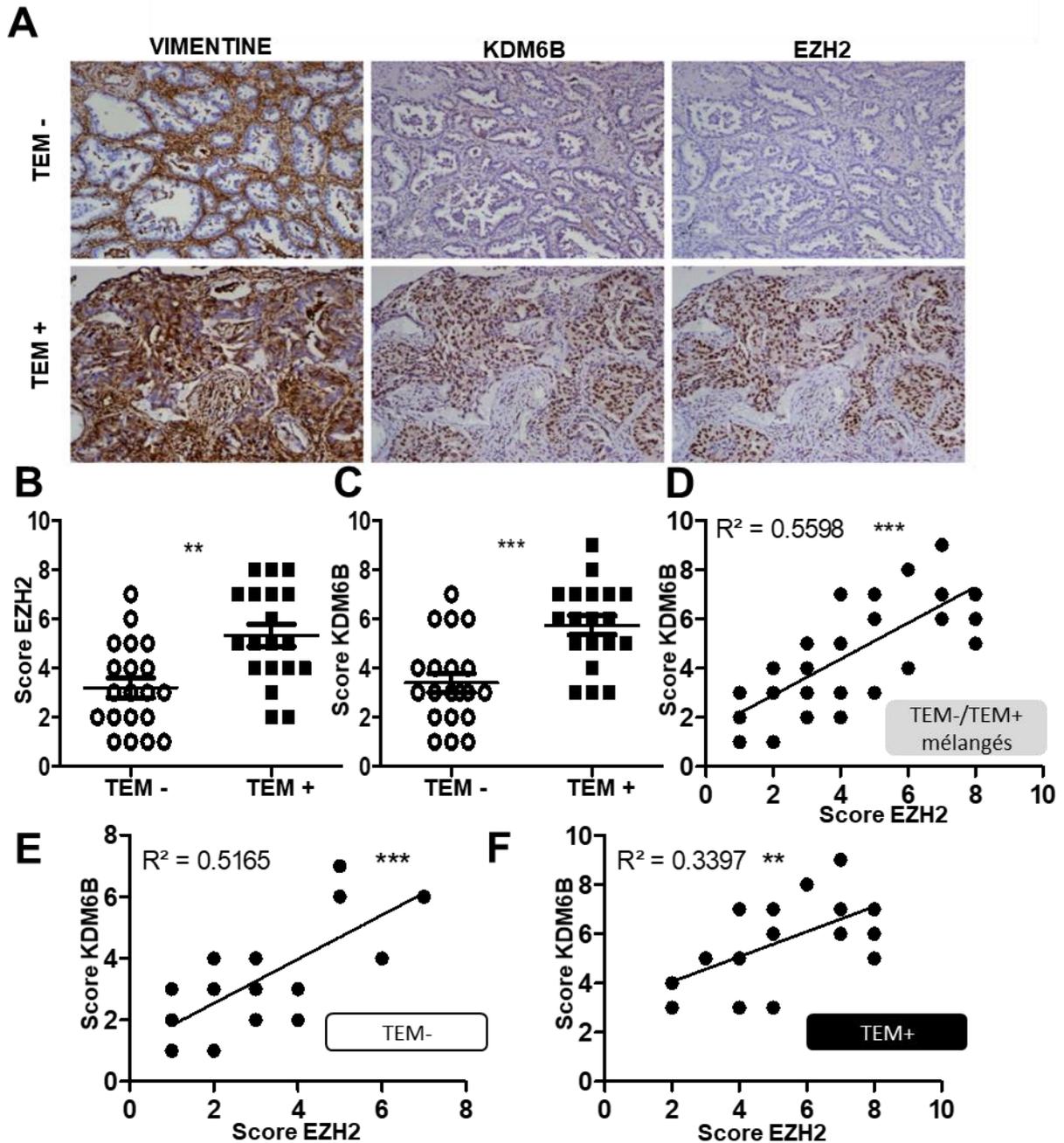


Figure 15 : Corrélation entre les niveaux d'expression d'EZH2 et de KDM6B et la TEM dans les NSCLC.
A. Marquage IHC VIMENTINE, EZH2 et KDM6B représentatifs de 39 NSCLC (TEM - = faible score VIMENTINE ; TEM + = Haut score VIMENTINE). **B.** Score des IHC EZH2 en fonction du statut TEM des tumeurs **C.** Score des IHC KDM6B en fonction du statut TEM des tumeurs. **D.** Corrélation entre les scores IHC d'EZH2 et KDM6B dans les 39 NSCLC. **E.** Corrélation entre les scores des IHC EZH2 et KDM6B dans les NSCLC TEM -. **F.** Corrélation entre les scores des IHC EZH2 et KDM6B dans les NSCLC TEM +.

Par la suite nous avons analysé les données de survie issues de la base *KM-plotter*⁴⁷³ sur les cancers du poumon. Ces données confirment que les patients atteints de cancers du poumon ayant une forte expression de l'ARNm de *KDM6B* (**Figure 16A**) ou d'*EZH2* (**Figure 16B**) ont une survie plus faible que les patients ayant une expression moindre d'*EZH2* ou *KDM6B*.

La survie d'autant plus faible lorsque l'on compare les patients avec une moyenne d'expression d'EZH2 et KDM6B élevée par rapport aux patients ayant une moyenne d'expression d'EZH2 et KDM6B faible (**Figure 16C**).

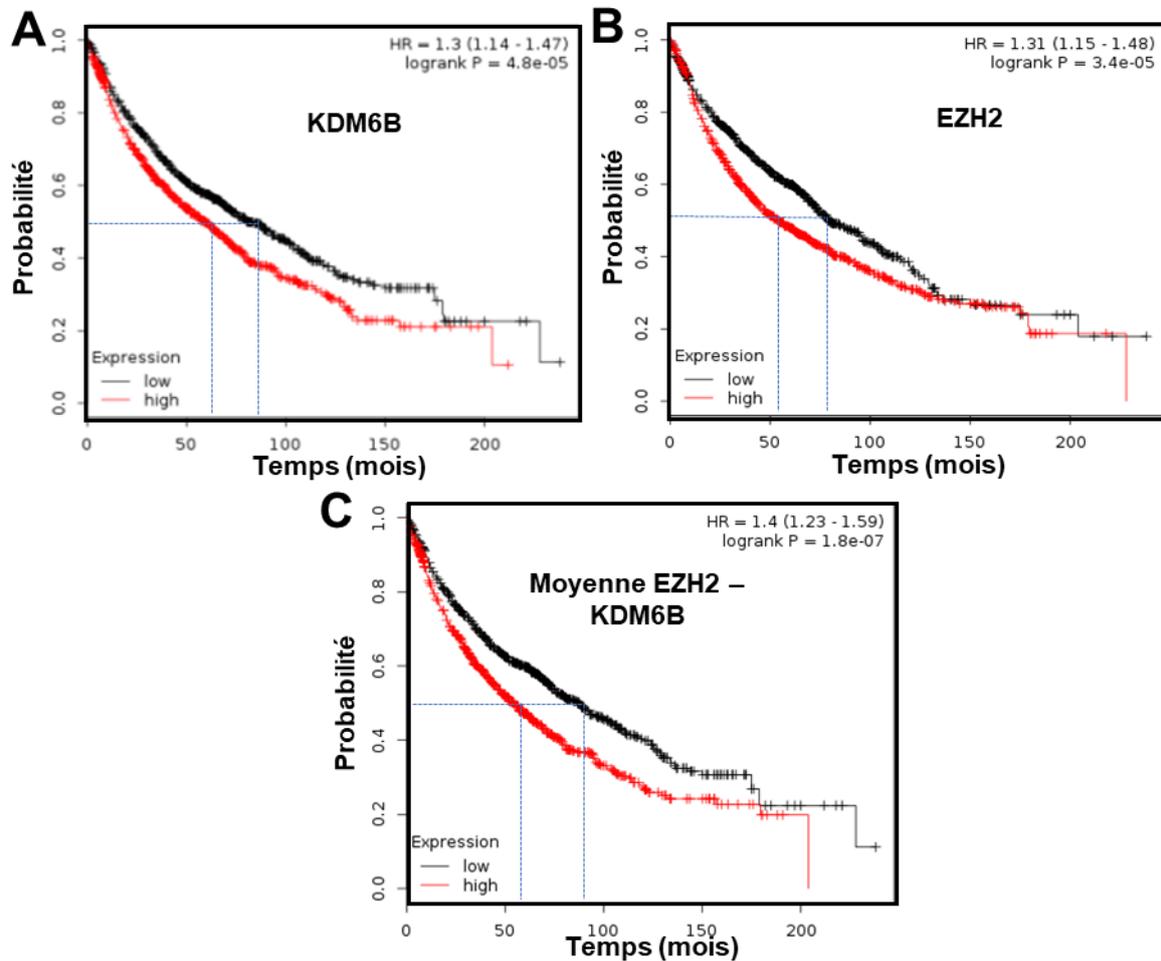


Figure 16 : Données KM-Plotter d'EZH2 et KDM6B dans les cancers du poumon.

Courbes de survie de patients atteints de cancers du poumon classés en groupe de forte expression (rouge) ou de faible expression (noir). **A.** KM-plotter pour l'expression de KDM6B. **B.** KM-plotter pour l'expression d'EZH2 **C.** KM-plotter pour l'expression moyenne d'EZH2 et KDM6B

Cette étude confirme que l'expression élevée d'EZH2 et KDM6B sont des marqueurs de mauvais pronostic pour les patients atteints de cancers du poumon, et que ces deux gènes semblent surexprimés ensemble dans les cancers les plus agressifs.

2- Modulation du niveau d'expression d'EZH2 ou de KDM6B au cours de la TEM

Afin d'étudier le rôle d'EZH2 et KDM6B au cours de la TEM, nous avons utilisé un modèle cellulaire de NSCLC : la lignée A549. Cette lignée est inductible en TEM par un co-traitement TGF- β /TNF- α .

Dans un premier temps nous avons vérifié l'expression des gènes d'EZH2 et KDM6B au cours de la TEM. L'induction de ces cellules en TEM s'accompagne bien d'une augmentation de l'expression d'EZH2 et KDM6B (**Figure 17A**). Ensuite, pour étudier les effets de ces deux protéines sur le phénotype mésenchymateux des cellules A549, nous les avons surexprimé de manière exogène dans ces cellules à l'aide de plasmides de surexpression (les protéines exogènes sont taguées par le peptide HA). Le taux de transfection étant trop faible pour nous permettre d'analyser les cellules en WB ou en RT-qPCR, nous avons réalisé des marquages d'immunofluorescence afin d'étudier les cellules transfectées par rapport aux non transfectées. Les surexpressions d'EZH2 (**Figure 17B**) et de KDM6B (**Figure 17E**) ont d'abord été confirmées. Une augmentation du niveau global de H3K27me3 dans les cellules surexprimant EZH2 et une diminution de ce niveau dans les cellules surexprimant KDM6B (**Figure 17C**) a été observée par rapport aux cellules non transfectées, ce qui démontre que les protéines exogènes sont actives. On observe également une augmentation du marquage EZH2 dans les cellules surexprimant KDM6B, suggérant que cette dernière pourrait réguler directement l'expression d'EZH2 (**Figure 17B**). Enfin, les cellules surexprimant EZH2 ou KDM6B montrent une augmentation du marquage VIMENTINE en IF (**Figure 17D**).

Ces données montrent que la surexpression de KDM6B ou d'EZH2 dans notre modèle de cellules A549 induit une augmentation de l'expression de la VIMENTINE, marqueur mésenchymateux, par rapport aux cellules qui ne surexpriment pas ces protéines. Le faible taux de transfection ne nous permet pas d'utiliser des techniques étudiant un ensemble de cellules comme la qPCR ou le WB, mais uniquement l'IF qui nous permet de comparer les cellules effectivement transfectées aux cellules non transfectées adjacentes. Afin de pouvoir étudier des ensembles de cellules, nous avons utilisé des lignées cellulaires surexprimant de manière stable EZH2 ou KDM6B.

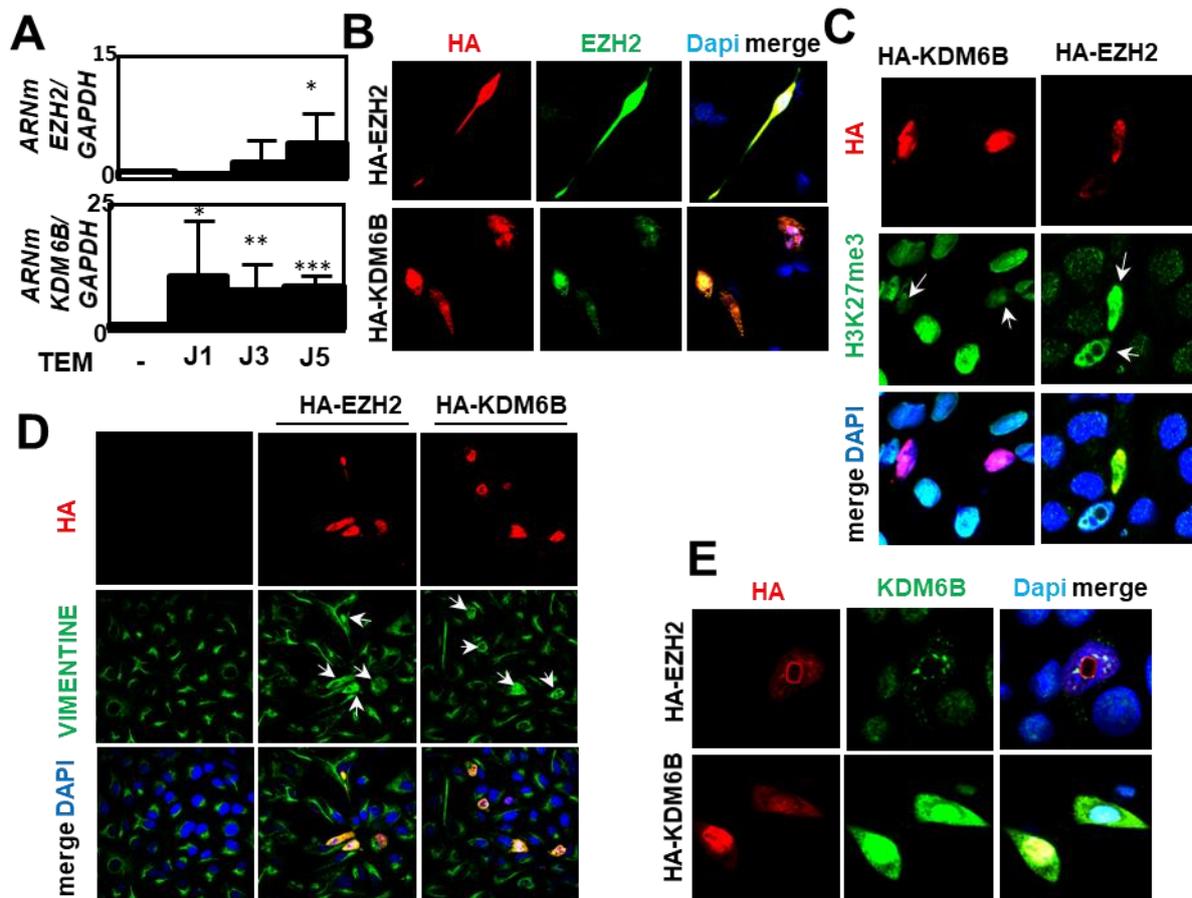


Figure 17 : Surexpression transitoire d'EZH2 et KDM6B.

A. Augmentation de l'expression d'EZH2 et KDM6B lors de l'induction de la TEM dans les cellules A549. **B.** Marquage IF d'HA (rouge) et EZH2 (vert) dans des cellules A549 transfectées transitoirement par un plasmide de surexpression de HA-EZH2 ou HA-KDM6B. **C.** Marquage IF de HA (rouge) et de H3K27me3 (vert) dans des cellules A549 transfectées transitoirement par un plasmide de surexpression de HA-EZH2 ou HA-KDM6B. **D.** Marquage IF de HA (rouge) et VIMENTINE (vert) dans des cellules A549 transfectées transitoirement par un plasmide de surexpression de HA-EZH2 ou HA-KDM6B. **E.** Marquage IF de HA (rouge) et KDM6B (vert) dans des cellules A549 transfectées transitoirement par un plasmide de surexpression de HA-EZH2 ou HA-KDM6B.

Dans le but d'étudier les effets sur la TEM de la surexpression d'EZH2 ou KDM6B d'un point de vue moléculaire (niveau d'expression d'ARN et protéines) et fonctionnel (tests de migration et d'invasion), nous avons en effet décidé d'utiliser des lignées surexprimant de manière stable ces protéines à partir des cellules A549, à l'aide de particules lentivirales. Nous avons alors obtenu une lignée surexprimant EZH2 sauvage (A549 EZH2), une lignée surexprimant KDM6B sauvage (A549 KDM6B) et une lignée surexprimant KDM6B mutée H1390A (A549 KDM6B H1390A). La mutation présente dans le gène codant pour KDM6B dans cette dernière lignée entraîne le remplacement de l'histidine 1390 par une alanine. La fonction chélatrice de fer du domaine jumanji de la protéine est supprimée ce qui rend la fonction déméthylase de KDM6B inactive⁴⁷⁴. L'obtention de ces lignées cellulaires est encore récente

au moment de l'écriture de ce manuscrit, et une lignée surexprimant une version mutée inactive d'EZH2 est toujours en cours d'obtention.

Nous avons d'abord vérifié la surexpression d'EZH2 (environ 1,5 fois) et *KDM6B* (10 à 20 fois) dans ces modèles de surexpression stable. (**Figure 18A-B**). Le niveau de H3K27me3 a été mesuré en WB afin de comparer aux données obtenues en IF dans les surexpressions transitoires. Comme attendu, la surexpression de *KDM6B* entraîne une diminution du niveau global de H3K27me3 qui n'est pas significative dans les cellules surexprimant *KDM6B H1390A*. En revanche, les cellules surexprimant *EZH2* ne montrent pas d'augmentation du niveau de H3K27me3 au niveau global (**Figure 18D-E**). L'expression de la *VIMENTINE* a ensuite été mesurée en RT-qPCR et au niveau protéique en WB. Une tendance de surexpression est observée dans les cellules surexprimant *EZH2*, comme dans celles surexprimant *KDM6B* (**Figure 18C-D-F**).

L'étude de l'expression de la *VIMENTINE* ne suffisant pas pour tirer des conclusions sur l'induction en TEM ou non des cellules A549 surexprimant *EZH2* ou *KDM6B*, le phénotype fonctionnel de la TEM a ensuite été étudié (migration et invasion).

Pour déterminer la vitesse de migration et les capacités d'invasion de ces cellules, des tests de blessure-cicatrisation et des tests d'invasion en chambre de Boyden ont été réalisés. Nous observons un gain des capacités de migration et d'invasion pour les cellules surexprimant *KDM6B* sauvage. De manière intéressante, l'inactivation de la fonction déméthylase de cette enzyme par la mutation *H1390A* empêche l'augmentation de migration et d'invasion. La surexpression de *KDM6B* induit un phénotype fonctionnel de type mésenchymateux dans les cellules A549, de manière dépendante de son activité déméthylase. De plus, les cellules surexprimant *EZH2* ont une tendance à migrer plus et à être plus invasives que les cellules A549 WT (**Figure 19**).

La surexpression de *KDM6B* induit la TEM dans les cellules A549, de manière dépendante de son activité déméthylase. La surexpression d'*EZH2* induit également une légère TEM caractérisée par la surexpression de la *VIMENTINE*, et l'augmentation de la migration et de l'invasion

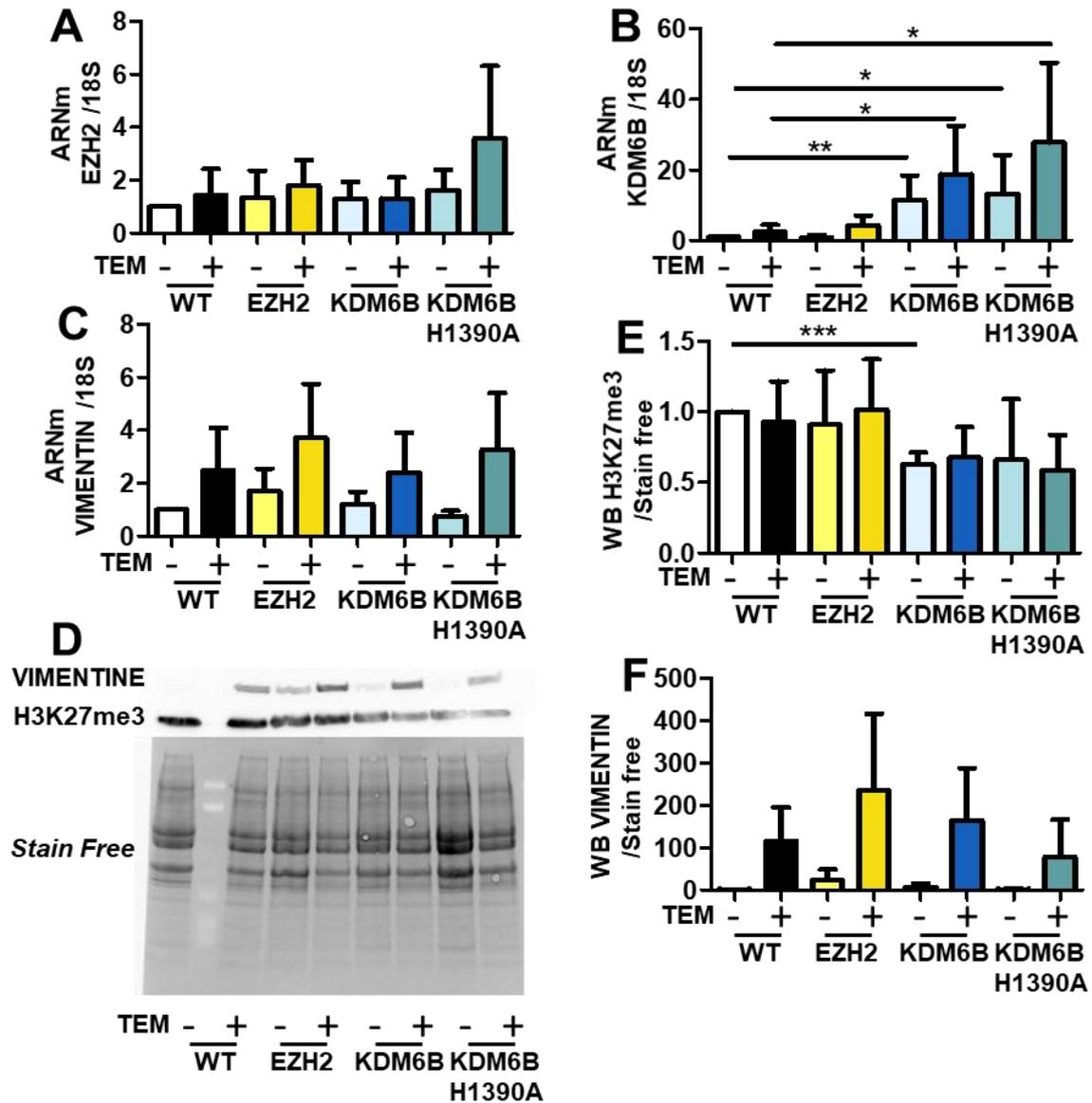


Figure 18 : Surexpression stable d'EZH2 et KDM6B dans les cellules A549 et étude moléculaire.

A. Expression ARNm d'EZH2 dans les lignées A549 WT, surexprimant EZH2, KDM6B WT ou KDM6B H1390, induites en TEM ou non. **B.** Expression ARNm de KDM6B dans les lignées A549 WT, surexprimant EZH2, KDM6B WT ou KDM6B H1390, induites en TEM ou non. **C.** Expression ARNm de la VIMENTINE dans les lignées A549 WT, surexprimant EZH2, KDM6B WT ou KDM6B H1390, induites en TEM ou non. **D.** Western Blotting à l'aide d'anticorps anti-VIMENTINE et anti-H3K27me3 dans les lignées A549 WT, surexprimant EZH2, KDM6B WT ou KDM6B H1390, induites en TEM ou non. Image représentative de 4 expériences indépendantes. **E-F.** Quantification des WB du D.

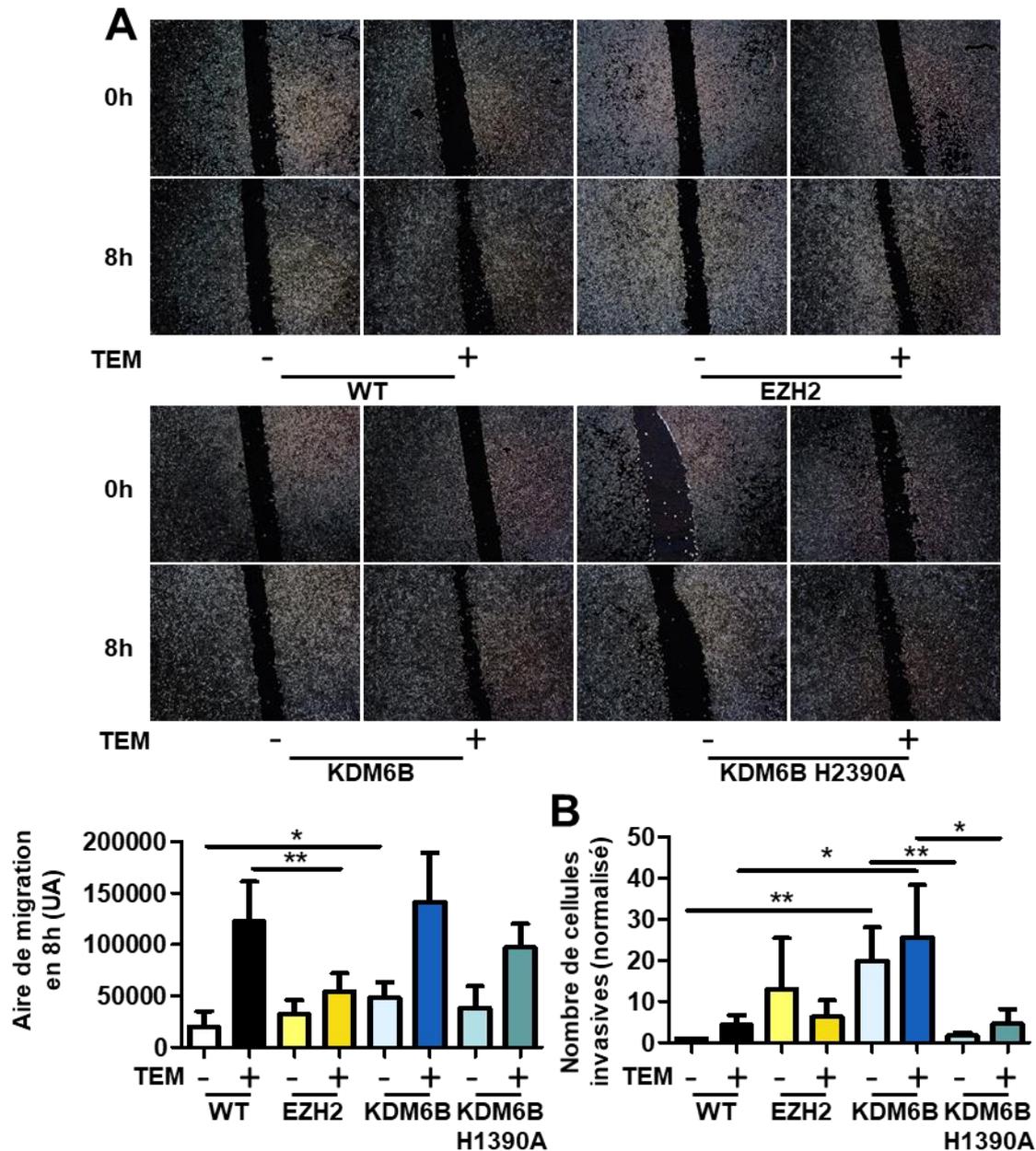


Figure 19 : Surexpression stable d'EZH2 et KDM6B dans les cellules A549 et étude fonctionnelle.

A. Test de migration dans les lignées A549 WT, surexprimant EZH2, KDM6B WT ou KDM6B H1390, induites en TEM ou non et sa quantification **B.** Test d'invasion en chambres de Boyden dans les lignées A549 WT, surexprimant EZH2, KDM6B WT ou KDM6B H1390, induites en TEM ou non.

Afin de compléter l'étude des effets du niveau d'expression d'EZH2 et KDM6B sur la TEM dans les cellules A549, nous avons ensuite éteint l'expression de ces gènes par différentes techniques. D'abord, par la technique de CRISPR/Cas9 pour obtenir des clones de cellules A549 KO pour EZH2 et KDM6B. L'utilisation de ces modèles nécessite l'obtention de plusieurs clones KO différents pour chaque protéine, dans le but de s'affranchir d'effets dépendants du clone et non uniquement de l'extinction de la protéine d'intérêt. Or, nous n'avons pu obtenir qu'un seul clone EZH2 KO et un seul clone KDM6B KO. Les résultats présentés ici sont donc à

considérer avec prudence, c'est pourquoi nous présenterons plus tard d'autres techniques d'extinction de l'expression d'*EZH2* et *KDM6B*.

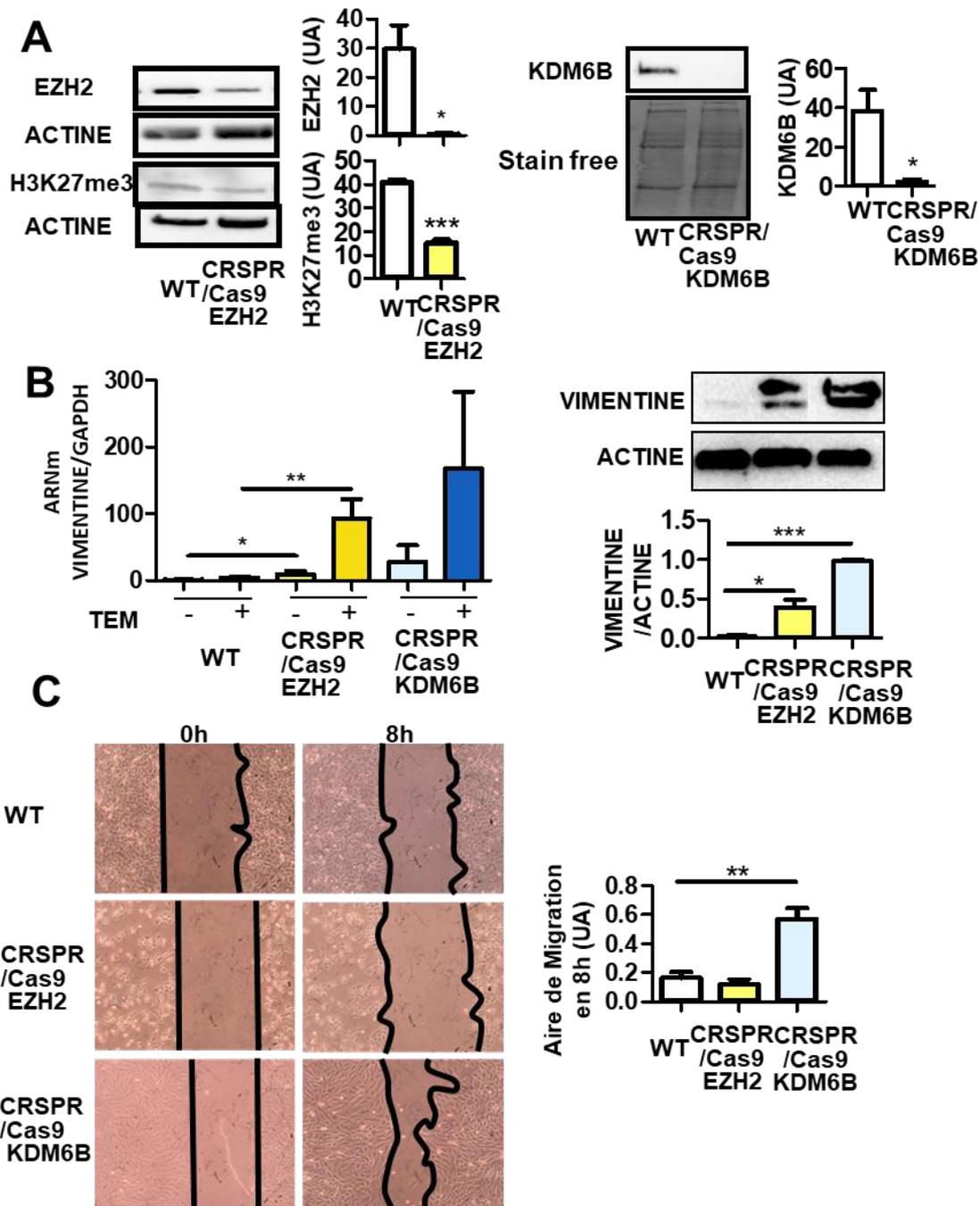


Figure 20 : Extinction d'*EZH2* et *KDM6B* dans les cellules A549 par CRISPR/Cas9

A. Western Blotting ciblant *EZH2*, *KDM6B* et *H3K27me3* sur les cellules A549 sauvages, CRISPR/Cas9 *EZH2* et CRISPR/Cas9 *KDM6B*. **B.** Expression de la VIMENTINE en ARNm et protéines dans les cellules A549 sauvages, CRISPR/Cas9 *EZH2* et CRISPR/Cas9 *KDM6B*. **C.** Test de blessure cicatrisation sur les cellules A549 sauvages, CRISPR/Cas9 *EZH2* et CRISPR/Cas9 *KDM6B*.

L'extinction d'EZH2 et de KDM6B a d'abord été vérifiée dans les deux clones obtenus, elle est de plus de 90%, et le KO EZH2 entraîne une diminution du niveau global de H3K27me3 d'environ 65% (**Figure 20A**). Le phénotype mésenchymateux a été étudié, comme pour les modèles de surexpression de ces deux enzymes. De manière surprenante, l'extinction d'EZH2 et de KDM6B entraîne également une augmentation de l'expression de la VIMENTINE au niveau ARNm et protéique (**Figure 20B**). L'extinction de KDM6B entraîne un phénotype mésenchymateux plus marqué que l'extinction d'EZH2 avec une expression de la VIMENTINE plus importante, et est la seule à augmenter la migration des cellules (**Figure 20C**). La surexpression ou l'extinction de KDM6B ou d'EZH2 semblent être (à des degrés divers) favorables au développement d'un phénotype mésenchymateux dans les cellules A549.

Nous avons ensuite utilisé des siRNA pour inhiber l'expression d'EZH2 et KDM6B pour réaliser une extinction transitoire de l'expression de ces gènes. L'extinction de ces deux gènes a d'abord été validée au niveau ARNm. L'inhibition de l'expression d'*EZH2* est d'environ 80% (**Figure 21A**), alors que celle de *KDM6B* est d'environ 60% (**Figure 21B**). L'effet de l'extinction de ces gènes sur le niveau global de H3K27me3 a été analysé par WB et il apparaît que l'extinction d'EZH2 a tendance à diminuer ce niveau alors que l'extinction de KDM6B a tendance à l'augmenter. Cependant, les variations sont faibles et non significatives, ce qui peut être dû à l'expression restante de ces deux protéines (**Figure 21D**). Nous avons à nouveau étudié le phénotype de TEM dans les cellules A549 transfectées ou non par des siRNA ciblant *EZH2* ou *KDM6B*. Aucune variation d'expression de la VIMENTINE au niveau ARNm ou protéique n'est observée lors de l'extinction de ces gènes (**Figure 21C-E**). Encore une fois cela peut être expliqué par l'expression restante des deux protéines ciblées. Des résultats préliminaires semblent montrer que l'expression d'autres marqueurs de la TEM est plus impactée que celle de la VIMENTINE par l'inhibition de l'expression d'EZH2 et KDM6B et fera l'objet d'une étude plus approfondie.

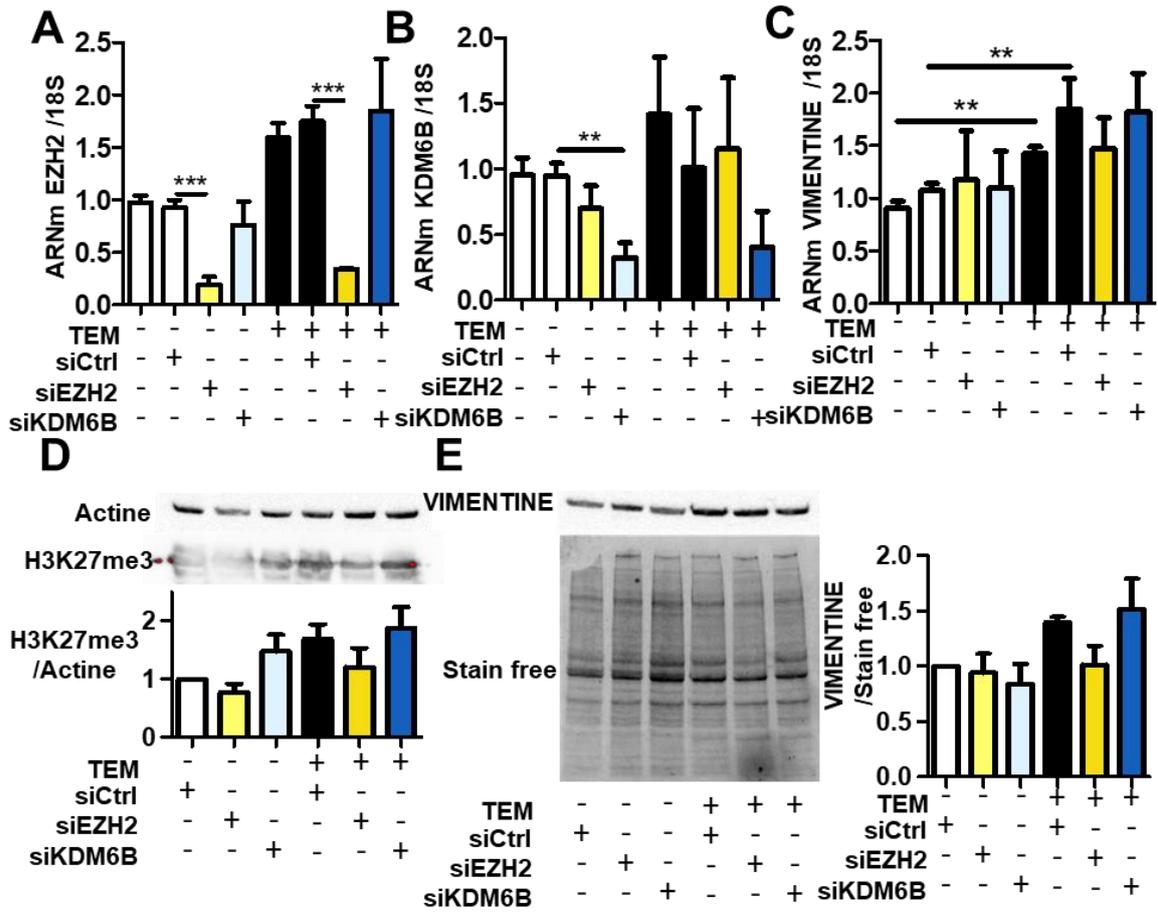


Figure 21 : Extinction d'EZH2 et KDM6B par siRNA dans les cellules A549 et étude moléculaire de la TEM.

A. Expression ARNm d'EZH2 dans des cellules A549 induites en TEM ou non et transfectées ou non par des siRNA dirigés contre EZH2 ou KDM6B **B.** Expression ARNm de KDM6B dans des cellules A549 induites en TEM ou non et transfectées ou non par des siRNA dirigés contre EZH2 ou KDM6B. **C.** Expression ARNm de la VIMENTINE dans des cellules A549 induites en TEM ou non et transfectées ou non par des siRNA dirigés contre EZH2 ou KDM6B. **D.** WB ciblant H3K27me3 dans des cellules A549 induites en TEM ou non et transfectées ou non par des siRNA dirigés contre EZH2 ou KDM6B et quantification. **E.** WB ciblant la VIMENTINE dans des cellules A549 induites en TEM ou non et transfectées ou non par des siRNA dirigés contre EZH2 ou KDM6B et quantification.

Nous avons ensuite étudié les capacités migratoires et invasives des cellules A549 transfectées par des siRNA ciblant *EZH2* ou *KDM6B*. De la même manière que pour l'expression de la VIMENTINE, les tests de blessures/cicatrisation réalisés ne montrent aucun effet de la diminution d'expression de l'une ou l'autre de ces protéines (**Figure 22A-B**), tout comme les tests d'invasion en chambre de Boyden (**Figure 22C**).

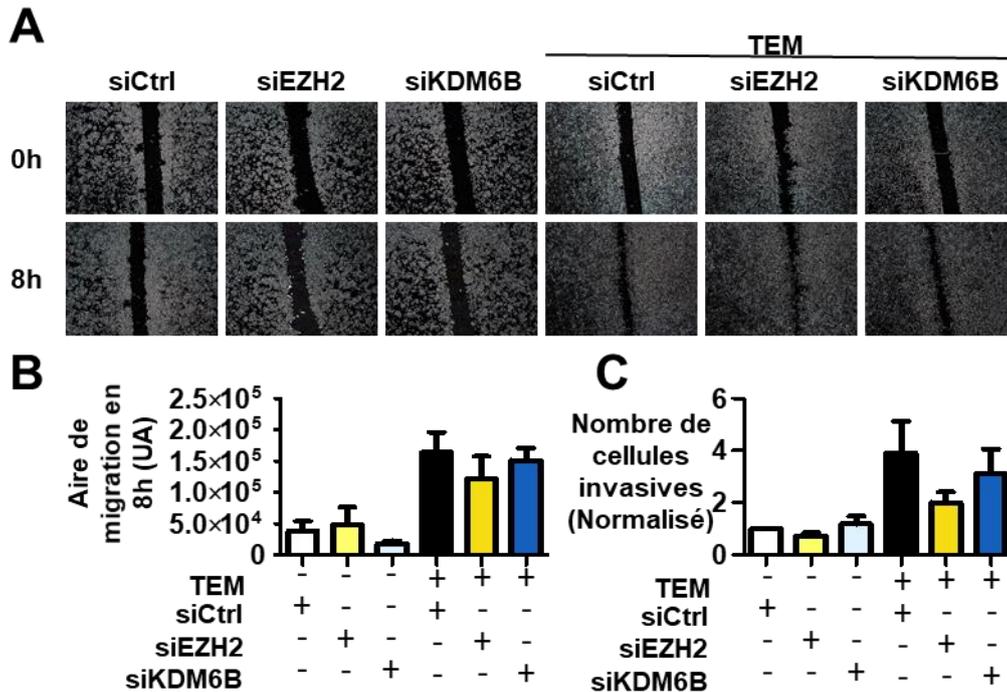


Figure 22 : Extinction d'EZH2 et KDM6B par siRNA dans les cellules A549 et étude fonctionnelle de la TEM.

A. Test de blessure cicatrisation avec des cellules A549 induites en TEM ou non et transfectées ou non par des siRNA dirigés contre EZH2 ou KDM6B **B.** Quantification du test de blessure cicatrisation en (A). **C.** Test d'invasion en chambres de Boyden dans des cellules A549 induites en TEM ou non et transfectées ou non par des siRNA dirigés contre EZH2 ou KDM6B.

Enfin, les deux modèles d'extinctions de l'expression d'EZH2 et de KDM6B présentés ci-dessus montrant des limites décrites ci-avant, nous avons voulu empêcher l'expression de ces protéines par une troisième technique : les sh-ARNs. Nous ne sommes malheureusement pas parvenus à obtenir de lignée KO pour EZH2 ou KDM6B par cette technique. Nous pouvons imaginer que l'extinction totale de l'expression de ces gènes n'est pas viable pour la cellule. Cela expliquerait également notre grande difficulté à empêcher l'expression de ces gènes par CRISPR/Cas9.

3- Inhibition de l'activité catalytique d'EZH2 et KDM6B au cours de la TEM

Nous avons ensuite utilisé des inhibiteurs chimiques de l'activité catalytique d'EZH2 et KDM6B (EZH2i = GSK343, KDM6Bi = GSKJ4) pour nous donner un éclairage complémentaire aux données obtenues précédemment sur le rôle que peuvent avoir ces enzymes au cours de la TEM. Elle permet de bloquer uniquement l'activité catalytique des enzymes d'intérêt tout en gardant un niveau d'expression physiologique des protéines.

Nous avons d'abord observé que l'inhibition d'EZH2 entraîne une diminution globale de la marque H3K27me3 dans les cellules A549, cependant, l'inhibition de KDM6B n'entraîne pas d'augmentation globale de cette marque, comme déjà montré dans la littérature⁴⁷⁵, même si la tendance est à la hausse (**Figure 23D**). Nous avons ensuite étudié le phénotype morphologique des cellules A549 (en microscopie optique, puis confocale par un marquage des microfilaments d'ACTINE), l'allongement cellulaire étant un marqueur de TEM. Les cellules A549 s'allongent sous l'effet de l'inhibition d'EZH2 ou de KDM6B couplés à l'induction de la TEM comparé à l'induction de la TEM seule. De plus, l'inhibition de KDM6B sans induire la TEM est suffisante pour provoquer un allongement significatif des cellules (**Figure 23A-C**).

Nous avons ensuite étudié le phénotype moléculaire de ces cellules. L'inhibition d'EZH2 et de KDM6B potentialise l'augmentation de l'expression de la VIMENTINE au niveau protéique au cours de la TEM, mais cette augmentation est plus importante lors de l'inhibition de KDM6B (**Figure 23D-F**). Au niveau ARNm, l'inhibition de KDM6B sans induction de la TEM augmente l'expression de la *VIMENTINE* (**Figure 23E**). L'inhibiteur de KDM6B, bien que n'ayant que très peu d'effets sur le niveau global de H3K27me3, a un effet important sur la TEM, dans les cellules A549. Nous avons ensuite mesuré l'expression d'un gène épithélial, *CDH1* codant pour la E-CADHERINE, et d'un autre gène mésenchymateux, *CDH2* codant pour la N-CADHERINE. Nous pouvons voir que l'inhibiteur de KDM6B a tendance à faiblement diminuer l'expression de *CDH1*, mais lors de l'induction de la TEM, l'expression de *CDH1* étant déjà éteinte, nous ne pouvons pas observer d'effet synergique des inhibiteurs d'EZH2 ou de KDM6B (**Figure 23E**). Enfin, l'inhibition de ces deux protéines fait apparaître un marquage N-CADHERINE en IF (**Figure 23G**).

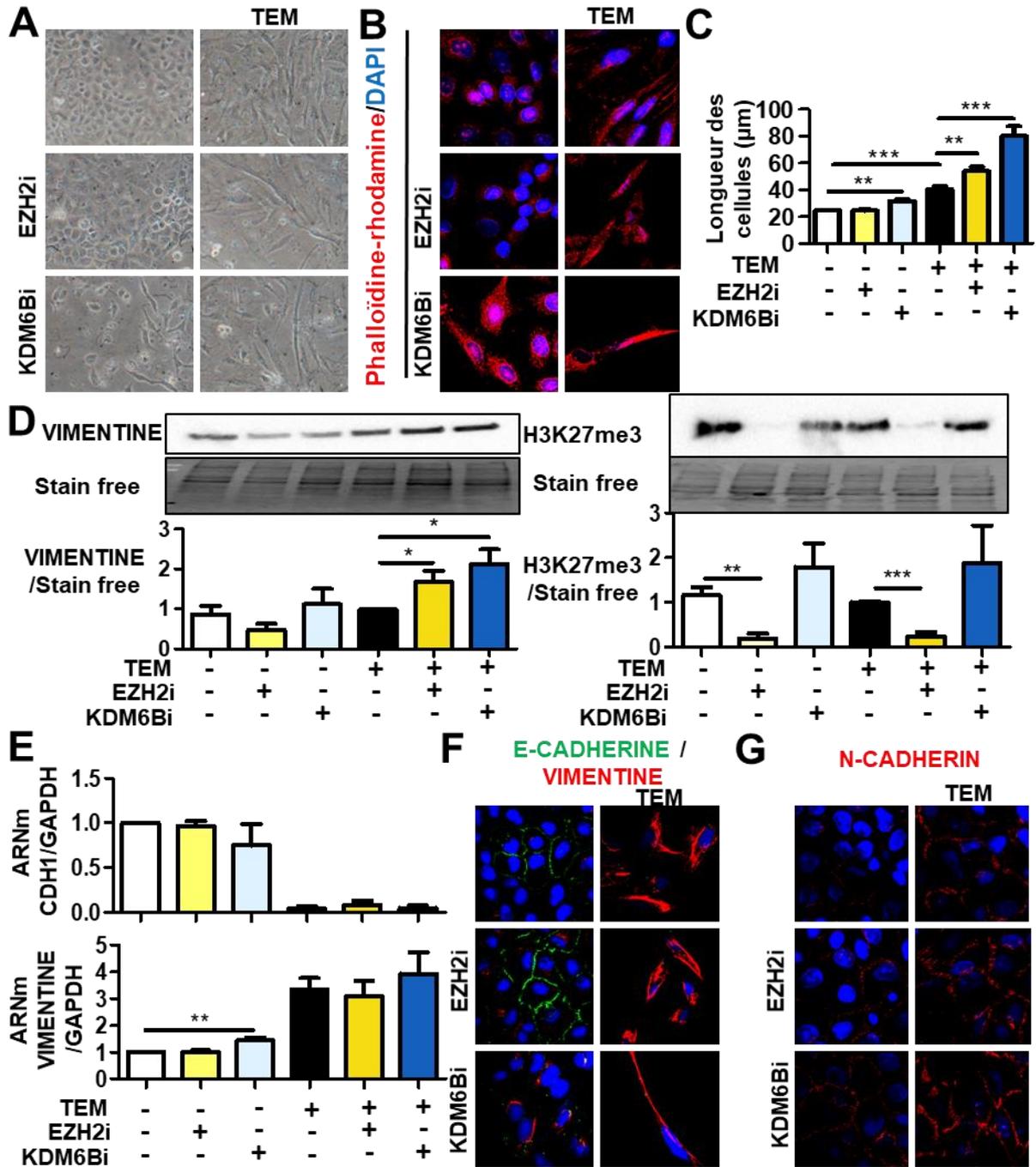


Figure 23 : Inhibition d'EZH2 et KDM6B au cours de la TEM.

A. Observation morphologique en microscopie optiques des cellules A549 induites en TEM ou non et traitées ou non par inhibiteurs chimiques d'EZH2 ou KDM6B. **B.** Observation en microscopie confocale des cellules A549 induites en TEM ou non et traitées ou non par inhibiteurs chimiques d'EZH2 ou KDM6B, avec marquage des microfilaments d'ACTINE par phalloïdine/rhodamine. **C.** Mesure de la longueur des cellules après marquage de l'ACTINE. **D.** Expression de la VIMENTINE et niveau global de H3K27me3 par WB dans les cellules A549 induites en TEM ou non et traitées ou non par inhibiteurs chimiques d'EZH2 ou KDM6B. **E.** Marquage IF de la E-CADHERINE (vert) et de la VIMENTINE (rouge) dans les cellules A549 induites en TEM ou non et traitées ou non par inhibiteurs chimiques d'EZH2 ou KDM6B. **F.** Marquage IF de la N-CADHERINE (rouge) dans les cellules A549 induites en TEM ou non et traitées ou non par inhibiteurs chimiques d'EZH2 ou KDM6B.

Afin de compléter ces résultats, nous avons utilisé un autre inhibiteur d'EZH2. Le GSK343 (utilisé précédemment) est 60 fois plus spécifique d'EZH2 que de son paralogue EZH1, nous avons donc testé un inhibiteur capable d'inhiber les 2 enzymes de la même manière : il se nomme UNC1999 (EZH1/2i). Cet inhibiteur induit également une diminution globale de la marque H3K27me3 (**Figure 24A**), une augmentation de l'expression de la VIMENTINE en WB et en IF (**Figure 24B-C**) et de la N-CADHERINE (**Figure 24C**) en IF, et un allongement des cellules A549 (**Figure 24D**). Il a été décrit dans l'introduction (Chapitre III) qu'EZH2 est plus actif que son paralogue EZH1. Cela semble se confirmer ici puisque le phénotype mésenchymateux obtenu en inhibant EZH2 et EZH1 est comparable à celui obtenu en inhibant uniquement EZH2.

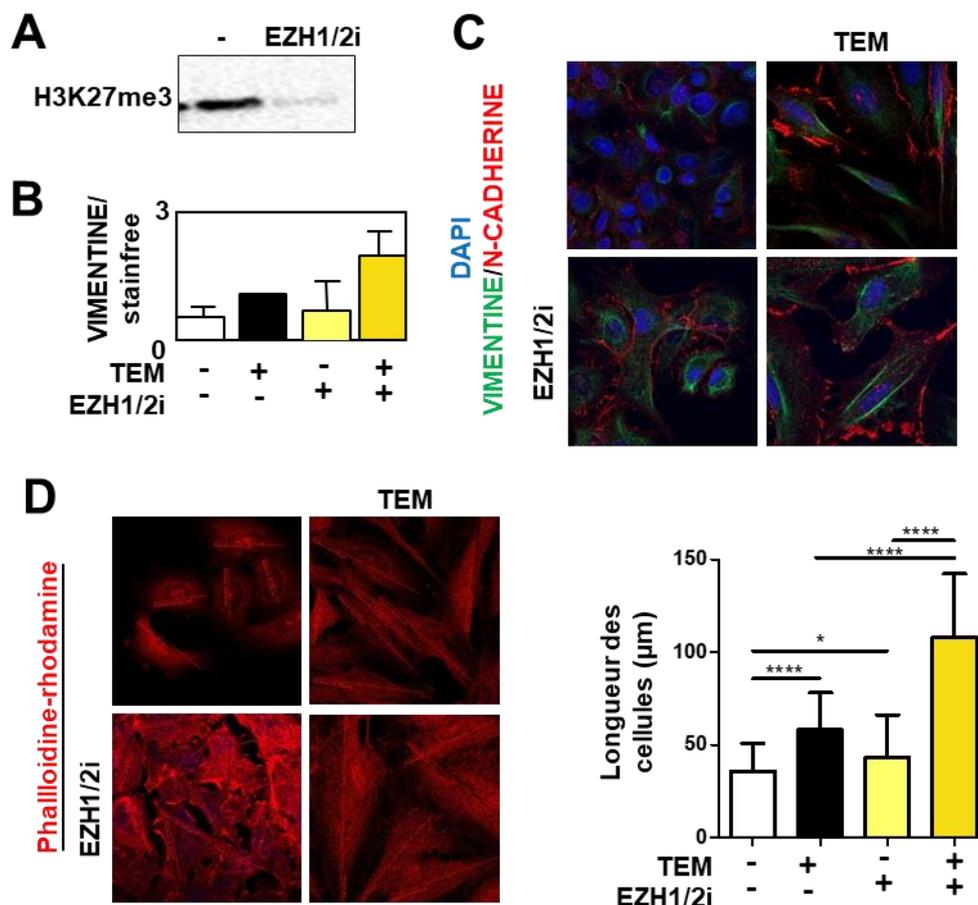


Figure 24 : Inhibition d'EZH1/2 et étude du phénotype morphologique et moléculaire des cellules A549.

A. WB H3K27me3 dans des cellules A549 traitées ou non par EZH1/2i. **B.** WB VIMENTINE sur des cellules A549 en TEM ou non et traitées ou non par EZH1/2i. **C.** Marquage IF VIMENTINE (vert) et N-CADHERINE (rouge) sur des cellules A549 en TEM ou non et traitées ou non par EZH1/2i. **D.** Coloration des microfilaments d'ACTINE par Phalloïdine/Rhodamine sur des cellules A549 en TEM ou non et traitées ou non par EZH1/2i et quantification de la longueur des cellules.

Par la suite, le phénotype fonctionnel des cellules A549 a été étudié après inhibition chimique d'EZH2 ou de KDM6B au cours de la TEM. Ainsi des tests de blessure cicatrisation et invasion en chambre de Boyden ont été réalisés sur ces cellules. Si l'inhibition d'EZH2 ne modifie pas ces capacités, l'inhibition de KDM6B dans des cellules en TEM augmente la migration et l'invasion (**Figure 25A-C**).

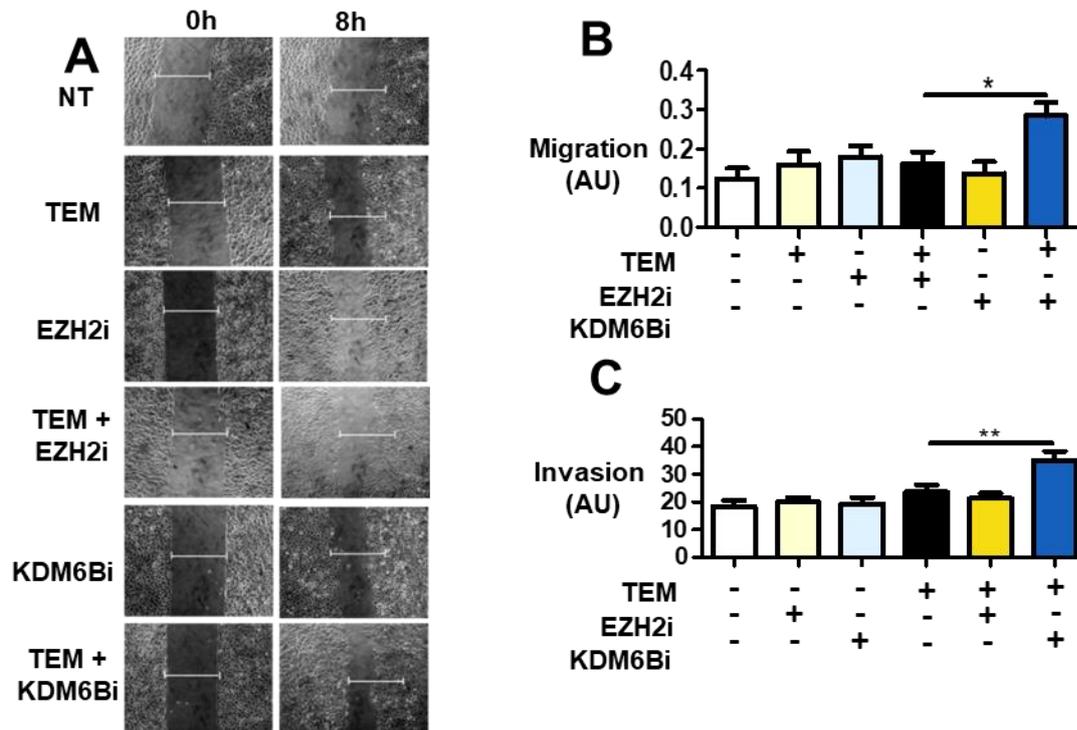


Figure 25 : Inhibition chimique d'EZH2 ou KDM6B dans les cellules A549 et étude fonctionnelle.

A. Test de blessure cicatrisation sur des cellules A549 induites en TEM ou non et traitées ou non par inhibiteurs chimiques d'EZH2 ou KDM6B. **B.** Quantification du test de blessure cicatrisation. **C.** Test d'invasion en chambres de Boyden sur des cellules A549 induites en TEM ou non et traitées ou non par inhibiteurs chimiques d'EZH2 ou KDM6B.

L'activité d'EZH2 et KDM6B a également été inhibée dans un autre modèle : des cellules de cancer du sein, les cellules MDA-MB-468, lesquelles sont inductibles en TEM par un traitement avec de l'EGF. L'utilisation de ce modèle permet de s'affranchir de la dépendance à un mode d'induction de la TEM, nous remplaçons l'induction par un co-traitement TGF- β /TNF- α par une induction à l'aide d'un traitement avec de l'EGF. Cela nous permet également de vérifier si les résultats obtenus précédemment peuvent être observés dans différents types de cancers. Dans ce modèle, la surexpression d'EZH2 ou KDM6B entraîne une augmentation du marquage VIMENTINE en IF (**Figure 26A**), de la même manière que dans le modèle A549. L'inhibition d'EZH2 ou de KDM6B en revanche induit des changements

morphologiques moindres que dans les cellules A549, même si EZH2i entraîne l’allongement des cellules (**Figure 26B-C-D**). De plus, l’inhibition d’EZH2 induit une augmentation des capacités de migration, mais pas l’inhibition de KDM6B (**Figure 26E**). Ces données, montrent qu’EZH2 et KDM6B sont également impliquées dans la TEM dans ce modèle.

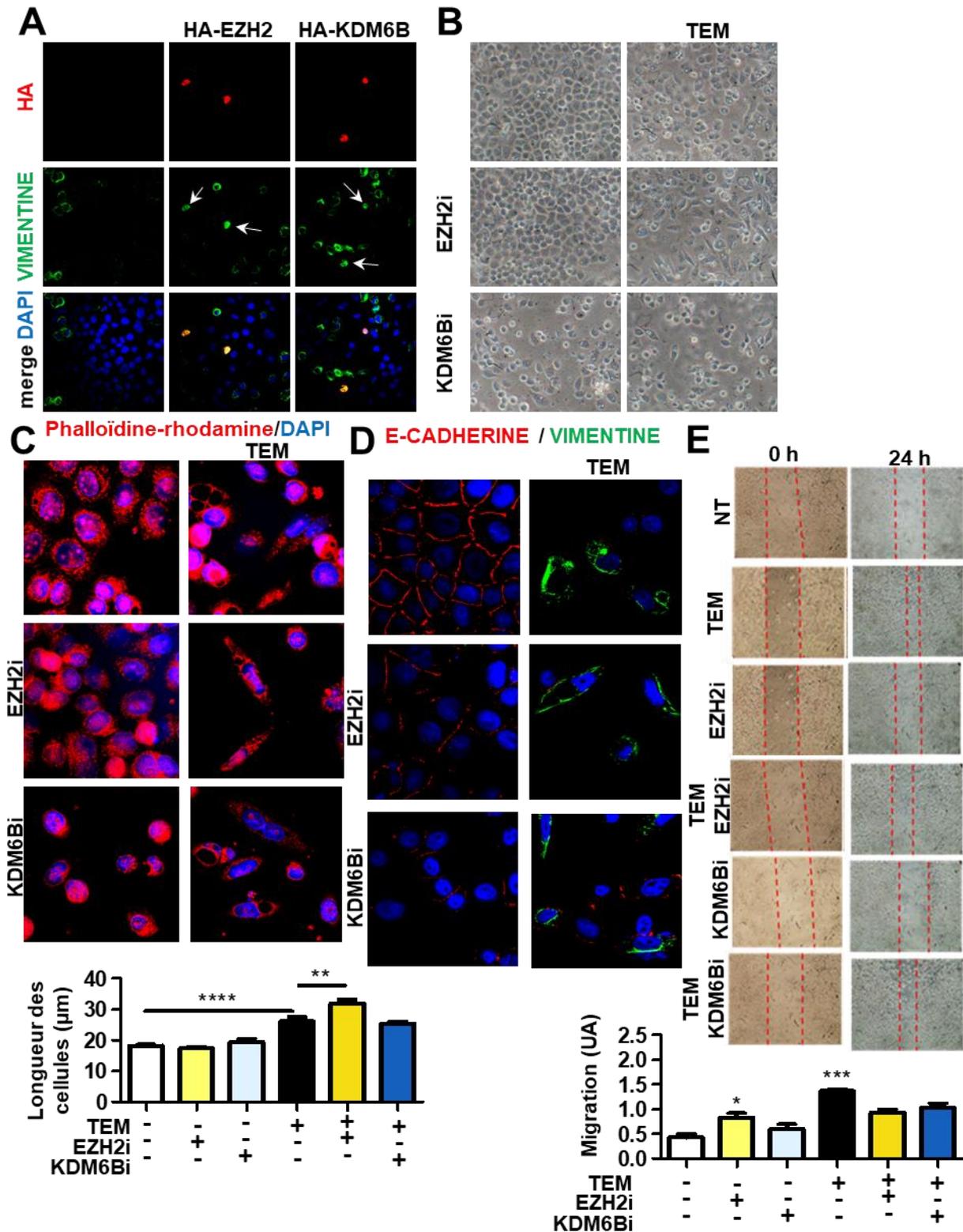


Figure 26 : Surexpression et inhibition chimique d'EZH2 et KDM6B dans les cellules MDA-MB-468.

A. Marquage IF VIMENTINE dans des cellules MDA-MB-468 transfectées ou non transitoirement par un plasmide de surexpression de HA-EZH2 ou HA-KDM6B. **B.** Observation morphologique en microscopie optique de cellules MDA-MB-468 induites en TEM ou non et traitées ou non par EZH2i ou KDM6Bi. **C.** Marquage des microfilaments d'ACTINE par phalloïdine/rhodamine de cellules MDA-MB-468 induites en TEM ou non et traitées ou non par EZH2i ou KDM6Bi et mesure de la longueur des cellules. **D.** Marquage IF VIMENTINE et E-CADHERINE de cellules MDA-MB-468 induites en TEM ou non et traitées ou non par EZH2i ou KDM6Bi. **E.** Test de blessure/cicatrisation de cellules MDA-MB-468 induites en TEM ou non et traitées ou non par EZH2i ou KDM6Bi.

L'implication d'EZH2 et KDM6B au cours de la TEM dans nos différents modèles a été montré, cependant, il est difficile de comprendre par quels mécanismes. En effet, l'augmentation de l'expression ou l'inhibition de l'activité de ces enzymes semblent induire dans tous les cas un phénotype plus mésenchymateux dans nos différents modèles.

4- Gènes cibles d'EZH2 et KDM6B au cours de la TEM

Afin de préciser la fonction d'EZH2 et KDM6B, nous avons alors émis l'hypothèse qu'EZH2 et KDM6B pouvaient réguler, chacun, un ensemble de gènes différent au cours de la TEM dans notre modèle. L'induction d'un phénotype mésenchymateux est un phénomène complexe reposant sur une modulation du niveau d'expression de très nombreux gènes, dont l'expression pourrait être contrôlée par EZH2 ou KDM6B. Nous avons donc décidé d'identifier les régions de l'ADN sur lesquelles sont recrutées EZH2 et KDM6B au cours de la TEM dans notre modèle de cellules A549.

Pour cela, nous avons réalisé un ChIP-seq (*ChIP-Sequencing*) ciblant EZH2, KDM6B et H3K27me3 dans des cellules A549 induites en TEM par un traitement TGF- β /TNF- α . Nous avons donc identifié les *loci* sur lesquels nous retrouvons EZH2, H3K27me3 ou KDM6B dans ces cellules. Nous avons ensuite cherché les *loci* sur lesquels étaient localisées EZH2 et H3K27me3 ensemble (au nombre de 9493), et ceux sur lesquels était localisée KDM6B, sans EZH2 et sans H3K27me3 (au nombre de 13122) (**Figure 27A**). Comme nous pouvions l'imaginer, très peu de *loci* (<3% des *loci* occupés par ces enzymes) présentent un enrichissement des deux enzymes à la fois, laissant penser que les recrutements de celles-ci sont exclusifs. Nous avons ensuite voulu savoir si le recrutement d'EZH2 et donc l'augmentation du niveau de H3K27me3 au niveau de ces *loci* entraînait une diminution de l'expression des gènes situés à proximité, et si le recrutement de KDM6B sur ces *loci* entraînait une augmentation de l'expression des gènes à proximité. Pour cela, ces données ont été comparées aux données de transcriptomiques obtenues précédemment au laboratoire dans

les cellules A549 en TEM ou non⁹, ce qui nous a permis d'identifier 169 gènes sous exprimés au cours de la TEM qui peuvent être régulés par H3K27me3 sous la dépendance d'EZH2, et 566 gènes surexprimés au cours de la TEM qui pourraient être régulés par KDM6B (**Figure 27A**).

Un enrichissement de KDM6B est observé au niveau des gènes *SNAI1*, *ADAM19* et *MMP9*, mais pas au niveau de *ZEB1*. Nous nous sommes alors intéressés à ces gènes bien connus pour leur implication dans la TEM, et avons validé les données du CHIP-seq et de la transcriptomique en validant leur surexpression par RT-qPCR et la diminution de H3K27me3 par CHIP classique au cours de la TEM (**figure 27 B-C**). De plus, une augmentation de l'expression de ces trois premiers gènes est observée dans les cellules A549 après inhibition d'EZH2 ou de KDM6B associée à l'induction de la TEM comparée aux cellules A549 simplement induites en TEM, alors que l'expression de *ZEB1* n'augmente pas (**Figure 27B**) ce qui laisse penser que KDM6B pourrait contrôler l'expression de ces *SNAI1*, *ADAM19* et *MMP9* durant la TEM. Le niveau de H3K27me3 au niveau des promoteurs de *ADAM19* et *MMP9* est diminué au cours de la TEM, et cette baisse est potentialisée par l'inhibition d'EZH2, dans les cellules A549 (**Figure 27C**).

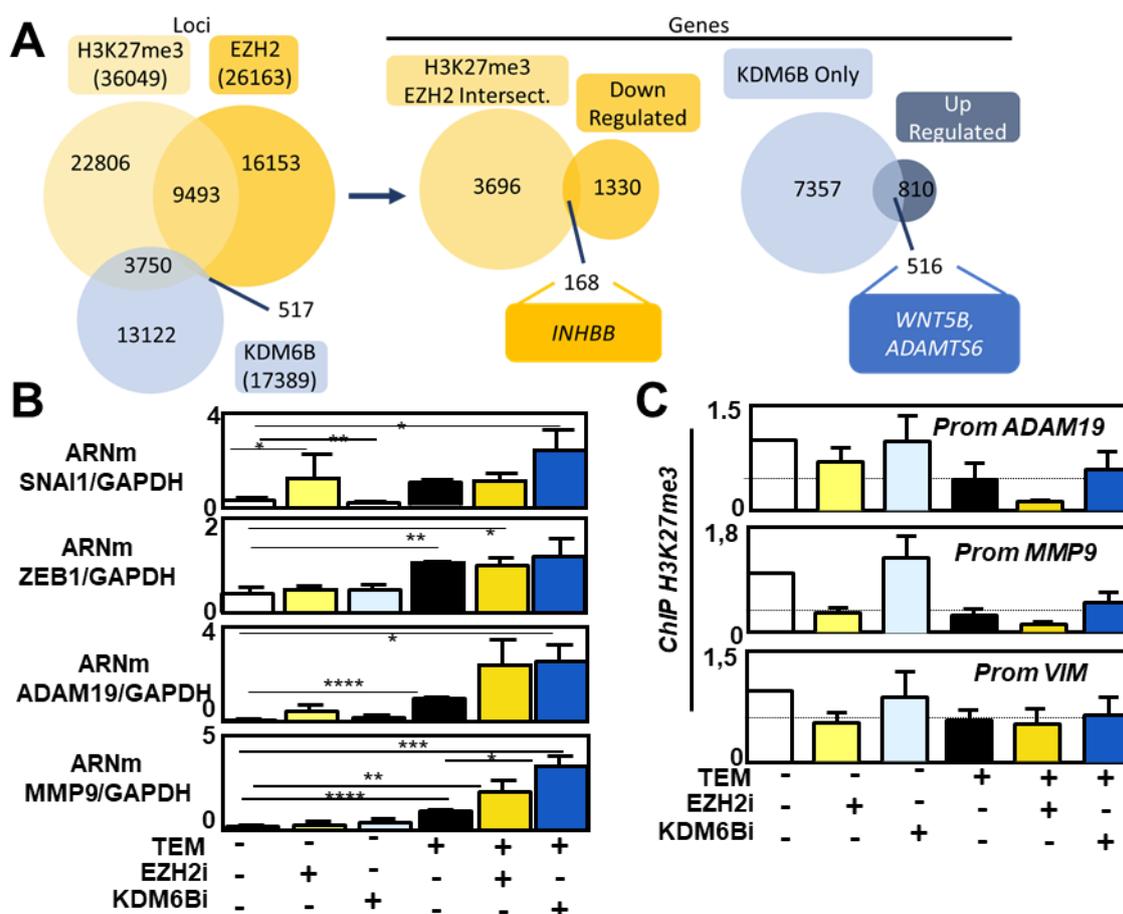


Figure 27 : Identification des gènes cibles d'EZH2 et KDM6B au cours de la TEM dans les cellules A549

A. Diagramme de VENN représentant les différents loci occupés par EZH2, H3K27me3 et KDM6B au cours de la TEM dans les cellules A549. A droite en jaune, les gènes où on retrouve H3K27me3 et EZH2 et sous exprimés au cours de la TEM. A droite, les gènes où on retrouve uniquement KDM6B et qui sont surexprimés au cours de la TEM. **B.** Expression ARNm de SNAI1, ZEB1, ADAM19 et MMP9 dans des cellules A549 induites ou non en TEM et traitées ou non par EZH2i et KDM6Bi. **C.** ChIP H3K27me3 sur les promoteurs de ADAM19, MMP9 et VIMENTINE dans des cellules A549 induites ou non en TEM et traitées ou non par EZH2i ou KDM6Bi.

La liste des 40 gènes les plus sous exprimés au cours de la TEM et qui présentent, au niveau de leur promoteur ou du corps du gène, un enrichissement en EZH2 et en H3K27me3 est présentée **Tableau 11**. De la même manière, la liste des 40 gènes les plus surexprimés au cours de la TEM et au niveau desquels (promoteur ou corps du gène) on retrouve un enrichissement de KDM6B est présentée **Tableau 12**. Certains de ces gènes ont déjà été associés à la TEM dans la littérature (voir **Tableau 11 & 12**, 3ème colonne).

Nom du gène	Nom Complet	Voie	Facteur de sous-expression
<u>INHBB</u>	<i>Inhibin Beta B Subunit</i>	Inflammation	-31,8
<u>ANK3</u>	<i>Ankyrin 3</i>	Cytosquelette	-25
<u>CABLES1</u>	<i>Cdk5 And Abl Enzyme Substrate 1</i>	Cycle cellulaire	-24
<u>GREM2</u>	<i>Gremlin 2, DAN Family BMP Antagonist</i>	Différentiation	-12
<u>VAV3</u>	<i>Vav Guanine Nucleotide Exchange Factor 3</i>	Cytosquelette/Signalisation	-11,7
<u>TC2N</u>	<i>Tandem C2 Domains, Nuclear</i>		-11,5
<u>HR</u>	<i>HR, Lysine Demethylase And Nuclear Receptor Corepressor</i>	Epigénétique	-10,7
<u>CPLX2</u>	<i>Complexin 2</i>	Trafique vésiculaire	-10,5
<u>COBL</u>	<i>Cordon-Bleu WH2 Repeat Protein</i>	Cytosquelette	-9,5
<u>SLC5A11</u>	<i>Solute Carrier Family 5 Member 11</i>	Métabolisme	-9,3
<u>C9orf3</u>	<i>Chromosome 9 Open Reading Frame 3</i>	Famille M1 zinc aminopeptidase	-8,4
<u>CEACAM7</u>	<i>Carcinoembryonic Antigen Related Cell Adhesion Molecule 7</i>	Adhésion	-8,4
<u>ABLIM1</u>	<i>Actin-Binding LIM Protein Family Member 1</i>	Cytosquelette	-8
<u>DBP</u>	<i>D-Box Binding PAR BZIP Transcription Factor</i>	FT	-7,8
<u>WNT6</u>			-6,7
<u>ANK1</u>	<i>Ankyrin 1</i>	Cytosquelette	-6,5
<u>EFCAB3</u>	<i>EF-Hand Calcium Binding Domain 3</i>	Calcium	-6,5
<u>CXXC5</u>	<i>CXXC Finger Protein 5</i>	FT	-6,1
<u>FGFR3</u>	<i>Fibroblast Growth Factor Receptor 3</i>	Signalisation	-6
<u>MYO5B</u>	<i>Myosin VB</i>	Trafique vésiculaire	-6
<u>CACNA1G</u>	<i>Calcium Voltage-Gated Channel Subunit Alpha1 G</i>	Canaux Calcium	-5,6
<u>PMP22</u>	<i>Peripheral Myelin Protein 22</i>	Neurones	-5,4
<u>PREX1</u>	<i>Phosphatidylinositol-3,4,5-Trisphosphate Dependent Rac Exchange Factor 1</i>	Signalisation	-5,4
<u>ANKRD33B</u>	<i>Ankyrin Repeat Domain 33B</i>	Cytosquelette	-4,8
<u>PAPLN</u>	<i>Papilin, Proteoglycan Like Sulfated Glycoprotein</i>	Peptidase	-4,6
<u>C20orf196</u>	<i>Chromosome 20 Open Reading Frame 196</i>		-4,5
<u>NR5A2</u>	<i>Nuclear Receptor Subfamily 5 Group A Member 2</i>	FT	-4,4
<u>NRG2</u>	<i>Neuregulin 2</i>	Différentiation	-4,4
<u>FOXA2</u>	<i>Forkhead Box A2</i>	FT	-4,2
<u>SYT12</u>	<i>Synaptotagmin 12</i>	Calcium/neurones/trafique vésiculaire	-4,2
<u>LRP2</u>	<i>LDL Receptor Related Protein 2</i>	Signalisation Epithéliale	-4,1
<u>NTRK3</u>	<i>Neurotrophic Receptor Tyrosine Kinase 3</i>	Différentiation/Signalisation	-4,1
<u>CXCL16</u>	<i>C-X-C Motif Chemokine Ligand 16</i>	Chémokine	-3,9
<u>EGLN3</u>	<i>Egl-9 Family Hypoxia Inducible Factor 3</i>	Hydroxylase	-3,9
<u>KIAA1217</u>			-3,9
<u>CEBPA</u>	<i>CCAAT/Enhancer Binding Protein Alpha</i>	FT	-3,8
<u>HOXC13</u>	<i>Homeobox C13</i>	FT	-3,8
<u>NR2F2</u>	<i>Nuclear Receptor Subfamily 2 Group F Member 2</i>	FT	-3,8
<u>RASSF5</u>	<i>Ras Association Domain Family Member 5</i>	Signalisation	-3,8
<u>HRK</u>	<i>Harakiri, BCL2 Interacting Protein</i>	Apoptose	-3,7

Tableau 11 : Liste des 40 gènes les plus sous exprimés au cours de la TEM au niveau desquels EZH2 et H3K27me3 sont retrouvés en CHIP-seq.

Nom du gène	Nom Complet	Voie	Facteur de surexpression
<u>LAMC2</u>	<i>Laminin Subunit Gamma 2</i>	Migration	136.06061
<u>MMP2</u>	<i>Matrix Metallopeptidase 2</i>	Invasion	84.03596
<u>IFI44</u>	<i>Interferon Induced Protein 44</i>		85.09684
<u>PDPN</u>	<i>Podoplanin</i>	Adhésion/Migration	70.26931
<u>EPHB1</u>	<i>EPH Receptor B1</i>	Signalisation/Différentiation	61.171906
ADAMTS6	<i>ADAM Metallopeptidase With Thrombospondin Type 1 Motif 6</i>	Invasion	60.858818
<u>PLXNA2</u>	<i>Plexin A2</i>	Neurones/Cytosquelette	51.367912
<u>CORO2B</u>	<i>Coronin 2B</i>	Cytosquelette	50.59241
<u>WNT5B</u>	<i>Wnt Family Member 5B</i>	Signalisation	49.2107
<u>FGF1</u>	<i>Fibroblast Growth Factor 1</i>	Invasion	46.811604
<u>IL11</u>	<i>Interleukin 11</i>	Inflammation	40.969658
<u>SERPINE1</u>	<i>Serpin Family E Member 1</i>	Signalisation TGF	36.279957
<u>SORBS2</u>	<i>Sorbin And SH3 Domain Containing 2</i>	Signalisation	32.88129
<u>ST3GAL1</u>	<i>ST3 Beta-Galactoside Alpha-2,3-Sialyltransferase 1</i>	Métabolisme/Golgi	31.096785
<u>ADRB2</u>	<i>Adrenoceptor Beta 2</i>	Signalisation	29.206749
<u>FLRT2</u>	<i>Fibronectin Leucine Rich Transmembrane Protein 2</i>	Migration/Neurones	29.155872
<u>CCBE1</u>	<i>Collagen And Calcium Binding EGF Domains 1</i>	Invasion	27.715591
<u>ITGA1</u>	<i>Integrin Subunit Alpha 1</i>	Inflammation/Adhésion	25.38341
<u>GABBR2</u>	<i>Gamma-Aminobutyric Acid Type B Receptor Subunit 2</i>	Signalisation	25.18972
<u>CNTNAP2</u>	<i>Contactin Associated Protein Like 2</i>	Neurones/Adhésion	24.962
<u>TSPAN2</u>	<i>Tetraspanin 2</i>	Signalisation/Migration	23.584604
<u>MAMDC2</u>	<i>MAM Domain Containing 2</i>		22.557695
<u>ABLIM3</u>	<i>Actin Binding LIM Protein Family Member 3</i>	Cytosquelette	21.122744
<u>PDE11A</u>	<i>Phosphodiesterase 11A</i>	Signalisation	22.096119
<u>SPOCK1</u>	<i>SPARC/Osteonectin, Cwcv And Kazal Like Domains Proteoglycan 1</i>		18.524563
<u>FHOD3</u>	<i>Formin Homology 2 Domain Containing 3</i>	Cytosquelette	17.957954
<u>LPAR5</u>	<i>Lysophosphatidic Acid Receptor 5</i>	Signalisation	17.839083
<u>KIF26B</u>	<i>Kinesin Family Member 26B</i>	Trafique Vésiculaire/Cancer	17.640966
<u>STC1</u>	<i>Stanniocalcin 1</i>	Métabolisme	15.435241
<u>FILIP1L</u>	<i>Filamin A Interacting Protein 1 Like</i>	Division Cellulaire/Invasion	15.412477
<u>GPAM</u>	<i>Glycerol-3-Phosphate Acyltransferase, Mitochondrial</i>	Métabolisme	15.332116
<u>FRMD6</u>	<i>FERM Domain Containing 6</i>		14.9776125
<u>COL1A1</u>	<i>Collagen Type I Alpha 1 Chain</i>	Invasion	14.108483
<u>PID1</u>	<i>Phosphotyrosine Interaction Domain Containing 1</i>		14.032291
<u>NTN1</u>	<i>Netrin 1</i>	Migration	13.977448
<u>CDCP1</u>	<i>CUB Domain Containing Protein 1</i>	Invasion	13.33593
<u>SCG5</u>	<i>Secretogranin V</i>	Transport de Protéines	12.452836
<u>TNS1</u>	<i>Tensin 1</i>	Adhésion	12.068397
<u>CUX2</u>	<i>Cut Like Homeobox 2</i>	FT	11.958643
<u>COL13A1</u>	<i>Collagen Type XIII Alpha 1 Chain</i>	Invasion	11.921377

Tableau 12 : Liste des 40 gènes les plus surexprimés au cours de la TEM au niveau desquels on retrouve KDM6B seul en CHIP-seq.

Nous avons alors cherché de nouvelles cibles d'EZH2 et KDM6B au cours de la TEM parmi ces gènes.

Nous avons identifié 3 gènes comme potentiels nouveaux marqueurs de la TEM : *INHBB*, *WNT5B* et *ADAMTS6* dont l'expression est contrôlée par le niveau de méthylation de H3K27. Nous avons confirmé les résultats de CHIP-seq et de transcriptomique par des ChIPs classiques couplés à la qPCR et par des RT-qPCR. Il a donc été confirmé que l'expression d'*INHBB* (*Inhibin subunit β B*) diminue au cours de la TEM dans les cellules A549, et cette diminution est associée à une augmentation du niveau de H3K27me3 au niveau du promoteur de ce gène. L'implication de la protéine INHBB dans la TEM est peu étudiée jusqu'à présent. De la même manière, l'expression de *WNT5B* et d'*ADAMTS6* augmente au cours de la TEM dans ce même modèle, et cette augmentation est accompagnée d'une diminution du niveau de H3K27me3 au niveau du promoteur de ces gènes (**Figure 28A-B**). Les rôles d'*INHBB*, de *WNT5B* et d'*ADAMTS6* déjà décrits dans les cancers ou dans la TEM seront détaillés dans la discussion.

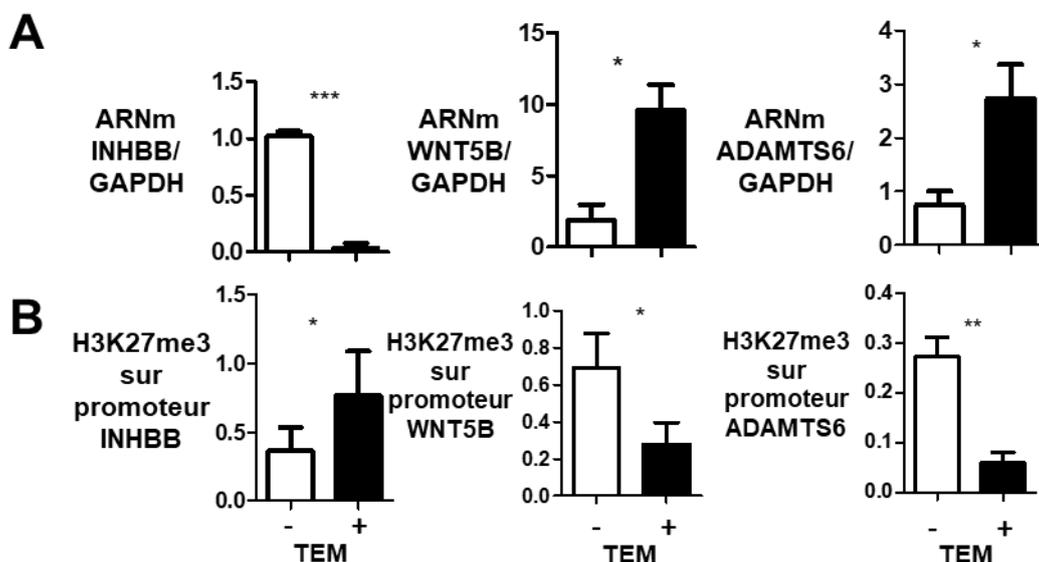


Figure 28 : *INHBB*, *WNT5B* et *ADAMTS6* sont régulés par EZH2 et KDM6B via H3K27me3 au cours de la TEM.

A. Expression ARNm d'*INHBB*, *WNT5B* et *ADAMTS6* dans les cellules A549 au cours de la TEM. **B.** ChIP H3K27me3 sur les promoteurs d'*INHBB*, *WNT5B* et *ADAMTS6* dans les cellules A549 au cours de la TEM.

Nous nous sommes intéressés à une autre marque épigénétique qui entre en compétition avec H3K27me3, et qui pourrait, à ce titre, être également impliquée dans la

régulation de l'expression de ces 3 gènes : H3K27Ac (marque activatrice de la transcription). Il a été montré que H3K27 est souvent acétylée (H3K27ac) lorsqu'elle n'est pas méthylée⁴⁰⁷. Des études cinétiques en CHIP ont alors été réalisées dirigées contre H3K27Ac et H3K27me3 et il apparaît que le niveau de H3K27Ac est inversement corrélé au niveau de H3K27me3 au niveau des promoteurs d'*INHBB*, *WNT5B* et *ADAMTS6* lors de l'induction de la TEM, ce qui suggère que la variation d'expression de ces gènes au cours de la TEM est due non seulement à la variation du niveau de méthylation de H3K27, mais également à la variation du niveau d'acétylation de cette lysine (**Figure 29**).

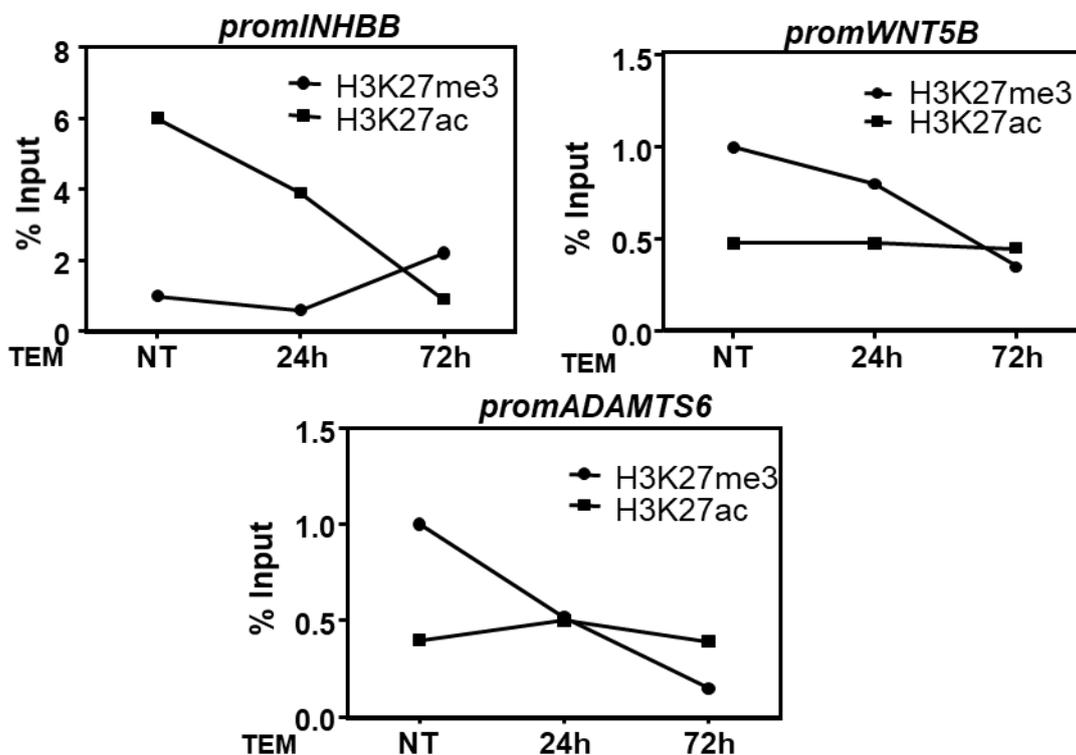


Figure 29 : Cinétique d'acétylation et de méthylation de H3K27 au cours de la TEM.

ChIP H3K27me3 et H3K27Ac sur les promoteurs d'*INHBB*, *WNT5B* et *ADAMTS6* dans des cellules A549 induites en TEM pendant 24h, 72h ou non induites.

Nous nous sommes ensuite intéressés à l'expression d'*INHBB*, de *WNT5B* et d'*ADAMTS6* au niveau protéique chez des patients atteints de NSCLC, pour voir si ces protéines pouvaient faire office de pronostic de tumeur invasive, ou au contraire peu invasive pour *INHBB* (**Figure 30**). L'expression de ces protéines a été comparée entre les tumeurs TEM- (pas d'expression de VIMENTINE, n=25) et les tumeurs TEM+ (forte expression de VIMENTINE, n=24) en IHC. Comme observé dans notre modèle cellulaire, il y a une surexpression de *WNT5B* et d'*ADAMTS6* dans les tumeurs TEM+ par rapport aux tumeurs TEM-, alors que

l'expression d'INHBB est diminuée dans les tumeurs TEM+ par rapport aux tumeurs TEM-. Les protéines INHBB, ADAMTS6 et WNT5B peuvent donc être considérées comme de nouveaux biomarqueurs de la TEM dans les NSCLC, dont l'expression est régulée épigénétiquement par H3K27me3 notamment.

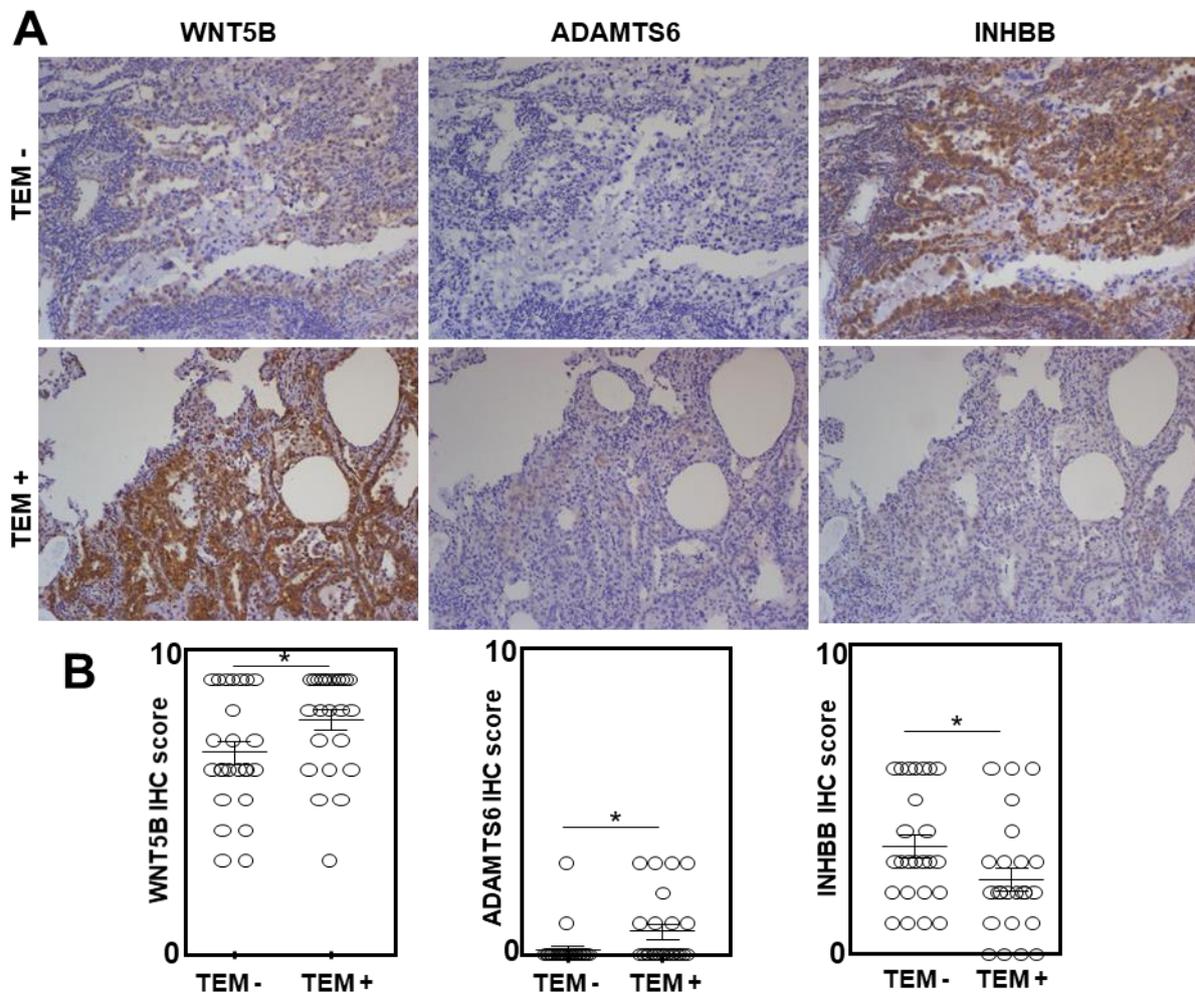


Figure 30 : Expression de WNT5B, ADAMTS6 et INHBB dans une cohorte de NSCLC en TEM ou non.
A. Marquage IHC de WNT5B, INHBB et ADAMTS6 dans des cancers du poumon classés TEM - (n=20) et TEM + (n=19). **B.** Quantification par score (entre 0 et 9) de l'expression d'INHBB, WNT5B et ADAMTS6 dans les cancers du poumon.

Nous avons ensuite voulu savoir si l'expression de nos gènes cibles d'EZH2 et KDM6B était directement impliquée dans le phénotype mésenchymateux, et si la modulation de leur expression pouvait suffire à modifier la TEM dans les cellules A549. Pour cela, les expressions d'INHBB, WNT5B et ADAMTS6 ont été inhibées à l'aide de siRNA. L'inhibition de l'expression des gènes INHBB et WNT5B est d'environ 90%, alors que celle d'ADAMTS6 est d'environ 50% (**Figure 31A**). L'extinction partielle de ces gènes n'a aucun effet sur l'expression de la VIMENTINE ou de CDH1, ni sur les capacités de migration des cellules A549 (**Figure 31B-C**).

L'inhibition de l'expression d'*ADAMTS6* donne lieu à une augmentation de l'expression de *ADAM19* (**Figure 31C**). De manière très intéressante, l'inactivation de l'expression d'*INHBB* a tendance à augmenter les capacités d'invasion des cellules. Lorsque les cellules sont en TEM, l'expression d'*INHBB* est indétectable, on ne peut donc observer aucun effet synergique (**Figure 31D**). *WNT5B* et *ADAMTS6* étant surexprimés au cours de la TEM, l'inhibition de leur expression revient à ramener celle-ci à un niveau basal dans les cellules, avant induction de la TEM. Cette inhibition a pour effet de ramener également l'invasion de ces cellules au niveau basal (**Figure 31D**). Ces données montrent que l'extinction d'*INHBB* et l'augmentation d'expression de *WNT5B* et *ADAMTS6* au cours de la TEM, médiées par H3K27me3 et donc par EZH2 et KDM6B favorisent l'augmentation des capacités d'invasion des cellules A549.

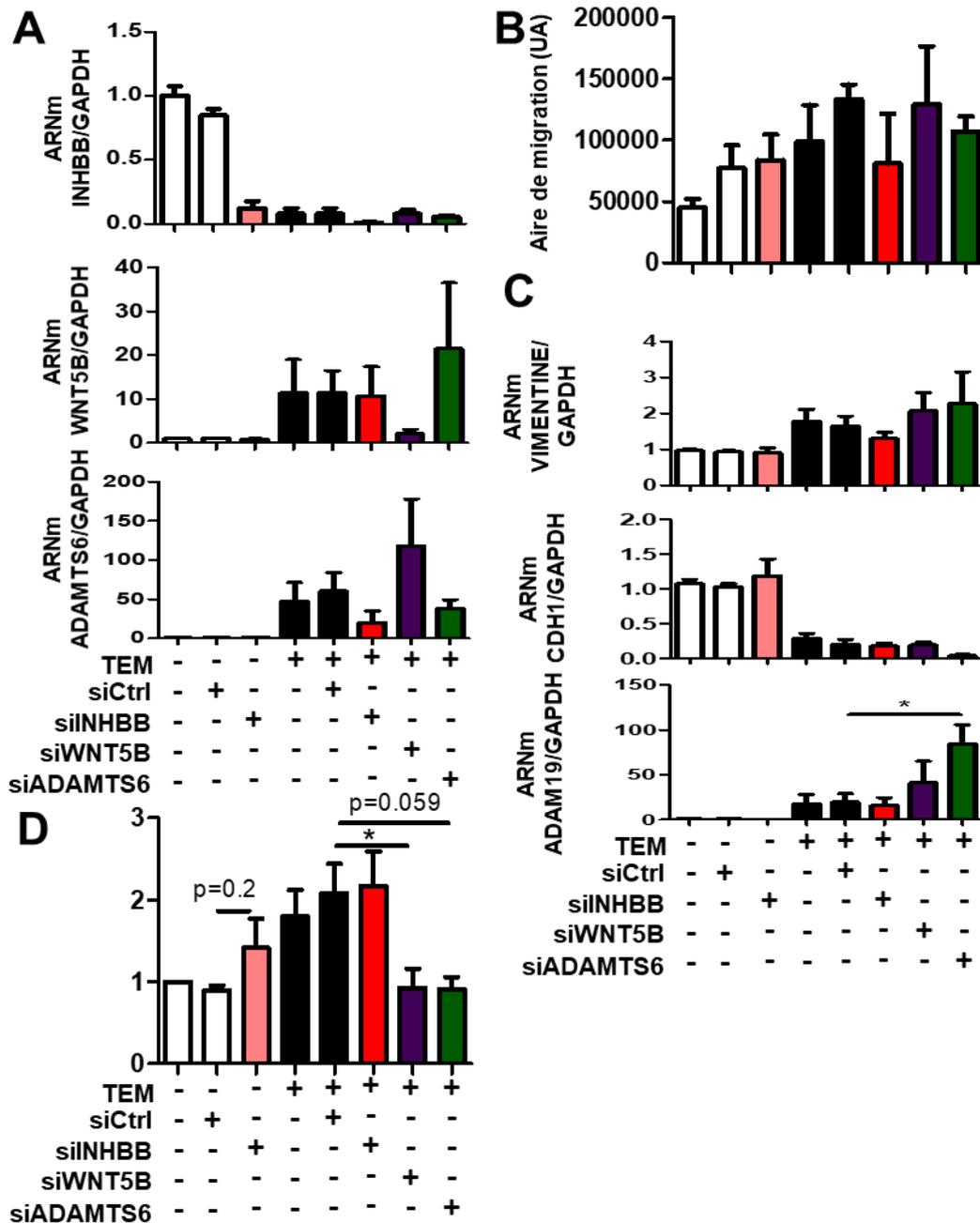


Figure 31 : Etude du phénotype mésenchymateux lors de l'extinction d'INHBB, WNT5B ou ADAMTS6 au cours de la TEM.

A. Expressions ARNm d'INHBB, WNT5B et ADAM19 dans des cellules A549 induites ou non en TEM et transfectées ou non par des siRNA dirigés contre INHBB, WNT5B et ADAMTS6. **B.** Tests de blessure cicatrisation dans des cellules A549 induites ou non en TEM et transfectées ou non par des siRNA dirigés contre INHBB, WNT5B et ADAMTS6. **C.** Expression ARNm de la VIMENTINE, CDH1 et ADAM19 dans des cellules A549 induites ou non en TEM et transfectées ou non par des siRNA dirigés contre INHBB, WNT5B et ADAMTS6. **D.** Test d'invasion en chambre de Boyden dans des cellules A549 induites ou non en TEM et transfectées ou non par des siRNA dirigés contre INHBB, WNT5B et ADAMTS6.

Afin de voir si la modulation du niveau de H3K27me3 peut suffire à modifier l'expression de ces gènes cible, nous avons inhibé EZH2 ou KDM6B et mesuré l'expression de nos nouvelles cibles potentielles de ces deux enzymes. L'inhibition d'EZH2 fait diminuer le niveau de H3K27me3 au niveau des promoteurs d'*INHBB*, *WNT5B* et *ADAMTS6*. L'inhibition de KDM6B en revanche ne modifie pas le niveau de cette marque sur les promoteurs de ces gènes (**Figure 32B**). Notons que de la même manière, nous ne voyons pas d'augmentation globale de la marque H3K27me3 dans les cellules A549 après inhibition de KDM6B. En revanche, bien que modulant le niveau de H3K27me3 au niveau des promoteurs de ces 3 gènes, l'inhibition d'EZH2 n'est pas suffisante pour faire varier le niveau d'expression de ceux-ci (**Figure 32A-B**). Le niveau de H3K27me3 au niveau des promoteurs d'*INHBB*, de *WNT5B* et d'*ADAMTS6* varie bien de manière inversement proportionnelle avec l'expression de ces gènes au cours de la TEM, cependant, le fait de moduler cette marque au niveau de leurs promoteurs ne suffit pas à changer leur niveau d'expression. La variation de H3K27me3 fait sans doute partie d'un plus vaste programme de régulation, impliquant d'autres marques épigénétiques.

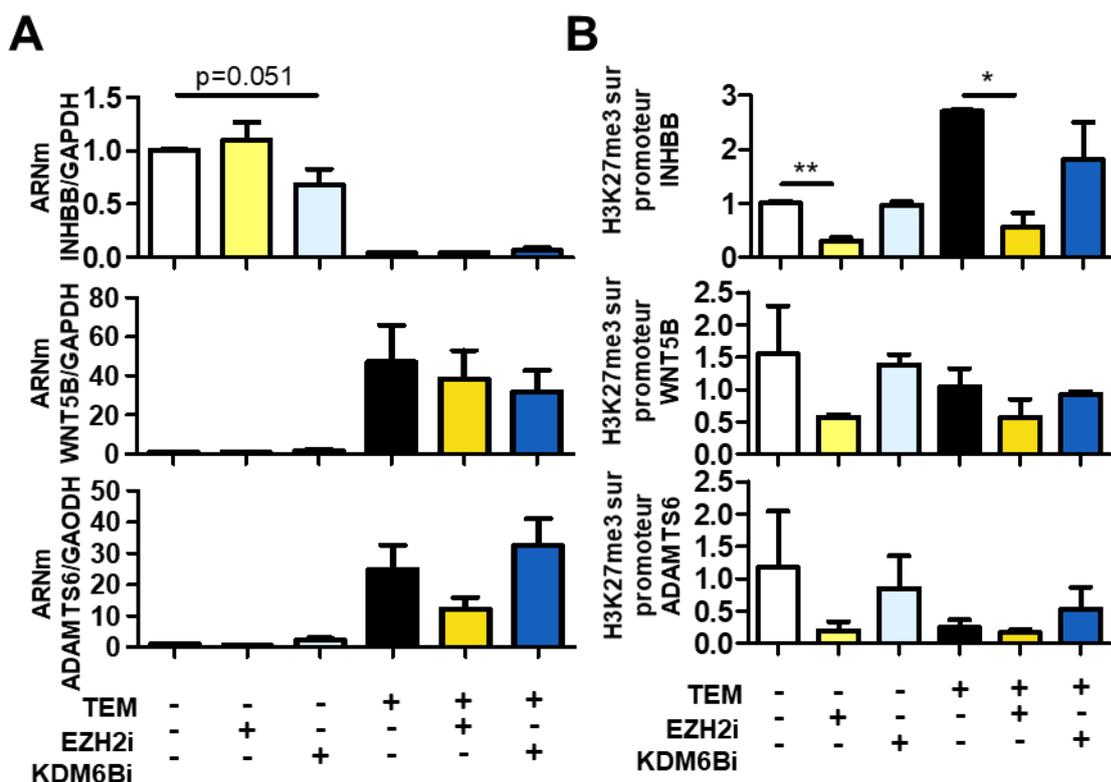


Figure 32 : Régulation d'*INHBB*, *WNT5B* et *ADAMTS6* au cours de la TEM par H3K27me3.

A. Expression ARNm d'*INHBB*, *WNT5B* et *ADAMTS6* dans des cellules A549 induites en TEM ou non et traitées ou non par EZH2i ou KDM6Bi. **B.** ChIP H3K27me3 sur les promoteurs d'*INHBB*, *WNT5B* et *ADAMTS6* dans des cellules A549 induites en TEM ou non et traitées ou non par EZH2i ou KDM6Bi.

Afin d'avoir de plus amples informations sur la régulation par H3K27me3 de l'expression d'*INHBB*, *WNT5B* et *ADAMTS6*, nous avons répétés la ChIP dirigée contre H3K27me3 et la mesure de l'expression de ces 3 gènes, cette fois en diminuant l'expression d'*EZH2* ou *KDM6B* par transfection de siRNA. De la même manière que pour l'expression de la VIMENTINE dans les cellules A549 ou la migration de ces cellules, la diminution de l'expression d'*EZH2* ou de *KDM6B* n'a aucun effet sur le niveau de H3K27me3 au niveau du promoteur de nos 3 gènes cibles de ces deux enzymes (**Figure 33B**), ni sur leur expression (**Figure 33A**). Encore une fois, cela peut être dû à une inhibition seulement partielle de l'expression des enzymes, leur permettant de garder une activité suffisante.

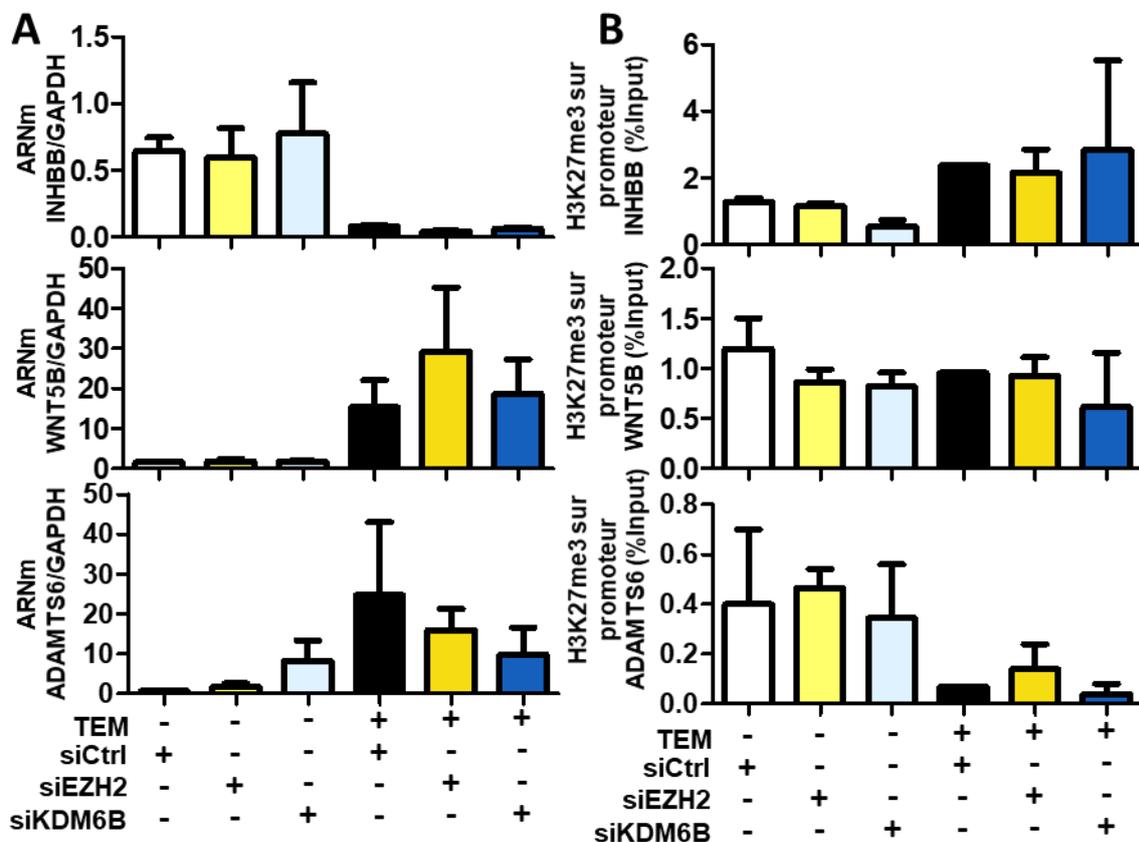


Figure 33 : Régulation de l'expression d'*INHBB*, *WNT5B* et *ADAMTS6* lors de l'extinction d'*EZH2* ou *KDM6B* par siRNA.

A. Expression ARNm d'*INHBB*, *WNT5B* et *ADAMTS6* dans les cellules A549 au cours de la TEM ou non et transfectées ou non par des siRNA ciblant *EZH2* ou *KDM6B*. **B.** ChIP H3K27me3 sur les promoteurs d'*INHBB*, *WNT5B* et *ADAMTS6* dans les cellules A549 au cours de la TEM ou non et transfectées ou non par des siRNA ciblant *EZH2* ou *KDM6B*.

Etant donné que la modulation de H3K27me3 sur les promoteurs de nos trois gènes n'est pas suffisante pour faire varier l'expression de ces gènes, nous nous sommes ensuite intéressés à la cinétique de variation de H3K27me3 sur les promoteurs d'*INHBB*, *WNT5B* et *ADAMTS6*, pour savoir si cette marque est plutôt initiatrice du changement d'expression des gènes, ou si elle se met en place plus tardivement afin de maintenir les changements d'expression de ces gènes. Au niveau du promoteur d'*INHBB*, nous observons une chute du niveau de H3K27me3 dès l'induction en TEM (6h plus tard) jusqu'à au moins 24h après l'induction, alors que 72h après l'induction, ce niveau a augmenté par rapport au niveau basal. Sur les promoteurs de *WNT5B* et *ADAMTS6* en revanche, le niveau de H3K27me3 décroît lentement à partir de l'induction jusqu'à 72h plus tard (**Figure 34**). Ces données semblent indiquer que H3K27me3 participerait au maintien de l'expression de ces gènes plutôt qu'être à l'origine du changement d'expression de ceux-ci.

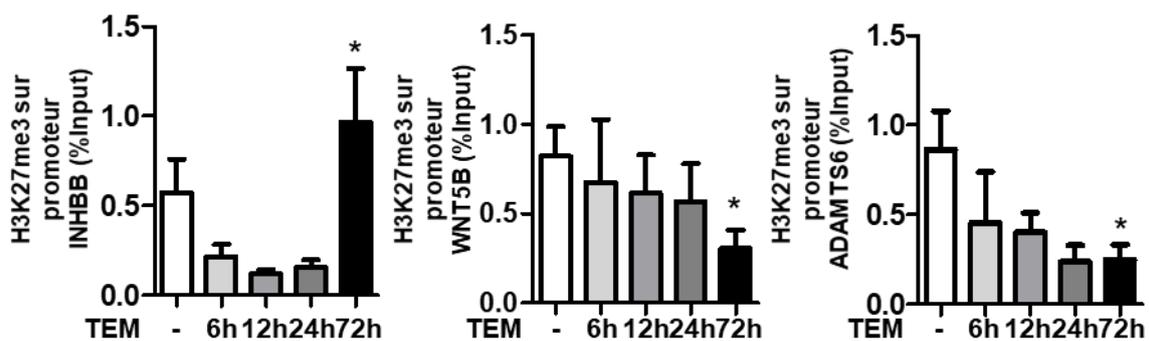


Figure 34 : H3K27me3 sur les promoteurs d'*INHBB*, *WNT5B* et *ADAMTS6* au cours de l'induction de la TEM dans les cellules A549.

ChIP cinétique dirigée contre H3K27me3 sur les promoteurs d'*INHBB*, *WNT5B* et *ADAMTS6* dans des cellules A549 induites en TEM pendant 6h, 12h, 24h ou 72h.

Pour conclure, la surexpression de *WNT5B* et *ADAMTS6* ainsi que la sous-expression d'*INHBB* a cours de la TEM dans les cellules A549 sont médiées au moins en partie par H3K27me3 et sont responsables de l'augmentation des capacités d'invasion de ces cellules. La modulation de H3K27me3 au niveau du promoteur de ces gènes n'est cependant pas suffisante pour faire varier leur expression, ce qui montre que le code histone fait intervenir plusieurs marques dans la régulation de leur expression. La marque H3K27me3 intervient tardivement dans cette régulation et participe au maintien de l'expression de ces gènes plutôt qu'à leur changement.

Discussion et perspectives

1- Modèles d'étude de la TEM

Les cellules A549 sont des cellules épithéliales, mais inductibles en TEM par un co-traitement TGF- β /TNF- α . C'est un bon modèle d'étude de la TEM puisqu'on peut très facilement les faire évoluer d'un phénotype épithélial à un phénotype mésenchymateux et inversement (simplement en retirant le traitement du milieu de culture) et contrôler au microscope le phénotype puisque l'allongement des cellules est remarquable. Cependant ces cellules, bien que de morphologie épithéliale, sont déjà engagées dans un processus de TEM puisqu'elles expriment à un niveau basal des gènes non exprimés dans les cellules épithéliales comme la *VIMENTINE* et *CDH2*. Il serait intéressant de réaliser la même étude, ou du moins en partie, sur une autre lignée cellulaire de cancer du poumon pour valider nos résultats et s'affranchir de données dépendantes de la lignée et non pas de la pathologie.

2- Corrélation entre les expressions d'EZH2 et de KDM6B

Au sein de notre cohorte de NSCLC, les expressions d'EZH2 et de KDM6B sont corrélées, indépendamment du statut TEM de la tumeur (**Figure 15**), ce qui peut suggérer une régulation de l'un par l'autre, une régulation par les mêmes voies de signalisation ou une boucle de rétrocontrôle. Il a été montré que dans une cohorte de cancer de la prostate, EZH2 et KDM6B sont toutes deux surexprimées dans les cancers les plus agressifs⁴⁶⁹. Nos données d'expression d'*EZH2* lors de la transfection des cellules A549 par un siRNA ciblant KDM6B (**Figure 21B**) montrent une tendance à la diminution de l'expression d'*EZH2* par le siRNA ciblant KDM6B. Enfin, nous observons une augmentation du marquage EZH2 en IF dans les cellules transfectées par un plasmide de surexpression transitoire de KDM6B par rapport aux cellules non transfectées. Cette donnée va dans le sens d'une régulation directe de KDM6B sur le promoteur d'*EZH2*. Nous pouvons également supposer que la surexpression de KDM6B induit une TEM dans ces cellules, et donc indirectement une surexpression d'*EZH2*.

Dans la littérature, une étude s'intéresse à l'expression d'EZH2 et KDM6B en même temps, et elle montre une surexpression conjointe de ces deux protéines dans les cancers de la prostate de haut grade comparé aux cancers moins avancés, mais aucune étude statistique ne montre si il y a corrélation entre les expressions de ces deux protéines dans cette cohorte, indépendamment du stade de la tumeur⁴⁶⁹. Une seconde étude montre l'expression d'EZH2 et KDM6B dans des médulloblastomes, sans s'intéresser à la corrélation entre les expressions

de ces protéines. Les données publiées laissent cependant penser que leur expression n'est pas corrélée dans ces tumeurs⁴⁷⁶. La corrélation entre l'expression de l'une et l'autre de ces enzymes serait donc dépendante du modèle. Mis à part les travaux cités ci-avant, il n'existe pas de données sur une éventuelle régulation directe de l'une de ces enzymes sur le promoteur de la deuxième ou sur une régulation commune de l'expression de ces enzymes par les mêmes mécanismes.

3- Surexpression d'EZH2 et KDM6B

Nous avons d'abord surexprimé EZH2 et KDM6B de façon transitoire dans nos cellules, à l'aide de différentes techniques de transfection de plasmide de surexpression de ces deux protéines : différents réactifs de transfection, puis électroporation. Dans tous les cas, le taux de transfection était trop faible pour analyser les cellules en population, et il n'y a que par IF que nous pouvions étudier les cellules effectivement transfectées et les comparer aux cellules voisines n'ayant pas reçu le plasmide.

Nous avons alors choisi de réaliser des lignées A549 surexprimant de manière stable EZH2, KDM6B sauvage ou KDM6B H1390A, à l'aide de transduction par des particules virales, contenant un plasmide d'expression viral de ces différentes protéines. L'obtention de ces lignées nous a permis de mener des études plus poussées en WB, RT-qPCR, tests de migration et d'invasion notamment. Une lignée surexprimant EZH2 inactive est en cours d'obtention pour compléter ces résultats.

De manière étonnante, la surexpression stable d'EZH2 n'entraîne pas d'augmentation du niveau global de H3K27me3, alors que la surexpression de KDM6B entraîne une diminution de ce niveau (**Figure 18**). EZH2 a déjà été surexprimée dans des cellules A549, mais le niveau de H3K27me3 après surexpression n'est pas montré⁴⁷⁷. Cela peut s'expliquer par le fait que le taux de surexpression d'EZH2 soit bien inférieur à celui de KDM6B (1,5 fois contre 10 à 20 fois). De plus, le niveau de H3K27me3 est déjà élevé dans les cellules A549. Nous pouvons également penser que contrairement à KDM6B, EZH2 a besoin d'être au sein du complexe PRC2 afin d'être active et de pouvoir méthyler H3K27. Or, il est possible qu'en surexprimant EZH2 uniquement, les autres protéines de ce complexe soient en concentrations limitantes dans la cellule ce qui ne permettrait pas à EZH2 de pouvoir augmenter son activité malgré une augmentation de son expression. Lorsqu'EZH2 est surexprimée dans des cancers du poumon à petites cellules, les autres membres du complexe PRC2 sont également surexprimés⁴³⁵. De

manière similaire, dans différentes tumeurs neurologiques, *SUZ12* et *RBBP7* sont également surexprimés⁴¹⁴. Dans des cancers du sein et de la prostate en revanche, *EZH2* est surexprimée dans les tumeurs invasives mais pas *EED*^{415,418}. La plupart du temps, l'expression des membres de PRC2 n'est pas étudiée dans les travaux s'intéressant à la surexpression d'*EZH2* dans certains cancers invasifs^{409–413,416,417,420,421}. L'étude de l'expression des autres membres de PRC2 dans ces différents types de cancers nous donnerait une indication sur leur implication dans la TEM et la nécessité ou non de leur surexpression aux côtés d'*EZH2* pour induire un phénotype mésenchymateux. Il existe des tests permettant de mesurer l'activité H3K27-méthyltransférase sur des extraits cellulaires, qui nous permettraient de savoir si l'activité de *EZH2* est augmentée dans nos modèles de surexpression stable, ou les autres membres de PRC2 ne sont pas surexprimés. Ces tests ont déjà été réalisés sans succès au laboratoire sur des lignées avec une expression endogène d'*EZH2* et *KDM6B*.

La surexpression de *KDM6B* fait diminuer le niveau global de H3K27me3 comme attendu (**Figure 18**). Cette enzyme a été surexprimée dans des cellules HeLa dans une autre étude : le niveau de H3K27me3 n'a pas été mesuré par WB, mais en IF et il n'y a pas de changement visible de cette marque⁴⁷⁸. Nous voyons enfin que la surexpression de *KDM6B H1390A* a tendance à faire baisser le niveau global de H3K27me3, bien que cette baisse ne soit pas significative. Cette tendance à la baisse du niveau de H3K27me3 peut être due au fait que *KDM6B H1390* va prendre la place de *KDM6B* ou d'*EZH2* au niveau de H3K27, sans la déméthylater, mais empêchant ainsi la méthylation par *EZH2*.

Nous avons montré que les cellules surexprimant de manière stable *KDM6B* et *EZH2* à un degré moindre sont plus invasives que les cellules A549 sauvages. De plus, la surexpression de *KDM6B H1390A* inactive n'entraîne pas d'augmentation de l'invasion, ce qui montre que *KDM6B* induit une augmentation de l'invasion dans nos cellules, de manière dépendante de son activité déméthylase. Pour donner suite aux données intéressantes obtenues en tests d'invasion en chambre de Boyden avec ces lignées de surexpression stable, ces lignées ont été injectées *in vivo* dans des modèles de souris immunodéficientes. Nous avons donc réalisé des xénogreffes de nos lignées en injection intraveineuse dans la queue des souris pour étudier la dissémination tumorale *in vivo* de ces lignées dans les poumons des souris. Le but est de voir si les capacités d'invasion *in vitro* de nos cellules vont se confirmer *in vivo* en permettant aux cellules surexprimant *KDM6B* sauvage ou *EZH2* de se disséminer plus rapidement au niveau

des poumons des souris. A cette occasion, nos lignées ont été transformées pour exprimer de manière stable le gène de la LUCIFERASE, pour nous permettre de suivre l'évolution des cellules cancéreuses dans les souris en imagerie bioluminescente (**Figure 35**). Cette expérience est en cours de réalisation lors de la rédaction de ce manuscrit.

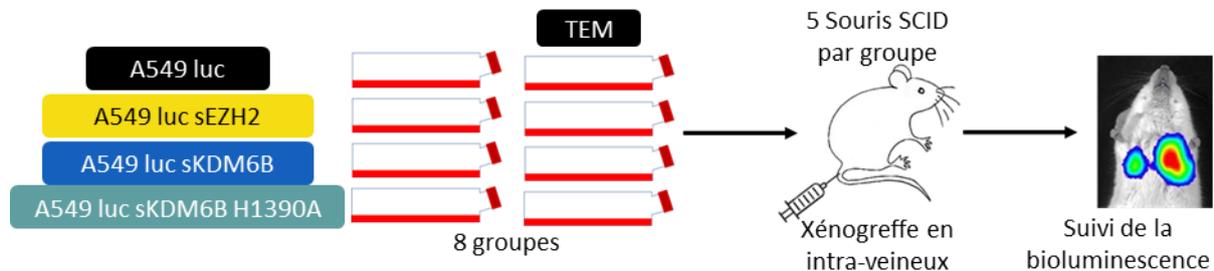


Figure 35 : Schéma descriptif de l'étude de la dissémination tumorale des cellules A549 in vivo.

Les cellules A549 exprimant la luciférase et surexprimant ou non EZH2, KDM6B ou KDM6B H1390A sont cultivées et pré-traitées ou non pendant 3 jours par TGF- β /TNF- α afin de les induire en TEM. Ces cellules sont ensuite injectées in vivo dans la veine de la queue de souris SCID (xéno greffe), puis leur dissémination dans les souris est étudiée par imagerie en bioluminescence.

4- L'inhibition d'EZH2 ou de KDM6B a les mêmes effets sur la TEM que leur surexpression

4.1- Extinction des gènes *EZH2* et *KDM6B*

D'abord nous avons, par plusieurs techniques différentes, fait diminuer l'expression d'EZH2 ou de KDM6B, ce qui diminue donc leur activité. Nous aborderons rapidement les résultats préliminaires obtenus à partir des clones KO EZH2 ou KDM6B par la technique de CRISPR/Cas9. Comme écrit précédemment, nous ne sommes parvenus à obtenir qu'un seul clone pour chaque extinction, ce qui rend nos données fragiles car potentiellement dépendantes d'une autre modification génétique advenue dans les clones sélectionnés, et nous ne pouvons pas être certains que les phénotypes observés dans ces clones soient uniquement dépendants de l'inhibition de KDM6B ou EZH2. Nous avons donc essayé d'obtenir des lignées A549 KO pour EZH2 ou KDM6B par la méthode de shRNA. Ce fut un échec, que ce soit en essayant d'obtenir un pool de cellules KO, ou en faisant (comme pour la méthode du CRISPR/Cas9), une sélection clonale des cellules transfectées. Nous supposons donc que l'extinction d'EZH2 ou de KDM6B est difficilement viable pour les cellules A549. Cependant, l'extinction de ces protéines a déjà été réalisée dans d'autres types cellulaires (cellules souches embryonnaires de souris pour KDM6B et fibroblastes embryonnaires de souris pour EZH2 par exemple)^{479,480}. Dans ces cellules, la perte d'EZH2 ou KDM6B est viable. En ce qui

concerne les modèles *in vivo* l'extinction d'EZH2 chez la souris entraîne la mort de l'animal dans les premiers stades du développement embryonnaires⁴⁸¹, et l'extinction de KDM6B entraîne elle la mort de l'animal le jour de sa naissance par déficience respiratoire⁴⁸².

L'extinction par CRISPR/Cas9 d'EZH2 ou de KDM6B entraîne dans les deux cas une augmentation de l'expression de la VIMENTINE. Cette augmentation est plus importante lorsque KDM6B est éteint, et seules les cellules où KDM6B est éteinte migrent plus que les cellules sauvages. D'après ces données, l'extinction ou l'activation d'EZH2 ou de KDM6B entraînent un phénotype plus mésenchymateux.

Nos tentatives d'extinctions stables d'EZH2 ou KDM6B s'étant révélées être en partie infructueuses (seulement un clone obtenu pour chaque protéine par CRISPR/Cas9), nous nous sommes tournés vers une extinction transitoire par siRNA. Cette extinction transitoire a permis de faire diminuer de 60% environ l'expression de KDM6B et de 80% environ l'expression d'EZH2. Il y a donc une présence résiduelle de ces protéines qui semble suffisante pour maintenir un niveau global de H3K27me3 presque identique (**Figure 21**). Nous émettons l'hypothèse que la diminution partielle des niveaux d'EZH2 ou KDM6B par siRNA ne modifie pas suffisamment le niveau de H3K27me3 au niveau des promoteurs de leurs gènes cibles pour modifier le niveau d'expression de ces derniers. Ainsi, nous n'observons pas de différences significatives du phénotype mésenchymateux, que ce soit du niveau d'expression de la VIMENTINE ou des capacités de migration et d'invasion (**Figures 21 et 22**). Notons que si le niveau global de H3K27me3 varie peu, le niveau de cette marque au niveau de gènes particuliers peut tout de même varier, et nous l'avons étudié plus tard (*cf* partie 5- de la discussion).

De plus, il y a une différence chronologique entre l'extinction stable et l'extinction transitoire. En effet, lors de l'extinction stable, les expressions des protéines sont diminuées avant que l'on induise les cellules en TEM par co-traitement TGF- β /TNF- α . Avec l'extinction transitoire, les cellules ont été transfectées par les siRNA le lendemain de l'induction en TEM, afin que les expressions d'EZH2 et KDM6B soient toujours diminuées au moment où nous analysons les cellules, 3 jours après l'induction en TEM, puisque l'inhibition transitoire ne perdure pas plus de 72h. Lorsque nous avons essayé de transfecter les cellules 1 jour avant

l'induction en TEM, les protéines sont réexprimées au moment de l'analyse, ce qui ne permet pas de valider l'expérience.

Globalement, les techniques d'extinction des gènes ne permettent pas d'inhiber complètement l'expression de ceux-ci. L'extinction dans les clones CRISPR/Cas9 est satisfaisante, mais nous ne pouvons pas nous affranchir des effets clones dépendants.

4.2- Inhibition chimique de l'activité d'EZH2 et KDM6B

L'inhibition chimique de ces enzymes est une technique complémentaire afin d'étudier leurs rôles. La molécule utilisée pour inhiber EZH2, GSK343 (**Figure 36**), se lie à EZH2 en compétition avec le donneur de méthyle SAM^{483,484}. Elle a 60 fois plus d'affinité pour EZH2 que pour son paralogue EZH1 et 1 000 fois plus que pour d'autres KMT. Cette molécule a déjà été utilisée sur des cellules A549, n'ayant aucun effet significatif sur l'expression de la VIMENTINE ou l'invasion des cellules, ce qui confirme nos résultats. Cependant, elle n'a pas été testée lors de l'induction de la TEM, où nous voyons une augmentation de l'expression de la VIMENTINE (**Figure23**)⁴⁸⁵. La molécule utilisée pour inhiber KDM6B, GSKJ4 (**Figure 36**) et un précurseur qui est dégradé par la cellule, ce qui va libérer GSK-J1 (**Figure 36**). Celle-ci se lie à KDM6B en compétition avec son cofacteur α -cétoglutarate, mais pas en compétition avec le substrat, H3K27me3⁴⁶⁶. Ce qui laisse penser que le traitement par GSKJ4 n'empêche pas KDM6B de former un complexe avec H3K27me3. GSKJ4 a été utilisé dans des lignées de cancer du sein MDA-MB-231 et MCF-7, dans lesquelles il n'induit pas d'augmentation significative du niveau global de H3K27me3, ce qui conforte nos résultats dans les cellules A549⁴⁵⁸. Ce niveau est au contraire largement augmenté dans des cellules de cancer des ovaires A2780 traitées par GSKJ4⁴⁸⁶.

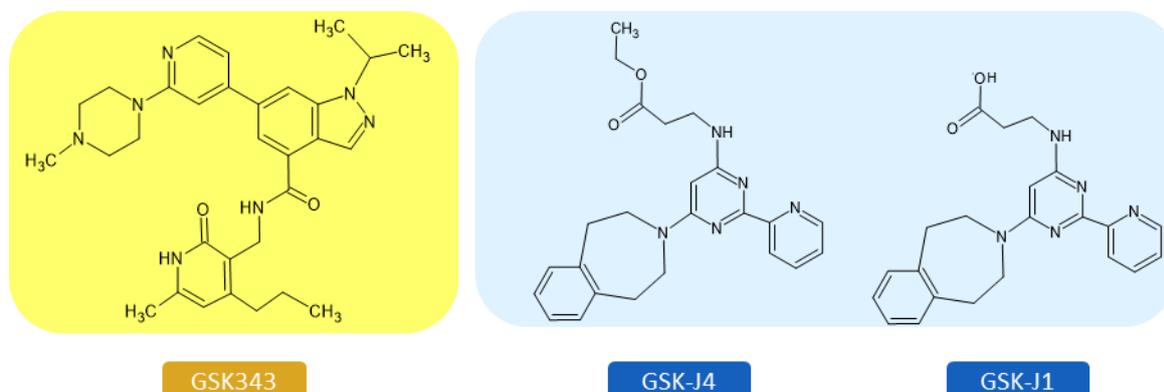


Figure 36 : Structure chimique de l'inhibiteur d'EZH2 (GSK343) et de KDM6B (GSKJ4/GSKJ1).

En ce qui nous concerne, l'inhibition chimique d'EZH2 permet de faire chuter le niveau global de H3K27me3, de la même manière que dans le clone CRISPR/Cas9 EZH2, mais l'inhibition de KDM6B ne fait pas augmenter significativement ce niveau en WB, bien que le marquage H3K27me3 en IF soit légèrement plus intense dans cette condition (**Figure 23**). Nous l'expliquons par l'hypothèse que KDM6B, malgré son inhibition peut toujours lier son substrat et éventuellement rester fixé sur H3K27me1, empêchant la nouvelle méthylation par EZH2. Il a en effet été montré que KDM6B aurait parfois plus pour effet d'empêcher une hyperméthylation de certaines régions en empêchant EZH2 de s'y fixer que de directement déméthyliser H3K27me3⁴⁰³.

Contrairement à l'extinction des gènes, l'inhibition chimique semble atteindre la totalité ou presque des protéines présentes dans la cellule, ce qui permet de moduler plus largement le niveau global de H3K27me3 et donc certainement de le modifier également au niveau des gènes régulés par cette marque. En revanche, l'extinction de l'activité méthyltransférase ou déméthylase par ces inhibiteurs peut également avoir des effets non spécifiques. La concentration utilisée ici correspond à la concentration minimale permettant de modifier le niveau global de H3K27me3 dans les cellules A549 (10 μ M).

Dans notre modèle, l'inhibition d'EZH2 entraîne une augmentation d'expression de la VIMENTINE lors de la TEM, mais pas de modification de la migration ou de l'invasion. L'inhibition de EZH1 et d'EZH2 entraîne les mêmes effets sur l'expression de la VIMENTINE. L'inhibition de KDM6B induit également l'augmentation de l'expression de la VIMENTINE, ainsi que de la migration et de l'invasion des cellules. L'effet de l'inhibiteur de KDM6B est surtout observé lorsque les cellules sont induites en TEM, ce qui pourrait s'expliquer par le fait que KDM6B est surexprimée au cours de cette induction. En effet, il a été dit précédemment que KDM6B a parfois plus la fonction d'empêcher EZH2 de méthyler H3K27 et ainsi empêcher une méthylation aberrante, plutôt que de proprement déméthyliser cette lysine. Nous pouvons supposer que la surexpression de KDM6B s'accompagne également d'une augmentation de l'activité déméthylase globale de KDM6B dans la cellule. L'inhibition d'une plus forte activité déméthylase entraînerait alors de plus grands effets.

Pour résumer les travaux effectués sur la modulation de l'activité d'EZH2 ou de KDM6B au cours de la TEM, la surexpression ou l'inhibition d'EZH2 ou de KDM6B ont tendance tous deux à induire un phénotype plus mésenchymateux dans les cellules A549 (**Tableau 13**).

Action	Niveau H3K27me3	Expression VIM	Migration	Invasion	Figure
Surexp. EZH2	=	+	+	+	17-18-19
CRISPR/Cas9 EZH2	--	++	=		20
siEZH2	-	-	=	-	21-22
EZH2i	--	++	=	=	23-25
EZH2i/EZH1i	--	+			24
Surexp. KDM6B	--	=	+	++	17-18-19
Surexp. KDM6B H1390A	-	=	=	=	17-18-19
CRISPR/Cas9 KDM6B		+++	++		20
siKDM6B	+	=	=	=	21-22
KDM6Bi	+	++	++	++	23-25

Tableau 13 : Récapitulatif des effets de la modulation de l'activité d'EZH2 ou KDM6B sur la TEM dans les cellules A549.

= : pas de différence comparée aux cellules WT, non traitées ; +/- : très légère tendance à la baisse ; - : tendance à la baisse ; -- : baisse significative ; + : tendance à la hausse ; ++ : Hausse significative ; +++ : hausse significative plus importante pour le CRISPR/Cas9 KDM6B que pour le CRISPR/Cas9 EZH2.

Ces données pourraient paraître contre-intuitives : la surexpression ou l'inhibition d'une enzyme entraîne le même phénotype, plus ou moins marqué, et en plus de cela, la surexpression ou l'inhibition de l'enzyme antagoniste entraîne également le même phénotype à des degrés variés. D'abord, la TEM est un phénomène très finement régulé, qui repose sur l'équilibre entre l'expression de nombreux gènes pouvant l'induire ou induire un phénotype épithélial, la plupart de ces gènes étant régulés par de nombreuses marques épigénétiques. De la même manière, H3K27me3 est une marque épigénétique régulant l'expression d'un grand nombre de gènes dans la cellule (**Tableaux 11 et 12, Figure27**). Il a notamment été montré qu'EZH2 peut cibler les promoteurs de gènes « pro-TEM », comme de gènes « anti-TEM » (*cf* Introduction, Chapitre III)^{368,371}, et de la même manière des gènes « pro-TEM » comme « anti-TEM » peuvent être activés par la déméthylation de H3K27me3 au niveau de leur promoteur (*cf* Introduction, Chapitre III)^{447,487,488}.

Ainsi, nous avons émis l'hypothèse qu'au cours de la TEM, EZH2 et KDM6B ciblent des gènes différents, et leur augmentation d'expression est associée à une relocalisation au niveau de certains promoteurs en particulier. La surexpression exogène de ces enzymes entraîne un niveau de surexpression qui n'est probablement jamais rencontré *in vivo*.

5- Identification de gènes cibles d'EZH2 et KDM6B au cours de la TEM dans les cellules A549

Les deux enzymes étant surexprimées au cours de la TEM, nous avons cherché à valider l'hypothèse formulée dans le paragraphe précédent en cherchant quels sont les gènes cibles de KDM6B et EZH2 au cours de la TEM. De plus, possédant des données de transcriptomique dans les cellules A549 au cours de la TEM issues de travaux précédents du laboratoire⁹, nous avons réalisés un CHIP-seq dirigé contre EZH2, KDM6B et H3K27me3 dans ces mêmes conditions. D'abord, EZH2 et H3K27me3 possèdent plus de *loci* en commun (36% des *loci* d'EZH2 et 26% des *loci* de H3K27me3) que KDM6B et H3K27me3 (21% des *loci* de KDM6B et 10% des *loci* d'H3K27me3) (**Figure 27**). Nous pouvons aussi dire que la fixation d'EZH2 et de KDM6B sont exclusives puisqu'on retrouve ces deux enzymes sur le même *loci* seulement dans 2% des *loci* d'EZH2 et 3% des *loci* de KDM6B. Parmi les gènes déjà publiés comme étant cibles de KDM6B dans différents cancers (**Tableau 8**), *EPCAM*, *SNAI2*, *NANOG*, *CEBPA*, *STC1*, *TFPI2* et *PTGS2* ont été identifiés comme cibles de KDM6B dans notre modèle. En ce qui concerne les gènes déjà décrits comme cibles d'EZH2 dans différents cancers, *CDH1*, *TGFB1*, *APC* et *MYC* ont été retrouvés comme cibles potentielles de cette enzyme dans notre modèle (**Tableau 5**).

La comparaison des données de CHIP-seq avec les données de transcriptomique nous a permis d'identifier de nombreux gènes à priori régulés par H3K27me3 au cours de la TEM (**Tableaux 11 et 12**). Nous avons alors voulu confirmer pour quelques gènes que cette régulation est bien dépendante d'EZH2 et de KDM6B au cours de la TEM, puis étudier les effets de l'expression de ces gènes sur la TEM dans notre modèle. Parmi ceux ciblés par ces enzymes, nous nous sommes intéressés aux gènes qui sont les plus surexprimés et les plus sous exprimés au cours de la TEM afin d'avoir plus de chance de sélectionner des gènes dont l'expression a un impact direct sur la TEM. Nous avons identifié de potentiels nouveaux marqueurs de la TEM parmi les gènes cibles d'EZH2 et KDM6B. Nos résultats confirment que l'expression d'*INHBB*, *WNT5B* et *ADAMTS6* ont une expression qui varie en sens inverse du niveau de H3K27me3 de leur promoteur au cours de la TEM (**Figure 27**).

EZH2 et KDM6B étant recrutées à l'ADN au niveau de gènes cibles différents au cours de la TEM, alors qu'elles ne possèdent pas de domaines permettant de reconnaître des séquences d'ADN en particulier, il sera intéressant de déterminer par quels mécanismes cela

est possible. Nous essaierons donc d'identifier les partenaires protéiques d'EZH2 et de KDM6B au cours de la TEM par la méthode de RIME (*Rapid immunoprecipitation mass spectrometry of endogenous proteins*). Elle consiste à immuno-précipiter nos protéines cibles uniquement lorsqu'elles sont liées à l'ADN, couplé à de la spectrométrie de masse, afin de nous permettre d'identifier uniquement les partenaires protéiques présents lors de la liaison à l'ADN. La découverte de partenaires différents avec induction de la TEM ou non dans nos cellules pourrait expliquer le fait que ces enzymes ciblent des gènes différents durant la TEM. Suivant les partenaires et les gènes identifiés, cela pourrait également expliquer pourquoi la surexpression ou l'inhibition d'EZH2 ou de KDM6B induisent toujours un phénotype mésenchymateux.

6- Effets de la modulation de l'expression d'*INHBB*, *WNT5B* ou *ADAMTS6* sur la TEM dans les cellules A549

Nous avons donc identifié *INHBB*, *WNT5B* et *ADAMTS6* dont l'expression varie au cours de la TEM dans notre modèle et qui sont régulés par H3K27me3. L'analyse par IHC sur une cohorte de NSCLC TEM+ et TEM- a permis de mettre en évidence que l'expression d'*INHBB* est diminuée dans les tumeurs TEM+ alors que l'expression de *WNT5B* et *ADAMTS6* est augmentée dans ces mêmes tumeurs (**Figure 30**). Ces trois protéines sont alors identifiées comme de nouveaux marqueurs de la TEM dans les NSCLC.

Nous avons éteint leur expression grâce à des siRNA et nous avons étudié la TEM dans les cellules A549 pour étudier si l'expression de ces nouveaux marqueurs de la TEM est nécessaire au phénotype mésenchymateux ou épithélial. De manière intéressante, nous observons une tendance à augmenter l'invasion des cellules A549 lorsqu'*INHBB* est éteint et l'extinction de *WNT5B* ou d'*ADAMTS6* dans des cellules préalablement induites en TEM fait diminuer leur capacité d'invasion (**Figure 31**). Cela est assez remarquable car la TEM fait intervenir un très grand nombre de gènes, comme discuté précédemment, et le fait que l'extinction d'un seul gène puisse modifier le phénotype mésenchymateux témoigne de la grande importance de ces gènes dans la mise en place et/ou le maintien de ce phénotype. Ces trois gènes apparaissent dès lors comme des nouveaux gènes clés de la TEM dans ces cellules et leur expression dans d'autres modèles devrait être étudiée pour éventuellement en faire de nouveaux marqueurs universels de la TEM. De plus, nous savons désormais que modifier

l'expression de ces gènes peut moduler la TEM dans ces cellules. Ces protéines sont donc des cibles thérapeutiques potentielles pour le traitement de cancers invasifs. D'autant que nous avons montré que leur expression est bien corrélée à la TEM dans une cohorte de patients atteints de cancers du NSCLC (**Figure 30**).

Pour résumer, l'induction de la TEM dans les cellules A549 entraîne la surexpression d'EZH2 et de KDM6B, qui ensemble vont modifier le niveau de H3K27me3 sur les promoteurs d'*INHBB*, *WNT5B* et *ADAMTS6*. La variation d'expression de ces gènes est alors suffisante pour augmenter les capacités d'invasion des cellules, mais pas l'expression de marqueurs mésenchymateux comme la VIMENTINE ou la migration (**Figure 37**).

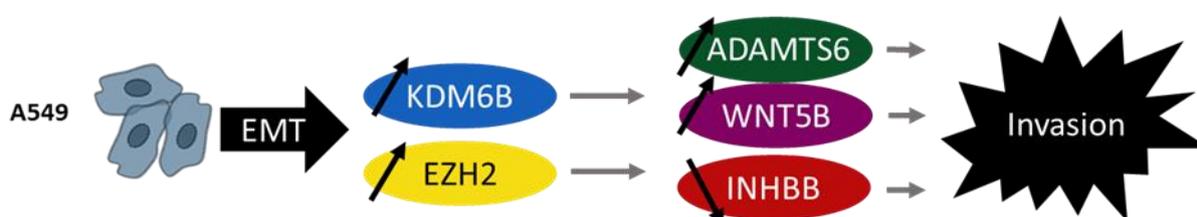


Figure 37 : Schéma simplifié de l'implication de KDM6B et EZH2 dans l'augmentation des capacités d'invasion des cellules A549 au cours de la TEM.

L'induction de la TEM entraîne l'augmentation de l'expression d'EZH2 et KDM6B, qui induisent ou maintiennent la surexpression d'*ADAMTS6* et *WNT5B* et la diminution de l'expression d'*INHBB* via H3K27me3, rendant les cellules plus invasives.

7- Implications d'*INHBB*, *WNT5B* et *ADAMTS6* au cours de la TEM

Nous avons identifié trois nouveaux marqueurs de TEM dans les cancers du poumon, régulés par EZH2 et KDM6B au cours de la TEM. Il existe cependant quelques données concernant *INHBB*, *WNT5B* et *ADAMTS6* et leur implication dans la TEM ou leur régulation par EZH2 ou KDM6B, qui seront détaillées ici.

7.1- *INHBB*

INHBB est un gène codant pour l'INHIBINE-B β (ou *INHIBIN SUBUNIT β B*), protéine appartenant à la superfamille du TGF- β . Cette protéine est une sous unité de dimères appelés ACTIVINES et INHIBINES qui sont principalement connues pour respectivement activer et inhiber la sécrétion de FSH (Follicle stimulating hormone) par l'hypophyse⁴⁸⁹. Il existe 3 gènes (*INHA*, *INHBA* et *INHBB*) codant pour trois protéines (respectivement INHIBINE- α , INHIBINE- β A et INHIBINE- β B), qui s'associant en dimère peuvent former deux INHIBINES différentes et

trois ACTIVINES différentes (**Figure 38**). Le rapport avec la TEM n'est donc pas évident. L'expression de ce gène n'est pas non plus connue pour être toujours induite par le TGF- β .

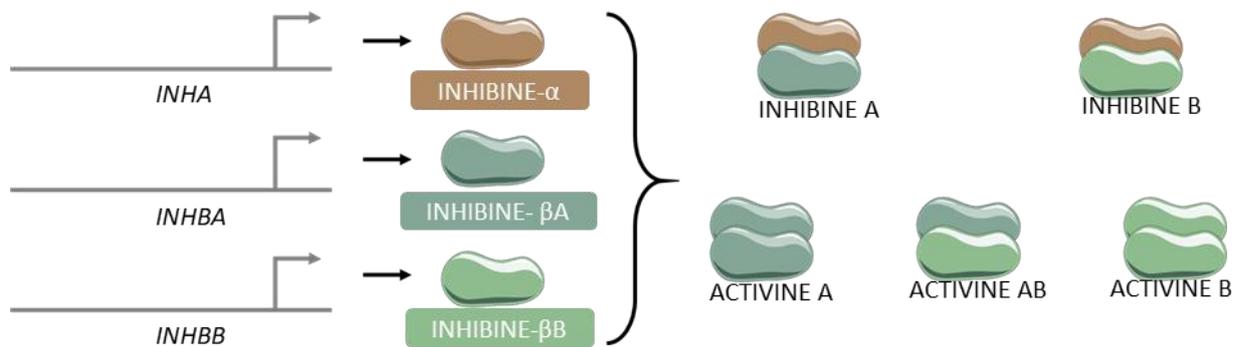


Figure 38 : Schéma des gènes codant pour les différentes sous-unités des ACTIVINES et INHIBINES. Trois gènes (*INHA*, *INHBA* et *INHBB*) codent pour trois protéines différentes (Respectivement *INHIBINE- α* , *INHIBINE- β A* et *INHIBINE- β B*). Ces 3 protéines, en s'assemblant deux à deux peuvent former 2 ACTIVINES différentes et 3 INHIBINES.

L'expression d'*INHBB* a pourtant été associée à la TEM ou à un phénotype agressif de certaines tumeurs dans quelques travaux. Dans des cancers nasopharyngées, l'expression d'*INHBB* est diminuée comparé aux tissus sains, et une forte expression d'*INHBB* est associée à bon pronostic dans ces cancers⁴⁹⁰. De plus, la surexpression d'*INHBB* dans des cellules de cancers nasopharyngés 5-8F entraîne la diminution de l'expression de nombreux marqueurs mésenchymateux (*VIMENTINE*, *SMAD2/3/4*, phospho-*SMAD2/3*, *MMP9*) et la diminution de l'expression de la *E-CADHERINE*. *INHBB* a donc également un rôle pro-épithélial dans ces cellules. Les auteurs montrent que *INHBB* réprime (de manière inconnue) l'expression du TGF- β 1 et participe ainsi à réprimer toute la voie du TGF- β ⁴⁹⁰. Il a été montré également qu'*INHBB* est moins exprimé dans les métastases de cancers du sein que dans les tumeurs primaires⁴⁹¹. Dans les cancers colorectaux en revanche, l'expression d'*INHBB* est associée à un mauvais pronostic et à un grade de tumeur élevé. Son expression est réprimé par les *miR 34a/b/c*⁴⁹². Dans les cancers de la voie orale, *INHBB* est surexprimée et son expression est corrélée à la formation de métastases. L'extinction d'*INHBB* par shRNA diminue la migration et l'invasion de lignées cellulaires de cancers de la voie orale⁴⁹³. L'expression d'*INHBB* est également augmentée dans les cancers du col de l'utérus les plus agressifs comparé au moins agressifs⁴⁹⁴.

Il a déjà été montré en 2017 qu'*EZH2* cible le promoteur d'*INHBB* dans des cellules de fibroblastes embryonnaires de souris. Ces travaux montrent que *PRC2* est recruté de manière indirecte par la protéine *MENIN* sur ce promoteur et induit la répression de l'expression d'*INHBB* en y augmentant la méthylation de H3K27⁴⁹⁵.

L'expression d'*INHBB* est donc corrélée ou inversement corrélée à la TEM dans de nombreux types cancéreux. *INHBB* induirait un phénotype épithélial dans les cellules de cancers nasopharyngés en réprimant l'expression de TGF- β 1, ce qui empêcherait une signalisation autocrine et paracrine par ce dernier.

7.2- WNT5B

WNT5B est une protéine de la famille WNT, activatrice de la voie du même nom non-canonique. La liaison par WNT5B du récepteur FRIZZLED peut entraîner l'activation de la voie RHO-GTPase ou MAPK (JUNK) par exemple, voies qui peuvent participer à l'induction de la TEM⁴⁹⁶ (**Figure 39**).

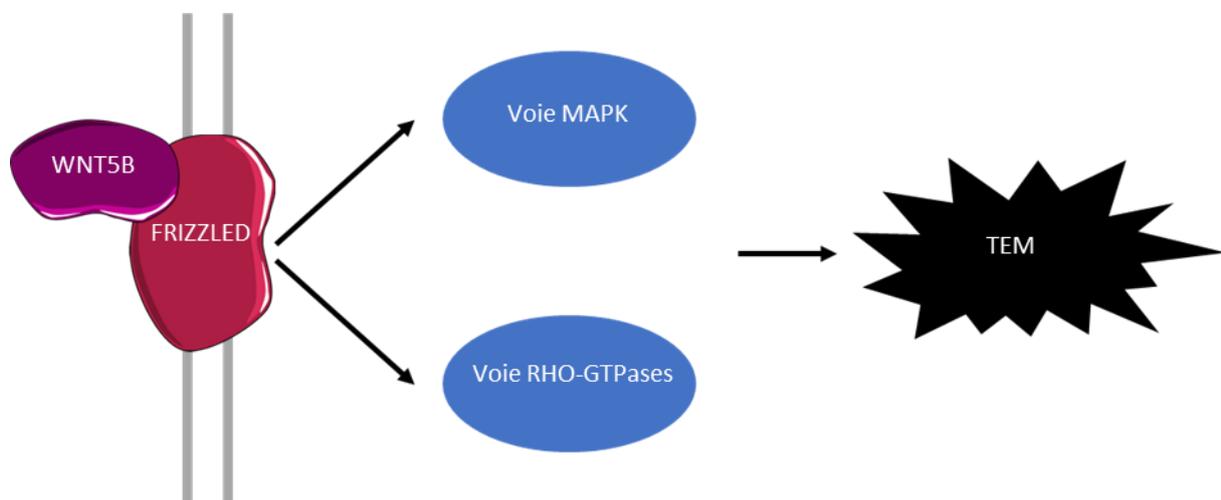


Figure 39 : Schéma très simplifié de la voie WNT non canonique induite par WNT5B.

WNT5B peut activer les voies MAPK et Rho-GTPases en liant son récepteur *FRIZZLED*, qui induisent l'expression d'un phénotype mésenchymateux.

WNT5B est associée à un mauvais pronostic dans les cancers du sein, et est surexprimée dans les cancers de type basaux par rapport aux types luminaux. De plus, sa surexpression augmente la migration et l'invasion des cellules de cancer du sein Bcap-37 et MDA-MB-231⁴⁹⁶. WNT5B est une protéine sécrétée. Il a été montré que dans les cellules Caco-2, cette protéine est sécrétée par des exosomes. Une étude a alors montré que des exosomes de cellules Caco-2 exprimant WNT5B sont capables d'induire une augmentation de la migration des cellules A549⁴⁹⁷.

Il a déjà été montré que WNT5B est surexprimée dans des cellules A549 induites en TEM par un traitement TGF- β , et cette protéine a également été identifiée comme capable

d'induire la TEM dans des cellules épithéliales adjacentes lorsqu'elle est sécrétée⁴⁹⁸. D'autres travaux montrent que l'expression de WNT5B est corrélée avec l'apparition de métastases dans des adénocarcinomes du poumon⁴⁹⁹. La surexpression de WNT5B dans des cellules de cancer colorectal COLO-205 entraîne l'augmentation de la migration et de l'invasion de ces cellules *via* la voie des MAPK⁵⁰⁰.

La voie activée par WNT5B est l'une des voies pouvant activer la TEM induite par un co-traitement TGF- β /TNF- α dans les cellules A549, parmi beaucoup d'autres. La voie SMAD notamment est considérée comme la voie principale, dans ce cas. Or, la voie médiée par WNT5B est suffisamment importante pour que l'extinction de WNT5B suffise à faire diminuer l'invasion des cellules A549 après qu'elles aient été induites en TEM (**Figure 31**).

Comme nous avons émis l'hypothèse que H3K27me3 participe au maintien du niveau d'expression de WNT5B au cours de la TEM, plutôt qu'à l'induction de sa surexpression, il est possible alors que la surexpression d'EZH2 et de KDM6B au cours de la TEM soit induite par l'activation de la voie WNT non canonique par WNT5B. Cela suggère en tout cas qu'il y a un rétrocontrôle positif entre l'induction de la TEM et l'expression de WNT5B. Dans tous les cas, il serait intéressant d'étudier les mécanismes induisant la surexpression d'EZH2 et de KDM6B au cours de la TEM dans notre modèle.

7.3- ADAMTS6

ADAMTS6 fait partie de la famille des métalloprotéinases ADAMTS, qui compte 19 membres⁵⁰¹. Là encore, c'est une protéine sécrétée, qui est capable de dégrader la MEC pour faciliter l'invasion des cellules.

Assez peu de données sont disponibles concernant ADAMTS6 par rapport aux autres membres de la famille ADAMTS. Il est rapporté que ADAMTS6 est surexprimée dans les cancers du sein, mais sans valeur prédictive parmi ceux-ci⁵⁰². Chez les patients atteints de carcinomes à cellules squameuses de l'œsophage, une forte expression d'ADAMTS6 est de mauvais pronostic⁵⁰³

D'autres travaux en revanche montrent que l'expression d'ADAMTS6 est de bon pronostic dans les cancers du sein, et que la surexpression de ce gène dans des lignées cellulaires de cancer du sein diminue leur migration et leur invasion⁵⁰⁴.

Enfin, ADAMTS6 étant une métalloprotéinase, le fait que son extinction entraîne une diminution des capacités d'invasion des cellules A549 était plutôt attendu (**Figure 31**) et cela peut également expliquer que son extinction n'entraîne pas de modification de l'expression de la VIMENTINE ou de la migration des cellules. En effet, éteignant son expression, nous éteignons directement une protéine effectrice de la TEM, et nous agissons directement sur le phénotype d'invasion.

8- Effet de la modulation d'EZH2 et KDM6B sur l'expression des nouveaux gènes cibles

Nous avons par la suite modulé l'activité d'EZH2 ou KDM6B à l'aide des inhibiteurs chimiques décrits précédemment ou des siRNA, afin de voir si cela suffisait à faire varier l'expression de nos nouveaux gènes cibles. L'inhibition d'EZH2 entraîne bien une forte diminution de H3K27me3 au niveau du promoteur d'INHBB. Cette inhibition a également tendance à faire diminuer H3K27me3 au niveau des promoteurs de *WNT5B* et *ADAMTS6*. Cela ne s'accompagne en revanche pas de variation de l'expression de ces gènes. Notamment, lorsque la TEM est induite, l'expression d'INHBB chute complètement. On pourrait s'attendre à ce que l'inhibition d'EZH2, qui entraîne une grosse diminution de H3K27me3 sur le promoteur d'INHBB puisse rétablir son expression mais ce n'est pas le cas (**Figure 32**). Il est donc tout à fait possible que d'autres phénomènes épigénétiques régulent l'expression de ces gènes. H3K27me3 est une marque parmi d'autre qui participe à leur régulation au cours de la TEM. Nous avons montré que l'acétylation de H3K27 qui est opposée à celle de H3K27me3 est également modifiée (**Figure 29**). Le code histone, qui gouverne en partie l'expression des gènes, est constitué par l'ensemble des modifications post-traductionnelles des histones à un *locus* donné. Cela peut expliquer pourquoi faire varier uniquement H3K27me3 n'est pas suffisant face aux autres marques mises en place, pour modifier l'expression des gènes. L'extinction d'EZH2 ou de *KDM6B* par siRNA ne montre aucun changement du niveau de H3K27me3 sur les promoteurs de nos 3 gènes cibles ni aucun changement d'expression de ces derniers (**Figure 33**), ce qui peut être expliqué à nouveau par un niveau résiduel trop important de nos deux enzymes. Nous remarquons également que l'inhibition de KDM6B n'induit pas d'augmentation du niveau de H3K27me3 au niveau des promoteurs des gènes cibles. Cette inhibition n'est donc pas suffisante pour entraîner l'augmentation de H3K27me3 au niveau de ces gènes, elle l'est peut-être au niveau des promoteurs d'autres gènes, ce qui expliquerait

pourquoi elle induit la TEM dans les cellules A549. Des CHIP ciblant directement EZH2 et KDM6B dans des cellules A549 traitées par EZH2i ou KDM6Bi ont également été réalisées afin de valider cette hypothèse, mais nous n'avons pas été capables d'en tirer des résultats. La quantité d'ADN récupérée était trop faible malgré un très grand nombre de cellules de départ utilisées.

Nous avons montré finalement que l'augmentation du niveau de H3K27me3 se met en place sur le promoteur d'*INHBB* après 24h. Sur le promoteur de *WNT5B* et *ADAMTS6*, ce changement s'opère très progressivement pour être conséquent seulement à 72h. Nous pouvons alors penser que H3K27me3 n'est pas à l'origine du changement d'expression de ces 3 gènes, mais plutôt que c'est un phénomène plus tardif, qui intervient en même temps ou après la surexpression ou la sous-expression du gène en aval. Cette marque serait alors requise pour le maintien, la stabilisation du niveau d'expression de ces gènes au cours de la TEM et ne serait pas l'instigatrice du changement de leur niveau d'expression (**Figure 34**).

Nous pourrions par la suite nous intéresser à d'autres cibles d'EZH2 et KDM6B afin d'essayer d'en identifier quelques-unes dont l'expression pourrait être modifiée par modulation de l'activité d'EZH2 et KDM6B. Cela nous permettrait d'identifier d'autres gènes qui seraient soumis cette fois principalement à une régulation par H3K27me3 au cours de la TEM.

Pour terminer, rappelons que très peu d'études s'intéressent aux deux enzymes en même temps, peut-être en conséquence de la complexité de leurs mécanismes de régulation de l'expression des gènes qui sont soulignés dans ce manuscrit et également dans une revue très récente de Das et Taube⁵⁰⁵. L'implication d'EZH2 et KDM6B dans l'agressivité des tumeurs est cependant indéniable mais les mécanismes impliqués sont toujours mal connus malgré les pistes apportées par cette thèse.

Annexes

Annexe 1 : Publication 1 publiée dans *cell death and disease*

ARTICLE

Open Access

EMT is associated with an epigenetic signature of ECM remodeling genes

Paul Peixoto^{1,2}, Amandine Etcheverry^{3,4,5,6,7}, Marc Aubry^{3,4,5,6,7}, Anaïs Missey¹, Camille Lachat¹, Jérôme Perrard¹, Elodie Hendrick⁸, Régis Delage-Mourroux¹, Jean Mosser^{3,4,5,6,7}, Christophe Borg^{1,9,10}, Jean-Paul Feugeas¹, Michaël Herfs⁸, Michaël Boyer-Guittaut^{1,2,11} and Eric Hervouet^{1,2,11}

Abstract

Type III epithelial–mesenchymal transition (EMT) has been previously associated with increased cell migration, invasion, metastasis, and therefore cancer aggressiveness. This reversible process is associated with an important gene expression reprogramming mainly due to epigenetic plasticity. Nevertheless, most of the studies describing the central role of epigenetic modifications during EMT were performed in a single-cell model and using only one mode of EMT induction. In our study, we studied the overall modulations of gene expression and epigenetic modifications in four different EMT-induced cell models issued from different tissues and using different inducers of EMT. Pangenomic analysis (transcriptome and ChIP–sequencing) validated our hypothesis that gene expression reprogramming during EMT is largely regulated by epigenetic modifications of a wide range of genes. Indeed, our results confirmed that each EMT model is unique and can be associated with a specific transcriptome profile and epigenetic program. However, we could select some genes or pathways that are similarly regulated in the different models and that could therefore be used as a common signature of all EMT models and become new biomarkers of the EMT phenotype. As an example, we can cite the regulation of gene-coding proteins involved in the degradation of the extracellular matrix (ECM), which are highly induced in all EMT models. Based on our investigations and results, we identified ADAM19 as a new biomarker of in vitro and in vivo EMT and we validated this biological new marker in a cohort of non-small lung carcinomas.

Introduction

Type III epithelial–mesenchymal transition (EMT) is a reversible process that contributes to invasion and metastasis. EMT is characterized by a downregulation of epithelial markers and an increase in mesenchymal markers and in EMT-linked transcription factors¹, but the molecular mechanisms governing EMT remain poorly understood. For the past decade, the role of epigenetics in EMT regulation has clearly emerged. For example, the

histone methyl transferase (HMT) EZH2 was required to downregulate *miR211* and EMT induction in glioblastoma multiforme², but, on the opposite, the histone demethylase KDM6B induced SNAIL2 and EMT³. The interaction of the transcription factor TWIST with another HMT, KMT5/SET8, has also been associated with the repression of *CDH1*⁴. Although these publications strongly support a role for epigenetic modifications during EMT, they all have been described in the same subtype of cancer or a single EMT cell model. Moreover, the high number of EMT markers described from one model to another suggest that EMT is a complex mechanism linked to different signaling pathways⁵ that led us to the hypothesis of the existence of numerous tissue- or cell-specific EMT.

Correspondence: Eric Hervouet (eric.hervouet@univ-fcomte.fr)

¹Univ. Bourgogne Franche-Comté, INSERM, EFS BFC, UMR1098, Interactions Hôte-Greffon-Tumeur/Ingénierie Cellulaire et Génique, F-25000 Besançon, France

²EPIGENEXP Platform, University of Bourgogne Franche-Comté, F-25000 Besançon, France

Full list of author information is available at the end of the article.

Edited by D. Aberdam

© The Author(s) 2019



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

To further characterize the epigenetic mechanisms regulating EMT, we decided to study overall gene expression and their associated epigenetic modifications in several EMT models. To do so, we used the A549 (non-small cell lung cancer (NSCLC)), the ACHN (renal cell carcinoma derived from pleural effusion), and the immortalized breast MCF10A cell lines treated, or not, with transforming growth factor beta (TGF β)/tumor necrosis factor alpha (TNF α) to induce EMT⁶. To confirm that the observed effects were not linked to the use of this combination of cytokines, we also used the breast cancer (BC) MDA-MB-468 cells treated, or not, with epidermal growth factor (EGF)⁷. As expected, using microarray and chromatin immunoprecipitation (ChIP)-sequencing (ChIP-seq) analyses, we showed that EMT-associated genes were largely regulated by epigenetic modifications. Our results also demonstrated, for the first time, that cell origin and EMT inducer were associated with a specific cellular response. However, the regulation of genes involved in the degradation of the extracellular matrix (ECM), in particular *ADAM19* (ADAM Metallopeptidase Domain 19) coding a metallopeptidase, was strongly regulated by epigenetics during EMT, independently of the EMT model, and we showed that epigenetic modifications were crucial for EMT in these cancer models.

Results

EMT-induced cell models

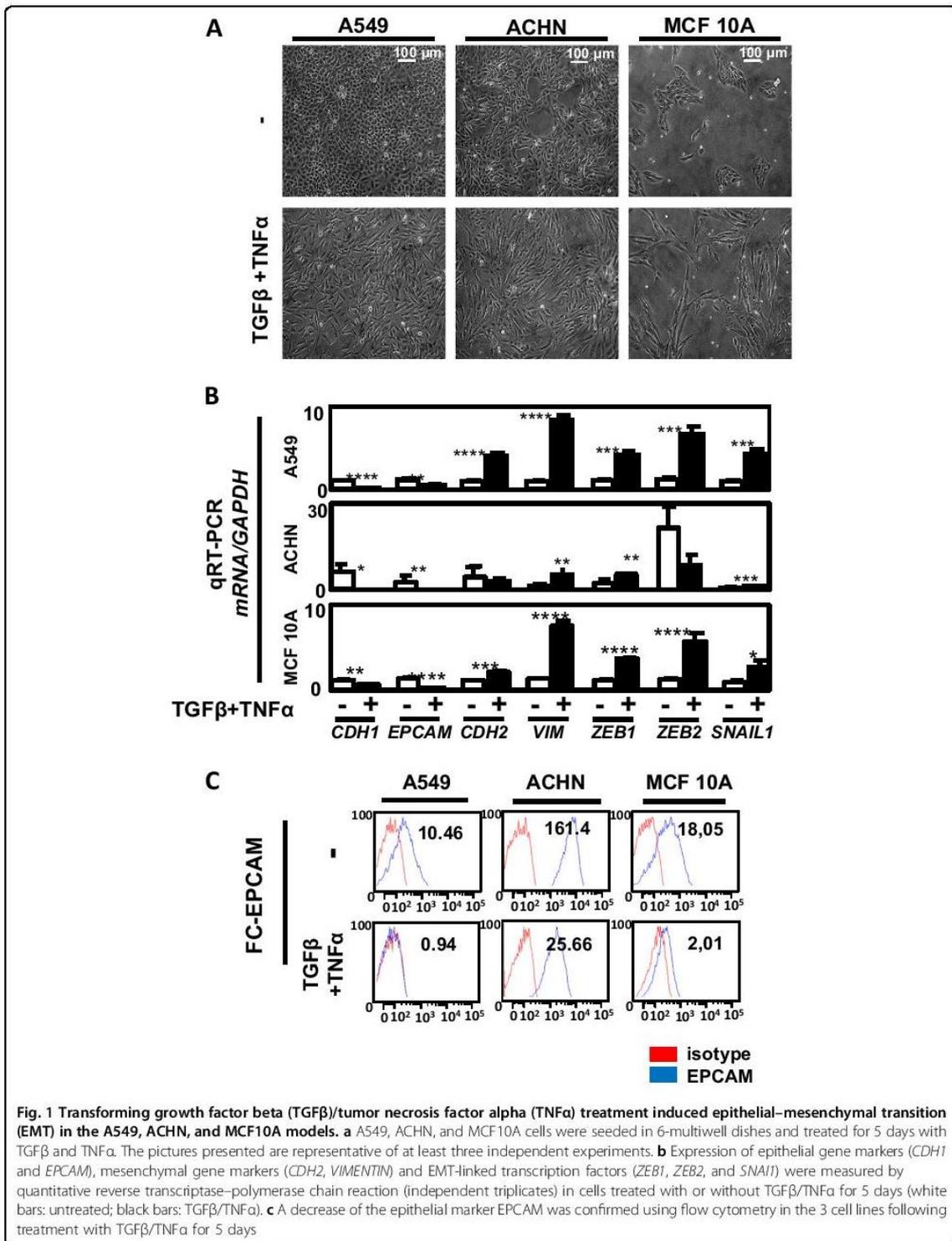
Our initial goal was to study the effects of EMT inducers on cells issued from different organs (lung, kidney, and breast). We then treated A549, ACHN, and MCF10A cells with TGF β /TNF α . TGF β is a well-admitted EMT inducer and TNF α has been described to potentiate EMT induction by stabilizing SNAIL in a nuclear factor- κ B-dependent manner^{8,9}. Following induction, a strong mesenchymal-like phenotype with the loss of cell-cell adhesion and an increase in cell elongation occurred (Fig. 1a). We next observed using quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction (qRT-PCR) that EMT markers were induced in the three cell lines but the fold changes were dependent of the cell line (Fig. 1b). We indeed quantified a strong decrease in epithelial markers *CDH1* and *EPCAM* and an increase in mesenchymal markers *SNAIL*, *VIM*, *ZEB1*, and *ZEB2* in the three models but the increase in *VIM*, *ZEB1*, and *ZEB2* expression was higher in A549 and MCF10A cells compared to the ones observed in the ACHN cells, suggesting that EMT induction is, at least partially, different in regard to cell origin. Regarding *MMP9* mRNA expression, an increase was observed in the three cell lines during EMT (Supp Fig. 1A/C). These data were confirmed at the protein level since we detected a strong decrease in *EPCAM* expression in these cell lines using flow cytometry (Fig. 1c) and a significant decrease in E-

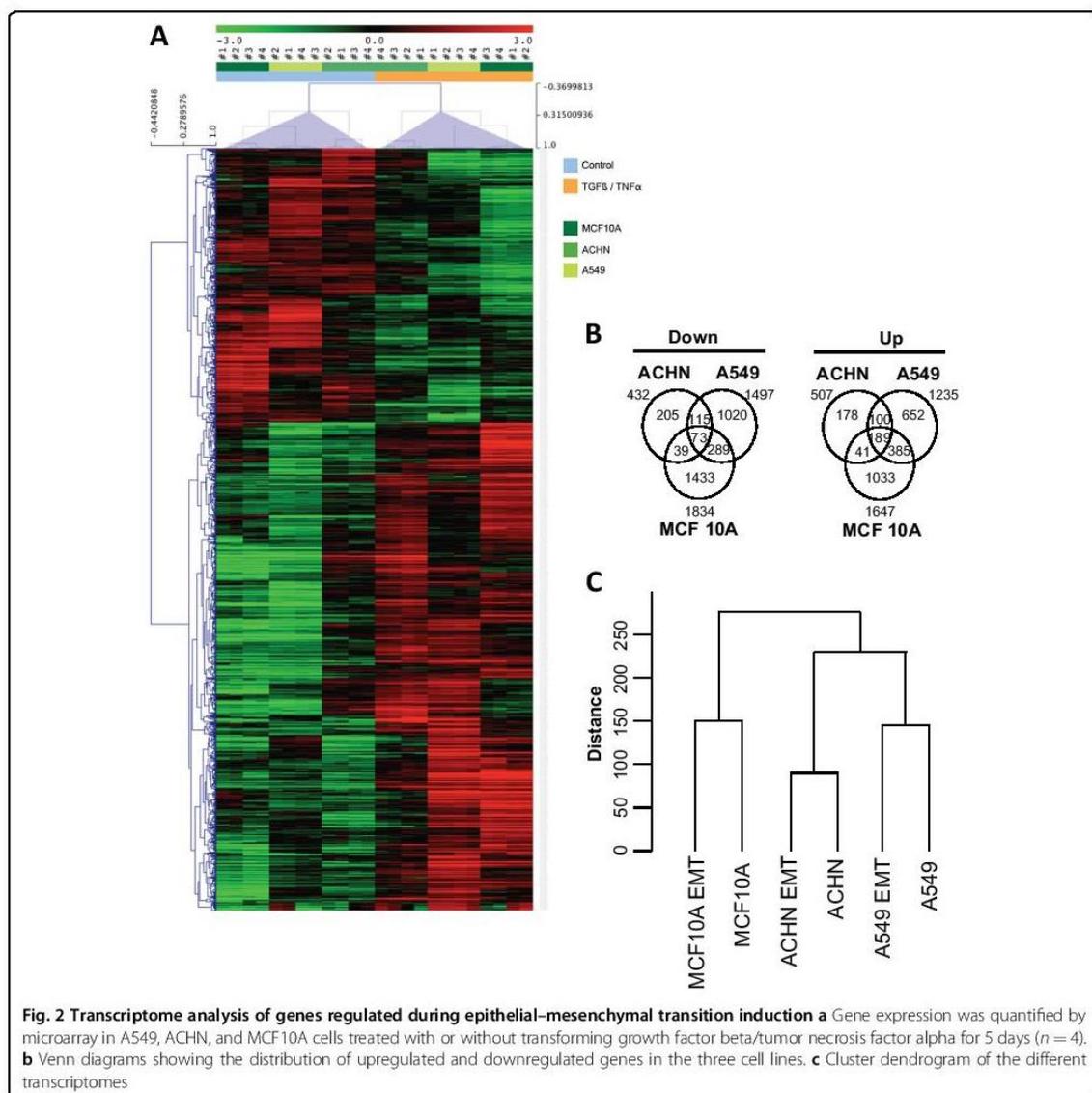
CADHERIN levels together with an increase of VIMENTIN in A549 and ACHN cells using western blotting (WB) and immunofluorescence (IF) (Supp Fig. 1B; Supp Fig. 1C).

Transcriptome analysis of EMT-induced models

Next, we decided to compare the EMT-linked gene expression in A549, ACHN, and MCF10A cell lines using microarray. High (red) or low decreased (green) gene expression was classified in regard to the cell line model and TGF β /TNF α treatment (Fig. 2a) ($n = 4$). In the A549 cells, 3636 probes were differentially expressed (DE) in treated versus control conditions (1763 upregulated and 1873 downregulated). In the ACHN cells, 1141 probes were DE (624 upregulated and 517 downregulated). In the MCF10A cells, 4683 probes were DE (2092 upregulated and 2591 downregulated) (Supp Table 1). Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) performed on the 258 TGF β /TNF α -regulated genes identified activated canonical pathways related to ECM organization and remodeling, Beta1 integrin cell surface interactions, and focal adhesion (Supp Table 1). A list of the 30 genes presenting the highest fold change expression within the three cell lines is reported in Table 1. Among these genes, the expression of *MMPI1*, *MMP9*, *MMP10*, *ADAM19*, or *ADAMTS6*, a family of proteins involved in ECM remodeling¹⁰, presented a 126-, 114-, 43-, 27-, and 34-fold increase, respectively. On the opposite, the expression of *CDH1* (41-fold decrease) was 1 of the only 2 genes downregulated among our selected list of 30 (Table 1). The induction of matrix metalloproteinase (MMP) protein levels (intracellular MMP9 by WB) and its activity (zymography) were confirmed in the A549 model (significant increase in excreted MMP2 ($p = 0.002$) and MMP9 ($p = 0.016$); Supp Fig. 2). Altogether, these data validated our EMT models as well as our protocol design to search for new regulated genes during EMT.

We also confirmed (Fig. 1) that morphological modifications were related to EMT in our models, and then the differential expression of the 12 main EMT markers was quantified in each cell line (Table 2). As expected and described above, *CDH1* expression was highly significantly decreased in the three cell lines following TGF β /TNF α treatment and similar results were obtained for *EPCAM*, but the expression of other EMT markers was not consistent throughout the three cell lines. For example, *ZEB1* expression was increased in both A549 and MCF10A cells but stable in ACHN cells (Table 2). These data strongly suggested that different and independent molecular signaling pathways might regulate different model-linked EMT. We then established Venn diagrams describing the distribution of upregulated and downregulated genes and we observed that only 73 genes were concomitantly downregulated while 189 were





concomitantly upregulated in the 3 cell lines during EMT (Fig. 2b), with most of the dysregulated genes (up or down) modified in only one or two models. Unsupervised hierarchical clustering analysis of the probes displaying the greatest variation among the samples (standard deviation) showed that transcriptomes were first clustered by cell line and then by TGFβ/TNFα treatment, confirming that differences in transcriptome profiles were primarily due to cell origin and secondarily to EMT induction (Fig. 2c).

To determine whether these different EMT phenotypes were dependent of the time of TGFβ/TNFα treatment, we

performed a kinetic analysis from 24 to 120 h treatment with TGFβ/TNFα or each cytokine alone in A549 and ACHN cells (Supp Fig. 3). As expected, a progressing mesenchymal-like phenotype was observed along the course of treatment (Supp Figs. 3A and 3B) but the phenotype was the most pronounced with both cytokines. A progressive increase in *VIMENTIN*, *ZEB1*, and *SNAI1* and decrease in *CDH1* and *EPCAM* gene expression levels were observed during the treatment and were further increased with TGFβ/TNFα compared to each cytokine alone (Supp Fig. 2C and Supp Fig. 4A). A *VIMENTIN* IF confirmed these data at the protein level and it was more

Table 1 List of the 30 genes with the most important modification of expression after TGF β and TNF α treatment

Gene	p Value	Up/down	Fold	Protein type/RNA	Pathways
CCL5	4.2E-9	Up	131.8	Chemokine	Immunoregulation
IL7R	9.7E-10	Up	149.4	Interleulin receptor	Immunoregulation
MMP1	3.5E-1	Up	126	Matrix metalloproteinase	Invasion
MMP9	2.2E-4	Up	114.1	Matrix metalloproteinase	Invasion
C4orf26	1.0E-4	Up	100.1	Extracellular protein	Mineralization
UBD	1.4E-5	Up	105.8	Ubiquitin	Protein ubiquitination/TNF pathway
LCE3D	0.0039	Up	99.2	Late cornified envelope	Keratinization/development
INHBA	0.0040	Up	82.6	FSH secretion inhibitor	Growth/differentiation factor
CSF2	0.0070	Up	66.5	Cytokine	Immunoregulation
SLAMF8	3.9E-6	Up	60.4	Cell surface receptor	Immunoregulation
ROBO4	2.0E-7	Up	62.4	Cell surface receptor	Angiogenesis/migration
MROH3P	1.5E-6	Up	40.0	pseudogene	
CDH1	0.0011	Down	40.8	Cadherin	Cell adhesion
MMP10	1.5E-5	Up	42.6	Metalloproteinase	Invasion/metastasis
FAP	0.00389	Up	45.1	Cell surface protein	Invasion/immunoregulation/tumor growth
lnc-C15orf48-1	1.9E-6	Up	45.2	Non-coding RNA	
C15orf48	0.0012	Up	47.0		Metabolism
lnc-LRRC1-5	1.3E-5	Up	47.7	Non-coding RNA	
LAMC2	2.1E-5	Up	47.8	Extracellular protein	Adhesion/differentiation/migration/metastasis
FGFBP1	0.0014	Down	48.3	Extracellular protein	Cell proliferation/differentiation/migration
NLRP3	0.0039	Up	30.9	Cell signaling	Inflammation/apoptosis
BMP2	0.0013	Up	33.6	Cytokine	Differentiation
KANK4	0.0060	Up	34.0	Cell signaling	Cytoskeleton remodeling
ADAMTS6	9.3E-5	Up	34.2	Metalloproteinase	Migration/Invasion
DHRS2	2.0E-6	Up	38.9	Dehydrogenase/reductase	
DCN	7.0E-5	Up	39.7	Proteoglycan	Migration /TGF β signaling
LCE3E	0.0016	Up	29.8	Late cornified envelope	Keratinization/development
CXCL8	7.3E-5	Up	29.6	Chemokine	Inflammation
LINC01583	6.2E-6	Up	28.1	Non-coding RNA	
ADAM19	9.3E-7	Up	27.4	Metalloproteinase	Adhesion

List of 30 genes issued from microarrays analysis with the most important fold increase or decrease expression. All transcriptome profiles were simultaneously analyzed (16 NT (A549 NT $n=4$, ACHN NT $n=4$, MCF10A cells NT $n=4$) versus 16 TGF β /TNF α treated 16 NT (A549 treated $n=4$, ACHN treated $n=4$, MCF10A cells treated $n=4$). Name of the gene, p value, fold change, and molecular-associated mechanisms (except for genes with unknown functions) are indicated. TGF β transforming growth factor beta, TNF α tumor necrosis factor alpha

pronounced in A549 cells compared to ACHN (Supp Fig. 4B) and with the double treatment (data not shown).

Global modulation of epigenetic marks during EMT

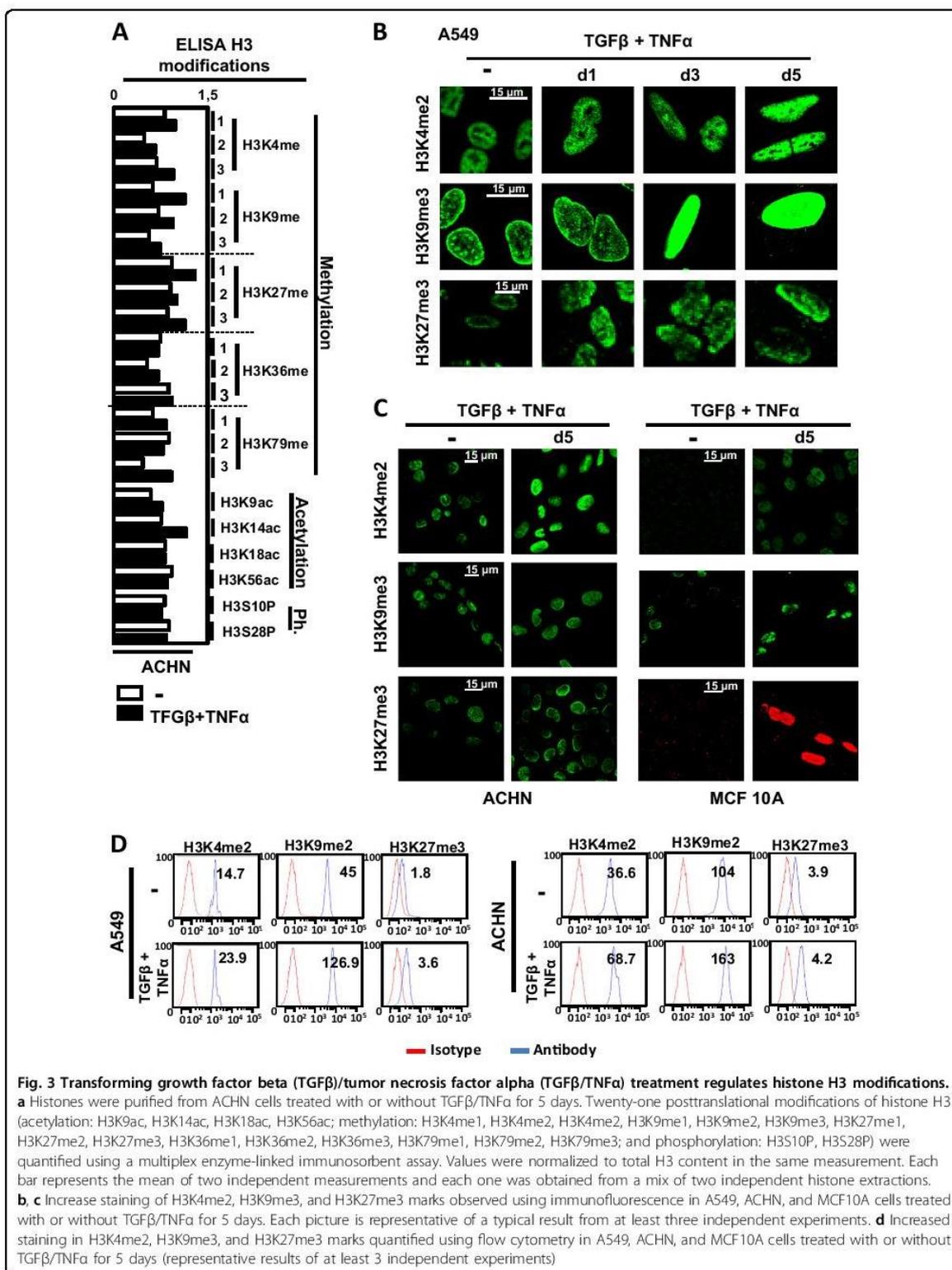
We next wondered whether epigenetic modifications occurred in these cells and whether the epigenetic mechanisms were similar in these different models. To do so, we used an enzyme-linked immunosorbent assay protocol to quantify 21 posttranslational H3 modifications

in ACHN cells treated, or not, with TGF β /TNF α (Fig. 3a). This experiment suggested that global histone methylation of H3K4, H3K9, and H3K27 were highly modified during EMT, while only low changes were observed for acetylation or phosphorylation of H3, apart from H3K14ac. We then performed IF (Fig. 3b, c) and flow cytometric (Fig. 3d) analyses of global H3K4me2, H3K9me3, and H3K27me3 in the three cell lines following TGF β /TNF α treatment and indeed confirmed an

Table 2 Expression of genes related to EMT after TGF β and TNF α treatment

Gene	Protein	Cells	p Value	Up/down	Fold	Marker
CDH1	E-CADHERIN	A549	1.6E-6	Down	250	Epithelial
		ACHN	0.007	Down	105	
		MCF10A	8.1E-4	Down	2.6	
EPCAM	EPCAM	A549	0.001	Down	14	Epithelial
		ACHN	0.001	Down	2.8	
		MCF10A	1.7E-4	Down	32	
CDH2	N-CADHERIN	A549	3.9E-4	Up	5.2	Mesenchymal
		ACHN	0.001	Up	2.0	
		MCF10A	1.8E-4	Up	6.3	
VIM	VIMENTIN	A549	0.003	Up	2.0	Mesenchymal
		ACHN	—			
		MCF10A	—			
ZEB1	ZEB1	A549	1.6E-4	Up	2.6	EMT-ATF
		ACHN	—			
		MCF10A	0.001	Up	3.8	
ZEB2	ZEB1	A549	6.3E-4	Up	2.8	EMT-ATF
		ACHN	—			
		MCF10A	0.001	Up	2.8	
SNAI1	SNAIL1	A549	3.1E-5	Up	2.8	EMT-ATF
		ACHN	—			
		MCF10A	2.0E-4	Up	7.0	
OCLN	OCCUDIN	A549	0.0010	Down	2.4	Epithelial
		ACHN	—			
		MCF10A	—			
ETS1	ETS1	A549	2.1E-5	Up	3.2	Mesenchymal
		ACHN	0.0024	Up	2.5	
		MCF10A	2.7E-5	Up	11.85	
FN1	FIBRONECTIN	A549	2.2E-4	Up	11.7	Mesenchymal
		ACHN	—			
		MCF10A	0.0091	Up	68.4	
SDC1	SYNDECAN-1	A549	3.0E-5	Up	2.8	Mesenchymal
		ACHN	—			
		MCF10A	—			
SNAI2	SLUG	A549	3.5E-6	Up	17.6	EMT-ATF
		ACHN	—			
		MCF10A	—			

List of genes issued from microarrays analysis ($n = 4$) in A549, ACHN, or MCF10A cells. *p* Value and fold change are indicated for each cell line. Epithelial markers (CDH1, EPCAM, OCLN, SDC1), mesenchymal markers (CDH2, VIMENTIN, ETS1, FN1), and EMT-ATFs (ZEB1, ZEB2, SNAI1, SNAI2) were analyzed. EMT epithelial-mesenchymal transition, TGF β transforming growth factor beta, TNF α tumor necrosis factor alpha



important increase in these different marks during EMT. These strong global histone modifications observed during EMT suggested that epigenetics might play a pivotal role in transcription reprogramming during EMT.

Genes involved in ECM degradation were regulated by epigenetics in TGF β -/TNF α -treated cells

Since >90% of the most DE genes in our models were overexpressed during EMT, we decided to conduct ChIP-seq analyses in A549 cells treated, or not, with TGF β /TNF α to target the H3K4me2 mark. Then we crossed our ChIP-seq data with the transcriptomes (Fig. 4). We detected 1952 H3K4me2 regions that were significantly enriched in TGF β -/TNF α -treated cells versus non-treated cells (1740 upregulated and 212 downregulated) (Fig. 4a and Supp Table 3), with most of these H3K4me2 regions located in introns (46%) (Supp Fig. 5). BETA analysis predicted an activating function of the H3K4me2 mark with a cumulative fraction of genes significantly above background for upregulated genes (Fig. 4b) and indeed identified 614 upregulated genes potentially activated by the H3K4me2 mark (Fig. 4a, Supp Table 4). Regarding these genes, the H3K4me2 mark was predominantly enriched in introns (81%) (Supp Fig. 5). Among the most significantly activated canonical pathways, identified by GSEA, we once again found genes linked to ECM organization, Beta1 integrin cell surface interactions, and focal adhesion (Supp Table 3). Among the overexpressed genes identified in the transcriptome analysis, 23% were found in the 614 genes potentially activated by the H3K4me2 mark.

To confirm that the expression of genes involved in ECM were indeed linked to epigenetic modifications during EMT, we selected *ADAM19* (22.6-, 4.5-, and 30.7-fold increase in A549, ACHN, and MCF10A, respectively) and *MMP9* (187- and 1000-fold increase in A549 and MCF10A, respectively, but no change in ACHN). The *SCNN1A* gene (12- and 4.5-fold decrease in A549 and MCF10A, respectively, but no change in ACHN cells) was used as a negative control. First, we confirmed a progressive modulation of *ADAM19*, *MMP9* and *SCNN1A* expression during EMT (Fig. 4d and Supp Fig. 6A). Next, we confirmed the epigenetic regulation during EMT using ChIP analysis (Fig. 4e). TGF β /TNF α -induced EMT was clearly associated with an increase in the H3K4me2 mark on the promoters of *ADAM19* and *MMP9* and a decrease on the *SCNN1A* promoter. Moreover, ChIP targeting the repressive mark H3K27me3 showed opposite profiles on these promoters (Fig. 4e). We also established the progressive modification of these epigenetic marks during TGF β /TNF α treatment as illustrated by kinetic ChIP experiments (Supp Fig. 6B). Since MCF10A cells are unable to form tumors in vivo, we also confirmed the induction of *MMP9* and *ADAM19* expression in MDA-

MB-157 induced in EMT (Supp Figs. 7A and 7B). Moreover, no induction of these genes was observed in MCF-7, which failed to initiate EMT, whereas a strong expression of both *MMP9* and *ADAM19* was quantified in the mesenchymal MDA-MB-231 cells.

The epigenetic regulation of genes involved in ECM degradation was independent of the EMT inducer

Even if we already used three different EMT models, we next wondered whether these results could be reproduced in a different and independent model to answer the fact that our observations might only be dependent of the TGF β /TNF α treatment. We chose the epithelial MDA-MB-468 breast cells in which EMT can be induced using EGF⁷. After 2 days of EGF treatment, an important proportion of cells presented an increased tubular shape (Fig. 5a) together with an increase in the expression of *VIMENTIN* and *SNAI1* and a decrease in *CDH1* (Fig. 5b). EMT was also confirmed by increased *VIMENTIN* staining in IF (Fig. 5c) and increased *SNAI1* levels in WB (Fig. 5d). We also confirmed a global increase in H3K4me2 and H3K27me3 in MDA-MB-468 treated with EGF (Fig. 5e). We next quantified the expression of our ECM remodeling genes in this new model and described that *ADAM19* expression was upregulated following EGF treatment (Fig. 5f). Moreover, this upregulation was correlated to an increase in the H3K4me2 mark on the *ADAM19* promoter together with a decrease in the H3K27me3 mark (Fig. 5g).

In vivo confirmation of the regulation of genes involved in ECM degradation in EMT

To address the question whether the genes involved in the degradation of the ECM degradation was associated with EMT and aggressive subtypes in vivo, we performed a retrospective analysis using previously published transcriptomes issued from NSCLC microarrays (Fig. 6a). We also added the expression of EMT markers as well as the expression of the genes of the ECM degradation signature identified in A549 (upregulated: *ADAM19*, *ADAMTS6*, *MMP-1*, *MMP-2*, *MMP-10*, *MMP-9*, *IL32*, downregulated: *SCNN1A*) on this graph. (Fig. 6a, c). As expected, large ADK or squamous lung cancers, which are associated with higher risks of metastasis compared to adenocarcinoma, presented a high expression of the ECM degradation genes and a low expression of epithelial markers compared to normal tissues. These data confirmed that ECM degradation biomarkers induced in our EMT models were associated with EMT and aggressiveness in vivo. Since we also confirmed the ECM degradation signature in our BC models, we analyzed 2627 transcriptomes from BC (Fig. 6b, d). The different subtypes, Luminal A, Her2, Basal, or normal breast tissues, were plotted on a three-dimensional diagram based on the

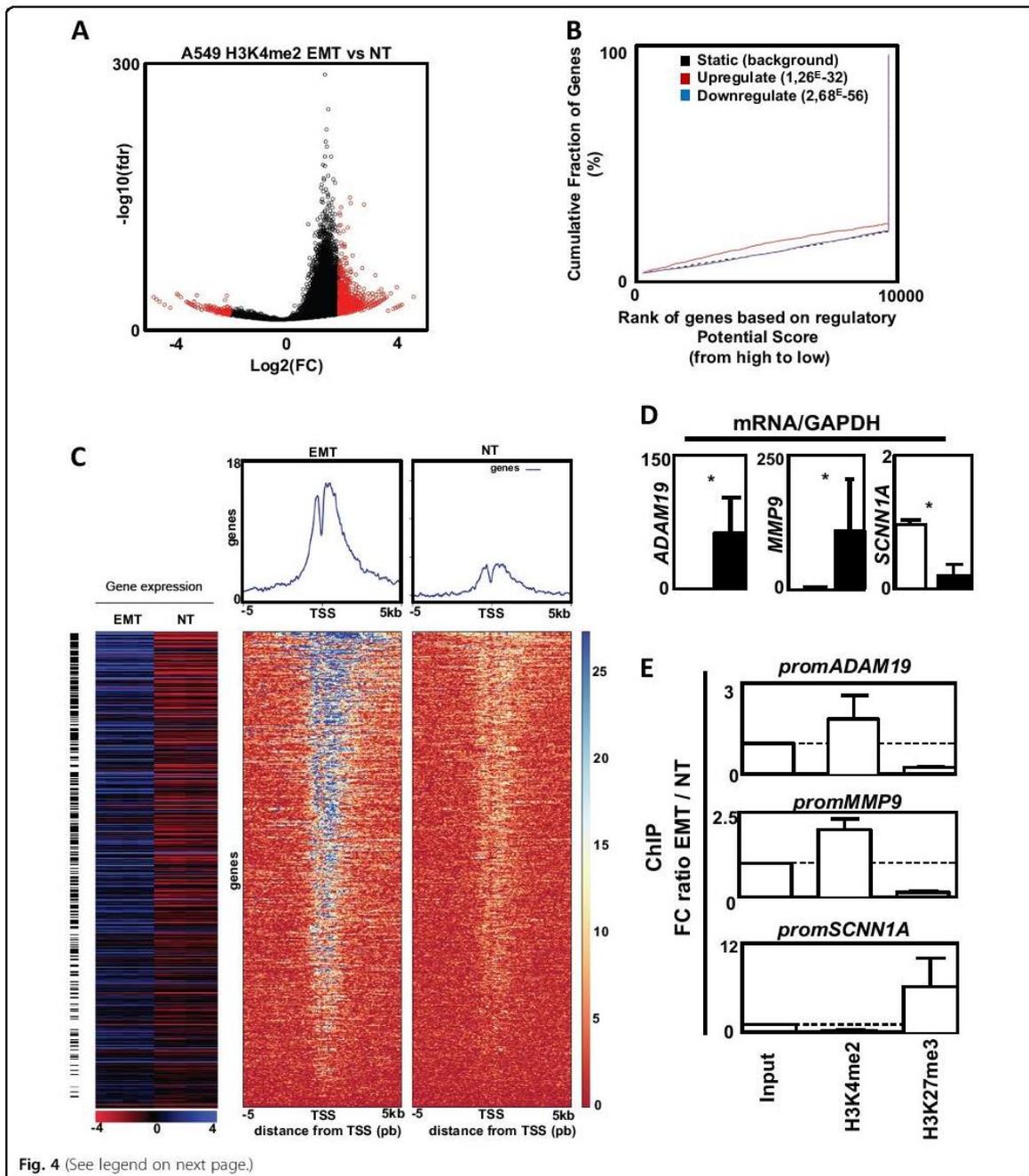


Fig. 4 (See legend on next page.)

Prediction Analysis of Microarray 50 (PAM50) classification using *ESR1*, *HER2*, and *KI67* gene expression¹¹. Interestingly, all genes found to be overexpressed (ECM degradation signature) were correlated to mesenchymal markers and to basal-like/mesenchymal subtypes (triple-negative BC), which are associated with a higher risk of

metastasis and poor prognosis. On the opposite, the *SCNN1A* gene was associated with normal breast or Luminal A BC and to the expression of epithelial markers. Moreover, we confirmed, in a cohort of 47 BC, an increased expression of *MMP9* and *ADAM19* in aggressive tumors as well as a decreased expression of *SCNN1A*

(see figure on previous page)

Fig. 4 Chromatin immunoprecipitation (ChIP) and ChIP-seq analysis on the H3K4me2 mark following transforming growth factor beta (TGFβ)/tumor necrosis factor alpha (TGFβ/TNFα) treatment. **a** Volcano plot of the 42,076 H3K4me2 merged islands. In red, the regions significantly enriched in TGFβ-/TNFα-treated cells versus non-treated cells. FC: fold change treated versus non-treated. fdr: false discovery rate treated versus non-treated. **b** Activating and/or repressive function prediction of H3K4me2 in A549 cells. BETA-basic integrates H3K4me2 differentially enriched regions and transcriptome data on TGFβ/TNFα treated cells and non-treated conditions to identify upregulated (red) and downregulated (purple) genes. The dashed line indicates the non-differentially expressed genes as background. Genes are cumulated by the rank on the basis of the regulatory potential score from high to low. *p* Values represent the significance of difference in the upregulated or downregulated groups compared with the non-differentially expressed group by Kolmogorov–Smirnov test. **c** Integration of transcriptome and ChIP-seq data for the A549 cell line. Top: heat maps of read coverage from -5 kb to +5 kb around the transcription start site for TGFβ-/TNFα-treated (left) and non-treated (right) conditions. Each line represents an upregulated gene identified by BETA. Genes are ordered according to their increasing rank product. Upper panels: read coverage density plots. Bottom: Corresponding gene expression heat map for treated (*n* = 4) and non-treated conditions (*n* = 4). Black lines indicate differentially expressed genes. **d** Increase expression of ADAM19 and MMP9 and decrease expression of SCNN1A in A549 cells treated with TGFβ/TNFα (mean ± SD of at least 3 independent experiments). **e** Ratio of fold change (epithelial–mesenchymal transition: TGFβ/TNFα treated A549 versus NT: untreated A549 cells) following ChIP against H3K4me2 and H3K27me3 marks on *MMP9*, *ADAM19*, and *SCNN1A* promoters. Dotted line = 1 (mean ± SEM of at least 3 independent experiments) **p* < 0.05

(Supp Fig. 9A). Finally, a positive correlation could be established between *ADAM19* and *VIMENTIN* or *MMP9* and *VIMENTIN* in these samples (Supp Fig. 9B). These data confirmed that the regulation of genes involved in the degradation of ECM was not specific of a particular model, tissue, or pathology but seemed to be a reliable biomarker of EMT in different cancers in vivo.

Characterization of ADAM19 as a new EMT marker in vivo

To investigate ADAM19 expression in vivo in EMT, we quantified the expression of ADAM19 and SCNN1A in NSCLCs by immunohistochemistry (IHC) (Fig. 7). Biopsies were stained for VIMENTIN and 30 patients were sorted according to their levels of VIMENTIN: high (EMT+) or low (EMT-) VIMENTIN staining. These data confirmed that ADAM19 was overexpressed in EMT+ tissues and repressed in EMT- while SCNN1A expression was repressed in the EMT+ tissues and increased in EMT-.

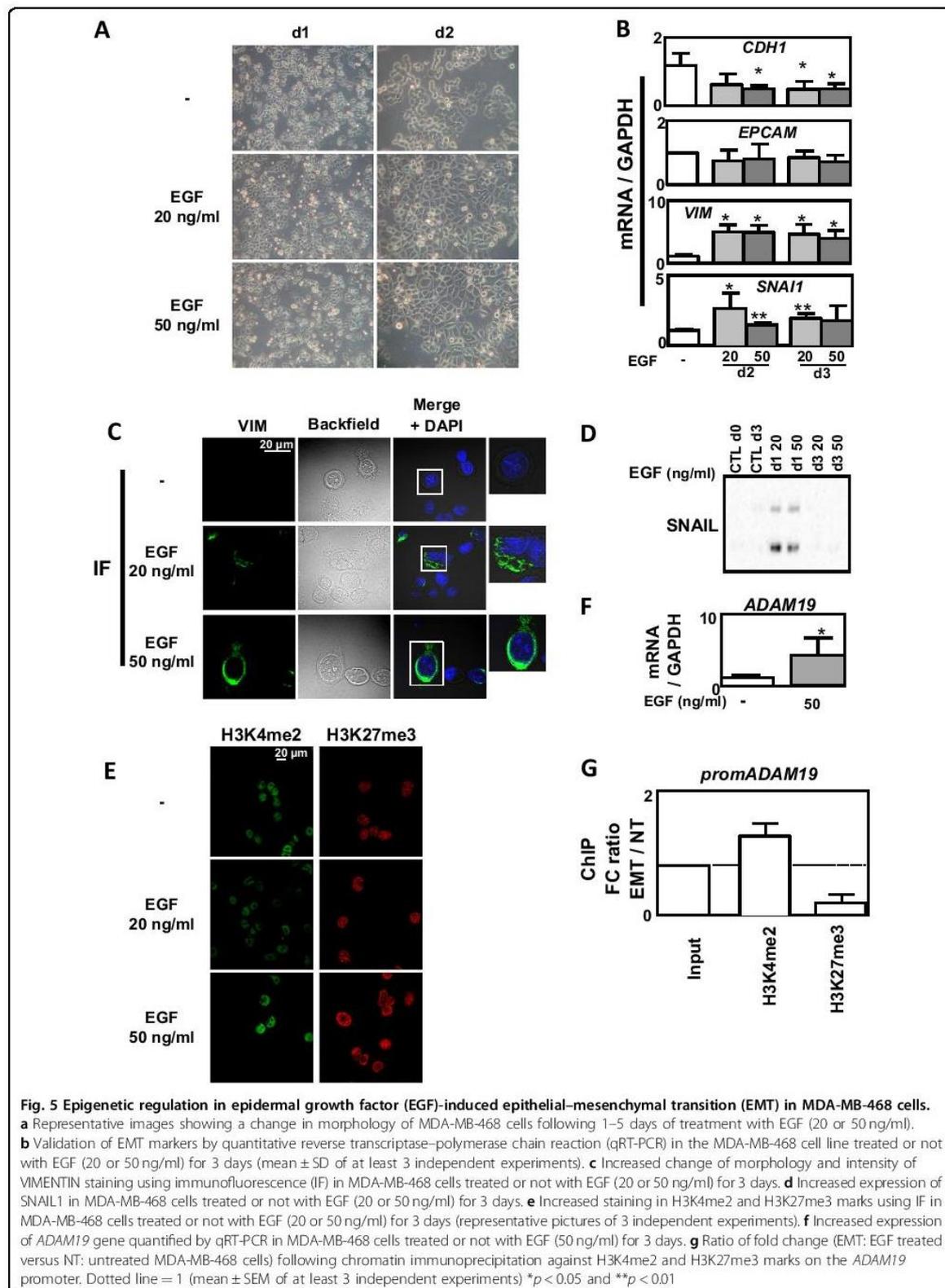
Discussion

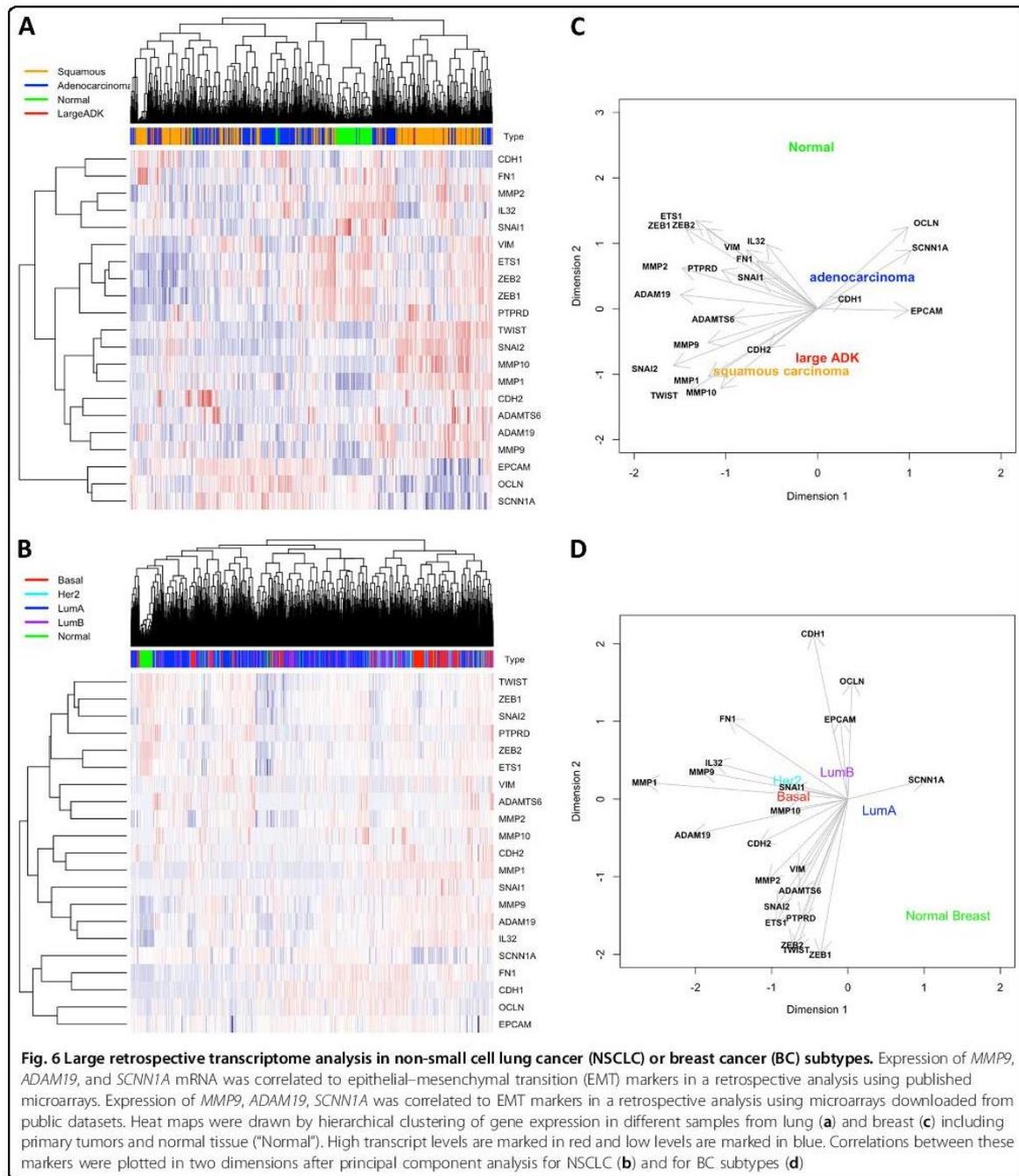
Although epigenetic modifications have already been associated with EMT¹², most of the studies were based on only one EMT model and one inducer. In order to characterize the global role of epigenetics during EMT, we performed an extended study on different EMT cell models (A549, ACHN, MCF10A). The transcriptome analysis revealed that most of the genes upregulated or downregulated in EMT were different in these models (downregulated in A549 alone: 1020/1497, in ACHN alone: 205/432, in MCF10A alone: 1433/1834 and upregulated in A549 alone: 652/1235, in ACHN alone: 178/507, in MCF10A alone: 1033/1647, Fig. 2b). The lower number of DE genes and the lower fold change of expression in the EMT-induced ACHN model compared to A549 and MCF10A suggested that TGFβ/TNFα signaling was less pronounced in ACHN.

These data suggested that EMT signaling could be, at least partially, cell-specific despite going through the same

pathway of EMT induction. Indeed, ChIP-seq analysis in non-EMT models previously revealed that TGFβ-induced specific recruitment of SMAD3 on target genes was dependent of the cell type¹³. However, among these EMT-modulated genes, some seemed to be similarly regulated in our models (Supp Table 4 and Supp Table 5) and, in particular, the previously identified EMT markers *CDH1*, *EPCAM*, *VIMENTIN*, and *MMPs*. When comparing the list of the ten most upregulated genes in MCF10A and H358 treated with TGFβ/OSM (Oncostatin M) with our data, we observed that four genes (*GPR68*, *SERPINE1*, *ADAM19*, *SLAMF8*) were also found to be upregulated in our models and three additional genes (*FAP*, *MMP9*, *SCG5*) were upregulated in two out of three of our models following TGFβ/TNFα treatment¹⁴. Moreover, 9/10 of these genes were also previously reported as upregulated in the EMT-induced A549 model¹⁵. These data strongly suggested that few genes were similarly regulated in different EMT models. Moreover, *ADAM19* and *MMP9* were also highly expressed in the mesenchymal MDA-MB-231 cells and strongly increased in the EMT-induced MDA-MB-157 cells (Supp Fig. 7).

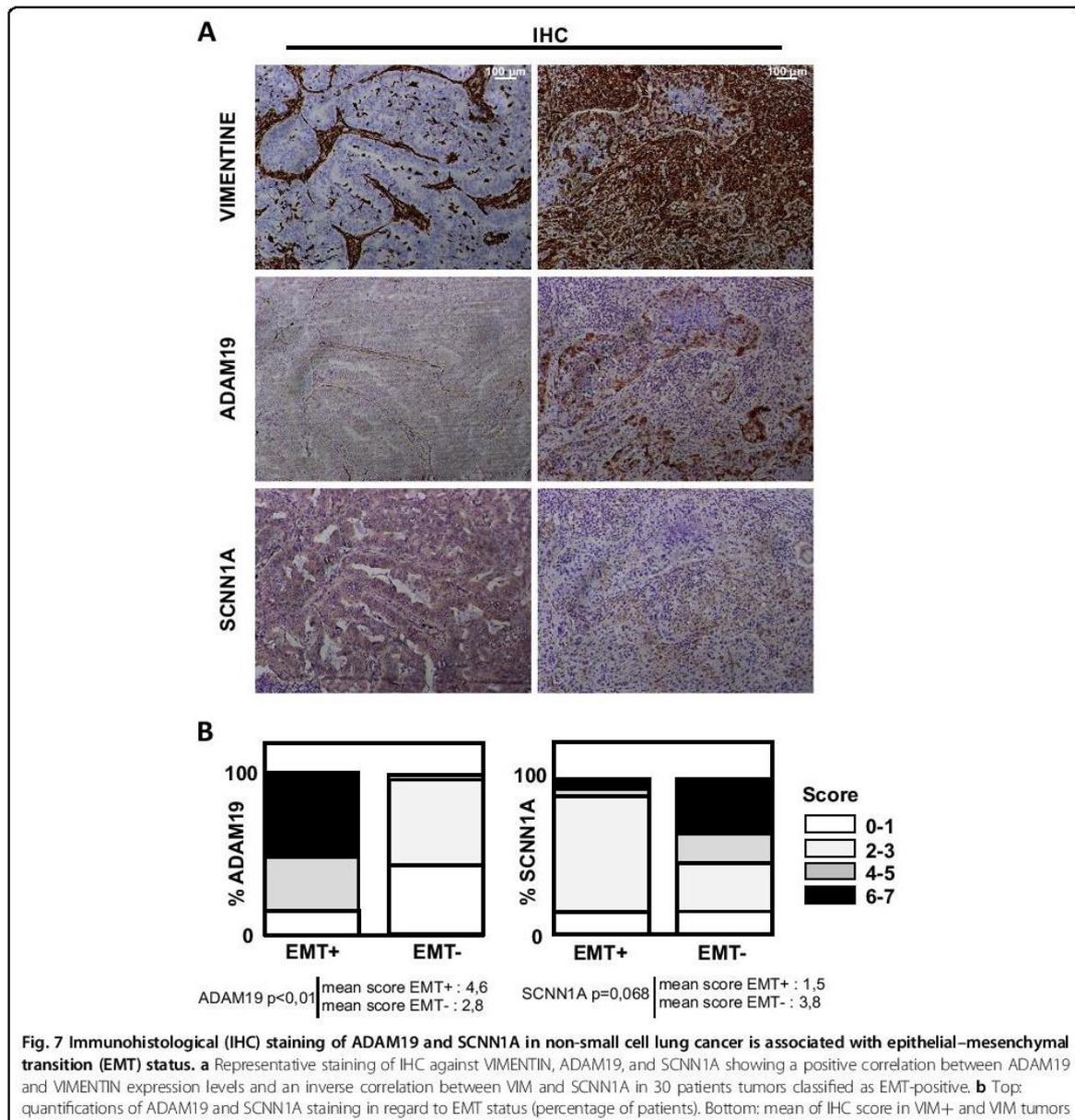
We also described several genes with high differences of expression between control and EMT-induced cells in the three models but that have never been related to EMT. For example, the expression of the poorly described *Cl5orf48* lncRNA, which has already been associated with cancer, was overexpressed (about 45-fold)¹⁶. *DHRS2*, overexpressed in the 3 cell models (about 38.9-fold) and encoding a dehydrogenase/reductase, has recently been associated with gastric carcinogenesis and 5-FU resistance¹⁷. On the opposite, the expression of *PPFIBP2* was downregulated in all our models (about 10-fold). Although very few data are currently available, *PPFIBP2* loci has been recently associated with increased probability of prostate cancer¹⁸. Altogether these data showed that all these genes might be considered as new markers of EMT in cancer.





We identified a specific and concomitant increase in positive, H3K4me2/3, and negative, H3K9me3 and H3K27me3, histone marks following TGFβ/TNFα treatment and we performed a ChIP-seq analysis targeting H3K4me2, with a profile similar to active genes in vertebrates¹⁹. We identified numerous genes whose regulation

could be explained by epigenetic modifications on their promoters and we highlighted an epigenetic signature on genes involved in ECM remodeling, such as *MMP9* and *ADAM19*, which was increased in A549, ACHN, and MCF10A and also previously reported in another study¹⁴. This was associated with an increase in the H3K4me2 mark



on their promoters during EMT. These results were consistent with a study showing that *MMP1/9/10* expression belonged to a gene cluster that overlaps an active enhancer¹⁵. We confirmed this analysis by showing a decrease of the H3K27me3 mark on the promoters of *MMP9* and *ADAM19*. Our data were in agreement with previously published results describing that the presence of these two latter marks were inversely correlated to one promoter²⁰. To determine whether the epigenetic signature observed on genes involved in ECM degradation was specific of EMT,

and not to TGF β /TNF α treatment, we performed the same set of experiments on an independent model (MDA-MB-468 cells in which EMT was induced using EGF^{21,22}). Indeed, we observed a progressive decrease in *CDHI* expression and an increase in *VIM* expression from day 2. Similarly, a strong increase in expression of *SNAIL* was also observed at day 2 and then progressively decreased at day 3. The induction of *SNAIL* protein expression was only visible at day 1, suggesting that *SNAIL* expression is thinly regulated during EMT.

EMT induction in this model also led to a large overall epigenetic reprogramming, in particular in genes involved in ECM remodeling. Indeed, we detected an enrichment in H3K4me2 on the *ADAM19* promoter. But, interestingly, some of the genes involved in the ECM degradation presented a different pattern in the MDA-MB-468 (Supp Fig. 8). These results demonstrated that epigenetic programs and expression profiles linked to EMT differed according to the model and the cytokine treatment.

We then established a list of seven new biomarkers of EMT that presented a similar regulation in our different models of EMT together with an enrichment of H3K4me2 on their promoter (Supp Fig. 8C and D). In this list, we highlighted *MYO10* and *ADAM19*, two genes linked to tumor aggressiveness. *MYO10* encodes a member of the myosin superfamily, which has been associated with metastasis²³. *ADAM19* encodes a metalloprotease that belongs to the ADAM family associated with cancer progression²⁴. This protein has been associated with EMT in a glioblastoma model where its silencing by the *miR-145* inhibited EMT²⁵. Interestingly, the epigenetic signature of these seven genes was identical whichever the cell model and the inducer used. We confirmed these in vitro data in a cohort of 100 NSCLCs. We first selected 30 EMT-positive tumors presenting a high VIMENTIN staining and confirmed that in vivo EMT was indeed correlated to an overexpression of the ADAM19 protein in NSCLCs. Interestingly, *ADAM19* was one of the few genes for which a strong upregulation was observed in our 5 different EMT models (5 different cell lines, 2 different EMT inducers) and also found in independent studies with similar or additional models^{14,15}. Altogether these data strongly supported the role of ADAM19 in EMT. Finally, survival analysis of lung cancer patients using the *kmplot.com* software showed that a high expression of genes involved in ECM degradation, such as *ADAM19* ($p = 3.3E-5$), *ADAMTS6* ($p = 0.00032$), or *MMP9* ($p = 0.04$), was associated with a poor prognosis (Supp Fig. 10).

In conclusion, our data demonstrated, for the first time, an epigenetic signature of genes involved in ECM remodeling during EMT. Our results suggested that *ADAM19* expression and its epigenetic regulation could be considered as a robust new biomarker of EMT in vitro and in vivo. Moreover, our work suggested that novel anticancer therapies combining conventional drugs with epidrugs, targeting *ADAM19* expression, might be tested in future preclinical studies to reduce metastasis and aggressiveness.

Materials and methods

Transcriptome analysis and qRT-PCR

Total RNA was isolated from cells using the Tri Reagent (TR118, Molecular Research Center) according to the manufacturer's instructions and RNA quality was

controlled using the Experion Analysis kit (Biorad, France). Transcriptome analysis was performed on extracted RNA from A549, ACHN, and MCF10A cell lines treated or not (control) with TGF β /TNF α . This analysis was performed on four RNA preparations for each cell line and condition. RNA integrity (RNA Integrity Number ≥ 8) was confirmed using an Agilent 2100 bioanalyzer (Agilent Technologies, France). Then transcriptome profiling was analyzed using the Agilent whole human genome 8×60 K microarray (kit G4851C, Agilent Technologies). Total RNA was labeled and hybridized according to the manufacturer's recommendations using the LowInput QuickAmp Labeling Kit One-Color (Agilent Technologies, 5190–2305), Gene expression Hybridization Kit (Agilent Technologies, 5188–5242), RNA Spike-in one Color Kit (Agilent Technologies, 5188–5282), and washing buffer (Agilent Technologies, 5188–5327). Raw intensity data were log₂-transformed and normalized (intra-array and inter-array scaling) using the GeneSpring GX software (Agilent Technologies), then gene expression were submitted to ArrayExpress repository under accession number "XXXXX."

Probes were selected according to their level of expression (intensity above background in treated and/or control conditions) and to their absolute fold change (FCA ≥ 2) between treated and control conditions. For each cell line, unequal variance *t* tests (Welch *t* test) were performed to identify DE probes between treated and control samples. Adjusted *p* values were calculated by controlling the false discovery rate according to the Benjamini and Hochberg procedure. Probes were considered as significantly DE if the adjusted *p* value was <0.01 . Venn diagrams were obtained using the http://biopuce.insa-toulouse.fr/ExperimentExplorer/venn/venn_graph.php software. Gene ontology was performed using the PANTHER software²⁶.

Reverse transcription was performed in a mix containing M-MLV (12 U, Sigma-Aldrich, M-1302) reverse transcriptase, oligodT (0.25 μ M, Eurogentec, Belgium), random hexamers (1.25 μ M, C118A Promega, France), and total RNA (1.5 μ g) according to the manufacturer's instructions (Sigma-Aldrich). Quantitative PCR were performed as duplicate using the Step one Real-Time PCR system (Applied Biosystems, France) and the Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) according to the manufacturer's instructions. Primers used in our study were designed using the primer 3 software or according to Gemmill et al.⁵ and are listed in the Supp Table 8.

Cell culture

The A549 (NSCLCC) cell line was obtained from Dr Christophe Borg (INSERM UMR1098, Besançon, France), the ACHN (metastatic renal cancer) cells were obtained

from Dr Viviane Gnemmi (INSERM UMRS995, Lille, France)²⁷, MCF10A (immortalized breast cells) cells were obtained from Philippe JUIN (INSERM U1232, Nantes, France), and the MDA-MB-468 (metastatic BC) cell line were obtained from Dr Christine Gilles (Laboratory of Tumor and Developmental Biology, Liège, Belgium). A549 and ACHN cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) 1 g/l glucose (Dominique Dutscher, L0066, France) and MDA-MB-468 were cultured in RPMI 1640 medium. Both medium were supplemented with fetal bovine serum (5%) (Dominique Dutscher, S1810), penicillin–streptomycin (50 U/ml) (Dominique Dutscher, L0018), and amphotericin B (1.25 µg/ml) (PAA, P11–001, France). Cells were cultured at 37 °C in 5% CO₂, and routinely used at 70–80% confluence. MCF10A were cultured in DMEM-F12 supplemented with 20 ng/ml EGF (Sigma-Aldrich, France), 100 ng/ml choleric toxin (Sigma-Aldrich), 10 µg/ml insulin (Sigma-Aldrich), 0.5 µg/ml hydrocortisone, and antibiotics as described above. Cells were cultured at 37 °C in 5% CO₂ and routinely used at 70–80% confluence. When indicated, EMT was induced for 1–5 days using 4 ng/ml TGFβ (100–21, Peprotech, France) (ACHN, A549 and MCF10A) and 20 ng/ml TNFα (300–01 A, Peprotech) or 20–50 ng/ml EGF (MDA-MB-468).

Epigenetics

Quantification of histone modifications

Histones were prepared from fresh cell pellets using the EpiQuik Total Histone Extraction Kit (OP-0006, Euro-medex, France) and the protein were quantified using the Bradford Protein Assay (Biorad, 5000006). The efficiency of histone extraction was controlled using migration (see below) and detection of total histones by Coomassie staining and then WB using an anti-H3 antibody. Histone posttranslational modifications were quantified using the EpiQuik Histone H3 Modification Multiplex Assay Kit (P-3100, Epigentek) as per the manufacturer's instructions. Each histogram corresponds to the mean of 2 independent experiments and each measure was obtained using a pool of 100 ng of total histones issued from 2 independent extractions (50 ng + 50 ng).

Chromatin immunoprecipitation

Chromatin was prepared using the truChIP™ Chromatin Shearing Kit (520154, Covaris, France) according to the manufacturer's instructions. Each sample was submitted to a 8 min sonicated using the M220 Covaris sonicator. ChIP were performed using the IP-Star Compact Automated System (Diagenode, Belgium) with the Auto iDeal ChIP-seq Kit for Histones (C01010171, Diagenode) and 1 µg of ChIP-grade antibody or IgG (IG07–2, P.A.R.I.S.). Libraries were prepared from 5 ng of ChIP DNA and Input DNA with the NEBNext® Ultra™ DNA Library Prep

Kit for Illumina (E7370S, New England Biolabs, USA), according to the manufacturer's instructions. From each library, 50 bp single reads were sequenced using an Illumina HiSeq 1500 system (Illumina). Reads were filtered according to their quality (Q Score ≥ 30) and adapter sequences were removed using Cutadapt²⁸. Reads were aligned to the human genome (hg19) using the BWA (version 0.7.10). We obtained a mean of 21 million (min = 10 M, max = 48 M, sd = 6 M) uniquely mapped reads per sample. H3K4me2 differentially enriched regions (peaks) were identified using SICER-df ($g = w = 200$ bp). We considered two pairs of libraries: (1) TGFβ-/TNFα-treated condition versus its input control, (2) non-treated condition versus its input control. The basic strategy of SICER-df is to identify significant islands using SICER.sh in each of the two pairs, merge the two sets of significant islands, and then determine the significance of changes by comparing merged islands between the treated and the non-treated condition²⁹. A region was considered significantly enriched between treated and non-treated conditions if the adjusted *p* value (Benjamini and Hochberg) was <0.01 and the FCA ≥ 2. We used the PAVIS software to annotate the H3K4me2 marks with an upstream/downstream interval of ±5 Kb from transcription start site³⁰. Integration of transcriptome and ChIP-seq data was performed using BETA on the H3K4me2 differentially enriched regions³¹. A gene was considered as potentially regulated by the H3K4me3 mark if its rank product was <0.01. We then used the DeepTools suite to generate heat maps of read coverage³², and we used GSEA to search for enriched molecular signatures among genes³³. A gene set was considered as significantly enriched if the Fisher exact test *q*-value was <0.001. Primers used for the ChIP validations were designed using the primer 3 software and listed in the Supp Table 8 and antibodies are listed in Supp Table 9.

Western blotting

For the preparation of total protein extracts, cells were scraped, harvested and lysed in RIPA buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8, 150 mM NaCl, 1% Triton X100, 0.5% DOCA, 0.1% sodium dodecyl sulfate (SDS)) supplemented with protease inhibitors (104 mM AEBSF, 1.5 mM pepstatin A, 1.4 mM E-64, 4 mM bestatin, 2 mM leupeptin, and 80 µM aprotinin) for 30 min on ice, then sonicated for 15 s, and centrifuged at 10,000 × *g* for 10 min at 4 °C. Proteins were quantified using the Bradford method and then proteins (25–40 µg) were separated on TGX acrylamide gels (1610172, Biorad) at 300 V for 30 min using and transferred onto Transblot turbo PVDF (1704157, Bio-Rad) membranes for 10–15 min with the Transblot turbo (1704150, Biorad) according to the manufacturer's recommendations. Membranes were saturated in TBS-Tween 20 0.1% supplemented with 5% milk for 1 h and

then incubated with primary antibodies (listed in Supp. Table 9) overnight at 4 °C. Membranes were washed 3 times with TBS-Tween 20 0.1% and incubated with secondary anti-rabbit or anti-mouse horseradish peroxidase conjugate antibody according to the manufacturer's instructions (BI2407, BI2413C, P.A.R.I.S., France). The membrane was then washed 3 times with TBS-Tween 20 0.1% and incubated with Clarity Western CI substrate (1705051, Biorad) and chemiluminescence was monitored using a Biorad ChemiDocTMXRS+.

Zymography

Cells were cultivated for 3 days in complete medium, with or without TGF β / TNF α , and then medium was replaced by serum-free medium containing or not the cytokines for 2 additional days. Five hundred μ l of medium was concentrated using Pierce Concentrator, PES 30K MWCO (88502, Thermo Scientific) columns at 15,000 \times g for 5 min. Samples were diluted in 1 \times non-reducing sample buffer (25 mM Tris-HCl, pH6.8, 0.8% SDS, 4% glycerol, 0.002% bromophenol blue) and separated in 7.5% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis containing 4 mg/ml Gelatin. The gel was washed 2 times with washing buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 2.5% Triton X-100, 5 mM CaCl₂, 1 μ M ZnCl₂) for 30 min, rinsed for 10 min at 37 °C in incubation buffer (50 mM Tris-HCl pH7.5, 1% Triton X-100, 5 mM CaCl₂, 1 μ M ZnCl₂) with agitation, and then incubated for 24 h at 37 °C in the incubation buffer with agitation. The gel was stained for 1 h in 40% methanol, 10% acetic acid, and 0.5% Coomassie blue, rinsed with water, and destained in 40% methanol and 10% acetic acid before quantification.

Immunofluorescence

Cells were cultured for 24 h on coverslips and then fixed with cold methanol for 20 min at -20 °C and then blocked with Blocking solution (82007, Olinkbioscience) for 1 h at 37 °C. Incubations with primary antibodies were performed overnight at 4 °C, and then cells were rinsed 3 times with TBS-tween 0.1%. Incubations with secondary antibodies goat anti-rabbit and goat anti-mouse AlexaFluor 488 or 555 (Life technologies) for were performed 1 h at 37 °C, and then cells were rinsed 3 times with TBS-tween, stained with DAPI (4',6'-diamidino-2-phénylindole), and mounted using Fluoromount Aqueous Mounting Medium (F4680, Sigma Aldrich). Images were acquired with an Olympus FV1000 laser scanning confocal microscope (\times 63 objective).

Flow cytometry

For membrane staining, cells were incubated with the corresponding antibody for 30 min at 4 °C, then washed with phosphate-buffered saline and centrifuged for 10 min at 300 \times g. Ten thousands cells from each sample were

evaluated for fluorescence detection using BD FACS-Canto cytometer (Becton Dickinson) and analyzed with the FACS Diva software.

Tissue samples, IHC, and immunostaining assessment

Paraffin-embedded tissue biopsies of NSCLCs were collected in collaboration with the Tissue Biobank of the University of Liege (Liege, Belgium). This protocol was approved by the Ethics Committee of The University Hospital of Liège. The initial diagnosis of each case was confirmed by experienced histopathologists. IHC analysis was performed with a standard protocol detailed previously and the primary antibodies listed in Supp. Table 9³⁴. Following IHC, samples were classified into two groups: EMT-positive versus EMT-negative in regard to the intensity of VIMENTIN staining (score (0–3) and extent (0–3)). As previously described³⁵, the 2 scores were multiplied to obtain a global score ranged between 0 and 9. All immune-labeled tissues were evaluated by two experienced histopathologists.

Statistics

Mean comparison were analyzed using Student's *t* test with the GraphPad Prism5 software. Correlation indices were measured using Spearman test calculated with the ImageJ software. Significant values are highlighted in bold in each figure. Retrospective transcriptome analysis was performed using the R software version 3.3.1, R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Transcriptomes were built from Affymetrix series (GPL570 platform) after GC-RMA normalization. For BCs, 2830 samples were used from the following GEO series: GSE12276, GSE12790, GSE18931, GSE2109, GSE22035, GSE23720, GSE23994, GSE25407, GSE26910, GSE30010, GSE3744, GSE5764, GSE17700, GSE26639, GSE16446, GSE18864, GSE22513, GSE19615, GSE20685, GSE21653, GSE23177, GSE9195, GSE6532. Samples were classified with PAM50 method using 50 genes (genefu R package). For lung cancers, 802 samples were normalized from the following GEO series: GSE101929, GSE10245, GSE18842, GSE22047, GSE30219, GSE32496, GSE37745, GSE43580, GSE77803.

Acknowledgements

We are most grateful to July Hémon from the Human & Environmental Genomics core facility of Rennes (Biosit/OSUR) for her technical support. This work is supported by institutional grants from INSERM, EFS, and Univ. Bourgogne Franche-Comté to the UMR1098 and by the "Ligue Contre le Cancer", "Région Bourgogne Franche-Comté," and "Canceropole Grand Est."

Author details

¹Univ. Bourgogne Franche-Comté, INSERM, EFS BFC, UMR1098, Interactions Hôte-Greffon-Tumeur/Ingénierie Cellulaire et Génique, F-25000 Besançon, France. ²EPIGENEXP Platform, University of Bourgogne Franche-Comté, F-25000 Besançon, France. ³CHU Rennes, Service de Génétique Moléculaire et Génomique, F-35033 Rennes, France. ⁴Plate-forme Génomique Environnementale et Humaine Biosit, Université Rennes1, F-35043 Rennes,

France. ⁵Cancéropole Grand-Ouest, Réseau Epigénétique (RepICGO), Rennes, France. ⁶CNRS, UMR 6290, Institut de Génétique et Développement de Rennes (IGDR), F-35043 Rennes, France. ⁷Faculté de Médecine, Université Rennes1, UEB, UMS 3480 Biosit, F-35043 Rennes, France. ⁸Laboratory of Experimental Pathology, GIGA-Cancer, University of Liege, 4000 Liege, Belgium. ⁹Department of Medical Oncology, University Hospital of Besançon ou Hôpital Universitaire de Besançon, F-25000 Besançon, France. ¹⁰INSERM CIC-1431, University Hospital of Besançon ou Hôpital Universitaire de Besançon, Clinical Investigation Center in Biotherapy, F-25000 Besançon, France. ¹¹DimaCell Platform, Univ. Bourgogne Franche-Comté, F-25000 Besançon, France

Received: 18 July 2018 Revised: 13 December 2018 Accepted: 17 December 2018

Published online: 27 February 2019

References

- Prieto-García, E., Díaz-García, C. V., García-Ruiz, I. & Agullo-Ortuno, M. T. Epithelial-to-mesenchymal transition in tumor progression. *Med. Oncol.* **34**, 122 (2017).
- Li, W. et al. Methylation-mediated silencing of microRNA-211 promotes cell growth and epithelial to mesenchymal transition through activation of the AKT/beta-catenin pathway in GBM. *Oncotarget* **8**, 25167–25176 (2017).
- Li, Q. et al. KDM6B induces epithelial-mesenchymal transition and enhances clear cell renal cell carcinoma metastasis through the activation of SLUG. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* **8**, 6334–6344 (2015).
- Yang, F. et al. SET8 promotes epithelial-mesenchymal transition and confers TWIST dual transcriptional activities. *EMBO J.* **31**, 110–123 (2012).
- Gemmill, R. M. et al. ZEB1-responsive genes in non-small cell lung cancer. *Cancer Lett.* **300**, 66–78 (2011).
- Yamauchi, Y. et al. Tumor necrosis factor-alpha enhances both epithelial-mesenchymal transition and cell contraction induced in A549 human alveolar epithelial cells by transforming growth factor-beta1. *Exp. Lung Res.* **36**, 12–24 (2010).
- Kim, J., Kong, J., Chang, H., Kim, H. & Kim, A. EGF induces epithelial-mesenchymal transition through phospho-Smad2/3-Snail signaling pathway in breast cancer cells. *Oncotarget* **7**, 85021–85032 (2016).
- Wu, Y. et al. Stabilization of snail by NF-kappaB is required for inflammation-induced cell migration and invasion. *Cancer Cell* **15**, 416–428 (2009).
- Asgarova, A. et al. PD-L1 expression is regulated by both DNA methylation and NF-kB during EMT signaling in non-small cell lung carcinoma. *Oncotarget* **7**, e1423170 (2018).
- Taddei, M. L., Giannoni, E., Comito, G. & Chiarugi, P. Microenvironment and tumor cell plasticity: an easy way out. *Cancer Lett.* **341**, 80–96 (2013).
- Parker, J. S. et al. Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes. *J. Clin. Oncol.* **27**, 1160–1167 (2009).
- Serrano-Gomez, S. J., Mazivey, M. & Alahari, S. K. Regulation of epithelial-mesenchymal transition through epigenetic and post-translational modifications. *Mol. Cancer* **15**, 18 (2016).
- Mullen, A. C. et al. Master transcription factors determine cell-type-specific responses to TGF-beta signaling. *Cell* **147**, 565–576 (2011).
- Du, L. et al. Transcriptome profiling reveals novel gene expression signatures and regulating transcription factors of TGFbeta-induced epithelial-to-mesenchymal transition. *Cancer Med.* **5**, 1962–1972 (2016).
- Cieslik, M. et al. Epigenetic coordination of signaling pathways during the epithelial-mesenchymal transition. *Epigenetics Chromatin* **6**, 28 (2013).
- Lang, Z. Q., Wu, Y. Q., Pan, X. B., Qu, G. M. & Zhang, T. G. The identification of multifocal breast cancer-associated long non-coding RNAs. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* **21**, 5648–5654 (2017).
- Han, Y. et al. HOXA13 contributes to gastric carcinogenesis through DHRS2 interacting with MDM2 and confers 5-FU resistance by a p53-dependent pathway. *Mol. Carcinog.* **57**, 722–734 (2018).
- Wang, M. et al. Large-scale association analysis in Asians identifies new susceptibility loci for prostate cancer. *Nat. Commun.* **6**, 8469 (2015).
- Schneider, R. et al. Histone H3 lysine 4 methylation patterns in higher eukaryotic genes. *Nat. Cell Biol.* **6**, 73–77 (2004).
- Kim, D. H. et al. Histone H3K27 trimethylation inhibits H3 binding and function of SET1-like H3K4 methyltransferase complexes. *Mol. Cell Biol.* **33**, 4936–4946 (2013).
- Lo, H. W. et al. Epidermal growth factor receptor cooperates with signal transducer and activator of transcription 3 to induce epithelial-mesenchymal transition in cancer cells via up-regulation of TWIST gene expression. *Cancer Res.* **67**, 9066–9076 (2007).
- Bonnomet, A. et al. A dynamic in vivo model of epithelial-to-mesenchymal transitions in circulating tumor cells and metastases of breast cancer. *Oncogene* **31**, 3741–3753 (2012).
- Cao, R. et al. Elevated expression of myosin X in tumours contributes to breast cancer aggressiveness and metastasis. *Br. J. Cancer* **111**, 539–550 (2014).
- Duffy, M. J., McKiernan, E., O'Donovan, N. & McGowan, P. M. Role of ADAMs in cancer formation and progression. *Clin. Cancer Res.* **15**, 1140–1144 (2009).
- Wang, X. et al. MIR-145 inhibits the epithelial-to-mesenchymal transition via targeting ADAM19 in human glioblastoma. *Oncotarget* **8**, 92545–92554 (2017).
- Mi, H. et al. PANTHER version 11: expanded annotation data from Gene Ontology and Reactome pathways, and data analysis tool enhancements. *Nucleic Acids Res.* **45**, D183–D189 (2017).
- Gnemmi, V. et al. MUC1 drives epithelial-mesenchymal transition in renal carcinoma through Wnt/beta-catenin pathway and interaction with SNAIL promoter. *Cancer Lett.* **346**, 225–236 (2014).
- Chen, C., Khaleel, S. S., Huang, H. & Wu, C. H. Software for pre-processing Illumina next-generation sequencing short read sequences. *Source Code Biol. Med.* **9**, 8 (2014).
- Zang, C. et al. A clustering approach for identification of enriched domains from histone modification ChIP-Seq data. *Bioinformatics* **25**, 1952–1958 (2009).
- Huang, W., Loganathanraj, R., Schroeder, B., Fargo, D. & Li, L. PAVIS: a tool for Peak Annotation and Visualization. *Bioinformatics* **29**, 3097–3099 (2013).
- Wang, S. et al. Target analysis by integration of transcriptome and ChIP-seq data with BETA. *Nat. Protoc.* **8**, 2502–2515 (2013).
- Ramirez, F. et al. deepTools2: a next generation web server for deep-sequencing data analysis. *Nucleic Acids Res.* **44**, W160–W165 (2016).
- Subramanian, A. et al. Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**, 15545–15550 (2005).
- Herfs, M. et al. Proteomic signatures reveal a dualistic and clinically relevant classification of anal canal carcinoma. *J. Pathol.* **241**, 522–533 (2017).
- Hubert, P. et al. Altered alpha-defensin 5 expression in cervical squamocolumnar junction: implication in the formation of a viral/tumour-permissive microenvironment. *J. Pathol.* **234**, 464–477 (2014).

Review

Epigenetic Regulation of EMT (Epithelial to Mesenchymal Transition) and Tumor Aggressiveness: A View on Paradoxical Roles of KDM6B and EZH2

Camille Lachat ¹, Michaël Boyer-Guittaut ^{2,2}, Paul Peixoto ^{1,3,†} and Eric Hervouet ^{1,2,3,†,*} 

¹ Interactions Hôte-Greffon-Tumeur/Ingénierie Cellulaire et Génique, INSERM, EFS BFC, UMR1098, Univ. Bourgogne Franche-Comté, F-25000 Besançon, France; camille.lachat@edu.univ-fcomte.fr (C.L.); michael.boyer-guittaut@univ-fcomte.fr (M.B.-G.); paul.peixoto@univ-fcomte.fr (P.P.)

² DImaCell Platform, Univ. Bourgogne Franche-Comté, F-25000 Besançon, France

³ EPIGENEXP Platform, Univ. Bourgogne Franche-Comté, F-25000 Besançon, France

* Correspondence: eric.hervouet@univ-fcomte.fr; Tel.: +33-81666542 † These authors contributed equally to this work.



Received: 3 December 2018; Accepted: 17 December 2018; Published: 20 December 2018

Abstract: EMT (epithelial to mesenchymal transition) is a plastic phenomenon involved in metastasis formation. Its plasticity is conferred in a great part by its epigenetic regulation. It has been reported that the trimethylation of lysine 27 histone H3 (H3K27me3) was a master regulator of EMT through two antagonist enzymes that regulate this mark, the methyltransferase EZH2 (enhancer of zeste homolog 2) and the lysine demethylase KDM6B (lysine demethylase 6B). Here we report that EZH2 and KDM6B are overexpressed in numerous cancers and involved in the aggressive phenotype and EMT in various cell lines by regulating a specific subset of genes. The first paradoxical role of these enzymes is that they are antagonistic, but both involved in cancer aggressiveness and EMT. The second paradoxical role of EZH2 and KDM6B during EMT and cancer aggressiveness is that they are also inactivated or under-expressed in some cancer types and linked to epithelial phenotypes in other cancer cell lines. We also report that new cancer therapeutic strategies are targeting KDM6B and EZH2, but the specificity of these treatments may be increased by learning more about

¹ . Introduction

² .1. Epithelial to Mesenchymal Transition (EMT)

Epithelial to mesenchymal transition (EMT) is a phenomenon that leads epithelial cells to gradually acquire a mesenchymal phenotype. This process is associated with a loss of expression of specific epithelial proteins called “epithelial markers,” such as E-CADHERIN (coded by *CDH1* gene), CLAUDIN, or OCCLUDIN, and a gain of expression of other proteins called “mesenchymal markers,” such as VIMENTIN or N-CADHERIN. At least three distinct types of EMT have been reported so far, even if they present highly similar mechanisms: (i) type I is implicated in embryo formation and organ development; (ii) type II is involved in wound healing, regeneration of tissues, and in organ fibrosis; and (iii) type III is implicated in cancer development and aggressiveness. The latter also plays a role in tumor escape, impairing the formation of the immune synapse or leading to the overexpression of the immune checkpoint inhibitor PD-L1 (programmed death ligand 1) [1–3], and in metastasis formation [4,5]. Indeed, in type III EMT, tumor cells have been shown to present a loss of expression of adhesion proteins [6], to secrete various metalloproteases, such as MMP9 or ADAM19 [7], leading to

Epigenomes **2019**, *3*, 1; doi:10.3390/epigenomes3010001 www.mdpi.com/journal/epigenomes

the mechanisms of action of these enzymes and their specific partners or target genes in different cancer types.

Keywords: cancer; EMT; metastasis; epigenetics; KDM6B; EZH2; H3K27

the digestion of the extracellular matrix and then to the escape of the primary tumor and the migration through the blood or lymphatic circulation [4,5].

All the changes occurring during EMT at the morphological, functional, or molecular levels can be reversed to return to the original epithelial phenotype. This phenomenon is called mesenchymal to epithelial transition (MET) [8,9]. Through this process, circulating cancer cells can invade another organ, leading to the formation and growth of a secondary tumor called metastasis (Figure 1). However, the definition of EMT remains complex since there is not only one EMT but a multitude of intermediate states presenting different expressions of epithelial and mesenchymal markers. This plasticity has been described to be mainly linked to the epigenetic regulation of EMT, which is itself a highly plastic and reversible process, as described below.

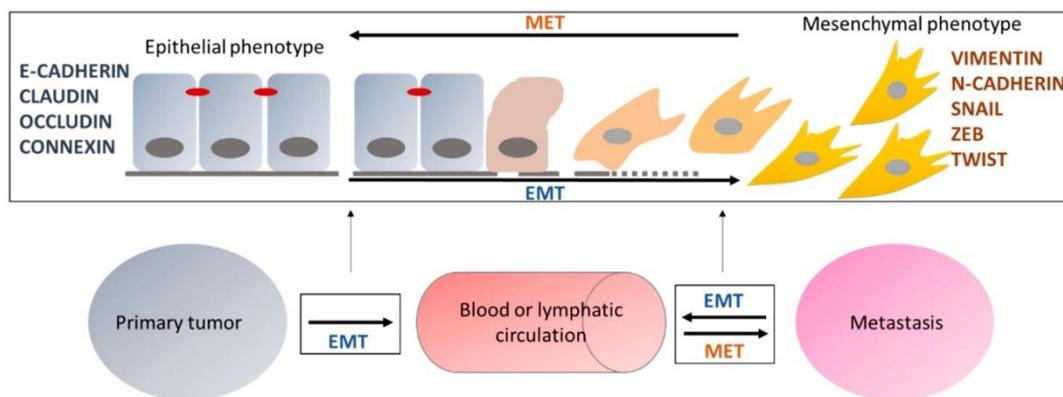


Figure 1. Roles of EMT in the formation of metastases. Epithelial cells, expressing epithelial markers, can undergo EMT and progressively acquire a mesenchymal phenotype characterized by the expression of mesenchymal markers. EMT is reversible and the opposite transition is called MET (mesenchymal to epithelial transition). EMT and MET are involved in the emergence of metastases by allowing cells to migrate to the blood or lymphatic circulation and then invade another organ to generate a secondary tumor called metastasis.

Type III EMT can be induced by various intra- or extra-cellular factors or stress. It has been described that EMT-activating transcription factors (EMT-ATFs), such as SNAIL, TWIST, and ZEB (zinc finger E-box-binding homeobox) families, are main regulators of EMT [10]. These EMT-ATFs are activated via hypoxia, cytokines (TGF β , TNF α), growth factors (EGF), or by cellular signaling pathways (WNT, HEDGEHOG, NF- κ B, and NOTCH), and their activation leads to EMT induction [11].

1.2. Epigenetic Regulation of EMT

The word “epigenetics” was used for the first time in 1942 by Conrad Hal Waddington, who used the term of “epigenotype” to describe the different phenomena which are involved in the implementation of a phenotype from a genotype, and “epigenetics” for studies related to the understanding of this phenomenon [12]. This definition has been widely modified since the 1940s to lead to the one currently used now: “Epigenetics is the study of the regulation of gene expression, without DNA nucleotide sequence alteration, and linked to hereditary transmission.” This field includes the study of non-coding RNA (miRNA, lncRNA, etc.), which can bind DNA or mRNA and influence gene transcription, DNA methylation (methylation of cytosines in CpG regions leading to the repression of transcription) and histone post-translational modifications (Table 1). Plasticity of epigenetic regulation is conferred by the reversible character of the corresponding biochemical reactions. Indeed, DNA methylation, histone post-translational modifications, and non-coding RNA expression can be reversed according to the cell pathophysiological context. Moreover, epigenetic modifications have been widely linked to EMT regulation and suggested to confer the necessary plasticity to regulate cancer aggressiveness, invasion, and metastasis [13].

Table 1. Main histone post-translational modifications and their effects on gene expression.

Type of Histones Modification	Description	Effect on the Gene Expression
Acetylation	Acetylation of the lysine amino groups of histones	Decrease of histone/DNA interaction, chromatin is structurally loose, less compact, and transcription is activated
Methylation	Methylation of arginine or lysine in histones	Arginine: transcription activation; lysine: activation or inhibition of transcription depending on the lysine targeted and the number of methyl groups added (mono-, di-, or tri-methylation)
Ubiquitination	Mono-ubiquitylation of lysine of histones H2A and H2B	Regulation of transcription initiation and elongation
Phosphorylation	Phosphorylation of serine, threonine or tyrosine of histones	DNA damage response (phosphorylation of H2AX), modulation of DNA compaction and interaction with other histone post translational modifications
SUMOylation	SUMO protein conjugation on lysine of histones	Competition with other lysine modifications. Decrease and stop of transcription
ADP ribosylation	Ribosyl-ADP addition on lysine of histones	DNA damage and transcription activation
Arginine Citrullination	Transformation of an arginine into a citrulline residue	Decrease of DNA compaction
Proline isomerization	Isomerization of a proline in cis conformation into a trans conformation	Modulation of histone methylation and transcription

In this review, we will focus on the regulation of the methylation of lysine 27 of histone H3 (H3K27me3), a repressive mark, which has been described as a master regulator of EMT. It is noteworthy that the amino group of lysine 27 of histone H3 can also be acetylated and that the H3K27Ac mark is generally associated with increased gene transcription and therefore inversely correlated with H3K27me3 [14,15]. It has also been shown that the H3K27me3 mark is associated with temporarily repressed gene expression, which could easily be re-expressed later [16]. H3K27 can be mono-, di-, or tri-methylated (H3K27me, H3K27me2, and H3K27me3). H3K27me is associated with active transcription, whereas H3K27me2, and in particular H3K27me3, are associated with repressed genes (Figure 2). This methylation status is regulated via a histone methyltransferase, EZH2 (enhancer of zeste homolog 2), which mono-, di-, or tri-methylates H3K27; and two lysine demethylases, KDM6B (lysine demethylase 6B) and KDM6A (lysine demethylase 6A), which can mono-, di-, or tri-demethylate H3K27.

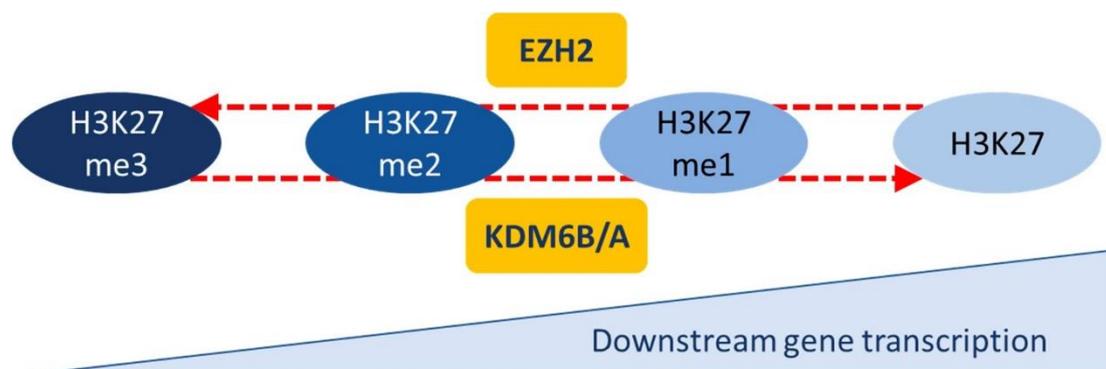


Figure 2. Regulation of H3K27 methylation status. H3K27 methylation status is regulated via three enzymes: EZH2 (methyltransferase) and KDM6B/A (demethylases). The H3K27 methylation level is inversely correlated to downstream gene transcription.

1.3. Current Described Roles of KDM6B and EZH2

EZH2, also called KMT6A (lysine methyl-transferase 6A or ENX-1), is a subunit of the polycomb repressive complex 2 (PRC2), which is normally involved in embryonic development and in stem cell maintenance. PRC2's main function is the di- or tri-methylation of H3K27, via its catalytic subunit EZH2. The other essential components of the PRC2 complex are SUZ12 (suppressor of zeste 12) and EED (embryonic ectoderm development). SUZ12 is directly involved in the tri-methylation of H3K27me3, more likely by inducing EZH2 binding to histone and modulating EZH2 conformation [17]. EED has a H3K27 binding domain that favors the

recruitment of PRC2 on histone H3. Additional proteins have also been associated with the PRC2 complex: RBBP4 and RBBP7 (retinoblastoma binding protein 4 and 7), and HDAC1 and HDAC2 (histone deacetylase 1 and 2). However, these proteins are not required for the histone methyltransferase activity of PRC2 [18] but they may drive the recruitment of the PRC2 complex onto DNA or histone H3 (Figure 3). PRC2 can regulate different subsets of genes depending on the cell type. Indeed, it has been described that PRC2 may be recruited to chromatin on a response element (PRE = PRC2 response element) [19], but the cell type-dependent profiles of PRC2 recruitment remain unclear. However, the potential presence of specific DNA- (or histone)-binding proteins in the PRC2 complex (e.g., HDAC1 and 2 or RBBP4 and 7) may partially explain these cell type specificities (Figure 3).

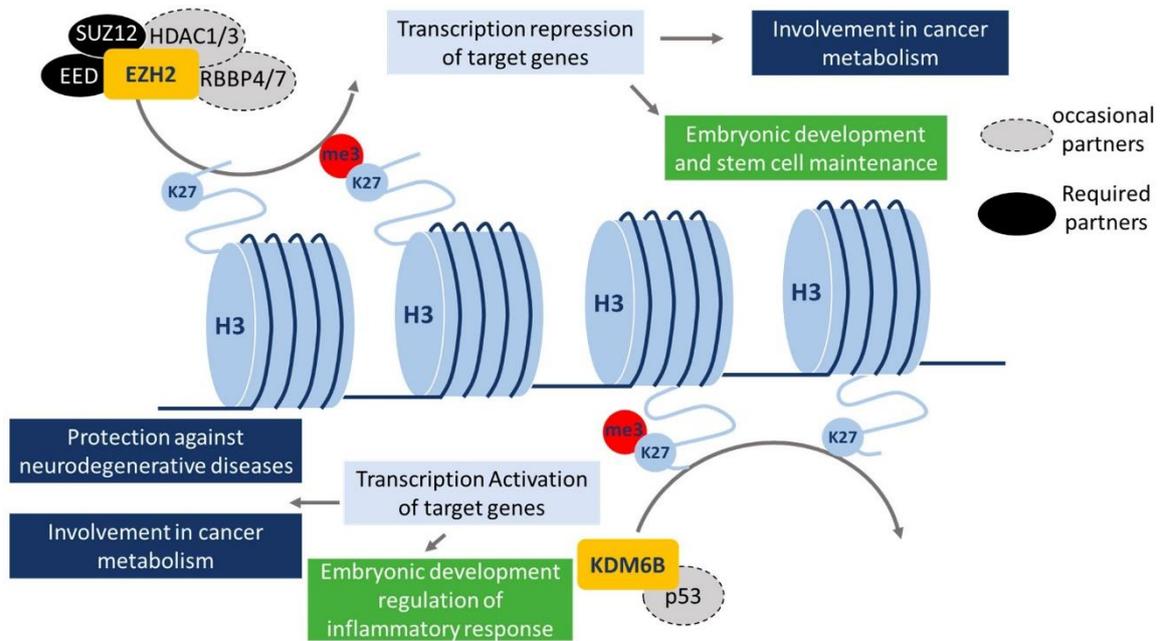


Figure 3. The current described roles of EZH2 and KDM6B. EZH2 methyltransferase activity, which catalyzes mono-, di-, or tri-methylation of H3K27, requires the presence of the PRC2-associated proteins, SUZ12 and EED. HDAC 1/3 and RBBP 4/7 can also be part of this complex but are not required for methyltransferase activity. EZH2 is important for normal embryonic development and stem cell maintenance. Moreover, it can also regulate cancer metabolism. KDM6B presents a lysine demethylase activity, which is a specific feature of H3K27. p53 has been reported to interact with KDM6B but is not required for its demethylase activity. KDM6B is required for embryonic development and the regulation of inflammatory responses, and is also important in cancer metabolism regulation and presents protective effects in some neurodegenerative diseases.

KDM6B, also called JMJD3 (Jumonji domain containing protein 3), is a H3K27me3 lysine demethylase, which plays an important role in the regulation of embryogenic development via controlling *HOX* genes (a subset of homeotic genes). For example, KDM6B can directly demethylate H3K27me3 in *HOX* and *BMP* (bone morphogenetic protein) promoters leading to activated transcription, which is essential for bone differentiation [20]. KDM6B also plays a role in the regulation of the inflammatory response by controlling macrophage differentiation (transcription activation of *HOXA11* and *BMP2* genes) [21]. The proteins involved in the recruitment of KDM6B on chromatin are poorly documented. Nonetheless, it has been shown that p53 can bind to KDM6B and promotes the recruitment of the complex on its target genes to activate their transcription [22].

Furthermore, even if PRC2 can bind to its PRE, this is not sufficient to explain the target genes of EZH2, and KDM6B appears to not have any affinity to specific DNA regions. EZH2 and KDM6B may rather require protein partners to specifically bind chromatin (Figure 3).

The deregulation of KDM6B and EZH2 has been described to be involved in the development of several disorders. KDM6B seems to prevent some neurodegenerative diseases, such as Alzheimer's disease [23], but the most documented disease linked to KDM6B and EZH2 dysregulation is cancer [23–25]. Indeed, both these enzymes have been involved in EMT and tumor aggressiveness in various cancer cell types, and this review will

specifically focus on the roles of EZH2 and KDM6B on the epigenetic regulation of EMT. Despite their described antagonist roles, these two enzymes were almost never studied together, apart from the work from Daures et al. [26,27].

2. EZH2 Is Associated to EMT and Cancer Aggressiveness

2.1. EZH2 Is Differently Expressed between Tumor and Normal Tissues in Various Cancer Types

A great number of publications studied EZH2 expression in different tumors using various techniques. These data have been summarized in Table 2. In clear cell renal cell carcinomas (ccRCCs), a high expression of EZH2 has been correlated with bad prognosis, metastasis, and high grade tumors [28,29]. Similar observations were collected in esophagus squamous cell carcinoma, in which EZH2 expression levels are higher in tumors compared to adjacent tissues and this higher expression has been correlated to the apparition of distant metastasis, bad prognosis, depth of invasion, and tumor size [30]. Similar data were also obtained in bladder urothelial carcinoma; in cutaneous (human and murine) melanoma; in hormone refractory and metastatic prostate cancer; in gastric cancer; breast, lung, and ovarian carcinoma; as well as in pediatric brain tumors. Therefore, it is clear that a high expression of EZH2 was frequently correlated to high grade tumors, aggressiveness, and poor patient outcome [31–40].

Although EZH2 seems generally associated to aggressiveness, some inactivating mutations or deletions of the *EZH2* gene have also been reported in different cancers, suggesting an ambiguous role of EZH2 in these cancers. In lung adenocarcinomas, the *KRAS* mutation is a major oncogenic mutation frequently associated with the *EZH2* mutation. Inactivating *EZH2* mutations was found in 14% of all the studied tumors. Conditional *EZH2* knock-out (KO) mice were also used to demonstrate that *EZH2* inactivation increased lung adenocarcinoma aggressiveness in mice carrying the *KRAS* mutation [41]. Moreover, a study performed on 119 patients with myelodysplastic syndromes and myeloproliferative neoplasms showed that 8.4% of the patients presented an inactivating mutation in the *EZH2* gene and that 3.4% of patients presented a deletion of this gene. Moreover, the deletion of the *EZH2* gene in mice was sufficient to induce a myeloid dysplasia [42].

Table 2. EZH2 expression in various cancer types and correlation to clinical parameters. EZH2 is often overexpressed in cancers (green), but in a few cases such as lung adenocarcinoma or myelodysplastic syndromes, some inactivating mutations (red) have been found in the *EZH2* gene. IHC: immunohistochemistry; IF: immunofluorescence.

Cancer Type	Over/Under Expressed	Technique	Ref.
Clear cell renal cell carcinomas (ccRCC)	Overexpressed in metastasis	IHC	[29]
Clear cell renal cell carcinomas (ccRCC)	Overexpressed in aggressive and invasive carcinomas	IHC	[28]
Esophagus squamous cell carcinomas	Overexpressed	IHC	[30]
Bladder urothelial carcinomas	Overexpressed in invasive and aggressive carcinomas	RT-qPCR on cell lines and tissues	[39]
Urothelial carcinomas	Overexpressed	Tissue microassays/IHC	[38]
Cutaneous melanomas and cancers of the endometrium, prostate and breast	Overexpressed	IHC, Tissue microarray	[31]
Human and murine melanomas	Overexpressed	IF	[40]
Hormone refractory, metastatic prostate cancers	Overexpressed	Gene expression profiling	[37]
Gastric cancers	Overexpressed and correlated with aggressiveness and invasion	IHC	[35]
Breast carcinomas	Overexpressed in invasive tumors	Tissue microarray	[34]
Ovarian carcinomas	Overexpressed	IHC	[36]
Lung Adenocarcinoma	Overexpressed in poor prognosis tumors	IHC	[32]
Adult and pediatric brain tumors	Overexpressed	IHC	[33]

Lung adenocarcinomas	Inactivating mutations in 14% of the cohort samples	Sequencing	[38]
Myelodysplastic syndromes/Myeloproliferative neoplasms	Inactivating mutations	Extensive mutation analyses	[42]

2.2. EZH2 Modulates EMT by Targeting a Specific Subset of Genes

Since EZH2 was described to be overexpressed in many aggressive tumors, this protein was proposed to act as a master regulator of the expression of EMT ATFs. However, it has been shown, in head and neck squamous cell carcinoma cell lines FaDu and SNU1041, that EZH2 did not regulate *SNAI1* or *SNAI2* gene expression. Moreover, a siRNA-driven knock-down of *EZH2* increased E-CADHERIN levels and decreased N-CADHERIN and VIMENTIN levels, leading to an inhibition of migration and invasion capacities without modulating EMT ATFs levels [43]. Surprisingly, in the ovarian cancer cells SKOV3, ChIP experiments showed that EZH2 could directly repress *ZEB2* expression when EMT was induced in these cells following TGF- β treatment [44] suggesting that EZH2 inhibited EMT in these cells. In the MHCC97H and MHCC97L cells lines (hepatocellular carcinomas), lncRNA *Carlo5* bound to EZH2 protein and recruited it onto the *miR-200b* promoter to repress its transcription. *miR-200b* was previously described to be linked to an epithelial phenotype by blocking EMT, provoked by the inhibition of ZEB1 and ZEB2 signaling (repressors of *CDH1* gene transcription). The repression of *miR-200b* expression by the complex lncRNA *Carlo5*-EZH2 therefore favored EMT [45]. In non-small cell lung cancer cells, *miR-21* overexpression also enhanced *EZH2* expression via an unknown mechanism and promoted cell invasion and migration [46].

Even if the implication of EZH2 in the regulation of EMT ATFs expression is not clearly defined, many interactions between these proteins have been reported. Indeed, overexpression of TWIST1 in bone marrow squamous cells led to the overexpression of *EZH2* via an unknown mechanism. This was also associated with the repression of cell proliferation mediated by the recruitment of EZH2 and addition of the H3K27me3 marks on the *P16/INK4/ARF* locus [47]. In oral tongue squamous cell carcinomas cells, Cal27, SNAI1, and SNAI2 induced the repression of *miR-101*, and consequently increased the levels of EZH2 in an unclear mechanism [48]. In the nasopharyngeal carcinoma cell line, HNE1 and SNAI1 can bind to the deacetylase enzymes HDAC1/2, which has also been described to interact with EZH2. This linear repressive complex is then able to trimethylate H3K27 and deacetylate histones, and thus repress the transcription of target genes, such as *CDH1* [49].

EZH2 did not only regulate EMT via its interaction with EMT ATFs, but also by regulating several target genes that were described as EMT regulators in many cell types (Table 3). Indeed, the down-regulation of *CDH1* can be directly controlled via EZH2. It has been shown in the colon cancer cell line HT-29-M6 that both SNAI1 and EZH2 were required to recruit PRC2 on the promoter of *CDH1*, and that EZH2 and SNAI1 stabilized each other on this promoter [50]. Cho and collaborators also reported that EZH2 directly repressed *CDH1* expression by the trimethylation of H3K27 on its promoter [51]. Similarly, it has been suggested, in the ovarian cancer cell line HO-8910, that EZH2 repressed *CDH1* gene expression. Indeed, a siRNA-driven knock-down of *EZH2* led to an increase in E-CADHERIN expression and to a decrease in invasion and migration capacities of these cells [36]. In the prostate cancer cell line PC3, the chemical compound triptolide (a promising anti-cancer drug whose mechanisms are not well described but are believed to involve the regulation of caspases, NF- κ B pathway, heat-shock proteins, and DNA repair associated factors [52]) decreased mRNA levels of *EZH2*, and led to an increase in *CDH1* expression [53].

RKIP (Raf-1 kinase protein inhibitor) inhibited tumor metastasis in different types of cancers such as breast, prostate, gastric, and cervical cancers [54–56]. In breast (MCF-7, T47-D, and MDA-MB-231) and prostate (LNCaP, DU145, and PC3) cancer cell lines, EZH2 directly repressed *RKIP* transcription by inducing H3K27 trimethylation on its promoter, leading to increased metastasis [57]. Furthermore, in melanomas, EZH2 similarly repressed *AMD1* gene expression (a protein involved in polyamine synthesis), leading to increased levels of SNAI1, ZEB1, and TWIST1, and to increased invasion and metastasis, both in vitro and in vivo [40]. In small cell lung cancers, EZH2 overexpression is related to poor prognosis and associated to the H3K27me3-dependent repression of *JUB1* in these tumors. Moreover, overexpression of *JUB1* in small cell lung cancer cells—DMS53, Lul30, and H209 cells—decreased cell proliferation showing that EZH2 promoted lung cancer cell proliferation via the inhibition of *JUB1* expression in these models [58]. *P27^{kip}*, a gene coding a tumor

suppressor protein involved in cell cycle arrest via the inhibition of CDK proteins, presented an EZH2-dependent repression of transcription in MIA-PaCa2 and Panc04.03 cancer cells, leading to uncontrolled cell growth and aggressiveness [59].

EZH2 also promoted EMT and cancer aggressiveness via the repression of genes involved in different signaling pathways. Indeed, in liver cancers, EZH2 was recruited by the long non-coding RNA *IncAPC* to the *APC* promoter where it repressed transcription in a H3K27 methylation-dependent manner. *APC* normally participates to the cytosolic sequestration of β -CATENIN and to its degradation. EZH2 overexpression therefore led to the activation of the Wnt/ β -CATENIN pathway that favored liver tumor initiating cells (TIC) self-renewal and cancer aggressiveness [60]. In the non-small cell lung adenocarcinoma cell lines, A549 and H358, chemical inhibition (using the specific GSK126 inhibitor) of EZH2 led to increased levels of *IGF1* mRNAs, associated to a global decrease in H3K27me3 levels [41]. Amongst the *IGF1* downstream targets, AKT and ERK signaling pathways were previously described to be both associated to increased proliferation.

Data obtained in breast cancers also illustrated the dual role of EZH2 in cancer aggressiveness. In the MDA-MB-231 cell line, an ER (estrogen receptor)-negative cell line, EZH2 positively activated the transcription of NF- κ B target genes in a methyltransferase-independent way, which contributed to aggressiveness of these breast cancer cells. On the contrary, in the ER-positive breast cancer cell line, MCF-7, EZH2 interacted with ER and activated the recruitment of the PRC2 complex on the NF- κ B promoter where EZH2 tri-methylated H3K27 and repressed NF- κ B transcription [61].

Altogether, these studies highlighted that EZH2 can be considered as an inducer of EMT or cancer aggressiveness in a large range of tumors, but surprisingly, in rare cases, EZH2 was also associated to anti-tumor properties. These studies highlighted the paradoxical role of EZH2 in the regulation of EMT.

Table 3. EZH2 target genes in various cancer cell lines. EZH2 directly downregulated (red) many genes in a wide range of cancer cell lines, but in some cases, it also directly, or indirectly, activated (green) transcription of some genes such as NF- κ B target genes, *C-MYC* or *CYCLIN D1*.

Tissue of Origin of the Cell Line	Name of the Cell Line	Genes Regulated	Direct/Indirect	Ref.
Head and neck squamous cell carcinoma	FaDu and SNU1041	Down-regulation of <i>N-CADHERIN</i> and Up-regulation of <i>VIMENTIN</i> regulation of <i>E-CADHERIN</i>	Unknown	[43]
Ovarian cancer	SKOV3 and Kuramochi	Down-regulation of <i>ZEB3</i> , <i>VIMENTIN</i> , <i>N-CADHERIN</i>	Direct	[44]
Colon cancer	HT-29 M6	Down-regulation of <i>CDH1</i>	Direct	[50]
Non-small cell lung cancer	A549	Down-regulation of <i>CDH1</i>	Direct	[51]
Ovarian cancer	HO-8910	Down-regulation of <i>CDH1</i> , Up-regulation of <i>TGF-β1</i>	Unknown	[36]
Prostate cancer	PC3	Down-regulation of <i>ADRB2</i> , <i>DAB2IP</i> , <i>CDH1</i> and <i>CDKN2A</i>	Unknown	[53]

³.3. EZH2 Modulates EMT and Cancer Aggressiveness via Activating Gene Transcription, Independently of Its Methyltransferase Catalytic Activity

As described above, EZH2 might present both methyltransferase and polycomb-independent activities (Table 3). In the absence of ER, in ER-negative breast cancers, EZH2 interacted with RelA and RelB, two NF- κ B subunit proteins, but surprisingly, EZH2 mutants lacking the enzymatic domain were still able to interact with both these proteins showing that these interactions were independent of the catalytic subunit of EZH2. Furthermore, in cells overexpressing either an inactive or an active EZH2, without expressing wild type EZH2, the transcription of NF- κ B target genes was up-regulated, showing that EZH2 activated transcription of these genes independently of its catalytic activity. Moreover, co-immunoprecipitation experiments of SUZ12 confirmed the interaction of SUZ12 with EZH2, but not with RelA or RelB, data which strongly suggested that the binding of EZH2 with the PRC2 polycomb complex or RelA/RelB was exclusive. These data therefore suggested that the Polycomb complex was not required for the transcriptional role of EZH2 [61].

Prostate and breast cancer	LnCAP, MCF7, DU-145 and LSHAR	Down-regulation of <i>RKIP</i>	Direct	[57]
Human and murine melanomas	XB2, Melan-a, HEK293T, B16F1 and B16F10	Down-regulation of <i>AMD1</i> , <i>DCK</i> and <i>WDR19</i>	Direct	[40]
Small cell lung cancer	DMS53, Lul30, H209	Down-regulation of <i>JUB</i>	Direct	[58]
Pancreatic cancer	MIA-PaCa2 and Panc04.03	Down-regulation of <i>p27^{kip}</i>	Direct	[59]
Liver hepatocellular carcinoma	huh-7 and Hep-3B	Down-regulation of <i>APC</i>	Direct	[60]
Non-small cell lung carcinoma	H358 and A549	Down-regulation of <i>IGF1</i> Down-regulation of <i>AKT</i> and <i>ERK</i> (via <i>IGF1</i>)	Unknown Indirect	[41]
ER-negative breast cancer	MDA-MB-231	Down-regulation of <i>NF-κB</i> target genes	Unknown	[61]
ER-positive luminal like breast cancer	MCF7	Up-regulation of <i>NF-κB</i> target genes by binding of <i>RelA</i> and <i>RelB</i>	Direct	[61]
Breast cancer	MCF-7	Up-regulation of <i>C-MYC</i> and <i>CYCLIN D1</i>	Direct	[62]

Similarly, in the breast cancer cell lines, MCF-7 and T47D, co-IP and GST-pulldown experiments revealed that EZH2 was found to interact with ER α and β -CATENIN and to induce the transcription of their target genes. In these models, these interactions contributed to cell cycle progression and cancer aggressiveness [62]. These examples also strongly suggested that EZH2 was able to induce the transcription of target genes independently of its interaction with the PRC2 complex.

2.4. Regulation of EZH2 Expression during EMT

EZH2 expression was described to be regulated at both transcriptional and post-translational levels. Two different transcription factors have been reported to activate *EZH2* transcription during EMT. First, in the breast epithelial cancerous and normal cells, PY2T and NMuMG, SOX4 was described as a direct activator of *EZH2* transcription following TGF- β treatment [63]. Second, in the breast cancer cell lines—MDA-MB-468, MDA-MB-231, and SKBr3—the MEK-ERK1/2 pathway activated *EZH2* transcription via the direct recruitment of P-ELK1 on the *EZH2* promoter. Indeed, this activation was not observed in the less aggressive breast cancer cell line HCC1500 (ER-positive cells) [64].

Many miRNAs were also described to target *EZH2* mRNA leading to decreased cellular levels of *EZH2* mRNA. Among these miRNAs, *miR-101* was the most frequently observed, since it has been described to target *EZH2* in gastric cancer cell lines (BGC-823, SGC-7901, AGS, and MKN-45), in head and neck squamous cell carcinomas (HNSCCs) and in the glioblastoma cell line U87. In all these cancer models, *miR-101* inhibited migration, invasion, or EMT [65–67]. Similarly, in the hepatocellular carcinoma cell line HEPG2, another miRNA, *miR-137*, targeted *EZH2* mRNA that led to decreased cell migration and invasion. Indeed, *miR-137* was described to be less expressed in HCCs than in normal tissues [68]. Moreover, *miR-138* also inhibited EMT by targeting *EZH2* mRNA in the HNSCCs 1386Ln and 686Tu cell lines [69]. *miR-124* targeted the 3'-UTR of *EZH2* mRNA leading to its degradation and overexpression of this miRNA suppressed cell motility, invasion and EMT in vitro, and intra-hepatic and pulmonary metastasis formation in vivo [70]. In the esophageal squamous cell carcinoma cell line, Ecal09, *miR-98*, and *miR-214* also targeted the 3'-UTR of *EZH2* mRNA and inhibited migration and invasion. These miRNAs were downregulated in esophageal squamous cell carcinomas and their expression was inversely correlated with lymph node metastasis [71]. Finally, various miRNA targeted *EZH2* mRNA and inhibit migration and invasion in various cancer cell lines. *MIR-214*, *miR-4465*, and *miR-137* targeted *EZH2* respectively in hepatocellular carcinoma cell line SK-HEP-1, in non-small cell lung cancer cell lines A549 and H2170, and in melanoma cell lines Ma-Mel-79b and -86b [72–74]

Altogether, these data demonstrated that the *EZH2* gene and *EZH2* mRNA levels are tightly regulated by both transcription factors and miRNAs during EMT.

2.5. New Anti-Cancer Therapeutic Protocols Targeting EZH2 Activity

More than 10 clinical studies are evaluating the effects of EZH2 inhibitors (EZH2i) against multiple cancers (<https://clinicaltrials.gov>). For example, a phase I study using the EZH2 chemical inhibitor GSK2816126 in elapsed/refractory diffuse large B-Cell lymphoma (DLBCL), other non-Hodgkin lymphomas (NHL), transformed

follicular lymphoma (tFL), solid tumors, and multiple myeloma (MM) showed an evident anti-tumoral effect of the molecule [75]. Many different EZH2i are tested such as tazemetostat (used in almost 15 studies), MK683, CPI-1205, and SHR2554. Although these compounds are still being evaluated, it appears that EZH2 inhibition is a very promising therapeutic approach in a wide range of cancer types (solid tumors or not) (Table 4).

Table 4. Summary of the clinical trials targeting EZH2 in cancers. Different molecules targeting EZH2 are used in clinical trials against a large range of solid and liquid tumors.

Title	Phase	Inhibitor	Cancer
A phase 1 study of SHR2554 in subjects with relapsed or refractory mature lymphoid neoplasms	Phase 1	SHR2554	Relapsed or refractory mature lymphoid neoplasms
A phase 1 study of the EZH2 inhibitor tazemetostat in pediatric subjects with relapsed or refractory INI1-negative tumors or synovial sarcoma	Phase 1	Tazemetostat	Rhabdoid tumors, INI1-negative tumors, Synovial sarcoma and malignant rhabdoid tumor of ovary
A phase II, multicenter study of the EZH2 inhibitor tazemetostat in adult subjects with INI-1-negative tumors or relapsed/refractory synovial sarcoma	Phase 2	Tazemetostat	Malignant rhabdoid tumors, rhabdoid tumors of the kidney, atypical teratoid rhabdoid tumors and eight more.
ProSTAR: A study evaluating CPI-1205 in patients with metastatic castration resistant prostate cancer	Phase 1/2	CPI-1205	Metastatic castration resistant prostate cancer (mCRPC)
ORION-E: A study evaluating CPI-1205 in patients with advanced solid tumors	Phase 1/2	CPI-1205	Advanced solid tumors
Study of the EZH2 Inhibitor Tazemetostat in malignant mesothelioma	Phase 2	Tazemetostat	Mesothelioma, BAP1 loss of function
Open-label, multicenter, phase 1/2 study of tazemetostat (EZH2 histone methyl transferase (HMT) inhibitor as a single agent in subjects with advanced solid tumors or with B-cell lymphomas and Tazemetostat in combination with Prednisolone in subjects with DLBCL	Phase 1/2	Tazemetostat	B-cell lymphomas, advanced solid tumors, diffuse large B-cell lymphoma (and 3 more)
A study evaluating CPI-1205 in patients with B-cell lymphomas	Phase 1	CPI-1205	B-cell lymphoma
Tazemetostat in treating patients with relapsed or refractory advanced solid tumors, non-Hodgkin lymphoma, or histiocytic disorders with EZH2, SMARCB1, or SMARCA4 gene mutations (a pediatric match treatment trial)	Phase 2	Tazemetostat	Advanced malignant solid neoplasm, Ann Arbor stage II childhood Hodgkin lymphoma (and 47more)
A study to investigate the safety, pharmacokinetics, pharmacodynamics and clinical activity of GSK2816126 in subjects with relapsed/refractory diffuse large B-cell lymphoma, transformed follicular lymphoma, other non-Hodgkin's lymphomas, solid tumors, and multiple myeloma	Phase 1	GSK2816126	Cancer
Safety and efficacy of MAK683 in adult patients with advanced malignancies	Phase 1/2	MAK683	Diffuse large B-cell lymphoma

3. KDM6B in EMT and Cancer Aggressiveness

3.1. KDM6B Is Differently Expressed between Tumor and Normal Tissues in Various Cancer Types

KDM6B has been described to be differentially expressed between cancer and normal adjacent tissues (Table 2). For example, in hepatocellular carcinomas, tissue-based RT-qPCR and Western-blotting analysis showed that *KDM6B* was overexpressed in tumor tissues compared to normal adjacent tissues. Moreover, *KDM6B* expression was correlated with distant metastasis and with an increased expression of *SNAI2* [76]. In clear cell renal cell carcinomas, *KDM6B* expression was also higher in tumor tissues compared to normal ones (tissue-based RT-qPCR, Western blotting, and IHC), and overexpression of *KDM6B* was also linked to increased tumor size, metastasis, and poor prognosis for patients [77]. Similar results were observed in multiple myelomas according to a public data set study [78] and in Hodgkin's lymphomas (IHC analysis) [79]. An *Oncomine* data analysis also confirmed that *KDM6B* was overexpressed in invasive and metastatic breast tumors compared to less invasive tumors [80]. Similarly, RT-PCR data showed that *KDM6B* mRNA was overexpressed in malignant pleural mesothelioma (MPM) compared to benign pleura [81]. Moreover, *KDM6B* was also overexpressed in ovarian cancers at both protein and mRNA levels and its expression was associated with invasion, metastasis, and low overall survival [82]. All these studies therefore clearly indicated that *KDM6B* could be classified as an oncogene and was correlated to EMT and cancer aggressiveness. However, some contradictory or intriguing results have also been reported. For example, even if *KDM6B* was overexpressed in pancreatic ductile adenocarcinoma (PDAC) compared to normal tissue, its expression decreased with tumor grades [83]. Moreover, *KDM6B* was under-expressed in poor differentiated tumors (mesenchymal phenotype) in a cohort of 96 colon cancer patients [84]. In 20 colorectal cancer patients, *KDM6B* was also under-expressed compared to normal tissues, and a high *KDM6B* expression was correlated with better overall survival in a cohort of 151 colorectal cancer (CRC) patients [85]. Altogether, these data suggested that *KDM6B* could be correlated, or inversely correlated, with invasion and cancer aggressiveness regarding the cancer model. All these data are summarized in Table 5.

Table 5. KDM6B expression in different cancer types. KDM6B is often overexpressed (green) in cancers; however, it was described to be under-expressed (red) in invasive pancreatic ductal adenocarcinomas and poor differentiated colon cancers.

Cancer Type	Over/Under Expressed	Technique	Ref.
Hepatocellular carcinoma	Overexpressed	Tissue RT-qPCR and Western blotting	[76]
Clear cell renal cell Carcinoma	Overexpressed	Tissue RT-qPCR, Western blotting, and IHC	[77]
Multiple Myeloma	Overexpressed	Public data set study	[78]
Hodgkin's lymphoma	Overexpressed	IHC	[79]
Breast cancer	Overexpressed	Oncomine data analysis	[80]
Malignant pleural mesothelioma	Overexpressed	Tissue RT-qPCR	[81]
Ovarian cancer	Overexpressed	IHC and tissue RT-qPCR	[82]
Pancreatic ductal adenocarcinoma	Under-expressed in invasive tumors compared to low grade cancers	Tissue microarray	[83]
Colon cancer	Under-expressed in poor differentiated tumors	Tissue RT-qPCR	[84]
Colorectal cancer	Under-expressed	IHC	[85]

3.2. KDM6B Modulates EMT by Targeting a Specific Subset of Genes

KDM6B was described to modulate the expression of EMT ATFs during EMT in various cancer cell lines (Table 6). Indeed, the expression of *SNAIL* was directly activated by *KDM6B*. For example, in the mammary mouse cell line, NmuMG, H3K27 was demethylated by *KDM6B* on the *SNAI1* promoter when *KDM6B* was overexpressed, leading to the expression of mesenchymal-related genes [80]. In the hepatocellular carcinoma cell line, HepG2, *KDM6B* directly activated *SNAI2* transcription via a demethylation of H3K27 on its promoter and *KDM6B* overexpression promoted EMT, migration and invasion capacities and stem cell-like features (holoclone formation, clonogenic capacities, and sphere establishment) [76]. In the clear-cell renal cell carcinoma cell line,

Caki-2, KDM6B also directly activated *SNAI2* transcription to increase mesenchymal marker expression, decreased epithelial protein expression, and increased invasion capacities [77]. In the renal cell carcinoma cell line, ACHN, the siRNA-driven knock-down of lncRNA *HOTAIR* led to decreased levels of both KDM6B and its target *SNAIL1*, and then decreased invasion and migration capacities of the cells [86], suggesting that KDM6B was also regulated at the mRNA level.

On the contrary, the knock-down of *KDM6B* or the expression of an inactive KDM6B mutant in SW-480 human colon cancer cells increased the expression of *SNAIL1*, *ZEB1*, and *ZEB2* EMT ATFs, and led to consecutive decreases in *E-CADHERIN*, *CLAUDIN1*, and *CLAUDIN7* expressions (epithelial markers) [84]. These data suggested that the KDM6B demethylase activity was frequently associated to EMT-related phenotypes, but some apparent contradictory roles of this enzyme could also be dependent on the model.

KDM6B has been described to modulate the expression of various genes involved in epithelial or mesenchymal cell state. Indeed, in the colorectal carcinoma cell line, HCT116, KDM6B directly activated the expression of the epithelial protein *EPCAM* (epithelial cell adhesion molecule) via its demethylase activity, leading to increased tumor growth, cell proliferation, and more surprisingly, to cell migration and invasion [87]. However, it should be noted that *EPCAM* and *WNT/β-catenin* expressions were inversely correlated with survival prognosis for patients with colon cancer [88]. In ovarian cancers, *HER2* (human epidermal growth factor receptor 2, a receptor involved in proliferation, migration, and survival) and KDM6B expressions were correlated to poor prognosis and a low survival rate. KDM6B promoted EMT in the SKOV-3 ovarian cancer cell line and directly activated *HER2* gene transcription. Treatment of ovarian cancer cells with both Paclitaxel (which blocked the depolymerization of microtubule assembly in the mitotic spindle) and Carboplatin (a DNA alkylation chemical) decreased KDM6B content and was linked to an increase of the H3K27me3 mark on the *HER2* promoter leading to its decreased expression and decreased invasive and migratory cell capacities [89]. In the breast cancer cell lines, MDA-MB-231 and MCF7, the inhibition of the KDM6B demethylase activity, using the specific inhibitor GSKJ4, led to a repression of the expression of the multipotent *SOX2*, *NANOG*, and *OCT4* genes, a decrease of which was linked to an increase of the H3K27me3 mark on their promoters. These transcription factors have been described to be essential for the maintenance of the stem-like phenotype, suggesting that KDM6B regulated stemness properties of breast cancer cells [90]. On the contrary, KDM6B also promoted an epithelial-like phenotype, since, in the pancreatic ductal adenocarcinoma cell line BxPC3 and in xenograft models, KDM6B directly induced the demethylation of the H3K27me3 mark on the *CEBPA* promoter and induced the expression of this gene. Moreover, both knock-out of *KDM6B* or *CEBPA* led to the appearance of a mesenchymal phenotype and increased invasion capacities of these cells [83]. In the BJ foreskin cell line, KDM6B was recruited on a p53 binding element via its direct interaction with p53 where it demethylated the H3K27me3 mark. Indeed, KDM6B was proposed to participate to p53 target genes up-regulation and therefore, to cell cycle arrest or apoptosis and decreased cancer aggressiveness [22].

Some signaling pathways closely linked to EMT were also described to be regulated by KDM6B. In the melanoma A375-LM3 cell line, KDM6B demethylated H3K27 at the *NF-κB* and *BMP* promoters leading to the activation of *NF-κB* and *BMP* signaling target genes and thus contributed to the malignant cell properties. Moreover, the *BMP* signaling pathway activated KDM6B transcription via a positive feedback regulation loop [91]. In multiple myeloma, *KDM6B* was also induced via the *NF-κB* pathway and activated the *MAPK* pathway through its direct recruitment onto the *ELK1* and *FOS* promoters leading to induced cell growth, proliferation, and aggressiveness [78]. On the contrary, in human fibroblasts, KDM6B directly activated *P16/INK4A* gene transcription via demethylation of H3K27 on its promoter leading to a P16-dependent arrest of the cell cycle. [92,93]. Similar results were also described in the human lung fibroblast cells, TIG-3, after induction of *KDM6B* expression following the *BRAF* pathway activation. Indeed, KDM6B was able to block cell proliferation in these cells following its recruitment on the *P16/INK4A* promoter [94]. All these data are summarized in Table 5.

Table 6. KDM6B target genes in various cancer cell lines. KDM6B directly activated (green) transcription of EMT-related genes in a wide range of cancer cell lines. It also down-regulated (red) the expression of EMT-ATFs, probably via an indirect way.

Tissue of Origin	Cell Line	Genes Regulated	Direct/Indirect	Ref.
------------------	-----------	-----------------	-----------------	------

Mouse breast	NmuMG	Up-regulation of <i>SNAI1</i>	Direct	[80]
Hepatocarcinoma	HepG2	Up-regulation of <i>SNAI2</i>	Direct	[76]
Clear cell renal cell carcinoma	Caki-2	Up-regulation of <i>SNAI2</i>	Direct	[77]
Renal cell carcinoma	ACHN	Up-regulation of <i>SNAI1</i>	Unknown	[86]
Colon carcinoma	SW-480	Down-regulation of <i>SNAI1</i> , <i>ZEB1</i> , and <i>ZEB2</i>	Unknown	[84]
Colorectal carcinoma	HCT116	Up-regulation of <i>EpCAM</i>	Direct	[87]
Ovarian cancer	SKOV-3	Up-regulation of <i>HER2</i>	Direct	[89]
Breast cancer	MCF-7 and MDA-MB-231	Up-regulation of <i>NANOG</i> , <i>SOX2</i> , <i>OCT3</i>	Unknown	[90]
Pancreas adenocarcinoma	BxPC3	Up-regulation of <i>CEBPA</i>	Direct	[83]
Skin, foreskin	BJ	Up-regulation of p53 target genes	Direct (via p53 binding)	[22]
Melanoma	A375-LM3	Up-regulation of <i>BMP2</i> ; <i>BMP4</i> , <i>CCL2</i> , <i>STC1</i> <i>TFPI2</i> , <i>PTGS2</i> and <i>TGM2</i>	Direct	[91]
Multiple myeloma	MM-1S	Up-regulation of <i>ELK1</i> and <i>FOS</i>	Direct	[78]
Lung	IMR-90	Up-regulation of <i>INK4a</i>	Direct	[92]
Lung fibroblast	TIG-3	Up-regulation of <i>INK4A</i>	Direct	[94]
Immortalized Human embryonic kidney cells	HEK-293	Stabilization of nuclear p53	Direct	[95]
Non-small cell lung cancer	H460 and A549	Stabilization of <i>FOXO1</i> in nucleus	Direct	[96]

3.3. *KDM6B* Modulates Cancer Aggressiveness by Activating Gene Transcription, Independently of Its Demethylase Catalytic Activity

KDM6B can also modulate cancer aggressiveness in a demethylase-independent manner. In the immortalized human embryonic kidney cell line, HEK-293, *KDM6B* favored the expression of p53 target genes without being recruited on their promoters, but rather through increasing p53 recruitment on its target sequences in these promoters. Indeed, overexpression of *KDM6B* induced the nuclear localization of p53 in these cells and the recruitment of p53 on the *p21* promoter, but not of *KDM6B* at this site. These data were in favor of a tumor suppressor role of *KDM6B* via controlling the expression of p53 downstream genes [95]. This mechanism has also been observed for other targets, since *KDM6B* was involved in the stabilization of the transcription factor FOXO1 (Forkhead box protein O1, an inducer of pro apoptotic genes *BIM*, *TRAIL*, and *FasL*) in the nucleus of A549 and H460 non-small cell lung cancer cell lines. This interaction led to increased apoptosis and decreased migration and invasion [96] (Table 6).

3.4. New Anti-Cancer Therapeutic Protocols Targeting *KDM6B* Activity

Some pre-clinical studies already used the *KDM6B* inhibitors, GSKJ1/GSKJ4, to target cancers. GSKJ4 is a pro-drug for a cellular use of GSKJ1 when GSKJ1 is used in vitro. This inhibitor has been identified by Kruidener and collaborators in 2012 [97]. In the acute lymphoblastic leukemia (ALL) cell line CUTLL1, GSKJ4 treatment induced cell cycle arrest and apoptosis and therefore is proposed as a promising therapeutic approach. However, this treatment did not affect myeloid leukemia cells, stromal cells, or hematopoietic progenitors [98]. GSKJ4 treatment also decreased tumor growth of xenografts of SF7761 and SF8628 pediatric brainstem glioma cells in mice. These cell lines present a heterozygous mutation of K27 of histone H3 (K27S) and half of histone H3 cannot be methylated at lysine 27 anymore. Nevertheless, mutated histone H3 sequestered PRC2 and induced a dominant negative effect via reducing H3K27me3 on non-mutated histone H3. GSKJ4 treatment allowed the restoration of the mark H3K27me3 on histone H3, which was not mutated. GSKJ4 did not present the same effect on other pediatric brainstem cell lines, which did not contain the mutation [99].

4. Conclusions

This review highlights the paradoxical functions of EZH2 and KDM6B during EMT and cancer aggressiveness. Indeed, even if it has been shown that these proteins often present pro-EMT or pro-metastasis roles in a wide range of cancers, some examples revealed that they also presented anti-tumor functions in some cancers. Moreover, EZH2 and KDM6B were frequently both overexpressed and associated with EMT, invasion, migration, or metastasis in the same cancer types, such as ovarian cancers [36,82] or clear cell renal cell carcinomas [28,29,77]. These observations suggested that EZH2 and KDM6B expression might be regulated via shared similar mechanisms. However, to our knowledge, no studies targeted the common regulation of EZH2 and KDM6B during EMT and cancer. This review shows that the action of these two antagonistic enzymes during EMT is a complex phenomenon. The first paradoxical role of these enzymes is so that they are antagonistic, but both are involved in cancer aggressiveness and EMT sometimes in the same cell lines. The second paradoxical role is that these enzymes are also inactivated or under-expressed in some cancer types and still linked to epithelial phenotype in other cancer cell lines.

Therefore, all these studies suggested that EZH2 and KDM6B can be considered as master regulators of EMT through orchestrating the regulation of the H3K27me3 epigenetic mark. However, the mechanisms involved in this regulation remain unclear and seem often indirect and/or cell/cancer model-dependent. We think that the process called “type III EMT” gathers a lot of processes regulated by different pathways but lead to a common phenotype: the activation of EMT-ATFs expression and induction of a mesenchymal phenotype at both molecular and functional levels. We also know that cancer cells present a very variable genotype and that EZH2 and KDM6B could drive a specific cell phenotype depending on the cellular context. Moreover, interaction of EZH2 and KDM6B with different partners may also regulate their specific recruitment on promoters. Finally, H3K27me3 seems to be dynamically regulated during EMT and a slight change in the equilibrium between EZH2 and KDM6B expression, or activity, might rapidly modify the expression of the target genes. As described before, many studies have already focused on the regulation of EZH2 but the regulation of KDM6B remains largely unknown and may become a major issue to understand its function during EMT.

Therefore, the characterization of the role of EZH2 and KDM6B during EMT should provide new possibilities for designing anti-cancer therapeutic approaches. For example, in a recent study, Tazemetostat (an EZH2 chemical inhibitor which is used in many clinical trials) is more effective to target B-cell lymphoma cell lines models bearing EZH2 activating mutations than models bearing wild-type EZH2 since cell viability is less dependent on EZH2 in WT cells. Indeed, EZH2 inhibition led to the activation of B-cell pathway. A better understanding of the EZH2 target genes allowed the authors to associate Tazemetostat with B-cell pathway inhibitors to increase the specificity and the efficacy of this treatment in B-cell lymphoma with wild-type EZH2 [100].

Funding: Camille Lachat was supported by a fellowship from the MESR (Ministère de l’Enseignement Supérieur et de la Recherche). This work was supported by funding from institutional grants from INSERM (Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale), EFS (Etablissement Français du Sang), and Univ. Bourgogne Franche-Comté and by the “Ligue Contre le Cancer” (001AC.2015) and the “Région Bourgogne Franche-Comté” (2014C-15449).

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

Abbreviations

ADP	Adenosine Diphosphate
AKT	Protein Kinase B
ALL	Akute Lymphoblastic Leukemia
AMD1	Adenosyl Methionine Decarboxylase 1
APC	Adenomatous Polyposis Coli
ARF	Alternative Reading Frame
BIM	BCL2 Like 11
BMP	Bone Morphogenetic Protein

CDH1	Cadherin 1
CDK	Cyclin Dependant Kinase
CEBPA	CCAAT/Enhancer Binding Protein α
ChIP	Chromatin ImmunoPrecipitation
DLBCL	Diffuse Large B Cell Lymphoma
DNA	Desoxyribonucleic Acid
EED	Embryonic Ectoderm Development
EGF	Epidermal Growth Factor
EMT	Epithelial to Mesenchymal Transition
EMT-ATF	Epithelial to Mesenchymal Transition Activating Transcription Factors
EPCAM	Epithelial Cell Adhesion Molecule
ER	Estrogen Receptor
ERK	Extracellular Signal-Regulated Kinase
EZH2	Enhancer of Zeste Homolog 2
EZH2i	Enhancer of Zeste Homolog 2 Inhibitor
FOS	FBJ Murine Osteosarcoma Viral Oncogene Homolog
FOXO1	Forkhead Box Protein O1
H2A	Histone 2A
H2B	Histone 2B
H3	Histone 3
H3K27Ac	Histone 3, Lysine 27 Acetylated
H3K27me2	Histone 3, Lysine 27 Dimethylated
H3K27me3	Histone 3, Lysine 27 Trimethylated
H3K27me3	Histone 3, Lysine 27 Methylated
HCC	Hepatocellular Carcinoma
HDAC1	Histone Deacetylase 1
HDAC2	Histone Deacetylase 2
HER2	Human Epidermal Growth Factor Receptor
HOTAIR	HOX Transcript Antisense RNA
HOX	Homeobox
IF	ImmunoFluorescence
IGF1	Insulin-Like Growth Factor 1
IHC	Immunohistochemistry
INK4	Inhibitor of CDK4
JMJD3	Jumonji Domain-Containing Protein 3

JUB1	JUNGBRUNNEN 1
KDM6A	Lysine Demethylase 6A
KDM6B	Lysine Demethylase 6B
KMT6A	Lysine Methyltransferase 6A
KO	Knock-Out
KRAS	V-Ki-Ras2 Kirsten Rat Sarcoma Viral Oncogene Homolog
lncRNA	Long Non-Coding Ribonucleic Acid
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
MEK	Mitogen-Activated Protein Kinase
MET	Mesenchymal to Epithelial Transition
miRNA	Micro Ribonucleic Acid
MM	Multiple Myeloma
MPM	Multiple Pleural Mesothelioma
mRNA	Messenger Ribonucleic Acid
N-CAD	N-Cadherin
NF- κ B	Nuclear Factor- κ B
NHL	Non-Hodgkin Lymphoma
OCT4	Octamer-Binding Transcription Factor 4
PDAC	Pancreatic Ductile Adenocarcinoma
PD-L1	Programmed Death Ligand 1
PRC2	Polycomb Repressive Complex 2
PRE	Polycomb Repressive Complex 2 Response Element
RBBP4	RetinoBlastoma Binding Protein 4
RBBP7	RetinoBlastoma Binding Protein 7
RelA	V-Rel Avian Reticuloendotheliosis Viral Oncogene Homolog A
RelB	V-Rel Avian Reticuloendotheliosis Viral Oncogene Homolog B
RKIP	Raf-1 Kinas Inhibitor Protein
RNA	Ribonucleic Acid
RT-PCR	Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction
RT-qPCR	Reverse Transcription Quantitative Polymerase Chain Reaction
siRNA	Small Interfering Ribonucleic Acid
SOX4	SRY-Related HMG Box
SUZ-12	Suppressor of Zeste 12
TF	Transcription Factor
tFL	Transformed Follicular Lymphoma

TGF- β	Transforming Growth Factor β
TIC	Tumor Initiating Cells
TNF- α	Tumor Necrosis Factor α
TRAIL	Tumor Necrosis Factor Related Apoptosis-Inducing Ligand
UTR	Untranslated Region
VIM	Vimentin
ZEB	Zinc Finger E-box Binding Homeobox

References

1. Akalay, I.; Janji, B.; Hasmim, M.; Noman, M.Z.; André, F.; de Cremoux, P.; Bertheau, P.; Badoual, C.; Vielh, P.; Larsen, A.K.; et al. Epithelial-to-mesenchymal transition and autophagy induction in breast carcinoma promote escape from T-cell-mediated lysis. *Cancer Res.* **2013**, *73*, 2418–2427. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Asgarova, A.; Asgarov, K.; Godet, Y.; Peixoto, P.; Nadaradjane, A.; Boyer-Guittaut, M.; Galaine, J.; Guenat, D.; Mougey, V.; Perrard, J.; et al. PD-L1 expression is regulated by both DNA methylation and NF- κ B during EMT signaling in non-small cell lung carcinoma. *Oncoimmunology* **2018**, *7*, e1423170. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Chouaib, S.; Janji, B.; Tittarelli, A.; Eggermont, A.; Thiery, J.P. Tumor plasticity interferes with anti-tumor immunity. *Crit. Rev. Immunol.* **2014**, *34*, 91–102. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Price, L.S.; Collard, J.G. Regulation of the cytoskeleton by Rho-family GTPases: Implications for tumour cell invasion. *Semin. Cancer Biol.* **2001**, *11*, 167–173. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Lozano, E.; Betson, M.; Braga, V.M.M. Tumor progression: Small GTPases and loss of cell–cell adhesion. *BioEssays* **2003**, *25*, 452–463. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Papiewska-Pajak, I.; Kowalska, M.A.; Boncela, J. Expression and activity of SNAIL transcription factor during Epithelial to Mesenchymal Transition (EMT) in cancer progression. *Postepy Hig. Med. Doswiadczalnej Online* **2016**, *70*, 968–980. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Nisticò, P.; Bissell, M.J.; Radisky, D.C. Epithelial-Mesenchymal Transition: General Principles and Pathological Relevance with Special Emphasis on the Role of Matrix Metalloproteinases. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2012**, *4*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Thiery, J.P.; Sleeman, J.P. Complex networks orchestrate epithelial–mesenchymal transitions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2006**, *7*, 131–142. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Thiery, J.P.; Aclouque, H.; Huang, R.Y.J.; Nieto, M.A. Epithelial-Mesenchymal Transitions in Development and Disease. *Cell* **2009**, *139*, 871–890. [[CrossRef](#)]
10. Sánchez-Tilló, E.; Liu, Y.; de Barrios, O.; Siles, L.; Fanlo, L.; Cuatrecasas, M.; Darling, D.S.; Dean, D.C.; Castells, A.; Postigo, A. EMT-activating transcription factors in cancer: Beyond EMT and tumor invasiveness. *Cell. Mol. Life Sci.* **2012**, *69*, 3429–3456. [[CrossRef](#)]
11. Lamouille, S.; Xu, J.; Derynck, R. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2014**, *15*, 178–196. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Waddington, C.H. The epigenotype. 1942. *Int. J. Epidemiol.* **2012**, *41*, 10–13. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Tam, W.L.; Weinberg, R.A. The epigenetics of epithelial-mesenchymal plasticity in cancer. *Nat. Med.* **2013**, *19*, 1438–1449. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Creighton, M.P.; Cheng, A.W.; Welstead, G.G.; Kooistra, T.; Carey, B.W.; Steine, E.J.; Hanna, J.; Lodato, M.A.; Frampton, G.M.; Sharp, P.A.; et al. Histone H3K27ac separates active from poised enhancers and predicts developmental state. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 21931–21936. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Rada-Iglesias, A.; Bajpai, R.; Swigut, T.; Brugmann, S.A.; Flynn, R.A.; Wysocka, J. A unique chromatin signature uncovers early developmental enhancers in humans. *Nature* **2011**, *470*, 279–283. [[CrossRef](#)]
16. Cedar, H.; Bergman, Y. Linking DNA methylation and histone modification: patterns and paradigms. *Nat. Rev. Genet.* **2009**, *10*, 295–304. [[CrossRef](#)]
17. Cao, R.; Zhang, Y. SUZ12 is required for both the histone methyltransferase activity and the silencing function of the EED-EZH2 complex. *Mol. Cell* **2004**, *15*, 57–67. [[CrossRef](#)]

18. Morey, L.; Helin, K. Polycomb group protein-mediated repression of transcription. *Trends Biochem. Sci.* **2010**, *35*, 323–332. [[CrossRef](#)]
19. Sing, A.; Pannell, D.; Karauskakis, A.; Sturgeon, K.; Djabali, M.; Ellis, J.; Lipshitz, H.D.; Cordes, S.P. A vertebrate Polycomb response element governs segmentation of the posterior hindbrain. *Cell* **2009**, *138*, 885–897. [[CrossRef](#)]
20. Ye, L.; Fan, Z.; Yu, B.; Chang, J.; Hezaimi, K.A.; Zhou, X.; Park, N.-H.; Wang, C.-Y. Histone Demethylases KDM4B and KDM6B Promotes Osteogenic Differentiation of Human MSCs. *Cell Stem Cell* **2012**, *11*, 50–61. [[CrossRef](#)]
21. De Santa, F.; Totaro, M.G.; Prosperini, E.; Notarbartolo, S.; Testa, G.; Natoli, G. The histone H3 lysine-27 demethylase Jmjd3 links inflammation to inhibition of polycomb-mediated gene silencing. *Cell* **2007**, *130*, 1083–1094. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Williams, K.; Christensen, J.; Rappilber, J.; Nielsen, A.L.; Johansen, J.V.; Helin, K. The Histone Lysine Demethylase JMJD3/KDM6B Is Recruited to p53 Bound Promoters and Enhancer Elements in a p53 Dependent Manner. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e96545. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Burchfield, J.S.; Li, Q.; Wang, H.Y.; Wang, R.-F. JMJD3 as an epigenetic regulator in development and disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2015**, *67*, 148–157. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Tan, J.; Yan, Y.; Wang, X.; Jiang, Y.; Xu, H.E. EZH2: Biology, disease, and structure-based drug discovery. *Acta Pharmacol. Sin.* **2014**, *35*, 161–174. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Perrigue, P.M.; Najbauer, J.; Barciszewski, J. Histone demethylase JMJD3 at the intersection of cellular senescence and cancer. *Biochim. Biophys. Acta Rev. Cancer* **2016**, *1865*, 237–244. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Daures, M.; Ngollo, M.; Judes, G.; Rifai, K.; Kemeny, J.-L.; Penault-Llorca, F.; Bignon, Y.-J.; Guy, L.; Bernard-Gallon, D. The JMJD3 Histone Demethylase and the EZH2 Histone Methyltransferase in Prostate Cancer. *Omics J. Integr. Biol.* **2016**, *20*, 123–125. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Daures, M.; Idrissou, M.; Judes, G.; Rifai, K.; Penault-Llorca, F.; Bignon, Y.-J.; Guy, L.; Bernard-Gallon, D. A new metabolic gene signature in prostate cancer regulated by JMJD3 and EZH2. *Oncotarget* **2018**, *9*, 23413–23425. [[CrossRef](#)]
28. Lee, H.W.; Choe, M. Expression of EZH2 in renal cell carcinoma as a novel prognostic marker. *Pathol. Int.* **2012**, *62*, 735–741. [[CrossRef](#)]
29. Xu, B.; Abourbih, S.; Sircar, K.; Kassouf, W.; Mansure, J.J.; Aprikian, A.; Tanguay, S.; Brimo, F. Enhancer of zeste homolog 2 expression is associated with metastasis and adverse clinical outcome in clear cell renal cell carcinoma: a comparative study and review of the literature. *Arch. Pathol. Lab. Med.* **2013**, *137*, 1326–1336. [[CrossRef](#)]
30. Yamada, A.; Fujii, S.; Daiko, H.; Nishimura, M.; Chiba, T.; Ochiai, A. Aberrant expression of EZH2 is associated with a poor outcome and P53 alteration in squamous cell carcinoma of the esophagus. *Int. J. Oncol.* **2011**, *38*, 345–353. [[CrossRef](#)]
31. Bachmann, I.M.; Halvorsen, O.J.; Collett, K.; Stefansson, I.M.; Straume, O.; Haukaas, S.A.; Salvesen, H.B.; Otte, A.P.; Akslen, L.A. EZH2 Expression Is Associated With High Proliferation Rate and Aggressive Tumor Subgroups in Cutaneous Melanoma and Cancers of the Endometrium, Prostate, and Breast. *J. Clin. Oncol.* **2006**, *24*, 268–273. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Behrens, C.; Solis, L.M.; Lin, H.; Yuan, P.; Tang, X.; Kadara, H.; Riquelme, E.; Galindo, H.; Moran, C.A.; Kalhor, N.; et al. EZH2 Protein Expression Associates With the Early Pathogenesis, Tumor Progression and Prognosis of Non-small Cell Lung Carcinoma. *Clin. Cancer Res.* **2013**, *19*, 6556–6565. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Crea, F.; Hurt, E.M.; Farrar, W.L. Clinical significance of Polycomb gene expression in brain tumors. *Mol. Cancer* **2010**, *9*, 265. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Kleer, C.G.; Cao, Q.; Varambally, S.; Shen, R.; Ota, I.; Tomlins, S.A.; Ghosh, D.; Sewalt, R.G.A.B.; Otte, A.P.; Hayes, D.F.; et al. EZH2 is a marker of aggressive breast cancer and promotes neoplastic transformation of breast epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 11606–11611. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Matsukawa, Y.; Semba, S.; Kato, H.; Ito, A.; Yanagihara, K.; Yokozaki, H. Expression of the enhancer of zeste homolog 2 is correlated with poor prognosis in human gastric cancer. *Cancer Sci.* **2006**, *97*, 484–491. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Rao, Z.-Y.; Cai, M.-Y.; Yang, G.-F.; He, L.-R.; Mai, S.-J.; Hua, W.-F.; Liao, Y.-J.; Deng, H.-X.; Chen, Y.-C.; Guan, X.-Y.; et al. EZH2 supports ovarian carcinoma cell invasion and/or metastasis via regulation of TGF-beta1 and is a predictor of outcome in ovarian carcinoma patients. *Carcinogenesis* **2010**, *31*, 1576–1583. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

37. Varambally, S.; Dhanasekaran, S.M.; Zhou, M.; Barrette, T.R.; Kumar-Sinha, C.; Sanda, M.G.; Ghosh, D.; Pienta, K.J.; Sewalt, R.G.A.B.; Otte, A.P.; et al. The polycomb group protein EZH2 is involved in progression of prostate cancer. *Nature* **2002**, *419*, 624–629. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Wang, H.; Albadine, R.; Magheli, A.; Guzzo, T.J.; Ball, M.W.; Hinz, S.; Schoenberg, M.P.; Netto, G.J.; Gonzalgo, M.L. Increased EZH2 protein expression is associated with invasive urothelial carcinoma of the bladder. *Urol. Oncol. Semin. Orig. Investig.* **2012**, *30*, 428–433. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Weikert, S.; Christoph, F.; Köllermann, J.; Müller, M.; Schrader, M.; Miller, K.; Krause, H. Expression levels of the EZH2 polycomb transcriptional repressor correlate with aggressiveness and invasive potential of bladder carcinomas. *Int. J. Mol. Med.* **2005**, *16*, 349–353. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Zingg, D.; Debbache, J.; Schaefer, S.M.; Tuncer, E.; Frommel, S.C.; Cheng, P.; Arenas-Ramirez, N.; Haeusel, J.; Zhang, Y.; Bonalli, M.; et al. The epigenetic modifier EZH2 controls melanoma growth and metastasis through silencing of distinct tumour suppressors. *Nat. Commun.* **2015**, *6*, 6051. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Wang, Y.; Hou, N.; Cheng, X.; Zhang, J.; Tan, X.; Zhang, C.; Tang, Y.; Teng, Y.; Yang, X. Ezh2 Acts as a Tumor Suppressor in Kras-driven Lung Adenocarcinoma. *Int. J. Biol. Sci.* **2017**, *13*, 652–659. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Muto, T.; Sashida, G.; Oshima, M.; Wendt, G.R.; Mochizuki-Kashio, M.; Nagata, Y.; Sanada, M.; Miyagi, S.; Saraya, A.; Kamio, A.; et al. Concurrent loss of Ezh2 and Tet2 cooperates in the pathogenesis of myelodysplastic disorders. *J. Exp. Med.* **2013**, *210*, 2627–2639. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Chang, J.W.; Gwak, S.Y.; Shim, G.-A.; Liu, L.; Lim, Y.C.; Kim, J.M.; Jung, M.G.; Koo, B.S. EZH2 is associated with poor prognosis in head-and-neck squamous cell carcinoma via regulating the epithelial-to-mesenchymal transition and chemosensitivity. *Oral Oncol.* **2016**, *52*, 66–74. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Cardenas, H.; Zhao, J.; Vieth, E.; Nephew, K.P.; Matei, D. EZH2 inhibition promotes epithelial-to-mesenchymal transition in ovarian cancer cells. *Oncotarget* **2016**, *7*, 84453–84467. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Korpai, M.; Lee, E.S.; Hu, G.; Kang, Y. The miR-200 Family Inhibits Epithelial-Mesenchymal Transition and Cancer Cell Migration by Direct Targeting of E-cadherin Transcriptional Repressors ZEB1 and ZEB2. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 14910–14914. [[CrossRef](#)]
46. Xia, H.; Zhang, W.; Zhang, B.; Zhao, Y.; Zhao, Y.; Li, S.; Liu, Y. miR-21 modulates the effect of EZH2 on the biological behavior of human lung cancer stem cells in vitro. *Oncotarget* **2017**, *8*, 85442–85451. [[CrossRef](#)]
47. Cakouros, D.; Isenmann, S.; Cooper, L.; Zannettino, A.; Anderson, P.; Glackin, C.; Gronthos, S. Twist-1 Induces Ezh2 Recruitment Regulating Histone Methylation along the Ink4A/Arf Locus in Mesenchymal Stem Cells. *Mol. Cell. Biol.* **2012**, *32*, 1433–1441. [[CrossRef](#)]
48. Zheng, M.; Jiang, Y.; Chen, W.; Li, K.; Liu, X.; Gao, S.; Feng, H.; Wang, S.; Jiang, J.; Ma, X.; et al. Snail and Slug collaborate on EMT and tumor metastasis through miR-101-mediated EZH2 axis in oral tongue squamous cell carcinoma. *Oncotarget* **2015**, *6*, 6797–6810. [[CrossRef](#)]
49. Tong, Z.-T.; Cai, M.-Y.; Wang, X.-G.; Kong, L.-L.; Mai, S.-J.; Liu, Y.-H.; Zhang, H.-B.; Liao, Y.-J.; Zheng, F.; Zhu, W.; et al. EZH2 supports nasopharyngeal carcinoma cell aggressiveness by forming a co-repressor complex with HDAC1/HDAC2 and Snail to inhibit E-cadherin. *Oncogene* **2012**, *31*, 583–594. [[CrossRef](#)]
50. Herranz, N.; Pasini, D.; Díaz, V.M.; Francí, C.; Gutierrez, A.; Dave, N.; Escrivà, M.; Hernandez-Muñoz, I.; Di Croce, L.; Helin, K.; et al. Polycomb Complex 2 Is Required for E-cadherin Repression by the Snail1 Transcription Factor. *Mol. Cell. Biol.* **2008**, *28*, 4772–4781. [[CrossRef](#)]
51. CHO, H.M.; JEON, H.S.; LEE, S.Y.; JEONG, K.J.; PARK, S.-Y.; LEE, H.Y.; LEE, J.U.; KIM, J.H.; KWON, S.J.; CHOI, E.; et al. microRNA-101 inhibits lung cancer invasion through the regulation of enhancer of zeste homolog 2. *Exp. Ther. Med.* **2011**, *2*, 963–967. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Meng, C.; Zhu, H.; Song, H.; Wang, Z.; Huang, G.; Li, D.; Ma, Z.; Ma, J.; Qin, Q.; Sun, X.; et al. Targets and molecular mechanisms of triptolide in cancer therapy. *Chin. J. Cancer Res.* **2014**, *26*, 622–626. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Tamgue, O.; Chai, C.-S.; Hao, L.; Zambé, J.-C.D.; Huang, W.-W.; Zhang, B.; Lei, M.; Wei, Y.-M. Triptolide inhibits histone methyltransferase EZH2 and modulates the expression of its target genes in prostate cancer cells. *Asian Pac. J. Cancer Prev. APJCP* **2013**, *14*, 5663–5669. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Martinho, O.; Pinto, F.; Granja, S.; Miranda-Gonçalves, V.; Moreira, M.A.R.; Ribeiro, L.F.J.; di Loreto, C.; Rosner, M.R.; Longatto-Filho, A.; Reis, R.M. RKIP Inhibition in Cervical Cancer Is Associated with Higher Tumor Aggressive Behavior and Resistance to Cisplatin Therapy. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e59104. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

55. Yousuf, S.; Duan, M.; Moen, E.L.; Cross-Knorr, S.; Brilliant, K.; Bonavida, B.; LaValle, T.; Yeung, K.C.; Al-Mulla, F.; Chin, E.; et al. Raf Kinase Inhibitor Protein (RKIP) Blocks Signal Transducer and Activator of Transcription 3 (STAT3) Activation in Breast and Prostate Cancer. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e92478. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Liu, H.; Li, P.; Li, B.; Sun, P.; Zhang, J.; Wang, B.; Jia, B. RKIP suppresses gastric cancer cell proliferation and invasion and enhances apoptosis regulated by microRNA-224. *Tumour Biol. J. Int. Soc. Oncodevelopmental Biol. Med.* **2014**, *35*, 10095–10103. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Ren, G.; Baritaki, S.; Marathe, H.; Feng, J.; Park, S.; Beach, S.; Bazeley, P.S.; Beshir, A.B.; Fenteany, G.; Mehra, R.; et al. Polycomb protein EZH2 regulates tumor invasion via the transcriptional repression of the metastasis suppressor RKIP in breast and prostate cancer. *Cancer Res.* **2012**, *72*, 3091–3104. [[CrossRef](#)]
58. Sato, T.; Kaneda, A.; Tsuji, S.; Isagawa, T.; Yamamoto, S.; Fujita, T.; Yamanaka, R.; Tanaka, Y.; Nukiwa, T.; Marquez, V.E.; et al. PRC2 overexpression and PRC2-target gene repression relating to poorer prognosis in small cell lung cancer. *Sci. Rep.* **2013**, *3*. [[CrossRef](#)]
59. Ougolkov, A.V.; Bilim, V.N.; Billadeau, D.D. Regulation of Pancreatic Tumor Cell Proliferation and Chemoresistance by the Histone Methyltransferase EZH2. *Clin. Cancer Res.* **2008**, *14*, 6790–6796. [[CrossRef](#)]
60. Fu, X.; Lin, J.; Qin, F.; Yang, Z.; Ding, Y.; Zhang, Y.; Han, L.; Zhu, X.; Zhang, Q. LncAPC drives Wnt/ β -catenin activation and liver TIC self-renewal through EZH2 mediated APC transcriptional inhibition. *Mol. Carcinog.* **2017**. [[CrossRef](#)]
61. Lee, S.T.; Li, Z.; Wu, Z.; Aau, M.; Guan, P.; Karuturi, R.K.M.; Liou, Y.C.; Yu, Q. Context-specific regulation of NF- κ B target gene expression by EZH2 in breast cancers. *Mol. Cell* **2011**, *43*, 798–810. [[CrossRef](#)]
62. Shi, B.; Liang, J.; Yang, X.; Wang, Y.; Zhao, Y.; Wu, H.; Sun, L.; Zhang, Y.; Chen, Y.; Li, R.; et al. Integration of Estrogen and Wnt Signaling Circuits by the Polycomb Group Protein EZH2 in Breast Cancer Cells. *Mol. Cell. Biol.* **2007**, *27*, 5105–5119. [[CrossRef](#)]
63. Tiwari, N.; Tiwari, V.K.; Waldmeier, L.; Balwiercz, P.J.; Arnold, P.; Pachkov, M.; Meyer-Schaller, N.; Schübeler, D.; van Nimwegen, E.; Christofori, G. Sox4 Is a Master Regulator of Epithelial-Mesenchymal Transition by Controlling Ezh2 Expression and Epigenetic Reprogramming. *Cancer Cell* **2013**, *23*, 768–783. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Fujii, S.; Tokita, K.; Wada, N.; Ito, K.; Yamauchi, C.; Ito, Y.; Ochiai, A. MEK–ERK pathway regulates EZH2 overexpression in association with aggressive breast cancer subtypes. *Oncogene* **2011**, *30*, 4118–4128. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Banerjee, R.; Mani, R.-S.; Russo, N.; Scanlon, C.S.; Tsodikov, A.; Jing, X.; Cao, Q.; Palanisamy, N.; Metwally, T.; Inglehart, R.C.; et al. The tumor suppressor gene rap1GAP is silenced by mir-101-mediated EZH2 overexpression in invasive squamous cell carcinoma. *Oncogene* **2011**, *30*, 4339–4349. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Smits, M.; Nilsson, J.; Mir, S.E.; van der Stoep, P.M.; Hulleman, E.; Niers, J.M.; de Witt Hamer, P.C.; Marquez, V.E.; Cloos, J.; Krichevsky, A.M.; et al. miR-101 is down-regulated in glioblastoma resulting in EZH2-induced proliferation, migration, and angiogenesis. *Oncotarget* **2011**, *1*, 710–720.
67. Wang, H.-J.; Ruan, H.-J.; He, X.-J.; Ma, Y.-Y.; Jiang, X.-T.; Xia, Y.-J.; Ye, Z.-Y.; Tao, H.-Q. MicroRNA-101 is down-regulated in gastric cancer and involved in cell migration and invasion. *Eur. J. Cancer* **2010**, *46*, 2295–2303. [[CrossRef](#)]
68. Cui, S.; Sun, Y.; Liu, Y.; Liu, C.; Wang, J.; Hao, G.; Sun, Q. MicroRNA-137 has a suppressive role in liver cancer via targeting EZH2. *Mol. Med. Rep.* **2017**, *16*, 9494–9502. [[CrossRef](#)]
69. Liu, X.; Wang, C.; Chen, Z.; Jin, Y.; Wang, Y.; Kolokythas, A.; Dai, Y.; Zhou, X. MicroRNA-138 suppresses epithelial-mesenchymal transition in squamous cell carcinoma cell lines. *Biochem. J.* **2011**, *440*, 23–31. [[CrossRef](#)]
70. Zheng, F.; Liao, Y.-J.; Cai, M.-Y.; Liu, Y.-H.; Liu, T.-H.; Chen, S.-P.; Bian, X.-W.; Guan, X.-Y.; Lin, M.C.; Zeng, Y.-X.; et al. The putative tumour suppressor microRNA-124 modulates hepatocellular carcinoma cell aggressiveness by repressing ROCK2 and EZH2. *Gut* **2012**, *61*, 278–289. [[CrossRef](#)]
71. Huang, S.-D.; Yuan, Y.; Zhuang, C.-W.; Li, B.-L.; Gong, D.-J.; Wang, S.-G.; Zeng, Z.-Y.; Cheng, H.-Z. MicroRNA-98 and microRNA-214 post-transcriptionally regulate enhancer of zeste homolog 2 and inhibit migration and invasion in human esophageal squamous cell carcinoma. *Mol. Cancer* **2012**, *11*, 51. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
72. Xia, H.; Ooi, L.L.P.J.; Hui, K.M. MiR-214 Targets β -Catenin Pathway to Suppress Invasion, Stem-Like Traits and Recurrence of Human Hepatocellular Carcinoma. *PLoS ONE* **2012**, *7*. [[CrossRef](#)]
73. Sun, J.; Tian, X.; Lu, S.-Q.; Hu, H.-B. MicroRNA-4465 suppresses tumor proliferation and metastasis in non-small cell lung cancer by directly targeting the oncogene EZH2. *Biomed. Pharmacother. Biomedecine Pharmacother.* **2017**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

74. Luo, C.; Tetteh, P.W.; Merz, P.R.; Dickes, E.; Abukiwan, A.; Hotz-Wagenblatt, A.; Holland-Cunz, S.; Sinnberg, T.; Schitteck, B.; Schadendorf, D.; et al. miR-137 Inhibits the Invasion of Melanoma Cells through Downregulation of Multiple Oncogenic Target Genes. *J. Invest. Dermatol.* **2013**, *133*, 768–775. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
75. Yap, T.A.; Winter, J.N.; Leonard, J.P.; Ribrag, V.; Constantinidou, A.; Giulino-Roth, L.; Michot, J.-M.; Khan, T.A.; Horner, T.; Carver, J.; et al. A Phase I Study of GSK2816126, an Enhancer of Zeste Homolog 2(EZH2) Inhibitor, in Patients (pts) with Relapsed/Refractory Diffuse Large B-Cell Lymphoma (DLBCL), Other Non-Hodgkin Lymphomas (NHL), Transformed Follicular Lymphoma (tFL), Solid Tumors and Multiple Myeloma (MM). *Blood* **2016**, *128*, 4203.
76. Tang, B.; Qi, G.; Tang, F.; Yuan, S.; Wang, Z.; Liang, X.; Li, B.; Yu, S.; Liu, J.; Huang, Q.; et al. Aberrant JMJD3 Expression Upregulates Slug to Promote Migration, Invasion, and Stem Cell–Like Behaviors in Hepatocellular Carcinoma. *Cancer Res.* **2016**, *76*, 6520–6532. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
77. Li, Q.; Hou, L.; Ding, G.; Li, Y.; Wang, J.; Qian, B.; Sun, J.; Wang, Q. KDM6B induces epithelial-mesenchymal transition and enhances clear cell renal cell carcinoma metastasis through the activation of SLUG. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* **2015**, *8*, 6334–6344.
78. Ohguchi, H.; Harada, T.; Sagawa, M.; Kikuchi, S.; Tai, Y.-T.; Richardson, P.G.; Hideshima, T.; Anderson, K.C. KDM6B modulates MAPK pathway mediating multiple myeloma cell growth and survival. *Leukemia* **2017**. [[CrossRef](#)]
79. Anderton, J.A.; Bose, S.; Vockerodt, M.; Vrzalikova, K.; Wei, W.; Kuo, M.; Helin, K.; Christensen, J.; Rowe, M.; Murray, P.G.; et al. The H3K27me3 demethylase, KDM6B, is induced by Epstein–Barr virus and over-expressed in Hodgkin’s Lymphoma. *Oncogene* **2011**, *30*, 2037–2043. [[CrossRef](#)]
80. Ramadoss, S.; Chen, X.; Wang, C.-Y. Histone demethylase KDM6B promotes epithelial-mesenchymal transition. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 44508–44517. [[CrossRef](#)]
81. Cregan, S.; Breslin, M.; Roche, G.; Wennstedt, S.; MacDonagh, L.; Albadri, C.; Gao, Y.; O’Byrne, K.J.; Cuffe, S.; Finn, S.P.; et al. Kdm6a and Kdm6b: Altered expression in malignant pleural mesothelioma. *Int. J. Oncol.* **2017**, *50*, 1044–1052. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
82. Liang, S.; Yao, Q.; Wei, D.; Liu, M.; Geng, F.; Wang, Q.; Wang, Y. KDM6B promotes ovarian cancer cell migration and invasion by induced transforming growth factor- β 1 expression. *J. Cell. Biochem.* **2019**, *120*, 493–506. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
83. Yamamoto, K.; Tateishi, K.; Kudo, Y.; Sato, T.; Yamamoto, S.; Miyabayashi, K.; Matsusaka, K.; Asaoka, Y.; Ijichi, H.; Hirata, Y.; et al. Loss of histone demethylase KDM6B enhances aggressiveness of pancreatic cancer through downregulation of C/EBP α . *Carcinogenesis* **2014**, *35*, 2404–2414. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
84. Pereira, F.; Barbáchano, A.; Silva, J.; Bonilla, F.; Campbell, M.J.; Muñoz, A.; Larriba, M.J. KDM6B/JMJD3 histone demethylase is induced by vitamin D and modulates its effects in colon cancer cells. *Hum. Mol. Genet.* **2011**, *20*, 4655–4665. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
85. Tokunaga, R.; Sakamoto, Y.; Nakagawa, S.; Miyake, K.; Izumi, D.; Kosumi, K.; Taki, K.; Higashi, T.; Imamura, Y.; Ishimoto, T.; et al. The Prognostic Significance of Histone Lysine Demethylase JMJD3/KDM6B in Colorectal Cancer. *Ann. Surg. Oncol.* **2016**, *23*, 678–685. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
86. Xia, M.; Yao, L.; Zhang, Q.; Wang, F.; Mei, H.; Guo, X.; Huang, W. Long noncoding RNA HOTAIR promotes metastasis of renal cell carcinoma by up-regulating histone H3K27 demethylase JMJD3. *Oncotarget* **2017**, *8*, 19795–19802. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
87. Liao, M.-Y.; Kuo, M.Y.-P.; Lu, T.-Y.; Wang, Y.-P.; Wu, H.-C. Generation of an anti-EpCAM antibody and epigenetic regulation of EpCAM in colorectal cancer. *Int. J. Oncol.* **2015**, *46*, 1788–1800. [[CrossRef](#)]
88. Zhou, F.Q.; Qi, Y.M.; Xu, H.; Wang, Q.Y.; Gao, X.S.; Guo, H.G. Expression of EpCAM and Wnt/ β -catenin in human colon cancer. *Genet. Mol. Res. GMR* **2015**, *14*, 4485–4494. [[CrossRef](#)]
89. Mo, J.; Wang, L.; Huang, X.; Lu, B.; Zou, C.; Wei, L.; Chu, J.; Eggers, P.K.; Chen, S.; Raston, C.L.; et al. Multifunctional nanoparticles for co-delivery of paclitaxel and carboplatin against ovarian cancer by inactivating the JMJD3-HER2 axis. *Nanoscale* **2017**, *9*, 13142–13152. [[CrossRef](#)]
90. Yan, N.; Xu, L.; Wu, X.; Zhang, L.; Fei, X.; Cao, Y.; Zhang, F. GSKJ4, an H3K27me3 demethylase inhibitor, effectively suppresses the breast cancer stem cells. *Exp. Cell Res.* **2017**, *359*, 405–414. [[CrossRef](#)]
91. Park, W.-Y.; Hong, B.-J.; Lee, J.; Choi, C.; Kim, M.-Y. H3K27 Demethylase JMJD3 Employs the NF- κ B and BMP Signaling Pathways to Modulate the Tumor Microenvironment and Promote Melanoma Progression and Metastasis. *Cancer Res.* **2016**, *76*, 161–170. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

92. Barradas, M.; Anderton, E.; Acosta, J.C.; Li, S.; Banito, A.; Rodriguez-Niedenführ, M.; Maertens, G.; Banck, M.; Zhou, M.-M.; Walsh, M.J.; et al. Histone demethylase JMJD3 contributes to epigenetic control of INK4a/ARF by oncogenic RAS. *Genes Dev.* **2009**, *23*, 1177–1182. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
93. Lin, C.; Ng, H.L.H.; Pan, W.; Chen, H.; Zhang, G.; Bian, Z.; Lu, A.; Yang, Z. Exploring Different Strategies for Efficient Delivery of Colorectal Cancer Therapy. *Int. J. Mol. Sci.* **2015**, *16*, 26936–26952. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
94. Agger, K.; Cloos, P.A.C.; Rudkjær, L.; Williams, K.; Andersen, G.; Christensen, J.; Helin, K. The H3K27me3 demethylase JMJD3 contributes to the activation of the INK4A–ARF locus in response to oncogene- and stress-induced senescence. *Genes Dev.* **2009**, *23*, 1171–1176. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
95. Ene, C.I.; Edwards, L.; Riddick, G.; Baysan, M.; Woolard, K.; Kotliarova, S.; Lai, C.; Belova, G.; Cam, M.; Walling, J.; et al. Histone Demethylase Jumonji D3 (JMJD3) as a Tumor Suppressor by Regulating p53 Protein Nuclear Stabilization. *PLoS ONE* **2012**, *7*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
96. Ma, J.; Wang, N.; Zhang, Y.; Wang, C.; Ge, T.; Jin, H.; Deng, X.; Huo, X.; Gu, D.; Ge, Z.; et al. KDM6B Elicits Cell Apoptosis by Promoting Nuclear Translocation of FOXO1 in Non-Small Cell Lung Cancer. *Cell. Physiol. Biochem.* **2015**, *37*, 201–213. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
97. Kruidenier, L.; Chung, C.; Cheng, Z.; Liddle, J.; Che, K.; Joberty, G.; Bantscheff, M.; Bountra, C.; Bridges, A.; Diallo, H.; et al. A selective jumonji H3K27 demethylase inhibitor modulates the proinflammatory macrophage response. *Nature* **2012**, *488*, 404–408. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
98. Ntziachristos, P.; Tsirigos, A.; Welstead, G.G.; Trimarchi, T.; Bakogianni, S.; Xu, L.; Loizou, E.; Holmfeldt, L.; Strikoudis, A.; King, B.; et al. Contrasting roles of histone 3 lysine 27 demethylases in acute lymphoblastic leukaemia. *Nature* **2014**, *514*, 513–517. [[CrossRef](#)]
99. Hashizume, R.; Andor, N.; Ihara, Y.; Lerner, R.; Gan, H.; Chen, X.; Fang, D.; Huang, X.; Tom, M.W.; Ngo, V.; et al. Pharmacologic inhibition of histone demethylation as a therapy for pediatric brainstem glioma. *Nat. Med.* **2014**, *20*, 1394–1396. [[CrossRef](#)]
100. Brach, D.; Johnston-Blackwell, D.; Drew, A.; Lingaraj, T.; Motwani, V.; Warholic, N.M.; Feldman, I.; Plescia, C.; Smith, J.J.; Copeland, R.A.; et al. EZH2 Inhibition by Tazemetostat Results in Altered Dependency on B-cell Activation Signaling in DLBCL. *Mol. Cancer Ther.* **2017**, *16*, 2586–2597. [[CrossRef](#)]



© 2018 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Annexe 3 : Publication 3, article publié dans *Cancers*

Article

EZH2 and KDM6B Expressions Are Associated with Specific Epigenetic Signatures during EMT in Non Small Cell Lung Carcinomas

Camille Lachat ¹, Diane Bruyère ², Amandine Etcheverry ^{3,4,5,6}, Marc Aubry ^{3,4,5,6}, Jean Mosser ^{3,4,5,6}, Walid Warda ¹, Michaël Herfs ², Elodie Hendrick ², Christophe Ferrand ¹, Christophe Borg ¹, Régis Delage-Mourroux ¹, Jean-Paul Feugeas ¹, Michaël Guittaut ^{1,7}, Eric Hervouet ^{1,7,8,*} and Paul Peixoto ^{1,8,*}

¹ UMR1098, RIGHT, Université Bourgogne Franche-Comté, INSERM, EFS BFC, F-25000 Besançon, France; camille.lachat@edu.univ-fcomte.fr (C.L.); walid.warda@univ-fcomte.fr (W.W.); christophe.ferrand@univ-fcomte.fr (C.F.); Christophe.BORG@efs.sante.fr (C.B.); regis.delage-mourroux@univ-fcomte.fr (R.D.-M.); jean-paul.feugeas@univ-fcomte.fr (J.-P.F.); michael.guittaut@univ-fcomte.fr (M.G.)

² Laboratory of Experimental Pathology, GIGA-Cancer, University of Liege, 4000 Liege, Belgium; Diane.Bruyere@uliege.be (D.B.); m.herfs@uliege.be (M.H.); E.Hendrick@uliege.be (E.H.)

³ Service de Génétique Moléculaire et Génomique, CHU Rennes, F-35033 Rennes, France; amandine.etccheverry@univ-rennes1.fr (A.E.); marc.aubry@univ-rennes1.fr (M.A.); Jean.Mosser@univ-rennes1.fr (J.M.)

⁴ Plate-Forme Génomique Environnementale et Humaine Biosit, Université Rennes1, F-35043 Rennes, France

⁵ UMR 6290, CNRS, Institut de Génétique et Développement de Rennes (IGDR), F-35043 Rennes, France

⁶ UMS 3480 Biosit, Faculté de Médecine, Université Rennes1, UEB, F-35043 Rennes, France

⁷ DimaCell Platform, Université Bourgogne Franche-Comté, F-25000 Besançon, France

⁸ EPIGENExp (EPIgenetics and GENE EXPression Technical Platform), Université Bourgogne Franche-Comté, F-25000 Besançon, France

* Correspondence: eric.hervouet@univ-fcomte.fr (E.H.); paul.peixoto@univ-fcomte.fr (P.P.)

Received: 28 October 2020; Accepted: 28 November 2020; Published: 5 December 2020



Simple Summary: Epithelial to Mesenchymal Transition (EMT) has been linked to multiple cancer features including invasion, metastasis, immune escape, and treatment resistance, and has therefore become a promising target mechanism for improving cancer treatment. Since it has also been described that EMT can be reversed by modulating its epigenetic regulation, our study was designed to decipher this epigenetic regulation of EMT, and more particularly its regulation by the H3K27me3 (trimethylation of lysine 27 of H3) mark and the two main enzymes which modulate it: EZH2 and KDM6B. Our results showed that these two enzymes present paradoxical roles during EMT in two cancer cell lines since both overexpression and inhibition of these two proteins led to the induction of EMT. We then identified three new target genes of EZH2 or KDM6B during EMT (*INHBB*, *WNT5B* and *ADAMTS6*) and demonstrated that the modulation of expression of these genes modulated the invasion capacities of the cells. These findings are therefore promising to prevent cancer cells from acquiring an invasive phenotype via the modulation of these new biomarkers of EMT regulated at the epigenetic level.

Abstract: The role of Epigenetics in Epithelial Mesenchymal Transition (EMT) has recently emerged. Two epigenetic enzymes with paradoxical roles have previously been associated to EMT, EZH2 (Enhancer of Zeste 2 Polycomb Repressive Complex 2 (PRC2) Subunit), a lysine methyltransferase able to add the H3K27me3 mark, and the histone demethylase KDM6B (Lysine Demethylase 6B), which can remove the H3K27me3 mark. Nevertheless, it still remains unclear how these enzymes, with apparent opposite activities, could both promote EMT. In this study, we evaluated the function of these two enzymes using an EMT-inducible model, the lung cancer A549 cell line.

ChIP-seq coupled with transcriptomic analysis showed that EZH2 and KDM6B were able to target and modulate the expression of different genes during EMT. Based on this analysis, we described INHBB, WTN5B, and ADAMTS6 as new EMT markers regulated by epigenetic modifications and directly implicated in EMT induction.

Keywords: epigenetics; epithelial mesenchymal transition; H3K27me3; EZH2; KDM6B

1. Introduction

The crucial role of Epigenetics in Epithelial Mesenchymal Transition (EMT) has recently emerged. Indeed, type III EMT, which has been linked to metastasis and tumor immune escape [1], two hallmarks of cancer, is a reversible process, conferring migration and invasive abilities to cancer cells [2]. EMT is a conserved cellular mechanism which leads to the transition from an epithelial phenotype to a mesenchymal one [3]. The loss of E-Cadherin, together with an increase in Vimentin expression, is a feature of EMT. Different biological or chemical molecules such as TGF- β , hypoxia, cytokines or growth factors are able to induce EMT in specific models [4–12]. This process is accompanied by various modifications of the expression of a wide variety of additional epithelial/mesenchymal markers, depending on the EMT model and the inducer used. These modifications are controlled by specific transcriptional factors, so-called EMT-TFs, belonging to the SNAIL, ZEB (Zinc Finger E-Box Binding Homeobox) and TWIST families.

Epigenetic marks, whose roles have been largely demonstrated in cancers, are reversible and control gene expression. It has, for example, been demonstrated that the hypermethylation of the *CDH1* (*Cadherin 1*) promoter is involved in the decrease in expression of the gene during EMT [13]. On the contrary, DNA demethylation has been shown to induce the upregulation of the microRNA, *miR-200c*, and the subsequent inhibition of EMT in clear cell renal cell carcinoma [14]. Similarly, the demethylation of the *PD-L1* (*Programmed Cell Death 1 Ligand 1*) promoter in TGF β -induced EMT cell models favored the expression of the immune checkpoint inhibitor PD-L1 and led to the inhibition of immune response against cancer cells during EMT [15]. Interestingly, two epigenetic enzymes with paradoxical roles have previously been associated to EMT: (i) the histone methyl transferase (HMT) EZH2 (Enhancer of Zeste 2 Polycomb Repressive Complex 2 (PRC2) Subunit also called ENX-1 or KMT6 for Lysine methyltransferase 6) which is able to add the H3K27me3 mark and, (ii) the histone demethylase (HDM) KDM6B (Lysine Demethylase 6B also called JMJD3) which is able to remove the H3K27me3 mark. In previous studies, it has been shown that the *miR101*-dependent inhibition of expression of EZH2 has been associated with EMT and poor prognosis in oral tongue squamous cell carcinoma [16]. EZH2 expression has also been correlated to invasiveness in laryngeal or breast carcinoma [17,18]. Similarly, KDM6B, although far less studied, has been positively associated with EMT or metastasis in renal cancer or hepatocarcinoma [19,20]. Although these paradoxical roles have been recently discussed [21], it remains unclear how these proteins, with apparent opposite activities, could both promote EMT and/or cancer aggressiveness. To address this question, and in order to better understand the respective roles of EZH2 and KDM6B during EMT, we decided, for the first time, to simultaneously study these proteins in *in vivo* and *in vitro* models.

2. Results

2.1. Both EZH2 and KDM6B Are Overexpressed during EMT in Patients with NSCLCs

Since EZH2 and KDM6B have been both associated with EMT and aggressiveness in independent cancer models, we first analyzed their expressions in NSCLCs (Non Small Cell Lung Carcinomas). FFPE (Formalin-Fixed Paraffin-Embedded) biopsies were sorted in EMT- and EMT+ groups according to their Vimentin status (Figure 1), as already described in Reference [15]. An increase in both EZH2 and

KDM6B stainings was observed in EMT+ tumors compared to EMT-tumors (Figure 1A–C). Increases in the mRNA level of EZH2 and KDM6B are also obtained using an EMT-inducible A549 cell model (using both TGF β /TNF α) (Figure S1A). Moreover, these expressions were also strongly correlated (Figure 1D), independently of the Vimentin status (Figure S1B). These results were confirmed using data issued from the retrospective KM-plotter database with JetSet best probes [22]. We showed that lung cancer patients presenting high *EZH2* mRNA levels or high *KDM6B* mRNA levels presented a significantly higher risk of early death ($p = 3.4 \times 10^{-5}$ and $p = 4.8 \times 10^{-5}$) compared to patients with lower *EZH2* or *KDM6B* mRNA levels (Figure 1E–G). This risk was further discriminated ($p = 1.8 \times 10^{-5}$) when patients were compared in regard to the mean expression of *EZH2* and *KDM6B* (high score: high mean *EZH2/KDM6B* vs. low score: low mean *EZH2/KDM6B*).

2.2. Effects of Overexpression of EZH2 and KDM6B on EMT Induction

Next, we determined, using an EMT-inducible A549 cell model (using both TGF β /TNF α), if the overexpression of EZH2 (pMSCV-EZH2-IRES-GFP) or KDM6B (pMSCV-JMJD3 expressing an HA tag) was able to induce EMT (Figure 2). Overexpression of both proteins in stable transfected cells (Figure 2A, Figure S2) did induce morphological changes characterized by a decrease in cell–cell adhesion and an increase in cell length (Figure 2B). Increased cell length was confirmed using phalloidin-rodhamin staining (Figure 2C). EZH2 and KDM6B overexpression also induced an increase in EMT markers at the mRNA level (Figure 2D) characterized by *VIMENTIN*, *ADAM19* or *MMP2* upregulation and a *CDH1* decrease, as already described using a TGF β /TNF α treatment. These effects were accentuated in cells overexpressing EZH2. Western-blot experiments show a significant Vimentin increase in cells overexpressing EZH2 and a decrease in E-Cadherin expression in cells overexpressing both EZH2 or KDM6B (Figure 2E). In order to clarify the role of these proteins on cancer phenotypes, we performed migration and invasion assays (Figure 2F–G). As expected, EZH2 and KDM6B overexpression increased these EMT-related phenotypes. To validate the role of EZH2 and KDM6B on EMT induction, we also performed transient transfection of HA-EZH2 and HA-KDM6B (Figure S3) and observed the same increase in EMT markers compared to the levels quantified in the untransfected control cells.

2.3. Inhibition of EZH2 and KDM6B Activities Regulated EMT Signaling

We next decided to clarify the function of these enzymes during EMT using specific inhibitors of EZH2 and KDM6B (EZH2i: GSK343 and KDM6Bi: GSKJ4) in EMT cell models. As expected, the inhibitor EZH2i decreased H3K27me3 levels in A549 cells, but according to the data found in the literature [23], we could not observe a significant increase in H3K27me3 signals in these cells when we used the inhibitor KDM6Bi (Figure 3A and Figure S4A). Inhibition of KDM6B activity alone, using the specific inhibitor, led to a slight induction of the mesenchymal phenotype (Figure 3B). Indeed, we observed an increase in cell length following an EZH2i or KDM6Bi/TGF β /TNF α co-treatment compared to the TGF β /TNF α treatment alone in the A549 cell model (Figure 3C). We next targeted molecular markers to confirm these results. Using RT-qPCR, WB, IF, or flow cytometry, we showed that KDM6Bi induced Vimentin expression (Figure 3D,E and Figure S4). Moreover, a decrease in E-Cadherin and an increase in N-Cadherin stainings were observed after a KDM6Bi treatment in the EMT-induced A549 cell model (Figure 3F,G). Since GSK343 is more specific to EZH2 than to EZH1 (about 60-fold and 1000-fold for others methyltransferases), we next used the chemical inhibitor UNC1999 (EZH1/2i) which targets both enzymes, EZH1 and EZH2. This inhibitor EZH1/2i decreased H3K27me3 levels and promoted Vimentin and N-Cadherin stainings (Figure S5). A phalloidin-rodhamin staining confirmed an increase in cell lengthening following the inhibition of both EZH1 and 2 activities. We finally analyzed whether EZH2i and KDM6Bi could also modulate EMT-related phenotypes, such as cell migration and invasiveness. As expected, KDM6Bi potentiated both cell migration and invasion in EMT-induced A549 cells by TGF β /TNF α , whereas EZH2i did not (Figure 3H,I).

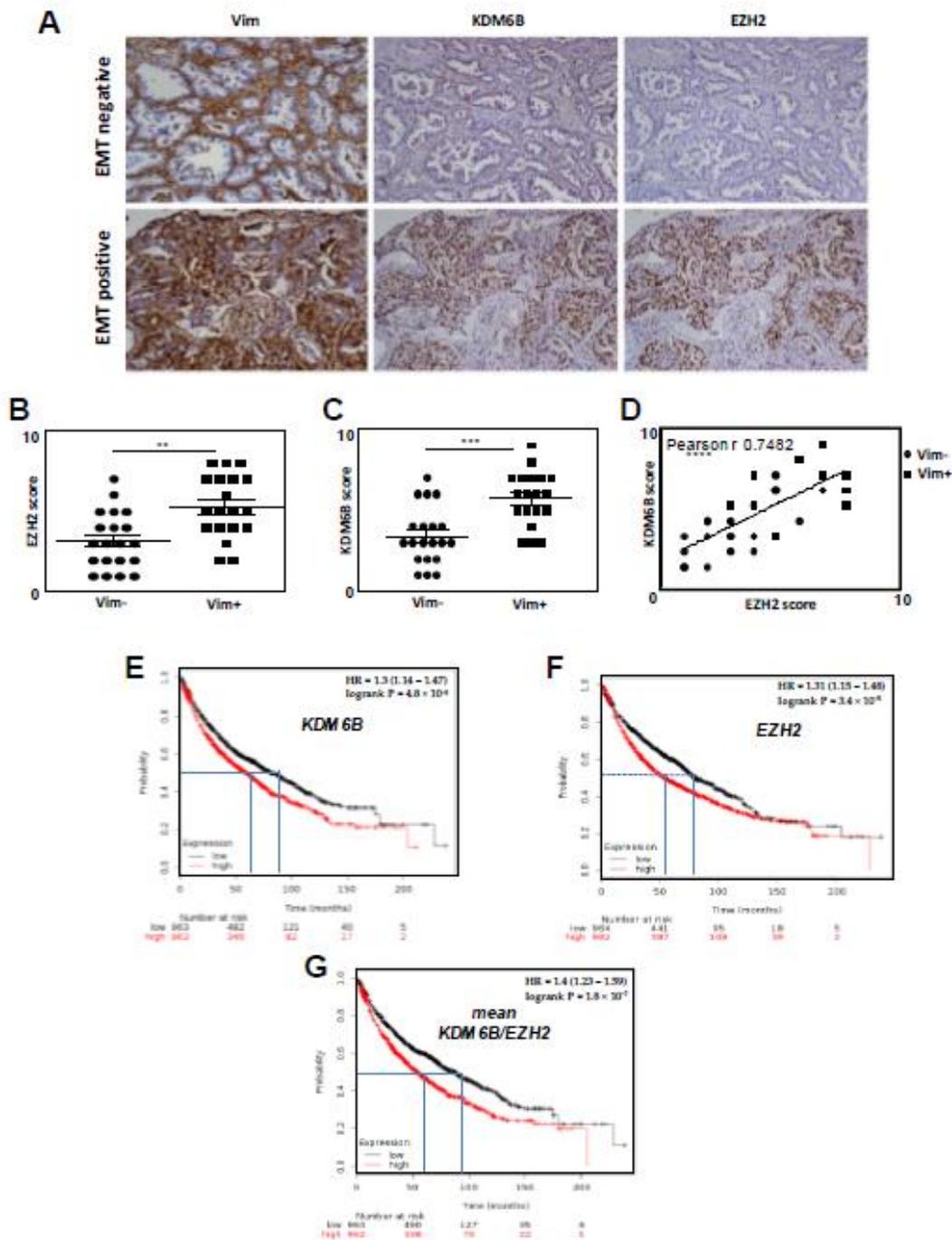


Figure 1. EZH2 and KDM6B expressions are correlated with EMT in NSCLC. (A) Representative IHC stainings of Vimentin (Vim, high score: EMT positive/low score: EMT negative), KDM6B, and EZH2 in 30 NSCLC (magnification $\times 100$). (B) Quantification of the IHC EZH2 score regarding the EMT status. (C) Quantification of the IHC KDM6B score regarding the EMT status. (D) The correlation between EZH2 and KDM6B scores in NSCLC. (E) The KM-plotter for *KDM6B* expression showing the survival curves of patients with lung cancer classified in high expression (red) or low expression (black) groups. (F) The KM-plotter for *EZH2* expression. (G) The KM-plotter for the mean of *EZH2/KDM6B* expression. ** = $0.005 < p < 0.01$; *** = $0.001 < p < 0.005$; **** = $p < 0.001$.

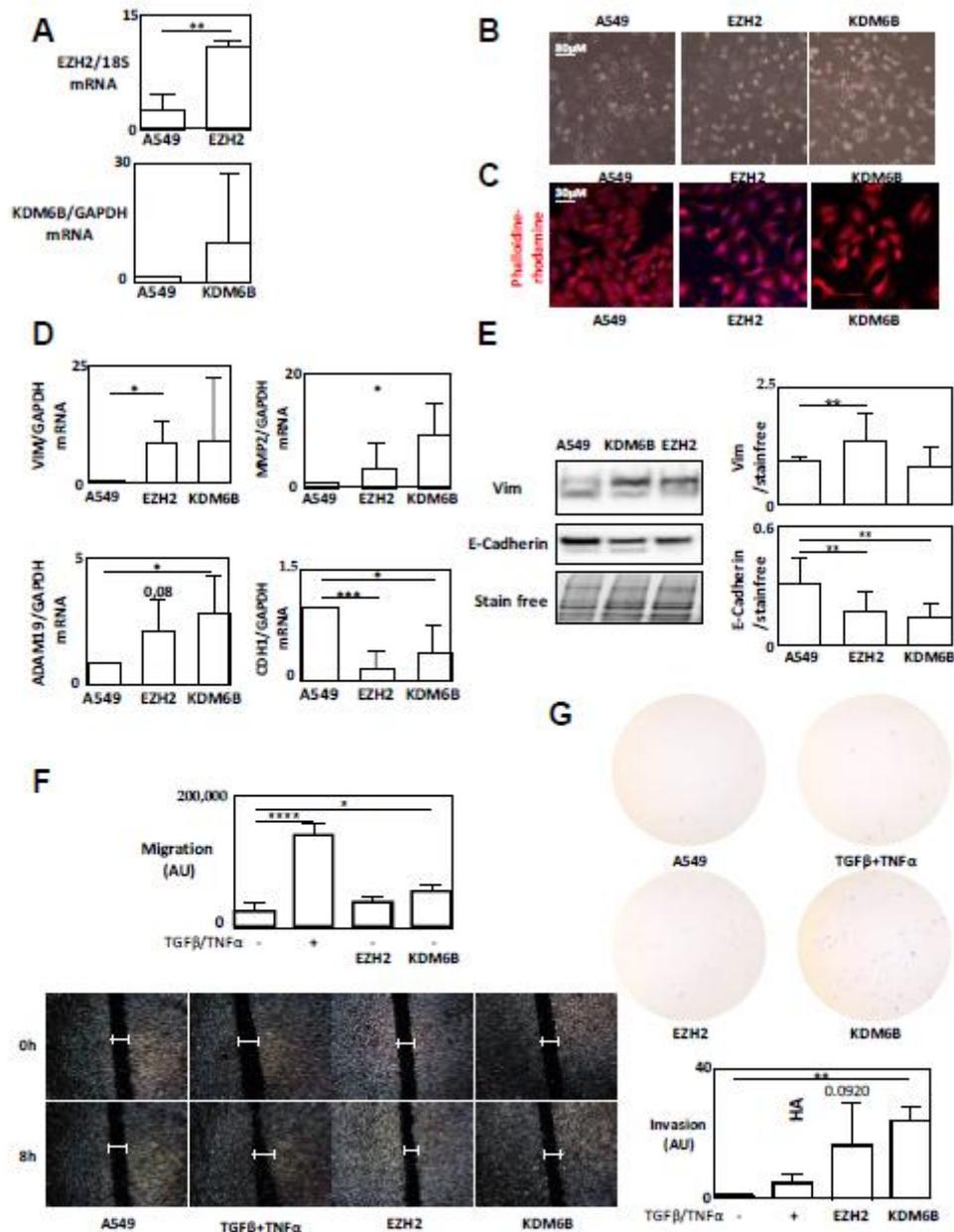


Figure 2. Overexpression of EZH2 and KDM6B induced EMT. (A) mRNA levels of *EZH2* and *KDM6B* after stable transfection of A549 with EZH2- or HA-KDM6B-expressing vectors. (B) Representative images showing the phenotype of A549 WT cells and A549 cells overexpressing EZH2 or KDM6B (EVOS™ 10× Objective). (C) Phalloidin-rhodamine staining of A549 WT or A549 cells overexpressing EZH2 or KDM6B. (D) Quantification of *Vimentin*, *CDH1*, *ADAM19*, and *MMP2* expression levels using qRT-PCR in A549 cells treated with TGFβ/TNFα or in cells overexpressing EZH2 or KDM6B. (E) Western-blot analysis showing a decrease in E-Cadherin expression in A549 cells overexpressing KDM6B. (F) Wound healing experiments in A549 cells treated with TGFβ/TNFα or in cells overexpressing EZH2 or KDM6B and the relative quantification of the effects observed (EVOS™ 4× Objective). (G) Invasion tests in A549 cells treated with TGFβ/TNFα or in cells overexpressing EZH2 or KDM6B (EVOS™ 4× Objective). * = 0.01 < p < 0.05; ** = 0.005 < p < 0.01; *** = 0.001 < p < 0.005; **** = p < 0.001.

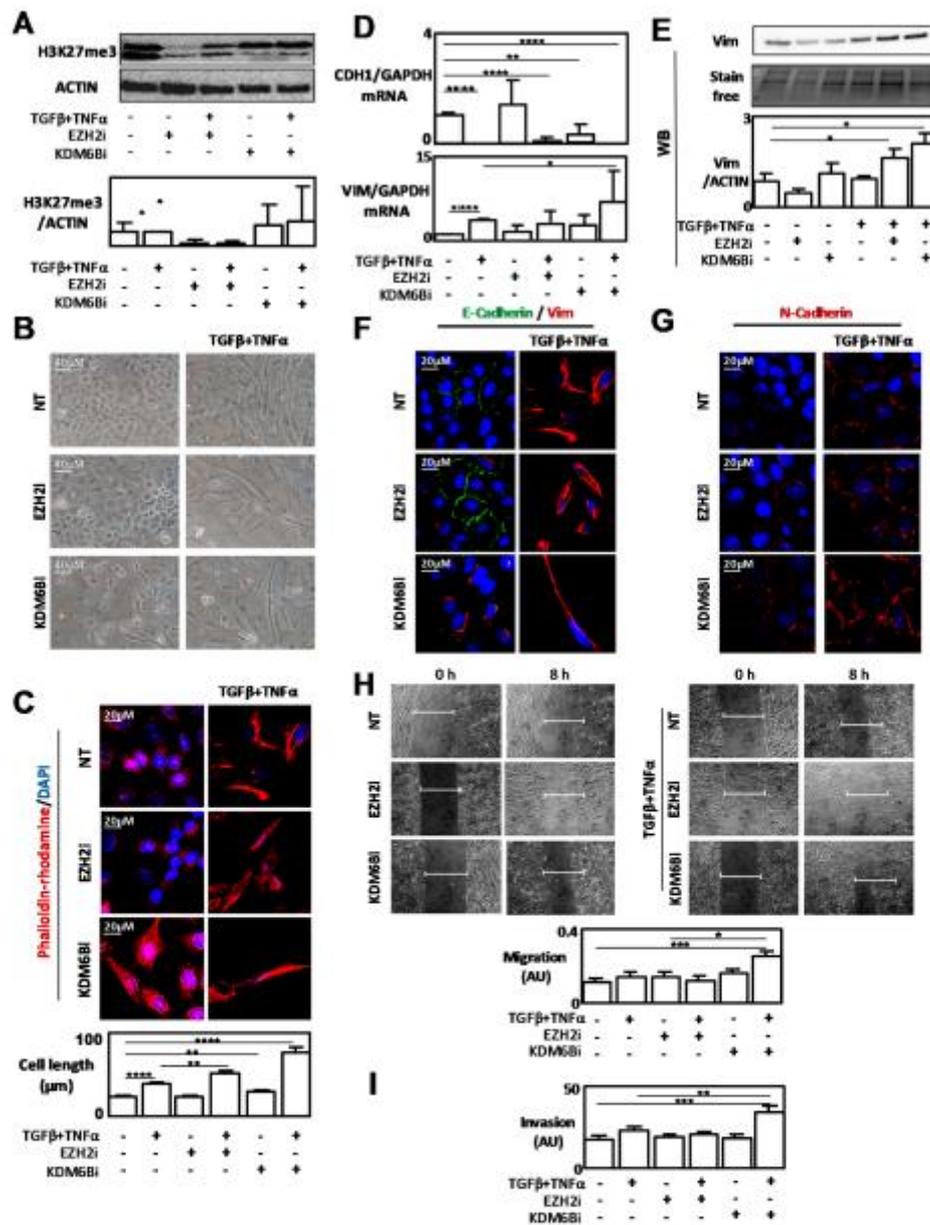


Figure 3. Inhibition of EZH2 and KDM6B activities using specific inhibitors favored EMT-like phenotypes. (A) Quantification of H3K27me3 levels using WB in A549 cells treated with TGFβ/TNFα and/or EZH2i. (B) Representative phenotype of A549 cells treated with TGFβ/TNFα and/or EZH2i or KDM6Bi (EVOS™ 10× Objective). (C) Phalloidin-rhodamine staining of A549 cells treated with TGFβ/TNFα and/or EZH2i or KDM6Bi. (D) Quantification of *CDH1* and *Vimentin* expression levels using RT-qPCR in A549 cells treated with TGFβ/TNFα and/or EZH2i or KDM6Bi. (E) Quantification of Vimentin expression using WB in A549 cells treated with TGFβ/TNFα and/or EZH2i or GSKJ4. (F) IF staining of E-Cadherin (green) and Vimentin (red) in A549 cells treated with TGFβ/TNFα and/or EZH2i or KDM6Bi. (G) IF staining of N-Cadherin (red) in A549 cells treated with TGFβ/TNFα and/or EZH2i or KDM6Bi. (H) Wound healing experiments in A549 cells treated with TGFβ/TNFα and/or EZH2i or KDM6Bi and relative quantifications (EVOS™ 4× Objective). (I) Invasion tests in A549 cells treated with TGFβ/TNFα and/or EZH2i or KDM6Bi. * = 0.01 < p < 0.05; ** = 0.005 < p < 0.01; *** = 0.001 < p < 0.005; **** = p < 0.001.

EZH2 and *KDM6B*_CRISPR/Cas9 A549 models also confirmed that the invalidation of both enzymes favored EMT phenotypes (Figure S6). However, in agreement with the results obtained with the chemical inhibitors, CRISPR/Cas9_ *KDM6B* cells presented a more detectable mesenchymal phenotype than CRISPR/Cas9_ *EZH2* cells, with a higher expression of Vimentin and a significant increase in cell migration ability compared to control cells.

To confirm that our results obtained using the A549 model induced in EMT using TGF β /TNF α were not dependent of the cell line, or the inducer, we also used a second model of EMT induction, the MDA-MB-468 cells in which EMT was induced using EGF. In this second model, overexpression of *EZH2* or *KDM6B* was also associated with a higher Vimentin staining. Moreover, *EZH2i*, and *KDM6Bi* at a lower level, promoted EMT-related phenotypes in this second model, as well (Figure S7).

2.4. The Genes Targeted by *EZH2* and *KDM6B* during EMT Were Different

Since we demonstrated that both enzymes were able to promote EMT, even if they present an apparent opposite activity, we speculated that these surprising results might be linked to the targeting of different genes during EMT. So, to answer this question, we performed ChIP-seq (chromatin immunoprecipitation-sequencing) experiments targeting *EZH2*, *KDM6B*, and the H3K27me3 mark in A549 cells treated with TGF β /TNF α . We then sorted 9493 loci presenting an enrichment of both *EZH2* and the H3K27me3 mark and 13,122 loci associated with an enrichment of only *KDM6B* (Figure 4A). As expected, the number of loci targeted by both *EZH2* and *KDM6B* was very low (<3%), suggesting that the recruitment of these enzymes was indeed exclusive. Overlap and downstream positions of these loci were then crossed with previous transcriptome results obtained in our laboratory [24], and we then identified 169 down-regulated genes during EMT which might be controlled by H3K27me3 methylation in an *EZH2* manner, and 566 up-regulated genes during EMT which could be regulated by *KDM6B* (Figure 4A). A list of the 40 most down-regulated genes presenting an increased enrichment of both *EZH2* and the H3K27me3 mark on the gene or the promoter was summarized in Table 1. Similarly, the 40 most up-regulated genes presenting an increased enrichment of *KDM6B* alone was summarized in Table 2. Amongst these genes, many have been previously associated with EMT features, such as adhesion, migration, invasion, cytoskeleton remodeling, or differentiation.

Interestingly, our ChIP-seq results revealed enrichment of *KDM6B* on the *SNAIL1*, *ADAM19*, (*ADAM Metallopeptidase Domain 19*), and *MMP9* genes, but not on the *ZEB-1* gene. Moreover, an increase in *SNAIL1*, *ADAM19*, and *MMP9* expression was observed when A549 cells were treated with *EZH2i* or *KDM6Bi* combined with a TGF β /TNF α treatment compared to a TGF β /TNF α treatment alone (Figure 4B). But, similarly to our previous results, the induction of expression was higher when we used *KDM6Bi* rather than *EZH2i*. As expected, the expression of the *ZEB-1* gene was not modified by *EZH2i* or *KDM6Bi*, the two enzymes being unable to bind to this core promoter. We then confirmed, using single ChIP experiments, that a decrease in the H3K27me3 mark, which was potentiated by *EZH2i*, was observed on *ADAM19* and *MMP9* promoters in cells treated with TGF β /TNF α (Figure 4C).

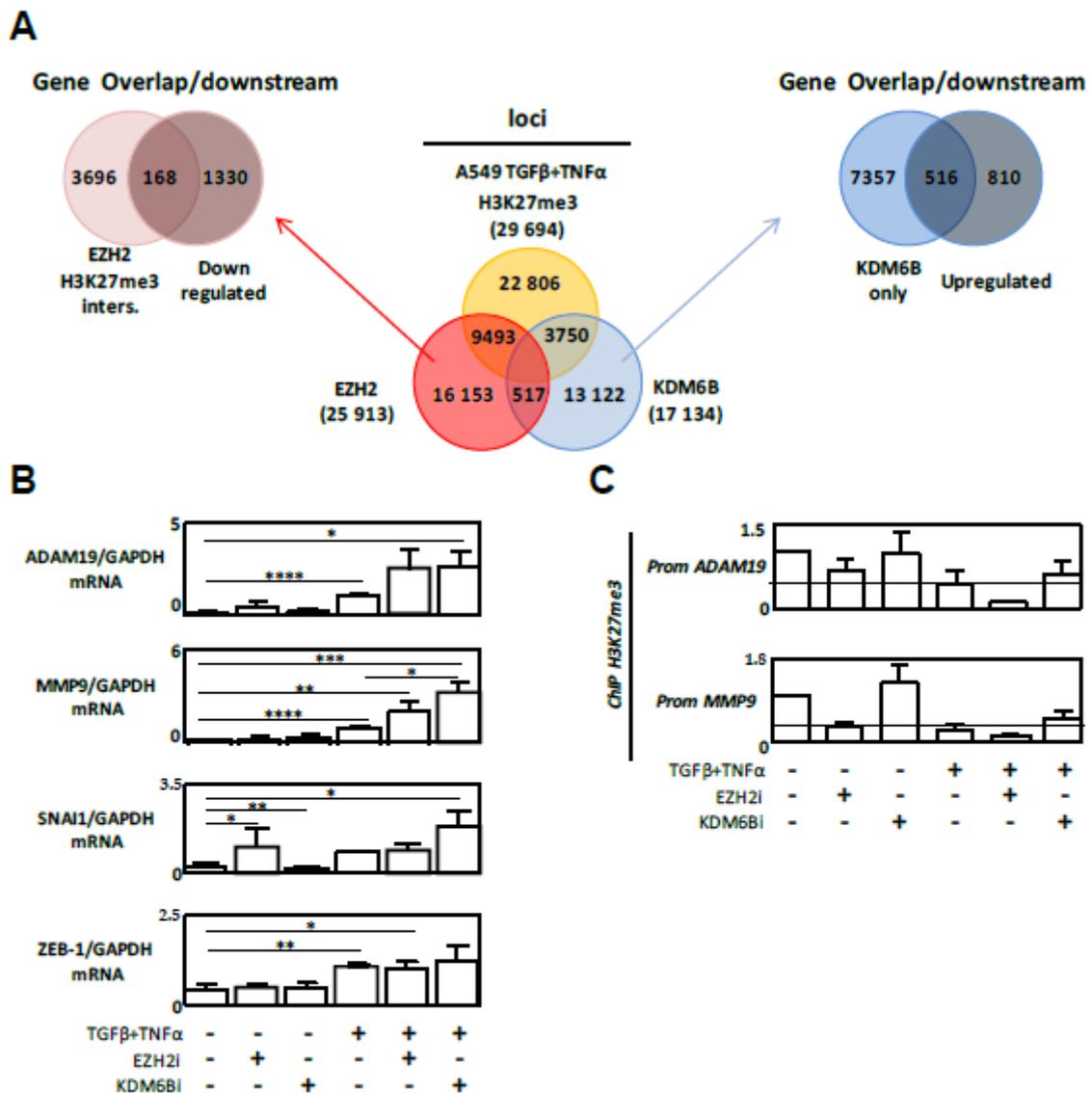


Figure 4. EZH2 and KDM6B regulated different genes during EMT. (A) Middle: Venn diagrams showing common and different DNA loci occupied by H3K27me3, EZH2, and KDM6B, and obtained following ChIP-seq experiments in A549 cells treated with TGFβ/TNFα. Left: A Venn diagram showing the intersection between genes co-occupied by H3K27me3 and EZH2 and down-regulated genes. Right: A Venn diagram showing the intersection between genes occupied by KDM6B alone and up-regulated genes. (B) Quantification of *ADAM19*, *MMP9*, *SNAI-1*, and *ZEB-1* expression levels using RT-qPCR in A549 cells treated with TGFβ/TNFα and/or EZH2i or KDM6Bi. (C) Quantification of the H3K27me3 content on *ADAM19*, *MMP9* using ChIP in A549 cells treated with TGFβ/TNFα and/or EZH2i or TGFβ/TNFα and/or KDM6Bi, respectively. * = 0.01 < p < 0.05; ** = 0.005 < p < 0.01; *** = 0.001 < p < 0.005; **** = p < 0.001.

Table 1. A list of 40 most down-regulated genes in EMT associated with the H3K27me3 mark and EZH2 recruitment. Genes previously associated with EMT are underlined.

Overlap H3K27me3/EZH2 (ALIAS)	Full Name	Pathway	Downregulated FC
INHBB	Inhibin Beta B Subunit	Inflammation	-31.8
ANK3	Ankyrin 3	cytoskeleton	-25
CABLES1	Cdk5 And Abl Enzyme Substrate 1	cell cycle	-24
GREM2	Gremlin 2, DAN Family BMP Antagonist	differentiation	-12
VAV3	Vav Guanine Nucleotide Exchange Factor 3	cytoskeleton/signaling	-11.7
TC2N	Tandem C2 Domains, Nuclear		-11.5
HR	HR, Lysine Demethylase And Nuclear Receptor Corepressor	EPIGENETICS	-10.7
CPLX2	Complexin 2	vesicle Trafficking	-10.5
COBL	Cordon-Bleu WH2 Repeat Protein	cytoskeleton	-9.5
SLC5A11	Solute Carrier Family 5 Member 11	metabolism	-9.3
C9orf3	Chromosome 9 Open Reading Frame 3	M1 zinc aminopeptidase family	-8.4
CEACAM7	Carcinoembryonic Antigen Related Cell Adhesion Molecule 7	adhesion	-8.4
ABLIM1	Actin-Binding LIM Protein Family Member 1	cytoskeleton	-8
DBP	D-Box Binding PAR BZIP Transcription Factor	TF	-7.8
WNT6			-6.7
ANK1	Ankyrin 1	cytoskeleton	-6.5
EFCAB3	EF-Hand Calcium Binding Domain 3	calcium	-6.5
CXXC5	CXXC Finger Protein 5	TF	-6.1
FGFR3	Fibroblast Growth Factor Receptor 3	signaling	-6
MYO5B	Myosin VB	vesicle Trafficking	-6
CACNA1G	Calcium Voltage-Gated Channel Subunit Alpha1 G	calcium channel	-5.6

Table 1. Cont.

Overlap H3K27me3/EZH2 (ALIASE)	Full Name	Pathway	Downregulated FC
PMP22	Peripheral Myelin Protein 22	neurones	-5.4
PREX1	Phosphatidylinositol-3,4,5-Trisphosphate Dependent Rac Exchange Factor 1	signaling	-5.4
ANKRD33B	Ankyrin Repeat Domain 33B	cytoskeleton	-4.8
PAPLN	Papilin, Proteoglycan Like Sulfated Glycoprotein	peptidase	-4.6
C20orf196	Chromosome 20 Open Reading Frame 196		-4.5
NR5A2	Nuclear Receptor Subfamily 5 Group A Member 2	TF	-4.4
NRG2	Neuregulin 2	differentiation	-4.4
FOXA2	Forkhead Box A2	TF	-4.2
SYT12	Synaptotagmin 12	calcium/neurones/vesicle Trafficking	-4.2
LRP2	LDL Receptor Related Protein 2	Epithelial/signaling	-4.1
NTRK3	Neurotrophic Receptor Tyrosine Kinase 3	differentiation/signaling	-4.1
CXCL16	C-X-C Motif Chemokine Ligand 16	Chemokine	-3.9
EGLN3	Egl-9 Family Hypoxia Inducible Factor 3	hydroxylase	-3.9
KIAA1217			-3.9
CEBPA	CCAAT/Enhancer Binding Protein Alpha	TF	-3.8
HOXC13	Homeobox C13	TF	-3.8
NR2F2	Nuclear Receptor Subfamily 2 Group F Member 2	TF	-3.8
RASSF5	Ras Association Domain Family Member 5	signaling	-3.8
HRK	Harakiri, BCL2 Interacting Protein	apoptosis	-3.7

Table 2. A list of 40 most up-regulated genes in EMT and associated with KDM6B recruitment. Genes previously associated to EMT are underlined.

Overlap KDM6B (ALIAS)	Full Name	Pathway	Upregulated FC
LAMC2	Laminin Subunit Gamma 2	migration	136.0
MMP2	Matrix Metalloproteinase 2	invasion	84.0
IFI44	Interferon Induced Protein 44		85.0
PDPN	Podoplanin	adhesion/migration	70.2
EPHB1	EPH Receptor B1	signalling/differentiation	61.1
ADAMTS6	ADAM Metalloproteinase with Thrombospondin Type 1 Motif 6	invasion	60.8
PLXNA2	Plexin A2	neurones/cytoskeleton	51.3
CORO2B	Coronin 2B	cytoskeleton	50.5
WNT5B	Wnt Family Member 5B	signaling	49.2
FGF1	Fibroblast Growth Factor 1	invasion	46.8
IL11	Interleukin 11	inflammation	40.9
SERPINE1	Serpin Family E Member 1	TGF signaling	36.2
SORBS2	Sorbin And SH3 Domain Containing 2	signaling	32.8
ST3GAL1	ST3 Beta-Galactoside Alpha-2,3-Sialyltransferase 1	golgi/metabolism	31.0
ADRB2	Adrenoceptor Beta 2	signalling	29.2
FLRT2	Fibronectin Leucine Rich Transmembrane Protein 2	migration/neurones	29.1
CCBE1	Collagen And Calcium Binding EGF Domains 1	invasion	27.7
ITGA1	Integrin Subunit Alpha 1	adhesion/inflammation	25.3
GABBR2	Gamma-Aminobutyric Acid Type B Receptor Subunit 2	signalling	25.1
CNTNAP2	Contactin Associated Protein Like 2	neurones/adhesion	24.9
TSPAN2	Tetraspanin 2	signaling/migration	23.5

Table 2. Cont.

Overlap KDM6B (ALIAS)	Full Name	Pathway	Upregulated FC
MAMDC2	MAM Domain Containing 2		22.5
ABLIM3	Actin Binding LIM Protein Family Member 3	cytoskeleton	21.1
PDE11A	Phosphodiesterase 11A	signaling	22.0
SPOCK1	SPARC/Osteonectin, Cwcv And Kazal Like Domains Proteoglycan 1		18.5
FHOD3	Formin Homology 2 Domain Containing 3	cytoskeleton	17.9
LPAR5	Lysophosphatidic Acid Receptor 5	signalling	17.8
KIF26B	Kinesin Family Member 26B	vesicle trafficking/cancer	17.6
STC1	Stanniocalcin 1	metabolism	15.4
FILIP1L	Filamin A Interacting Protein 1 Like	cell division/invasion regulation	15.4
GPAM	Glycerol-3-Phosphate Acyltransferase, Mitochondrial	metabolism	15.3
FRMD6	FERM Domain Containing 6		14.9
COL1A1	Collagen Type I Alpha 1 Chain	invasion	14.1
PID1	Phosphotyrosine Interaction Domain Containing 1		14.0
NTN1	Netrin 1	migration	13.9
CDCP1	CUB Domain Containing Protein 1	invasion	13.3
SCG5	Secretogranin V	protein transport	12.4
TNS1	Tensin 1	adhesion	12.0
CUX2	Cut Like Homeobox 2	TF	11.9
COL13A1	Collagen Type XIII Alpha 1 Chain	invasion	11.9

2.5. *INHBB*, *WNT5B* and *ADAMTS6* Established as New Epigenetic Biomarkers of EMT

In order to identify new target genes of EZH2 and KDM6B during EMT which could be later used as epigenetic biomarkers during EMT, we next confirmed our transcriptome and ChIP-seq results using single H3K27me₃-targeted ChIP experiments and RT-qPCR analysis. Our data showed that, in agreement with the data presented in Table 1, *INHBB* (*Inhibin Subunit Beta B*) expression was significantly decreased during EMT and associated with a gain of the H3K27me₃ mark on its promoter in EMT-induced A549 cells. On the contrary, in agreement with the data presented in Table 2, *WNT5B* (*Wnt Family Member 5B*) and *ADAMTS6* (*ADAM Metallopeptidase with Thrombospondin Type 1 Motif 6*) expressions were increased during EMT and associated with a loss of the H3K27me₃ mark on their respective promoters (Figure 5A,B). To determine whether the modulation of the levels of H3K27 methylation was inversely correlated to the level of H3K27 acetylation (H3K27ac, a permissive mark [25]) in EZH2/KDM6B-targeted genes and to characterize the timing of these epigenetic modifications during EMT, we performed kinetic ChIP experiments (Figure 5C). The data obtained validated our hypothesis that an increase in the H3K27ac content was correlated with a decrease in the H3K27me₃ level, and inversely, on *INHBB*, *ADAMTS6*, or *WNT5B* promoters. Our data, therefore, validated the idea that the H3K27 mark was tightly regulated during EMT and might be a determinant of controlling gene expression. Moreover, these kinetic analyses indicated that the modulation of H3K27 methylation levels was progressive during EMT induction, with the highest effect obtained after 72 h of induction.

Next, we analyzed the expression of *INHBB*, *ADAMTS6*, and *WNT5B* at the protein level in NSCLCs (Figure 5D,E). The expression of these markers was assessed in EMT- ($n = 25$) and EMT+ ($n = 24$) tumors using IHC. Our in vivo data were in agreement with our in cellulo results since we observed a significant increase in *WNT5B* and *ADAMTS6* expressions in EMT+ vs. EMT-tumors while the expression of *INHBB* was significantly decreased in EMT+ compared to EMT-tumors.

We next wondered whether our targets were directly involved in EMT-related phenotypes following the invalidation of *INHBB*, *WNT5B*, and *ADAMTS6* using specific siRNAs (Figure 5F). Interestingly, the invalidation of *INHBB* expression, without the use of an EMT inducer, was sufficient to increase invasion (Figure 5G). As expected, since a TGF β /TNF α treatment completely abolished *INHBB* expression, no additive effect of the combination of *siINHBB* and TGF β /TNF α could be observed. On the opposite, the combination of TGF β /TNF α with a *siWNT5B*, or with a *siADAMTS6*, decreased invasion. These data strongly supported the idea that the invalidation of *INHBB* expression mediated by H3K27 methylation and the promotion of *WNT5B* and *ADAMTS6* expressions mediated by H3K27 demethylation favored invasion during EMT. Altogether, our data demonstrated that *INHBB*, *ADAMTS6*, and *WNT5B* could be considered as three new EMT biomarkers, epigenetically regulated during EMT.

2.6. Effect of EZH2 and KDM6B Inhibition on *INHBB*, *WNT5B* or *ADAMTS6* Expression

To analyze whether the inhibition of EZH2 and KDM6B was able to modulate *INHBB*, *WNT5B*, or *ADAMTS6* expression, we performed RT-qPCR experiments in the presence of the different enzyme inhibitors (Figure 6A). As expected, EZH2i decreased the levels of the H3K27me₃ mark on the three promoters (Figure 6B). Neither EZH2i (Figure 6A) nor *siEZH2* (Figure S8) were sufficient to induce *INHBB* expression during EMT, even if H3K27me₃ levels were decreased after EZH2i treatment. However, EZH2i was able to induce an increase of *WNT5B* expression in cells co-treated with TGF β /TNF α (Figure 6A). Similar results were observed when EZH2 expression was silenced (Figure S8). Regarding *ADAMTS6*, unexpected results were observed with EZH2i since we observed a decreased expression, whereas, as expected, *siEZH2* increased its expression in the presence of TGF β /TNF α . These results indicated that the modulation of these enzymes partially modulated the expression of our targeted genes, probably due to additional post-translational histone marks, such as deacetylation, which could not be reversed by these treatments. Our results (Figure 5C) might also

suggest that H3K27me3 is a late mark modified to stabilize the effects on gene expression, rather than to induce the initial modulations.

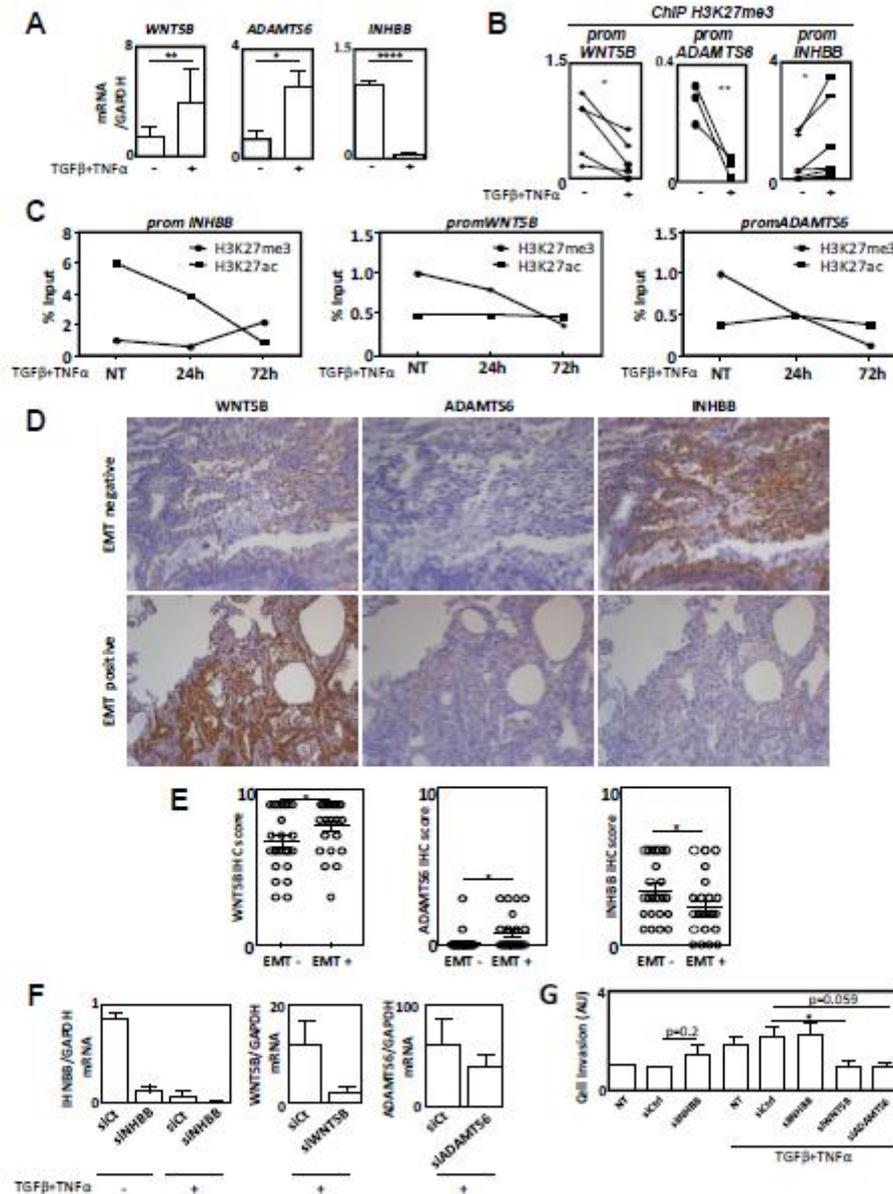


Figure 5. WNT5B, ADAMTS6, and INHBB were established as new epigenetic markers of EMT. (A) The validation of our biomarkers using classical ChIP targeting the H3K27me3 status on *WNT5B*, *ADAMTS6*, and *INHBB* promoters following TGFβ/TNFα treatment. (B) Validation using RT-qPCR of *WNT5B*, *ADAMTS6*, and *INHBB* expression following TGFβ/TNFα treatment. (C) Quantification of H3K27me3 and H3K27ac contents on *INHBB*, *WNT5B*, and *ADAMTS6* promoters following TGFβ/TNFα treatment for 24 to 72 h in A549 cells. (D) Representative IHC stainings of *WNT5B*, *ADAMTS6*, and *INHBB* in EMT-positive and EMT-negative NSCLCs (magnification × 100). (E) Quantification of IHC scores in regards to EMT status. (F) Validation of *siWNT5B*, *siADAMTS6*, and *siINHBB* using qRT-PCR. (G) Effects of *siWNT5B*, *siADAMTS6*, and *siINHBB* on A549 cell invasion. * = 0.01 < p < 0.05; ** = 0.005 < p < 0.01; **** = p < 0.001.

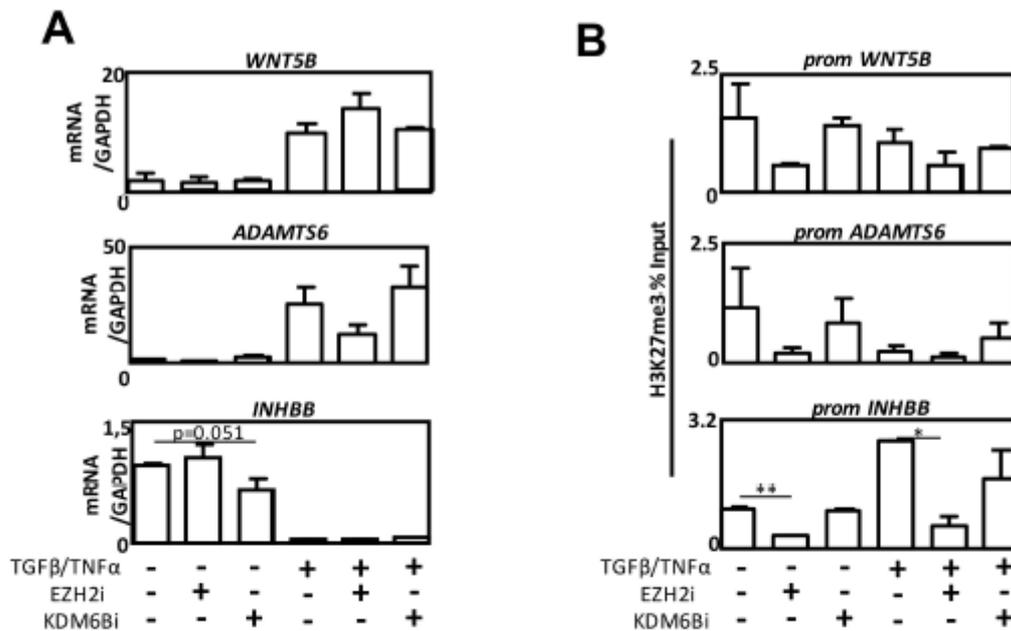


Figure 6. The effect of EZH2 and KDM6B inhibition on *INHBB*, *WNT5B*, or *ADAMTS6* expression. **(A)** Quantification of *WNT5B*, *ADAMTS6*, or *INHBB* expression using RT-qPCR in A549 cells treated with TGFβ/TNFα and/or EZH2i or KDM6Bi. **(B)** Quantification of H3K27me3 content in *WNT5B*, *EZH2*, or *KDM6B* promoters using ChIP, in A549 cells treated with TGFβ/TNFα and/or EZH2i or TGFβ/TNFα and/or KDM6Bi. * = 0.01 < *p* < 0.05; ** = 0.005 < *p* < 0.01.

3. Discussion

Both EZH2 and KDM6B, two proteins with opposite catalytic activities, have previously been associated with cancer aggressiveness or EMT. Indeed, a high expression of EZH2 was associated with metastasis and a poor clinical outcome in clear cell renal cell carcinoma, esophagus squamous cell carcinoma, bladder urothelial carcinoma, cutaneous melanoma, hormone-refractory and metastatic prostate cancer, gastric carcinoma, breast carcinoma, lung carcinoma and ovarian carcinoma, as well as in pediatric brain tumors (for a review, see Lachat et al. [21]). However, KDM6B expression has also been correlated with metastasis in clear cell renal cell carcinoma, ovarian cancer, myeloma, hepatocellular carcinoma, malignant pleural mesothelioma, and Hodgkin's lymphoma or invasive breast tumors. To clarify this apparent paradox or to understand whether these proteins were involved in metastasis in specific models, we decided to analyze the role of both EZH2 and KDM6B in the same EMT cellular model. Indeed, the majority of previous investigations were focused on only one epigenetic enzyme, and our study highlighted the complexity of simultaneously analyzing two epigenetic modulators with opposite functions. Therefore, for the first time, we observed that EZH2 and KDM6B expressions were strongly correlated in NSCLCs and both enzymes correlated with EMT in these tumors (Figure 1) and with poor clinical outcomes. These data strongly supported the idea that both enzymes were involved in EMT and activated pro-EMT signaling pathways and that this induction only required one of these proteins as most people suggested in the literature. Our data also suggested that the expression of these two enzymes was co-regulated in lung cancers, but this last point would need further investigation to be confirmed.

To clarify the roles of EZH2 and KDM6B during EMT, we modulated the expression and/or activity of these enzymes separately. As expected, both overexpression of EZH2 or KDM6B promoted Vimentin expression, a well-known EMT marker (Figure 2). Interestingly, the inhibition of KDM6B activity alone, using a specific inhibitor, was sufficient to promote EMT signaling (Figure 3). Nevertheless, the EZH2 or KDM6B inhibitor potentiated the effect of TGFβ/TNFα to induce EMT, and a more

pronounced phenotype was observed when the activity of KDM6B was inhibited compared to the inhibition of EZH2. These data confirmed that the modulation (increase or decrease) of expression of each enzyme promoted EMT. Das and Taube [26] indeed highlighted the difficulty of addressing the precise contribution of these enzymes in a recent review.

The results of Figure 1 and Figure S1 suggest that both enzymes were strongly co-regulated and might be each responsible for the regulation of a specific panel of genes during EMT. Indeed, EZH2 would be involved in the repression of a specific subset of genes, whereas KDM6B would activate different targets. Our data also highlighted that the down- or up-regulation of one enzyme might be compensated by an increase, or inhibition, of the other. For example, it has been shown that PRC2, whose EZH2 is the catalytic member, could regulate different subsets of genes depending on the cell type and could function, at least partially, independently of the EMT-TFs. Indeed, EZH2 did not regulate *SNAI1* or *SNAI2* gene expression in head and neck squamous cell carcinoma cell lines, and the inhibition of its expression repressed the expression of mesenchymal markers and inhibited migration and invasion capacities without modulating EMT-TF levels [27]. Similarly, KDM6B has also been associated with the direct activation of the EMT-TF gene *SNAI1*, or *SNAI2*, in different cancer models (breast cancer cells [28], hepatocarcinoma cells [20], and CRCCs [19]) but KDM6B might also be recruited on specific promoters involved in downstream EMT signaling. Therefore, to identify the promoters which could be targeted by EZH2 or KDM6B, we performed a ChIP-seq analysis in A549 EMT-induced cells (Figure 4). We first confirmed that EZH2 and KDM6B occupied distinct sites in the genome and that most sites targeted by EZH2 also presented the H3K27me3 mark, while KDM6B was mostly associated with genomic sites in which the H3K27me3 mark was absent. Although *CDH1* is a well-known repressed gene by EZH2 [29,30], our study suggested, for the first time, that numerous additional genes were also controlled by EZH2 and KDM6B during EMT. Interestingly, it has been previously reported in liver cancers that EZH2 repressed, in an H3K27me3-dependent manner, the *APC* promoter leading to the activation of the Wnt/ β -Catenin pathway [31]. Interestingly, our study confirmed the presence of both EZH2 and the H3K27me3 mark on the *APC* promoter (data not shown) demonstrating the validity of our model and experimental scheme.

Amongst the genes specifically targeted by EZH2 and KDM6B during EMT, we confirmed a decreased expression of *INHBB* and an increased expression of *WNT5B* and *ADAMTS6* (Figure 5). *INHBB* was the gene presenting the most important decrease in expression (FC = 31) associated with concomitant recruitment of EZH2 and the presence of the H3K27me3 mark. Interestingly, this gene was previously identified as a regulator of hormone secretion from the pituitary gland (for a review, see Reference [32]) but, more recently, *INHBB* expression has been associated with cancer, although its role in EMT remains controversial. Indeed, high Activin B levels, a homodimer of *INHBB*, have been associated with a higher risk of metastasis in oral squamous cell carcinoma [33] but, *INHBB* expression was more recently associated with an inhibition of cell migration in nasopharyngeal carcinomas [34]. *ADAMTS6* and *WNT5B*, whose expressions were increased (FC = 60 and 49, respectively) and associated with the presence of KDM6B on their promoters, have been associated with EMT in recent publications, although their roles are still poorly investigated in this process [35–37]. *ADAMTS6* is one of the 19 members of the metalloproteinase ADAMTS family, but its physiological role is unknown. For example, its expression has been associated with invasion and cancer recurrence in pituitary tumors and poor prognosis (clinical stage, lymph node metastasis and recurrence) in esophageal squamous cell carcinoma [37,38]. Similarly, *WNT5B* has been very recently identified as a key regulator governing the aggressive basal-like phenotype in breast cancers [39]. Moreover, *WNT5B* appeared necessary to promote invasion and secondary EMT in a non-canonical WNT pathway manner [35]. We confirmed, by selectively inhibiting the expression of these genes, that the inhibition of *INHBB* promoted cell invasion, whereas the inhibition of *WNT5B* or *ADAMTS6* decreased cell invasion in EMT-induced cells (Figure 5). Moreover, an increased expression of *ADAMTS6* and *WNT5B* and a decreased expression of *INHBB* were confirmed in EMT-positive compared to EMT-negative NSCLCs (Figure 5). Although EZH2 or KDM6B were found on the promoters of these genes, the regulation

of their expression seemed only partially regulated by the H3K27me3 mark. Indeed, the inhibition of EZH2 or KDM6B partially controlled the expression levels of these new targets. These partial effects might be due to additional epigenetic modifications or the fact that H3K27me3 might only stabilize previous modulations of gene expression rather than to initiate these modulations. To further characterize the list of genes, directly and fully, controlled by EZH2 and KDM6B, new ChIP-seq experiments combined with transcriptomic analysis will be performed following the inhibition of EZH2 or KDM6B.

4. Materials and Methods

4.1. Cell Culture, Transfections, and Inhibitors Used in Cell Culture

The A549 (NSCLC) cell line was obtained from Dr Christophe Borg (INSERM UMR1098, Besançon, France) and the MDA-MB-468 cell line was obtained from Dr Christine Gilles (Laboratory of Tumor and Developmental Biology, Liège, Belgium). A549 cells were grown in DMEM 1 g/L glucose (L0066, Dominique Dutscher, Brumath, France) and MDA-MB-468 were cultured in RPMI 1640 medium. Both media were supplemented with fetal calf serum (respectively 5 and 10%) (S1810, Dominique Dutscher), penicillin-streptomycin (50 U/mL) (L0018, Dominique Dutscher) and amphotericin B (1.25 µg/mL) (P11-001, PAA). Cells were cultured at 37°C in 5% CO₂, and routinely used at 70–80% confluence. When indicated, cells were treated for 3 days using 4 ng/mL TGFβ (100-21, Peprotech) and 20 ng/mL TNFα (300-01A, Peprotech, Rocky Hill, NJ, USA) or EGF (AF-100-15, Peprotech) for 2 days. GSK343 (SML0766, Sigma-Aldrich, St. Louis, MI, USA), GSKJ4 (SML0701, Sigma-Aldrich) were used at 10 µM or 5 µM (in A549 cells or MDA-MB-468 cells, respectively), and UNC1999 (#46080, Cell Signaling) was used at 5 µM. Transfections of plasmids were performed using the JetPrime reagent (#114, Polyplus, New York, NY, USA) or with the Cell line Nucleofector™ Kit T (VCA-1002, Lonza, Basel, Switzerland) using the Nucleofector™ 2b Device (AAB-1001, Lonza) following the supplier's recommendations. The pCMV-HA-EZH2 (#24230), pCMV-HA-KDM6B (#24167), pMSCV-JMJD3 (#21212) and pMSCV-EZH2-PGK-Puro-IRES-GFP (#75125) vectors were obtained from Addgene. A stable wild type JMJD3 cell line was obtained using pMSCV plasmids via transduction of the A549 cells with lentiviral particles as described in Reference [40]. The selection of transduced cells overexpressing EZH2 or KDM6B was performed under a puromycin treatment at 3 µg/mL for 1 week. siRNA *EZH2* (Dharmacon, Catalog ID:L-004218-00-0005), siRNA *KDM6B* (Dharmacon, Catalog ID:L-023013-01-0005) and siRNA *ADAMTS6* (L-005-776-00-005, Dharmacon, Lafayette, CO, USA) were obtained from Dharmacon and siRNA *WNT5B* (5'-CUCCUGGUGUCAUAGCUUU-3', 5'-GCTAAUGACCACCAGGAGUUU-3', Eurogentec, Madison, WI, USA) and siRNA *INHBB* (sc43861, Thermo Fisher Scientific, Santa Cruz, CA, USA) were transfected using Interferin (409-10, Polyplus) according to the manufacturer's protocol.

4.2. Invasion and Migration Assays

Migration assays were performed using a 2-well culture-insert in 35 mm microdishes (81176, ibidi). A total of 18,000 pretreated cells were plated in the 2 wells, and the inserts were removed 24 h later. Migration was monitored for 8 h. For Invasion assays, 50 µL of ECM Gel from Engelbreth-Holm-Swarm murine sarcoma (diluted 8 fold in free serum medium) (E1270, Sigma-Aldrich) was added in the upper chamber (140629, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA), positioned in 24-multiwell dishes, and incubated for 4 h at 37 °C for polymerization. Then, 50,000 pretreated cells were seeded into the upper chamber in presence of the desired treatment, diluted in free serum medium, and 500 µL of complete medium containing the same treatment was added into the lower chamber. The insert was removed 24 h later, rinsed with PBS, and invasive cells present in the well (cells which migrated through the matrigel and attached to the bottom of the well) were fixed with ethanol 100% for 5 min, stained with crystal violet for 10 min, and then counted.

4.3. Quantitative RT-PCR

RNA was isolated from cells using the Tri Reagent (TR118, Molecular Research Center, Cincinnati, OH, USA) as described by the manufacturer. Reverse transcription was performed using 12 U of M-MLV (M-1302, Sigma-Aldrich) reverse transcriptase, 0.25 μ M oligodT (Eurogentec, Liège, Belgium), 1.25 μ M random hexamers (C118A, Promega), and 1.5 μ g of total RNA according to the manufacturer's instructions (Sigma-Aldrich). Quantitative PCR (qPCR) was performed in duplicate using the Step one plus Real-Time PCR system (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), the TB Green Premix Ex Taq (Tli RNase H Plus) kit (R420L, Takara, Ann Arbor, MI, USA), and specific primers (Eurogentec) according to the manufacturer's instructions. The primers were designed using the Primer 3 software and are listed in the Table S1.

4.4. ChIP/ChIP-seq

Washed cells were fixed with 1 % formaldehyde at RT for 8 min with gentle agitation and then quenched with the addition of 125 mM Glycine for 5 additional minutes. Cells were centrifuged for 5 min at 500 g and washed twice with 1 \times cold PBS. Chromatin was prepared using the truChIP™ Chromatin Shearing Kit (520154, Covaris, Woburn, MA, USA) according to the manufacturer's instructions. Nuclei were submitted to 10 min of sonication using the M220 Covaris sonicator. ChIP was performed using the IP-Star Compact Automated System (B03000002, Diagenode, Denville, NJ, USA) with the Auto iDeal ChIP-seq kit for Histones (C01010171, Diagenode) and 1.5 μ g of ChIP-grade antibody or IgG (IG07-2, P.A.R.I.S.; C15410206, Diagenode). Protein inhibitor cocktails were added in all buffers. Inputs and ChIP products were purified using the Auto Ipure kit V2 (C03010010, Diagenode) and IP-Star Compact Automated System (Diagenode). For ChIP-seq, libraries were prepared from 5 ng of ChIP DNA and Input DNA with the NEBNext®Ultra™ DNA Library Prep Kit for Illumina (E7370S, New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) according to the manufacturer's instructions. From each library, 50 bp single-reads were sequenced using an Illumina HiSeq 1500 system (Illumina, San Diego, CA, USA). Reads were filtered according to their quality (Q Score \geq 30), and adapter sequences were removed using Cutadapt [41]. Reads were aligned to the human genome (hg19) using the BWA (version 0.7.10). H3K27me3, EZH2, KDM6B differentially enriched regions (peaks) were identified using SICER-df (g = w = 200 bp). Primers used for classical ChIP were designed using the Primer 3 software (<http://primer3.ut.ee/>) and listed in the Table S1. Antibodies used for ChIP are listed in the Table S2.

4.5. Western-Blotting

For total protein extracts, cells were scraped, harvested, and lysed in lysis buffer (10 mM Tris, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 1 mM NA-Vanadate, 1% DOCA) supplemented with protease inhibitors (104 mM AEBSE, 1.5 mM pepstatin A, 1.4 mM E-64, 4 mM bestatin, 2 mM leupeptin, 80 μ M aprotinin) for 30 min on ice and sonicated for 15 s. Protein quantification was performed using the Bradford method, and then proteins (25–40 μ g) were separated on TGX acrylamide gels (1610172, Biorad) at 300 V for 30 min using the Protean 3 system and transferred onto Transblot turbo PVDF (1704157, Bio-Rad) membranes for 10–15 min using the Transblot turbo (1704150, Biorad) according to the manufacturer's recommendations. Membranes were saturated in 0.1% TBS-Tween 20 and 5% milk or BSA (according to antibodies datasheets) for 1 h and then incubated with primary antibodies diluted according to manufacturer's instructions in 0.1% TBS-Tween 20 and 5% milk or BSA (Table S2) overnight at 4 °C. Membranes were washed 3 times 10 min with TBS-Tween 20 0.1%, incubated with secondary anti-rabbit HRP conjugate (1/10,000, BI2407, Abliance, Compiègne, France) or anti-mouse HRP conjugate antibody (1/10,000, BI2413C, Abliance) according to manufacturer's instructions. The membrane was then washed 3 times for 5 min with TBS-Tween 20 0.1% and incubated with the Clarity Western ECL substrate (1705051, Biorad, Hercules, CA, USA) and chemiluminescence was monitored using a Biorad ChemiDoc™XRS+.

4.6. Confocal Microscopy

Cells were cultured for 24 h on coverslips and then fixed with cold methanol for 20 min at -20°C . Blocking was realized with 1% BSA for 1 h at 37°C . Incubations with primary antibodies were performed overnight at 4°C , and then cells were rinsed 3 times with 0.1% tween-TBS. Incubations with secondary antibodies goat anti-rabbit and goat anti-mouse AlexaFluor 488 or 555 (1/1000, A11008, A21428, A11001, A21422, Life technologies, Carlsbad, CA, USA) were performed for 1 h at 37°C and cells were then rinsed 3 times with 0.1% tween-TBS, stained with DAPI (4',6'-diamidino-2-phénylindole) and mounted using Fluoromount Aqueous Mounting Medium (F4680, Sigma Aldrich). ACTIN was stained with Phalloidin-Rhodamin (P1951, Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France). Images were collected with an Olympus FV1000 or Zeiss LSM800 AiryScan laser scanning confocal microscope with a 63X objective.

4.7. Immunohistochemistry

FFPE biopsies of NSCLCs were collected (in collaboration with the Tissue Biobank of the University of Liege (Liege, Belgium)) and stained with the listed antibodies (Table S2). The protocol was approved by the Ethics Committee of the University Hospital of Liege and the diagnosis of each case was confirmed by experienced histopathologists. IHC analysis was performed with a standard protocol detailed previously [42]. Samples were classified into two groups: EMT-positive vs. EMT-negative depending on their Vimentin staining. According to Reference [43], IHC were scored by multiplying two values: intensity (0–3) and extent (0–3), leading to a global score ranging between 0 and 9. All immunolabelled tissues were evaluated by two experienced histopathologists.

4.8. Statistics

Mean comparisons were analyzed using a Student *t*-test performed with the GraphPad Prism5 software (San Diego, CA, USA). Correlation indexes were measured using a Pearson test performed with the GraphPad Prism5 software. Significant values were highlighted in bold in each figure.

5. Conclusions

The epigenetic proteins EZH2 and KDM6B, two enzymes controlling the methylation level of the histone H3 at the position K27 (H3K27), are major components of cancer aggressiveness and EMT. Altogether, our results demonstrated, for the first time, that both EZH2 and KDM6B were involved in EMT. Moreover, we showed that the H3K27me3-mediated repression of *INHBB* and the activation of *WNT5B* or *ADAMTS6* expression, linked to the loss of the H3K27me3 mark, could be considered as new biomarkers of EMT *in vitro* and *in vivo*, which could be later quantified to better stratify patients. Moreover, the targeting of EZH2 and/or KDM6B might offer new perspectives of therapies to fight metastasis apparition and formation in the future.

Supplementary Materials: The following are available online at <http://www.mdpi.com/2072-6694/12/12/3649/s1>, Figure S1: Expression of EZH2 and KDM6B during EMT in A549 cellular model and correlation between EZH2 and KDM6B expression in NSCLCs, Figure S2: Validation of stable transfection of EZH2 and KDM6B in A549 cells, Figure S3: Effects of transient overexpression of EZH2 and KDM6B on EMT induction, Figure S4: EZH2i and KDM6Bi regulated the expression of Vimentin and the levels of H3K27me3 in A549 cells, Figure S5: EZH2/i (UNC1999) promoted an EMT-related phenotype in A549 cells, Figure S6: Invalidation of EZH2 and KDM6B using CRISPR/Cas9 favored EMT-like phenotypes in A549 cells, Figure S7: Overexpression and chemical inhibition of EZH2 and KDM6B regulated EMT-like phenotype in MDA-MB-468 cells, Figure S8: Effects of siEZH2 or siKDM6Bi on target genes. Table S1: List of primers, Table S2: List of antibodies.

Author Contributions: Conceptualization and methodology, E.H. (Eric Hervouet) and P.P.; software, J.-P.E., M.A. and J.M.; investigation, C.L., D.B., P.P., E.H. (Eric Hervouet), E.H. (Elodie Hendrick), W.W., A.E.; writing—original draft preparation, E.H. (Eric Hervouet) and P.P.; writing—review and editing, E.H. (Eric Hervouet), P.P., M.G., R.D.-M., M.H.; visualization, M.G., R.D.-M., C.B., M.H. and C.E.; supervision, E.H. (Eric Hervouet) and P.P.; project administration, E.H. (Eric Hervouet) and P.P.; funding acquisition, E.H. (Eric Hervouet) and P.P. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by our financial supports: “Ligue Contre le Cancer”, “Région Bourgogne Franche-Comté” and “Cancéropôle Grand Est”.

Acknowledgments: We are most grateful to July Hémon from the Human & Environmental Genomics core facility of Rennes (Biosit/OSUR) for her technical support. We thank the EPIGENExp platform and our financial supports: “Ligue Contre le Cancer”, “Région Bourgogne Franche-Comté” and “Cancéropôle Grand Est”.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

Abbreviations

ADAM19	ADAM Metallopeptidase Domain 19
ADAMTS6	ADAM Metallopeptidase with Thrombospondin Type 1 Motif 6
BC	Breast Cancer
ChIP-seq	Chromatin ImmunoPrecipitation-sequencing
EMT	Epithelial Mesenchymal Transition
EMC	ExtraCellular Matrix
EMT-TF	EMT-Transcriptional Factor
EZH2	Enhancer of Zeste Homolog 2
FFPE	Formalin-Fixed Paraffin-Embedded
HDM	Histone DeMethylase
HMT	Histone MethylTransferase
IF	ImmunoFluorescence
INHBB	Inhibin Subunit Beta B
KDM6B	Lysine DeMethylase 6B
MMP9	Matrix Metallopeptidase 9
NSCLC	Non-Small Cell Lung Carcinoma
WB	Western-Blotting

References

1. Terry, S.; Savagner, P.; Ortiz-Cuaran, S.; Mahjoubi, L.; Saintigny, P.; Thiery, J.P.; Chouaib, S. New insights into the role of EMT in tumor immune escape. *Mol. Oncol.* **2017**, *11*, 824–846. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Hanahan, D.; Weinberg, R.A. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* **2011**, *144*, 646–674. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Kalluri, R.; Weinberg, R.A. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J. Clin. Investig.* **2009**, *119*, 1420–1428. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Noguchi, K.; Dalton, A.C.; Howley, B.V.; McCall, B.J.; Yoshida, A.; Diehl, J.A.; Howe, P.H. Interleukin-like EMT inducer regulates partial phenotype switching in MITF-low melanoma cell lines. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0177830. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Lehmann, S.; Te Boekhorst, V.; Odenthal, J.; Bianchi, R.; van Helvert, S.; Ikenberg, K.; Ilina, O.; Stoma, S.; Xandry, J.; Jiang, L.; et al. Hypoxia Induces a HIF-1-Dependent Transition from Collective-to-Amoeboid Dissemination in Epithelial Cancer Cells. *Curr. Biol.* **2017**, *27*, 392–400. [[CrossRef](#)]
6. Zhu, L.; Li, X.; Chen, Y.; Fang, J.; Ge, Z. High-mobility group box 1: A novel inducer of the epithelial-mesenchymal transition in colorectal carcinoma. *Cancer Lett.* **2015**, *357*, 527–534. [[CrossRef](#)]
7. Bacigalupo, M.L.; Manzi, M.; Espelt, M.V.; Gentilini, L.D.; Compagno, D.; Laderach, D.J.; Wolfenstein-Todel, C.; Rabinovich, G.A.; Troncoso, M.F. Galectin-1 triggers epithelial-mesenchymal transition in human hepatocellular carcinoma cells. *J. Cell Physiol.* **2015**, *230*, 1298–1309. [[CrossRef](#)]
8. Joseph, J.V.; Conroy, S.; Tomar, T.; Eggens-Meijer, E.; Bhat, K.; Copray, S.; Walenkamp, A.M.; Boddeke, E.; Balasubramanyan, V.; Wagemakers, M.; et al. TGF-beta is an inducer of ZEB1-dependent mesenchymal transdifferentiation in glioblastoma that is associated with tumor invasion. *Cell Death Dis.* **2014**, *5*, e1443. [[CrossRef](#)]
9. Miao, J.W.; Liu, L.J.; Huang, J. Interleukin-6-induced epithelial-mesenchymal transition through signal transducer and activator of transcription 3 in human cervical carcinoma. *Int. J. Oncol.* **2014**, *45*, 165–176. [[CrossRef](#)]
10. Kim, J.; Kong, J.; Chang, H.; Kim, H.; Kim, A. EGF induces epithelial-mesenchymal transition through phospho-Smad2/3-Snai1 signaling pathway in breast cancer cells. *Oncotarget* **2016**, *7*, 85021–85032. [[CrossRef](#)]

11. Yang, L.; Lin, C.; Liu, Z.R. P68 RNA helicase mediates PDGF-induced epithelial mesenchymal transition by displacing Axin from beta-catenin. *Cell* **2006**, *127*, 139–155. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Stoker, M.; Perryman, M. An epithelial scatter factor released by embryo fibroblasts. *J. Cell Sci.* **1985**, *77*, 209–223. [[PubMed](#)]
13. Kogure, T.; Kondo, Y.; Kakazu, E.; Ninomiya, M.; Kimura, O.; Shimosegawa, T. Involvement of miRNA-29a in epigenetic regulation of transforming growth factor-beta-induced epithelial-mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma. *Hepatol. Res.* **2014**, *44*, 907–919. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Jiang, J.; Yi, B.O.; Ding, S.; Sun, J.; Cao, W.; Liu, M. Demethylation drug 5-Aza-2'-deoxycytidine-induced upregulation of miR-200c inhibits the migration, invasion and epithelial-mesenchymal transition of clear cell renal cell carcinoma in vitro. *Oncol. Lett.* **2016**, *11*, 3167–3172. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Asgarova, A.; Asgarov, K.; Godet, Y.; Peixoto, P.; Nadaradjane, A.; Boyer-Guittaut, M.; Galaine, J.; Guenat, D.; Mougey, V.; Perrard, J.; et al. PD-L1 expression is regulated by both DNA methylation and NF-kB during EMT signaling in non-small cell lung carcinoma. *Oncoimmunology* **2018**, *7*, e1423170. [[CrossRef](#)]
16. Zheng, M.; Jiang, Y.P.; Chen, W.; Li, K.D.; Liu, X.; Gao, S.Y.; Feng, H.; Wang, S.S.; Jiang, J.; Ma, X.R.; et al. Snail and Slug collaborate on EMT and tumor metastasis through miR-101-mediated EZH2 axis in oral tongue squamous cell carcinoma. *Oncotarget* **2015**, *6*, 6797–6810. [[CrossRef](#)]
17. Luo, H.; Jiang, Y.; Ma, S.; Chang, H.; Yi, C.; Cao, H.; Gao, Y.; Guo, H.; Hou, J.; Yan, J.; et al. EZH2 promotes invasion and metastasis of laryngeal squamous cells carcinoma via epithelial-mesenchymal transition through H3K27me3. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2016**, *479*, 253–259. [[CrossRef](#)]
18. Li, Z.; Hou, P.; Fan, D.; Dong, M.; Ma, M.; Li, H.; Yao, R.; Li, Y.; Wang, G.; Geng, P.; et al. The degradation of EZH2 mediated by lncRNA ANCR attenuated the invasion and metastasis of breast cancer. *Cell Death Differ.* **2017**, *24*, 59–71. [[CrossRef](#)]
19. Li, Q.; Hou, L.; Ding, G.; Li, Y.; Wang, J.; Qian, B.; Sun, J.; Wang, Q. KDM6B induces epithelial-mesenchymal transition and enhances clear cell renal cell carcinoma metastasis through the activation of SLUG. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* **2015**, *8*, 6334–6344.
20. Tang, B.; Qi, G.; Tang, F.; Yuan, S.; Wang, Z.; Liang, X.; Li, B.; Yu, S.; Liu, J.; Huang, Q.; et al. Aberrant JMJD3 Expression Upregulates Slug to Promote Migration, Invasion, and Stem Cell-Like Behaviors in Hepatocellular Carcinoma. *Cancer Res.* **2016**, *76*, 6520–6532. [[CrossRef](#)]
21. Lachat, C.; Boyer-Guittaut, M.; Peixoto, P.; Hervouet, E. Epigenetic Regulation of EMT (Epithelial to Mesenchymal Transition) and Tumor Aggressiveness: A View on Paradoxical Roles of KDM6B and EZH2. *Epigenomes* **2019**, *3*, 1. [[CrossRef](#)]
22. Gyorffy, B.; Surowiak, P.; Budczies, J.; Lanczky, A. Online survival analysis software to assess the prognostic value of biomarkers using transcriptomic data in non-small-cell lung cancer. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e82241. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Rath, B.H.; Waung, I.; Camphausen, K.; Tofilon, P.J. Inhibition of the Histone H3K27 Demethylase UTX Enhances Tumor Cell Radiosensitivity. *Mol. Cancer Ther* **2018**, *17*, 1070–1078. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Peixoto, P.; Etcheverry, A.; Aubry, M.; Missey, A.; Lachat, C.; Perrard, J.; Hendrick, E.; Delage-Mourroux, R.; Mosser, J.; Borg, C.; et al. EMT is associated with an epigenetic signature of ECM remodeling genes. *Cell Death Dis.* **2019**, *10*, 205. [[CrossRef](#)]
25. Wang, Y.; Chen, S.Y.; Colborne, S.; Lambert, G.; Shin, C.Y.; Santos, N.D.; Orlando, K.A.; Lang, J.D.; Hendricks, W.P.D.; Bally, M.B.; et al. Histone Deacetylase Inhibitors Synergize with Catalytic Inhibitors of EZH2 to Exhibit Antitumor Activity in Small Cell Carcinoma of the Ovary, Hypercalcemic Type. *Mol. Cancer Ther.* **2018**, *17*, 2767–2779. [[CrossRef](#)]
26. Das, P.; Taube, J.H. Regulating Methylation at H3K27: A Trick or Treat for Cancer Cell Plasticity. *Cancers* **2020**, *12*, 2792. [[CrossRef](#)]
27. Chang, J.W.; Gwak, S.Y.; Shim, G.A.; Liu, L.; Lim, Y.C.; Kim, J.M.; Jung, M.G.; Koo, B.S. EZH2 is associated with poor prognosis in head-and-neck squamous cell carcinoma via regulating the epithelial-to-mesenchymal transition and chemosensitivity. *Oral Oncol.* **2016**, *52*, 66–74. [[CrossRef](#)]
28. Ramadoss, S.; Chen, X.; Wang, C.Y. Histone demethylase KDM6B promotes epithelial-mesenchymal transition. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 44508–44517. [[CrossRef](#)]
29. Herranz, N.; Pasini, D.; Díaz, V.M.; Francí, C.; Gutierrez, A.; Dave, N.; Escrivà, M.; Hernandez-Muñoz, I.; Di Croce, L.; Helin, K.; et al. Polycomb complex 2 is required for E-cadherin repression by the Snail1 transcription factor. *Mol. Cell Biol.* **2008**, *28*, 4772–4781. [[CrossRef](#)]

30. Cho, H.M.; Jeon, H.S.; Lee, S.Y.; Jeong, K.J.; Park, S.Y.; Lee, H.Y.; Lee, J.U.; Kim, J.H.; Kwon, S.J.; Choi, E.; et al. microRNA-101 inhibits lung cancer invasion through the regulation of enhancer of zeste homolog 2. *Exp. Ther. Med.* **2011**, *2*, 963–967. [[CrossRef](#)]
31. Fu, X.; Lin, J.; Qin, F.; Yang, Z.; Ding, Y.; Zhang, Y.; Han, L.; Zhu, X.; Zhang, Q. LncAPC drives Wnt/ β -catenin activation and liver TIC self-renewal through EZH2 mediated APC transcriptional inhibition. *Mol. Carcinog.* **2018**, *57*, 408–418. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Thompson, T.B.; Cook, R.W.; Chapman, S.C.; Jardeetzky, T.S.; Woodruff, T.K. Beta A versus beta B: Is it merely a matter of expression? *Mol. Cell Endocrinol.* **2004**, *225*, 9–17. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Kita, A.; Kasamatsu, A.; Nakashima, D.; Endo-Sakamoto, Y.; Ishida, S.; Shimizu, T.; Kimura, Y.; Miyamoto, I.; Yoshimura, S.; Shiiba, M.; et al. Activin B Regulates Adhesion, Invasiveness, and Migratory Activities in Oral Cancer: A Potential Biomarker for Metastasis. *J. Cancer* **2017**, *8*, 2033–2041. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Zou, G.; Ren, B.; Liu, Y.; Fu, Y.; Chen, P.; Li, X.; Luo, S.; He, J.; Gao, G.; Zeng, Z.; et al. Inhibin B suppresses anoikis resistance and migration through the transforming growth factor- β signaling pathway in nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Sci.* **2018**, *109*, 3416–3427. [[CrossRef](#)]
35. Kato, S.; Hayakawa, Y.; Sakurai, H.; Saiki, I.; Yokoyama, S. Mesenchymal-transitioned cancer cells instigate the invasion of epithelial cancer cells through secretion of WNT3 and WNT5B. *Cancer Sci.* **2014**, *105*, 281–289. [[CrossRef](#)]
36. Shin, Y.J.; Jeon, Y.J.; Jung, N.; Park, J.W.; Park, H.Y.; Jung, S.C. Substrate-specific gene expression profiles in different kidney cell types are associated with Fabry disease. *Mol. Med. Rep.* **2015**, *12*, 5049–5057. [[CrossRef](#)]
37. Liu, L.; Yang, Z.; Ni, W.; Xuan, Y. ADAMTS-6 is a predictor of poor prognosis in patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Exp. Mol. Pathol.* **2018**, *104*, 134–139. [[CrossRef](#)]
38. Raverot, G.; Wierinckx, A.; Dantony, E.; Auger, C.; Chapas, G.; Villeneuve, L.; Brue, T.; Figarella-Branger, D.; Roy, P.; Jouanneau, E.; et al. Prognostic factors in prolactin pituitary tumors: Clinical, histological, and molecular data from a series of 94 patients with a long postoperative follow-up. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2010**, *95*, 1708–1716. [[CrossRef](#)]
39. Jiang, S.; Zhang, M.; Zhang, Y.; Zhou, W.; Zhu, T.; Ruan, Q.; Chen, H.; Fang, J.; Zhou, F.; Sun, J.; et al. WNT5B governs the phenotype of basal-like breast cancer by activating WNT signaling. *Cell Commun. Signal.* **2019**, *17*, 109. [[CrossRef](#)]
40. Warda, W.; Larosa, F.; Neto Da Rocha, M.; Trad, R.; Deconinck, E.; Fajloun, Z.; Faure, C.; Caillot, D.; Moldovan, M.; Valmary-Degano, S.; et al. CML Hematopoietic Stem Cells Expressing IL1RAP Can Be Targeted by Chimeric Antigen Receptor-Engineered T Cells. *Cancer Res.* **2019**, *79*, 663–675. [[CrossRef](#)]
41. Chen, C.; Khaleel, S.S.; Huang, H.; Wu, C.H. Software for pre-processing Illumina next-generation sequencing short read sequences. *Source Code Biol. Med.* **2014**, *9*, 8. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Herfs, M.; Longuespee, R.; Quick, C.M.; Roncarati, P.; Suarez-Carmona, M.; Hubert, P.; Lebeau, A.; Bruyere, D.; Mazzucchelli, G.; Smargiasso, N.; et al. Proteomic signatures reveal a dualistic and clinically relevant classification of anal canal carcinoma. *J. Pathol.* **2017**, *241*, 522–533. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Hubert, P.; Herman, L.; Roncarati, P.; Maillard, C.; Renoux, V.; Demoulin, S.; Erpicum, C.; Foidart, J.M.; Boniver, J.; Noel, A.; et al. Altered alpha-defensin 5 expression in cervical squamocolumnar junction: Implication in the formation of a viral/tumour-permissive microenvironment. *J. Pathol.* **2014**, *234*, 464–477. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Annexe 4 : Liste des communications orales

- 1- **Camille LACHAT**, Paul PEIXOTO, Michael BOYER-GUITTAUT and Eric HERVOUET. Roles of the lysine demethylase KDM6B and the histone methyltransferase EZH2 during Epithelial to Mesenchymal Transition (EMT). Forum des Jeunes Chercheurs, Besançon, 15 Juin 2018.

- 2- **Camille LACHAT**, Paul PEIXOTO, Michael BOYER-GUITTAUT and Eric HERVOUET. Roles of the lysine demethylase KDM6B and the histone methyltransferase EZH2 during Epithelial to Mesenchymal Transition (EMT). EpiNantes, Nantes, 14-15 Octobre 2018.

- 3- **Camille LACHAT**, Amandine ETCHEVERRY, Marc AUBRY, Jean MOSSER, Michael HERFS, Jean-Paul FEUGEAS, Michaël GUITTAUT, Paul PEIXOTO et Eric HERVOUET. La régulation épigénétique de la Transition Epithélio-Mésenchymateuse (TEM) régule les propriétés invasives des cellules cancéreuses. Concours de communication de la Société de Biologie de Besançon (SBB), Besançon, 12 Décembre 2019.

Annexe 5 : Liste des communications affichées

Camille LACHAT, Michael BOYER-GUITTAUT, Paul PEIXOTO and Eric HERVOUET. Roles of the lysine demethylase KDM6B and the histone methyltransferase EZH2 during Epithelial to Mesenchymal Transition (EMT). Forum des Jeunes Chercheurs, Dijon, 14 Juin 2019

Epigenetic regulation of Epithelial to Mesenchymal Transition (EMT) : roles of EZH2 and KDM6B

Camille LACHAT¹, Michaël GUITTAUT^{1,2}, Paul PEIXOTO^{1,3} and Eric HERVOUET^{1,2,3}

¹: Univ. Bourgogne Franche-Comté, INSERM, EFS BFC, UMR1098, Interactions Hôte-Greffon-Tumeur/Ingénierie Cellulaire et Génétique, F-25000 Besançon, France; ²: Plateforme DImaCell, Univ. Bourgogne Franche-Comté, F-25000 Besançon, France; ³: Plateforme EPIGENEXp, Univ. Bourgogne Franche-Comté, F-25000 Besançon, France



Introduction

Metastatic tumors are the main cause of death in patients bearing solid tumors and EMT is involved in the metastatic process.

Epigenetic modifications play a key role in the regulation of gene expression during EMT. Our previous studies show that methylation status of H3K27 is a crucial point for cells to undergo EMT. That's why we focus on EZH2 and KDM6B. Despite their opposite roles, they were both involved in EMT in various models

Objectives

- Study of the effect of EZH2 and KDM6B activities and expression modulation on EMT phenotype
- Determine the target genes of EZH2 and KDM6B during EMT

1 Modulation of EZH2 and KDM6B activity *in vitro*

Study of A549 lung tumor cells molecular and functional phenotype after EZH2 or KDM6B activity modulation. A- VIMENTIN expression by immunofluorescence after overexpression of EZH2 or KDM6B. B- VIMENTIN expression by Western blotting after chemical inhibition of EZH2 or KDM6B and/or EMT induction. C- Migration capacities of A549 cells after EZH2 or KDM6B chemical inhibition and/or EMT induction. Mean +/- SEM. *_{0,01}<p<0,05; ***_{0,001}<p<0,005

Overexpression of EZH2 or KDM6B increased VIM expression in A549 cells. Chemical inhibition of these enzymes also increased VIM expression during EMT. However, only KDM6B chemical inhibition increased migration properties of these cells during EMT. These data highlight that KDM6B and EZH2 have ambiguous roles during EMT. The determination of their target genes during EMT may enlighten us about their specific roles in this process

2 Determination of EZH2 and KDM6B target genes

A549 EMT induced

ChIP sequencing and transcriptome data were compared to select potential EZH2 and KDM6B target genes. We selected some genes which are up-regulated during EMT and where we found only KDM6B on the promoter (*WNT5B*, *ADAMTS6*, *MMP2*) and some genes which were down-regulated and where we found H3K27me3 and EZH2 on the promoter (*INHBB*, *ANK1*).

3 Validation of EZH2 and KDM6B target genes

The under expression of the potential EZH2 target gene *INHBB* and overexpression of the KDM6B potential target gene *WNT5B* during EMT was validated using RT-qPCR. *INHBB* and *WNT5B* expression are correlated with H3K27me3 level modifications during EMT (ChIP experiments)

Validation of KDM6B and EZH2 target genes in A549 cells by RT-qPCR and ChIP. A- mRNA expression of potential target gene of EZH2 (*INHBB*) and KDM6B (*WNT5B*) by RT-qPCR during EMT. B- H3K27me3 level at EZH2 and KDM6B potential target genes (*INHBB* and *WNT5B*) during EMT by ChIP experiments. A549 cells were induced in EMT by TGF-β/TNFα treatment during 3 days. Mean +/- SEM. *_{0,01}<p<0,05; **_{0,005}<p<0,01; ***_{0,001}<p<0,005

4 Modulation of EZH2 and KDM6B expression during EMT

We shown that *ADAMTS6* is epigenetically regulated during EMT, by H3K27 demethylation involving KDM6B. Here we confirm these data using specific siRNA targeting EZH2 and KDM6B.

During EMT, EZH2 KO leads to increased *ADAMTS6* mRNA expression when KDM6B KO leads to decreased *ADAMTS6* mRNA expression. Altogether, these results confirm that *ADAMTS6* expression regulation is highly dependent on H3K27 methylation status on its promoter.

ADAMTS6 mRNA expression during the modulation of EZH2 and KDM6B expression using specific siRNA. *ADAMTS6* mRNA expression using RT-qPCR during EMT when EZH2 and KDM6B were knock-out using siRNA. EMT induction: 72h. siRNA concentration: 4nM. Mean +/- SEM, n=2

Perspectives

- The expression of EZH2 and KDM6B target genes during EMT will be modulated using siRNA or overexpression plasmids and the effects during EMT will be analyzed (morphological, molecular and functional phenotypes).
- In vivo* expression of EZH2 and KDM6B target genes will be measured using IHC in a cancer cohort already classified in EMT+ or EMT-
- We will try to explain why EZH2 and KDM6B target these genes by identifying their protein partners using automated Co-IP protocol

Camille LACHAT, Amandine ETCHEVERRY, Marc AUBRY, Jean MOSSER, Michael HERFS, Jean-Paul FEUGEAS, Michaël GUITTAUT, Paul PEIXOTO and Eric HERVOUET. Epigenetic regulation of Epithelial to Mesenchymal Transition (EMT): roles of EZH2 and KDM6B. NCRI Cancer Conference, Glasgow, UK, 3-5 Novembre 2019.

Epigenetic regulation of Epithelial to Mesenchymal Transition (EMT) : roles of EZH2 and KDM6B

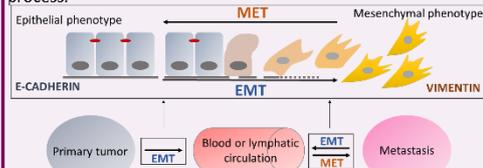
Camille LACHAT¹, Amandine ETCHEVERRY²⁻⁵, Marc AUBRY²⁻⁵, Jean MOSSER²⁻⁵, Michael HERFS⁶, Jean-Paul FEUGEAS¹, Michaël GUITTAUT^{1,7}, Paul PEIXOTO^{1,8} and Eric HERVOUET^{1,7,8}

¹: Univ. Bourgogne Franche-Comté, INSERM, EFS, UMR1098, Interactions Hôte-Greffon-Tumeur/Ingénierie Cellulaire et Génétique, F-25000 Besançon, France; ²: CHU Rennes, Service de Génétique moléculaire et Génétique, Rennes F-35033, France; ³: CNRS, UMR 6290, Institut de Génétique et Développement de Rennes (IGDR), Rennes F-35043, France; ⁴: Université Rennes1, UEB, UMS 3480 Biosit, Faculté de Médecine, Rennes F-35043, France; ⁵: Plateforme Génomique Environnementale et Humaine Biosit, Université Rennes1, Rennes F-35043, France; ⁶: Laboratory of Experimental Pathology, GIGA-Cancer, University of Liege, Liege, Belgium; ⁷: Plateforme DimaCell, Univ. Bourgogne Franche-Comté, F-25000 Besançon, France; ⁸: Plateforme EPIGENEXp, Univ. Bourgogne Franche-Comté, F-25000 Besançon, France

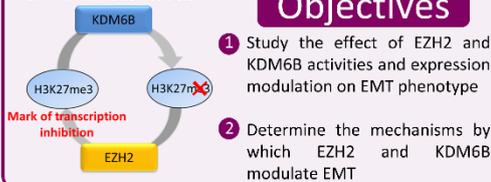


1 Introduction

Metastatic tumors are the main cause of death in patients bearing solid tumors and EMT is involved in the metastatic process.



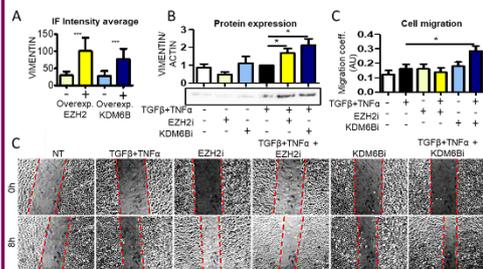
Epigenetic modifications play a key role in the regulation of gene expression during EMT. Our previous studies show that methylation status of H3K27 is a crucial point for cells to undergo EMT. That's why we focus on EZH2 and KDM6B. Despite their opposite roles, they were both involved and overexpressed in EMT in various models



Objectives

- 1 Study the effect of EZH2 and KDM6B activities and expression modulation on EMT phenotype
- 2 Determine the mechanisms by which EZH2 and KDM6B modulate EMT

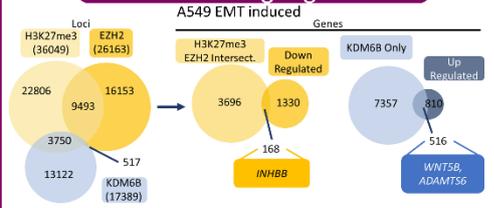
1 Modulation of EZH2 and KDM6B activity *in vitro*



Study of A549 lung tumor cells molecular and functional phenotype after EZH2 or KDM6B activity modulation. A- VIMENTIN expression by immunofluorescence after overexpression of EZH2 or KDM6B. B- VIMENTIN expression by Western blotting after chemical inhibition of EZH2 or KDM6B and/or EMT induction. C- Migration capacities of A549 cells after EZH2 or KDM6B chemical inhibition and/or EMT induction. Mean \pm SEM, * = 0,01 < p < 0,05, ** = 0,001 < p < 0,005

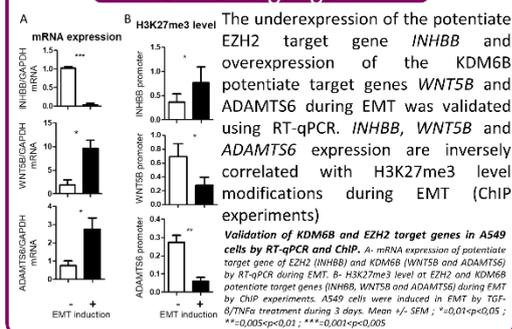
Overexpression of EZH2 or KDM6B increased VIM expression in A549 cells. Chemical inhibition of these enzymes also increased VIM expression during EMT. However, only KDM6B chemical inhibition increased migration properties of these cells during EMT. These data highlight that KDM6B and EZH2 have ambiguous roles during EMT. The determination of their target genes during EMT may enlighten us about their specific roles in this process

2 Determination of EZH2 and KDM6B target genes

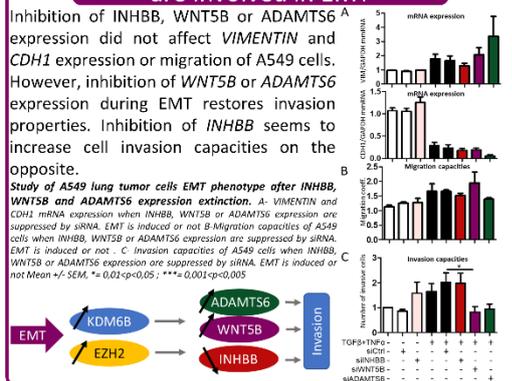


ChIP sequencing and transcriptome data were compared to select potentiate EZH2 and KDM6B target genes. Some genes which are up-regulated during EMT and where we found only KDM6B on the promoter (*WNT5B*, *ADAMTS6*) and some genes which were down-regulated and where we found H3K27me3 and EZH2 on the promoter (*INHBB*) were selected for further studies.

3 Validation of EZH2 and KDM6B target genes



4 INHBB, WNT5B and ADAMTS6 are involved in EMT



Inhibition of *INHBB*, *WNT5B* or *ADAMTS6* expression did not affect *VIMENTIN* and *CDH1* expression or migration of A549 cells. However, inhibition of *WNT5B* or *ADAMTS6* expression during EMT restores invasion properties. Inhibition of *INHBB* seems to increase cell invasion capacities on the opposite.

Study of A549 lung tumor cells EMT phenotype after *INHBB*, *WNT5B* and *ADAMTS6* expression extinction. A- *VIMENTIN* and *CDH1* mRNA expression when *INHBB*, *WNT5B* or *ADAMTS6* expression are suppressed by siRNA. EMT is induced or not B Migration capacities of A549 cells when *INHBB*, *WNT5B* or *ADAMTS6* expression are suppressed by siRNA. EMT is induced or not C Invasion capacities of A549 cells when *INHBB*, *WNT5B* or *ADAMTS6* expression are suppressed by siRNA. EMT is induced or not Mean \pm SEM, * = 0,01 < p < 0,05, ** = 0,001 < p < 0,005

Conclusion/Perspectives

- 1 *WNT5B* and *INHBB* are new interesting genes involved in EMT. The mechanisms by which they contribute (or not) in EMT will be further considered.
- 2 *In vivo* capacities of A549 to create metastasis in mice will be studied inhibiting EZH2 or KDM6B to confirm *in vitro* results
- 3 *In vivo* expression of EZH2 and KDM6B target genes will be measured using IHC in a cancer cohort already classified in EMT+ or EMT-

conference.ncri.org.uk

#NCRI2019

Références Bibliographiques

- 1 Wild CP, Weiderpass E, Stewart BW (eds.). *World Cancer Report : Cancer research for cancer prevention*. International Agency for Research on Cancer. Lyon, France, 2020<http://publications.iarc.fr/586> (accessed 21 Mar2020).
- 2 Defossez G, Le Guyader-Peyrou S, Uhry Z, Grosclaude P, Colonna M, Dantony E *et al*. *Estimations Nationales de l'incidence et de la mortalité par cancer en France métropolitaine entre 1990 et 2018. Volume 1 - tumeurs solides*. Santé Publique France. Santé Publique France: Saint-Maurice (Fra), 2019<https://www.geodes.santepubliquefrance.fr> (accessed 27 Mar2020).
- 3 Colonna M, Boussari O, Cowppli-Bony A, Delafosse P, Romain G, Grosclaude P *et al*. Time trends and short term projections of cancer prevalence in France. *Cancer Epidemiol* 2018; **56**: 97–105.
- 4 Mazeau-Woynar V, Cerf N. Survie attendue des patients atteints de cancers en France : état des lieux. 2010.www.e-cancer.fr (accessed 30 Mar2020).
- 5 Sant M, Allemani C, Capocaccia R, Hakulinen T, Aareleid T, Coebergh JW *et al*. Stage at diagnosis is a key explanation of differences in breast cancer survival across Europe. *International Journal of Cancer* 2003; **106**: 416–422.
- 6 David M, Lepage C, Jouve J-L, Jooste V, Chauvenet M, Faivre J *et al*. Management and prognosis of pancreatic cancer over a 30-year period. *Br J Cancer* 2009; **101**: 215–218.
- 7 Pastushenko I, Brisebarre A, Sifrim A, Fioramonti M, Revenco T, Boumahdi S *et al*. Identification of the tumour transition states occurring during EMT. *Nature* 2018; **556**: 463–468.
- 8 Nieto MA, Huang RY-J, Jackson RA, Thiery JP. EMT: 2016. *Cell* 2016; **166**: 21–45.
- 9 Peixoto P, Etcheverry A, Aubry M, Missey A, Lachat C, Perrard J *et al*. EMT is associated with an epigenetic signature of ECM remodeling genes. *Cell Death Dis* 2019; **10**: 1–17.
- 10 Pan M-R, Hsu M-C, Chen L-T, Hung W-C. Orchestration of H3K27 methylation: mechanisms and therapeutic implication. *Cell Mol Life Sci* 2018; **75**: 209–223.
- 11 Lachat C, Boyer-Guittaut M, Peixoto P, Hervouet E. Epigenetic Regulation of EMT (Epithelial to Mesenchymal Transition) and Tumor Aggressiveness: A View on Paradoxical Roles of KDM6B and EZH2. *Epigenomes* 2019; **3**: 1.
- 12 Hay ED. Organization and Fine Structure of Epithelium and Mesenchyme in the Developing Chick Embryo. In: Fleischmajer R, Billingham R (eds). *Epithelial-Mesenchymal Intercations, 18th Hahnemann symposium*. The Williams and Wilkins Company: Baltimore, 1968, pp 31–55.
- 13 Greenburg G, Hay ED. Epithelia suspended in collagen gels can lose polarity and express characteristics of migrating mesenchymal cells. *J Cell Biol* 1982; **95**: 333–339.
- 14 Gavrilović J, Moens G, Thiery JP, Jouanneau J. Expression of transfected transforming growth factor alpha induces a motile fibroblast-like phenotype with extracellular matrix-degrading potential in a rat bladder carcinoma cell line. *Cell Regul* 1990; **1**: 1003–1014.
- 15 Potts JD, Dagle JM, Walder JA, Weeks DL, Runyan RB. Epithelial-mesenchymal transformation of embryonic cardiac endothelial cells is inhibited by a modified antisense oligodeoxynucleotide to transforming growth factor beta 3. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; **88**: 1516–1520.
- 16 Miettinen PJ, Ebner R, Lopez AR, Derynck R. TGF-beta induced transdifferentiation of mammary epithelial cells to mesenchymal cells: involvement of type I receptors. *J Cell Biol* 1994; **127**: 2021–2036.
- 17 Hay ED. An overview of epithelio-mesenchymal transformation. *Acta Anat (Basel)* 1995; **154**: 8–20.

- 18 Hay ED, Zuk A. Transformations between epithelium and mesenchyme: Normal, pathological, and experimentally induced. *American Journal of Kidney Diseases* 1995; **26**: 678–690.
- 19 Nawshad A, LaGamba D, Hay ED. Transforming growth factor β (TGF β) signalling in palatal growth, apoptosis and epithelial mesenchymal transformation (EMT). *Archives of Oral Biology* 2004; **49**: 675–689.
- 20 Nawshad A, Medici D, Liu C-C, Hay ED. TGF β 3 inhibits E-cadherin gene expression in palate medial-edge epithelial cells through a Smad2-Smad4-LEF1 transcription complex. *J Cell Sci* 2007; **120**: 1646–1653.
- 21 Medici D, Hay ED, Olsen BR. Snail and Slug Promote Epithelial-Mesenchymal Transition through β -Catenin–T-Cell Factor-4-dependent Expression of Transforming Growth Factor- β 3. *Mol Biol Cell* 2008; **19**: 4875–4887.
- 22 Heinemann U, Schuetz A. Structural Features of Tight-Junction Proteins. *Int J Mol Sci* 2019; **20**. doi:10.3390/ijms20236020.
- 23 Niessen CM, Gottardi CJ. Molecular Components of the Adherens Junction. *Biochim Biophys Acta* 2008; **1778**: 562–571.
- 24 Yonemura S. Actin filament association at adherens junctions. *J Med Invest* 2017; **64**: 14–19.
- 25 Takai Y, Ikeda W, Ogita H, Rikitake Y. The immunoglobulin-like cell adhesion molecule nectin and its associated protein afadin. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2008; **24**: 309–342.
- 26 Broussard JA, Getsios S, Green KJ. Desmosome regulation and signaling in disease. *Cell Tissue Res* 2015; **360**: 501–512.
- 27 Green KJ, Simpson CL. Desmosomes: new perspectives on a classic. *J Invest Dermatol* 2007; **127**: 2499–2515.
- 28 Garrod D, Chidgey M. Desmosome structure, composition and function. *Biochim Biophys Acta* 2008; **1778**: 572–587.
- 29 Delva E, Tucker DK, Kowalczyk AP. The Desmosome. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2009; **1**. doi:10.1101/cshperspect.a002543.
- 30 Beyer EC, Berthoud VM. Gap junction gene and protein families: Connexins, innexins, and pannexins. *Biochim Biophys Acta* 2018; **1860**: 5–8.
- 31 Wen W, Zhang M. Protein Complex Assemblies in Epithelial Cell Polarity and Asymmetric Cell Division. *J Mol Biol* 2018; **430**: 3504–3520.
- 32 Rodriguez-Boulan E, Macara IG. Organization and execution of the epithelial polarity programme. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2014; **15**: 225–242.
- 33 Pelaseyed T, Bretscher A. Regulation of actin-based apical structures on epithelial cells. *J Cell Sci* 2018; **131**. doi:10.1242/jcs.221853.
- 34 Sauvanet C, Wayt J, Pelaseyed T, Bretscher A. Structure, regulation, and functional diversity of microvilli on the apical domain of epithelial cells. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2015; **31**: 593–621.
- 35 Yurchenco PD. Basement Membranes: Cell Scaffoldings and Signaling Platforms. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2011; **3**. doi:10.1101/cshperspect.a004911.
- 36 Sekiguchi R, Yamada KM. Basement membranes in development and disease. *Curr Top Dev Biol* 2018; **130**: 143–191.
- 37 Yurchenco PD, Patton BL. Developmental and Pathogenic Mechanisms of Basement Membrane Assembly. *Curr Pharm Des* 2009; **15**: 1277–1294.

- 38 Masraksa W, Tanasawet S, Hutamekalin P, Wongtawatchai T, Sukketsiri W. Luteolin attenuates migration and invasion of lung cancer cells via suppressing focal adhesion kinase and non-receptor tyrosine kinase signaling pathway. *Nutr Res Pract* 2020; **14**: 127–133.
- 39 Makowiecka A, Malek N, Mazurkiewicz E, Mrówczyńska E, Nowak D, Mazur AJ. Thymosin β 4 Regulates Focal Adhesion Formation in Human Melanoma Cells and Affects Their Migration and Invasion. *Front Cell Dev Biol* 2019; **7**. doi:10.3389/fcell.2019.00304.
- 40 Chen X, Halberg RB, Burch RP, Dove WF. Intestinal Adenomagenesis Involves Core Molecular Signatures of the Epithelial-Mesenchymal Transition. *J Mol Histol* 2008; **39**: 283–294.
- 41 Xu J, Lamouille S, Derynck R. TGF- β -induced epithelial to mesenchymal transition. *Cell Res* 2009; **19**: 156–172.
- 42 Hirohashi S. Inactivation of the E-Cadherin-Mediated Cell Adhesion System in Human Cancers. *Am J Pathol* 1998; **153**: 333–339.
- 43 Savagner P, Yamada KM, Thiery JP. The Zinc-Finger Protein Slug Causes Desmosome Dissociation, an Initial and Necessary Step for Growth Factor–induced Epithelial–Mesenchymal Transition. *J Cell Biol* 1997; **137**: 1403–1419.
- 44 Bai Y, Sha J, Kanno T. The Role of Carcinogenesis-Related Biomarkers in the Wnt Pathway and Their Effects on Epithelial–Mesenchymal Transition (EMT) in Oral Squamous Cell Carcinoma. *Cancers (Basel)* 2020; **12**. doi:10.3390/cancers12030555.
- 45 Kim J-B, Islam S, Kim YJ, Prudoff RS, Sass KM, Wheelock MJ *et al*. N-Cadherin Extracellular Repeat 4 Mediates Epithelial to Mesenchymal Transition and Increased Motility. *J Cell Biol* 2000; **151**: 1193–1206.
- 46 Wheelock MJ, Johnson KR. Cadherins as modulators of cellular phenotype. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2003; **19**: 207–235.
- 47 Islam S, Carey TE, Wolf GT, Wheelock MJ, Johnson KR. Expression of N-cadherin by human squamous carcinoma cells induces a scattered fibroblastic phenotype with disrupted cell-cell adhesion. *J Cell Biol* 1996; **135**: 1643–1654.
- 48 Stossel TP, Fenteany G, Hartwig JH. Cell surface actin remodeling. *J Cell Sci* 2006; **119**: 3261–3264.
- 49 Morris HT, Machesky LM. Actin cytoskeletal control during epithelial to mesenchymal transition: focus on the pancreas and intestinal tract. *British Journal of Cancer* 2015; **112**: 613–620.
- 50 Peng J-M, Bera R, Chiou C-Y, Yu M-C, Chen T-C, Chen C-W *et al*. Actin cytoskeleton remodeling drives epithelial-mesenchymal transition for hepatoma invasion and metastasis in mice. *Hepatology* 2018; **67**: 2226–2243.
- 51 Boyer B, Thiery JP. Epithelium-mesenchyme interconversion as example of epithelial plasticity. *APMIS* 1993; **101**: 257–268.
- 52 Yang J, Mani SA, Donaher JL, Ramaswamy S, Itzykson RA, Come C *et al*. Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis. *Cell* 2004; **117**: 927–939.
- 53 Satelli A, Li S. Vimentin as a potential molecular target in cancer therapy Or Vimentin, an overview and its potential as a molecular target for cancer therapy. *Cell Mol Life Sci* 2011; **68**: 3033–3046.
- 54 Kokkinos MI, Wafai R, Wong MK, Newgreen DF, Thompson EW, Waltham M. Vimentin and epithelial-mesenchymal transition in human breast cancer--observations in vitro and in vivo. *Cells Tissues Organs (Print)* 2007; **185**: 191–203.

- 55 Chi Q, Yin T, Gregersen H, Deng X, Fan Y, Zhao J *et al.* Rear actomyosin contractility-driven directional cell migration in three-dimensional matrices: a mechano-chemical coupling mechanism. *J R Soc Interface* 2014; **11**. doi:10.1098/rsif.2013.1072.
- 56 Nelson WJ. Remodeling Epithelial Cell Organization: Transitions Between Front–Rear and Apical–Basal Polarity. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2009; **1**. doi:10.1101/cshperspect.a000513.
- 57 Palazzo AF, Cook TA, Alberts AS, Gundersen GG. mDia mediates Rho-regulated formation and orientation of stable microtubules. *Nat Cell Biol* 2001; **3**: 723–729.
- 58 Scheau C, Badarau IA, Costache R, Caruntu C, Mihai GL, Didilescu AC *et al.* The Role of Matrix Metalloproteinases in the Epithelial-Mesenchymal Transition of Hepatocellular Carcinoma. *Anal Cell Pathol (Amst)* 2019; **2019**. doi:10.1155/2019/9423907.
- 59 Wang X, Wang E, Cao J, Xiong F, Yang Y, Liu H. MiR-145 inhibits the epithelial-to-mesenchymal transition via targeting ADAM19 in human glioblastoma. *Oncotarget* 2017; **8**: 92545–92554.
- 60 Nassar D, Blanpain C. Cancer Stem Cells: Basic Concepts and Therapeutic Implications. *Annu Rev Pathol Mech Dis* 2016; **11**: 47–76.
- 61 Lapidot T, Sirard C, Vormoor J, Murdoch B, Hoang T, Caceres-Cortes J *et al.* A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature* 1994; **367**: 645–648.
- 62 Bonnet D, Dick JE. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nature Medicine* 1997; **3**: 730–737.
- 63 Pastushenko I, Blanpain C. EMT Transition States during Tumor Progression and Metastasis. *Trends Cell Biol* 2019; **29**: 212–226.
- 64 Weidenfeld K, Barkan D. EMT and Stemness in Tumor Dormancy and Outgrowth: Are They Intertwined Processes? *Front Oncol* 2018; **8**. doi:10.3389/fonc.2018.00381.
- 65 Rodriguez-Aznar E, Wiesmüller L, Sainz B, Hermann PC. EMT and Stemness—Key Players in Pancreatic Cancer Stem Cells. *Cancers (Basel)* 2019; **11**. doi:10.3390/cancers11081136.
- 66 Shibue T, Weinberg RA. EMT, CSCs, and drug resistance: the mechanistic link and clinical implications. *Nat Rev Clin Oncol* 2017; **14**: 611–629.
- 67 Tan TZ, Miow QH, Miki Y, Noda T, Mori S, Huang RY-J *et al.* Epithelial-mesenchymal transition spectrum quantification and its efficacy in deciphering survival and drug responses of cancer patients. *EMBO Molecular Medicine* 2014; **6**: 1279–1293.
- 68 Sun D, Vanderburg CR, Odierna GS, Hay ED. TGFbeta3 promotes transformation of chicken palate medial edge epithelium to mesenchyme in vitro. *Development* 1998; **125**: 95–105.
- 69 Moustakas A, Heldin C-H. Signaling networks guiding epithelial–mesenchymal transitions during embryogenesis and cancer progression. *Cancer Science* 2007; **98**: 1512–1520.
- 70 Hao Y, Baker D, ten Dijke P. TGF- β -Mediated Epithelial-Mesenchymal Transition and Cancer Metastasis. *Int J Mol Sci* 2019; **20**. doi:10.3390/ijms20112767.
- 71 Valcourt U, Kowanetz M, Niimi H, Heldin C-H, Moustakas A. TGF- β and the Smad Signaling Pathway Support Transcriptomic Reprogramming during Epithelial-Mesenchymal Cell Transition. *Mol Biol Cell* 2005; **16**: 1987–2002.
- 72 Shi Y, Massagué J. Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell* 2003; **113**: 685–700.

- 73 Wrighton KH, Lin X, Feng X-H. Phospho-control of TGF- β superfamily signaling. *Cell Res* 2009; **19**: 8–20.
- 74 Sato M, Muragaki Y, Saika S, Roberts AB, Ooshima A. Targeted disruption of TGF- β 1/Smad3 signaling protects against renal tubulointerstitial fibrosis induced by unilateral ureteral obstruction. *J Clin Invest* 2003; **112**: 1486–1494.
- 75 Piek E, Moustakas A, Kurisaki A, Heldin CH, Dijke P ten. TGF-(beta) type I receptor/ALK-5 and Smad proteins mediate epithelial to mesenchymal transdifferentiation in NMuMG breast epithelial cells. *J Cell Sci* 1999; **112**: 4557–4568.
- 76 Ashcroft GS, Yang X, Glick AB, Weinstein M, Letterio JJ, Mizel DE *et al.* Mice lacking Smad3 show accelerated wound healing and an impaired local inflammatory response. *Nature Cell Biology* 1999; **1**: 260–266.
- 77 Kaimori A, Potter J, Kaimori J-Y, Wang C, Mezey E, Koteish A. Transforming growth factor-beta1 induces an epithelial-to-mesenchymal transition state in mouse hepatocytes in vitro. *J Biol Chem* 2007; **282**: 22089–22101.
- 78 Takano S, Kanai F, Jazag A, Ijichi H, Yao J, Ogawa H *et al.* Smad4 is essential for down-regulation of E-cadherin induced by TGF-beta in pancreatic cancer cell line PANC-1. *J Biochem* 2007; **141**: 345–351.
- 79 Hoot KE, Lighthall J, Han G, Lu S-L, Li A, Ju W *et al.* Keratinocyte-specific Smad2 ablation results in increased epithelial-mesenchymal transition during skin cancer formation and progression. *J Clin Invest* 2008; **118**: 2722–2732.
- 80 Oft M, Akhurst RJ, Balmain A. Metastasis is driven by sequential elevation of H-ras and Smad2 levels. *Nat Cell Biol* 2002; **4**: 487–494.
- 81 Yan X, Chen Y-G. Smad7: not only a regulator, but also a cross-talk mediator of TGF- β signalling. *Biochem J* 2011; **434**: 1–10.
- 82 Shi W, Sun C, He B, Xiong W, Shi X, Yao D *et al.* GADD34–PP1c recruited by Smad7 dephosphorylates TGF β type I receptor. *J Cell Biol* 2004; **164**: 291–300.
- 83 Kuratomi G, Komuro A, Goto K, Shinozaki M, Miyazawa K, Miyazono K *et al.* NEDD4-2 (neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 4-2) negatively regulates TGF- β (transforming growth factor- β) signalling by inducing ubiquitin-mediated degradation of Smad2 and TGF- β type I receptor. *Biochem J* 2005; **386**: 461–470.
- 84 Komuro A, Imamura T, Saitoh M, Yoshida Y, Yamori T, Miyazono K *et al.* Negative regulation of transforming growth factor-beta (TGF-beta) signaling by WW domain-containing protein 1 (WWP1). *Oncogene* 2004; **23**: 6914–6923.
- 85 Kavsak P, Rasmussen RK, Causing CG, Bonni S, Zhu H, Thomsen GH *et al.* Smad7 binds to Smurf2 to form an E3 ubiquitin ligase that targets the TGF beta receptor for degradation. *Mol Cell* 2000; **6**: 1365–1375.
- 86 Ebisawa T, Fukuchi M, Murakami G, Chiba T, Tanaka K, Imamura T *et al.* Smurf1 interacts with transforming growth factor-beta type I receptor through Smad7 and induces receptor degradation. *J Biol Chem* 2001; **276**: 12477–12480.
- 87 Huang F, Chen Y-G. Regulation of TGF- β receptor activity. *Cell & Bioscience* 2012; **2**: 9.
- 88 Galliher AJ, Schiemann WP. Src phosphorylates Tyr284 in TGF-beta type II receptor and regulates TGF-beta stimulation of p38 MAPK during breast cancer cell proliferation and invasion. *Cancer Res* 2007; **67**: 3752–3758.
- 89 Lee MK, Pardoux C, Hall MC, Lee PS, Warburton D, Qing J *et al.* TGF- β activates Erk MAP kinase signalling through direct phosphorylation of ShcA. *EMBO J* 2007; **26**: 3957–3967.

- 90 Lehmann K, Janda E, Pierreux CE, Rytömaa M, Schulze A, McMahon M *et al.* Raf induces TGF β production while blocking its apoptotic but not invasive responses: a mechanism leading to increased malignancy in epithelial cells. *Genes Dev* 2000; **14**: 2610–2622.
- 91 Xie L, Law BK, Chytil AM, Brown KA, Aakre ME, Moses HL. Activation of the Erk Pathway Is Required for TGF- β 1-Induced EMT In Vitro. *Neoplasia* 2004; **6**: 603–610.
- 92 Bakin AV, Rinehart C, Tomlinson AK, Arteaga CL. p38 mitogen-activated protein kinase is required for TGFbeta-mediated fibroblastic transdifferentiation and cell migration. *J Cell Sci* 2002; **115**: 3193–3206.
- 93 Yu L, Hébert MC, Zhang YE. TGF- β receptor-activated p38 MAP kinase mediates Smad-independent TGF- β responses. *EMBO J* 2002; **21**: 3749–3759.
- 94 Yamashita M, Fatyol K, Jin C, Wang X, Liu Z, Zhang YE. TRAF6 mediates Smad-independent activation of JNK and p38 by TGF- β . *Mol Cell* 2008; **31**: 918–924.
- 95 Sorrentino A, Thakur N, Grimsby S, Marcusson A, von Bulow V, Schuster N *et al.* The type I TGF-beta receptor engages TRAF6 to activate TAK1 in a receptor kinase-independent manner. *Nat Cell Biol* 2008; **10**: 1199–1207.
- 96 Delaney JR, Mlodzik M. TGF-beta activated kinase-1: new insights into the diverse roles of TAK1 in development and immunity. *Cell Cycle* 2006; **5**: 2852–2855.
- 97 Kretschmar M, Doody J, Timokhina I, Massagué J. A mechanism of repression of TGF β / Smad signaling by oncogenic Ras. *Genes Dev* 1999; **13**: 804–816.
- 98 Ge J, Burnier L, Adamopoulou M, Kwa MQ, Schaks M, Rottner K *et al.* RhoA, Rac1, and Cdc42 differentially regulate α SMA and collagen I expression in mesenchymal stem cells. *J Biol Chem* 2018; **293**: 9358–9369.
- 99 Tavares ALP, Mercado-Pimentel ME, Runyan RB, Kitten GT. TGF beta-mediated RhoA expression is necessary for epithelial-mesenchymal transition in the embryonic chick heart. *Dev Dyn* 2006; **235**: 1589–1598.
- 100 Cho HJ, Yoo J. Rho activation is required for transforming growth factor-beta-induced epithelial-mesenchymal transition in lens epithelial cells. *Cell Biol Int* 2007; **31**: 1225–1230.
- 101 Vardouli L, Moustakas A, Stournaras C. LIM-kinase 2 and Cofilin Phosphorylation Mediate Actin Cytoskeleton Reorganization Induced by Transforming Growth Factor- β . *J Biol Chem* 2005; **280**: 11448–11457.
- 102 Pellegrin S, Mellor H. Actin stress fibres. *J Cell Sci* 2007; **120**: 3491–3499.
- 103 Kattla JJ, Carew RM, Heljić M, Godson C, Brazil DP. Protein kinase B/Akt activity is involved in renal TGF- β 1-driven epithelial-mesenchymal transition in vitro and in vivo. *Am J Physiol Renal Physiol* 2008; **295**: F215–F225.
- 104 Bakin AV, Tomlinson AK, Bhowmick NA, Moses HL, Arteaga CL. Phosphatidylinositol 3-Kinase Function Is Required for Transforming Growth Factor β -mediated Epithelial to Mesenchymal Transition and Cell Migration. *J Biol Chem* 2000; **275**: 36803–36810.
- 105 Cho HJ, Baek KE, Saika S, Jeong M-J, Yoo J. Snail is required for transforming growth factor-beta-induced epithelial-mesenchymal transition by activating PI3 kinase/Akt signal pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; **353**: 337–343.
- 106 Yi JY, Shin I, Arteaga CL. Type I transforming growth factor beta receptor binds to and activates phosphatidylinositol 3-kinase. *J Biol Chem* 2005; **280**: 10870–10876.
- 107 Tan AC. Targeting the PI3K/Akt/mTOR pathway in non-small cell lung cancer (NSCLC). *Thorac Cancer* 2020; **11**: 511–518.

- 108 Sarbassov DD, Ali SM, Sabatini DM. Growing roles for the mTOR pathway. *Curr Opin Cell Biol* 2005; **17**: 596–603.
- 109 Pon YL, Zhou HY, Cheung ANY, Ngan HYS, Wong AST. p70 S6 kinase promotes epithelial to mesenchymal transition through snail induction in ovarian cancer cells. *Cancer Res* 2008; **68**: 6524–6532.
- 110 Nieto MA. The snail superfamily of zinc-finger transcription factors. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2002; **3**: 155–166.
- 111 Mauhin V, Lutz Y, Dennefeld C, Alberga A. Definition of the DNA-binding site repertoire for the Drosophila transcription factor SNAIL. *Nucleic Acids Res* 1993; **21**: 3951–3957.
- 112 LaBonne C, Bronner-Fraser M. Snail-related transcriptional repressors are required in Xenopus for both the induction of the neural crest and its subsequent migration. *Dev Biol* 2000; **221**: 195–205.
- 113 Wu W-S, You R-I, Cheng C-C, Lee M-C, Lin T-Y, Hu C-T. Snail collaborates with EGR-1 and SP-1 to directly activate transcription of MMP 9 and ZEB1. *Scientific Reports* 2017; **7**: 1–13.
- 114 Haraguchi M, Sato M, Ozawa M. CRISPR/Cas9n-Mediated Deletion of the Snail 1Gene (SNAIL1) Reveals Its Role in Regulating Cell Morphology, Cell-Cell Interactions, and Gene Expression in Ovarian Cancer (RMG-1) Cells. *PLoS One* 2015; **10**. doi:10.1371/journal.pone.0132260.
- 115 Tran HD, Luitel K, Kim M, Zhang K, Longmore GD, Tran DD. Transient SNAIL1 Expression Is Necessary for Metastatic Competence in Breast Cancer. *Cancer Res* 2014; **74**: 6330–6340.
- 116 Cano A, Pérez-Moreno MA, Rodrigo I, Locascio A, Blanco MJ, del Barrio MG *et al*. The transcription factor Snail controls epithelial–mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression. *Nature Cell Biology* 2000; **2**: 76–83.
- 117 Tomono T, Yano K, Ogihara T. Snail-Induced Epithelial-to-Mesenchymal Transition Enhances P-gp-Mediated Multidrug Resistance in HCC827 Cells. *J Pharm Sci* 2017; **106**: 2642–2649.
- 118 Mezencev R, Matyunina LV, Jabbari N, McDonald JF. Snail -induced epithelial-to-mesenchymal transition of MCF-7 breast cancer cells: systems analysis of molecular changes and their effect on radiation and drug sensitivity. *BMC Cancer* 2016; **16**: 1–21.
- 119 Carver EA, Jiang R, Lan Y, Oram KF, Gridley T. The Mouse Snail Gene Encodes a Key Regulator of the Epithelial-Mesenchymal Transition. *Mol Cell Biol* 2001; **21**: 8184–8188.
- 120 Nieto MA, Sargent MG, Wilkinson DG, Cooke J. Control of cell behavior during vertebrate development by Slug, a zinc finger gene. *Science* 1994; **264**: 835–839.
- 121 Thuault S, Tan E-J, Peinado H, Cano A, Heldin C-H, Moustakas A. HMGA2 and Smads Co-regulate SNAIL1 Expression during Induction of Epithelial-to-Mesenchymal Transition. *J Biol Chem* 2008; **283**: 33437–33446.
- 122 Horiguchi K, Shirakihara T, Nakano A, Imamura T, Miyazono K, Saitoh M. Role of Ras Signaling in the Induction of Snail by Transforming Growth Factor- β . *J Biol Chem* 2009; **284**: 245–253.
- 123 Lamouille S, Xu J, Derynck R. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2014; **15**: 178–196.
- 124 Craene BD, Berx G. Regulatory networks defining EMT during cancer initiation and progression. *Nature Reviews Cancer* 2013; **13**: 97–110.
- 125 Ikenouchi J, Matsuda M, Furuse M, Tsukita S. Regulation of tight junctions during the epithelium-mesenchyme transition: direct repression of the gene expression of claudins/occludin by Snail. *Journal of Cell Science* 2003; **116**: 1959–1967.

- 126 Whiteman EL, Liu C-J, Fearon ER, Margolis B. The transcription factor snail represses Crumbs3 expression and disrupts apico-basal polarity complexes. *Oncogene* 2008; **27**: 3875–3879.
- 127 De Craene B, Gilbert B, Stove C, Bruyneel E, van Roy F, Berx G. The transcription factor snail induces tumor cell invasion through modulation of the epithelial cell differentiation program. *Cancer Res* 2005; **65**: 6237–6244.
- 128 Guaita S, Puig I, Francí C, Garrido M, Domínguez D, Batlle E *et al.* Snail Induction of Epithelial to Mesenchymal Transition in Tumor Cells Is Accompanied by MUC1 Repression and ZEB1 Expression. *J Biol Chem* 2002; **277**: 39209–39216.
- 129 Olmeda D, Jordá M, Peinado H, Fabra Á, Cano A. Snail silencing effectively suppresses tumour growth and invasiveness. *Oncogene* 2007; **26**: 1862–1874.
- 130 Moreno-Bueno G, Cubillo E, Sarrió D, Peinado H, Rodríguez-Pinilla SM, Villa S *et al.* Genetic profiling of epithelial cells expressing E-cadherin repressors reveals a distinct role for Snail, Slug, and E47 factors in epithelial-mesenchymal transition. *Cancer Res* 2006; **66**: 9543–9556.
- 131 Taki M, Verschueren K, Yokoyama K, Nagayama M, Kamata N. Involvement of Ets-1 transcription factor in inducing matrix metalloproteinase-2 expression by epithelial-mesenchymal transition in human squamous carcinoma cells. *Int J Oncol* 2006; **28**: 487–496.
- 132 Jordà M, Olmeda D, Vinyals A, Valero E, Cubillo E, Llorens A *et al.* Upregulation of MMP-9 in MDCK epithelial cell line in response to expression of the Snail transcription factor. *J Cell Sci* 2005; **118**: 3371–3385.
- 133 Dave N, Guaita-Esteruelas S, Gutarra S, Frias À, Beltran M, Peiró S *et al.* Functional cooperation between Snail1 and twist in the regulation of ZEB1 expression during epithelial to mesenchymal transition. *J Biol Chem* 2011; **286**: 12024–12032.
- 134 Peiró S, Escrivà M, Puig I, Barberà MJ, Dave N, Herranz N *et al.* Snail1 transcriptional repressor binds to its own promoter and controls its expression. *Nucleic Acids Res* 2006; **34**: 2077–2084.
- 135 Peinado H, Olmeda D, Cano A. Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype? *Nature Reviews Cancer* 2007; **7**: 415–428.
- 136 Postigo AA, Depp JL, Taylor JJ, Kroll KL. Regulation of Smad signaling through a differential recruitment of coactivators and corepressors by ZEB proteins. *EMBO J* 2003; **22**: 2453–2462.
- 137 Sánchez-Tilló E, Lázaro A, Torrent R, Cuatrecasas M, Vaquero EC, Castells A *et al.* ZEB1 represses E-cadherin and induces an EMT by recruiting the SWI/SNF chromatin-remodeling protein BRG1. *Oncogene* 2010; **29**: 3490–3500.
- 138 Wang J, Scully K, Zhu X, Cai L, Zhang J, Prefontaine GG *et al.* Opposing LSD1 complexes function in developmental gene activation and repression programmes. *Nature* 2007; **446**: 882–887.
- 139 Byles V, Zhu L, Lovaas J, Chmielewski L, Wang J, Faller D *et al.* SIRT1 induces EMT by cooperating with EMT transcription factors and enhances prostate cancer cell migration and metastasis. *Oncogene* 2012; **31**: 4619–4629.
- 140 Postigo AA. Opposing functions of ZEB proteins in the regulation of the TGF β /BMP signaling pathway. *EMBO J* 2003; **22**: 2443–2452.
- 141 Comijn J, Berx G, Vermassen P, Verschueren K, van Grunsven L, Bruyneel E *et al.* The two-handed E box binding zinc finger protein SIP1 downregulates E-cadherin and induces invasion. *Mol Cell* 2001; **7**: 1267–1278.

- 142 Eger A, Aigner K, Sonderegger S, Dampier B, Oehler S, Schreiber M *et al.* DeltaEF1 is a transcriptional repressor of E-cadherin and regulates epithelial plasticity in breast cancer cells. *Oncogene* 2005; **24**: 2375–2385.
- 143 Vandewalle C, Comijn J, De Craene B, Vermassen P, Bruyneel E, Andersen H *et al.* SIP1/ZEB2 induces EMT by repressing genes of different epithelial cell-cell junctions. *Nucleic Acids Res* 2005; **33**: 6566–6578.
- 144 Spaderna S, Schmalhofer O, Wahlbuhl M, Dimmler A, Bauer K, Sultan A *et al.* The transcriptional repressor ZEB1 promotes metastasis and loss of cell polarity in cancer. *Cancer Res* 2008; **68**: 537–544.
- 145 Bindels S, Mestdagt M, Vandewalle C, Jacobs N, Volders L, Noël A *et al.* Regulation of vimentin by SIP1 in human epithelial breast tumor cells. *Oncogene* 2006; **25**: 4975–4985.
- 146 Sánchez-Tilló E, de Barrios O, Siles L, Cuatrecasas M, Castells A, Postigo A. β -catenin/TCF4 complex induces the epithelial-to-mesenchymal transition (EMT)-activator ZEB1 to regulate tumor invasiveness. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011; **108**: 19204–19209.
- 147 Massari ME, Murre C. Helix-Loop-Helix Proteins: Regulators of Transcription in Eucaryotic Organisms. *Mol Cell Biol* 2000; **20**: 429–440.
- 148 Kondo M, Cubillo E, Tobiume K, Shirakihara T, Fukuda N, Suzuki H *et al.* A role for Id in the regulation of TGF-beta-induced epithelial-mesenchymal transdifferentiation. *Cell Death Differ* 2004; **11**: 1092–1101.
- 149 Perez-Moreno MA, Locascio A, Rodrigo I, Dhondt G, Portillo F, Nieto MA *et al.* A new role for E12/E47 in the repression of E-cadherin expression and epithelial-mesenchymal transitions. *J Biol Chem* 2001; **276**: 27424–27431.
- 150 Chen ZF, Behringer RR. twist is required in head mesenchyme for cranial neural tube morphogenesis. *Genes Dev* 1995; **9**: 686–699.
- 151 Howard TD, Paznekas WA, Green ED, Chiang LC, Ma N, Ortiz de Luna RI *et al.* Mutations in TWIST, a basic helix-loop-helix transcription factor, in Saethre-Chotzen syndrome. *Nat Genet* 1997; **15**: 36–41.
- 152 Shapiro IM, Cheng AW, Flytzanis NC, Balsamo M, Condeelis JS, Oktay MH *et al.* An EMT-Driven Alternative Splicing Program Occurs in Human Breast Cancer and Modulates Cellular Phenotype. *PLoS Genet* 2011; **7**. doi:10.1371/journal.pgen.1002218.
- 153 Ansieau S, Bastid J, Doreau A, Morel A-P, Bouchet BP, Thomas C *et al.* Induction of EMT by twist proteins as a collateral effect of tumor-promoting inactivation of premature senescence. *Cancer Cell* 2008; **14**: 79–89.
- 154 Alexander NR, Tran NL, Rekapally H, Summers CE, Glackin C, Heimark RL. N-cadherin gene expression in prostate carcinoma is modulated by integrin-dependent nuclear translocation of Twist1. *Cancer Res* 2006; **66**: 3365–3369.
- 155 Eckert MA, Lwin TM, Chang AT, Kim J, Danis E, Ohno-Machado L *et al.* Twist1-induced invadopodia formation promotes tumor metastasis. *Cancer Cell* 2011; **19**: 372–386.
- 156 Yang F, Sun L, Li Q, Han X, Lei L, Zhang H *et al.* SET8 promotes epithelial-mesenchymal transition and confers TWIST dual transcriptional activities. *EMBO J* 2012; **31**: 110–123.
- 157 Yang M-H, Hsu DS-S, Wang H-W, Wang H-J, Lan H-Y, Yang W-H *et al.* Bmi1 is essential in Twist1-induced epithelial-mesenchymal transition. *Nat Cell Biol* 2010; **12**: 982–992.
- 158 Kang Y, Chen C-R, Massagué J. A self-enabling TGFbeta response coupled to stress signaling: Smad engages stress response factor ATF3 for Id1 repression in epithelial cells. *Mol Cell* 2003; **11**: 915–926.

- 159 Thuault S, Valcourt U, Petersen M, Manfioletti G, Heldin C-H, Moustakas A. Transforming growth factor- β employs HMGA2 to elicit epithelial–mesenchymal transition. *J Cell Biol* 2006; **174**: 175–183.
- 160 Hou M, Bao X, Luo F, Chen X, Liu L, Wu M. HMGA2 Modulates the TGF β /Smad, TGF β /ERK and Notch Signaling Pathways in Human Lens Epithelial-Mesenchymal Transition. *Curr Mol Med* 2018; **18**: 71–82.
- 161 Fernando RI, Litzinger M, Trono P, Hamilton DH, Schlom J, Palena C. The T-box transcription factor Brachyury promotes epithelial-mesenchymal transition in human tumor cells. *J Clin Invest* 2010; **120**: 533–544.
- 162 Larsen JE, Nathan V, Osborne JK, Farrow RK, Deb D, Sullivan JP *et al.* ZEB1 drives epithelial-to-mesenchymal transition in lung cancer. *J Clin Invest* 2016; **126**: 3219–3235.
- 163 Saitoh M. Epithelial–mesenchymal transition is regulated at post-transcriptional levels by transforming growth factor- β signaling during tumor progression. *Cancer Sci* 2015; **106**: 481–488.
- 164 Ishii H, Saitoh M, Sakamoto K, Kondo T, Katoh R, Tanaka S *et al.* Epithelial splicing regulatory proteins 1 (ESRP1) and 2 (ESRP2) suppress cancer cell motility via different mechanisms. *J Biol Chem* 2014; **289**: 27386–27399.
- 165 Pradella D, Naro C, Sette C, Ghigna C. EMT and stemness: flexible processes tuned by alternative splicing in development and cancer progression. *Mol Cancer* 2017; **16**. doi:10.1186/s12943-016-0579-2.
- 166 Fiegen D, Haeusler L-C, Blumenstein L, Herbrand U, Dvorsky R, Vetter IR *et al.* Alternative splicing of Rac1 generates Rac1b, a self-activating GTPase. *J Biol Chem* 2004; **279**: 4743–4749.
- 167 Gonçalves V, Matos P, Jordan P. Antagonistic SR proteins regulate alternative splicing of tumor-related Rac1b downstream of the PI3-kinase and Wnt pathways. *Hum Mol Genet* 2009; **18**: 3696–3707.
- 168 Radisky DC, Levy DD, Littlepage LE, Liu H, Nelson CM, Fata JE *et al.* Rac1b and reactive oxygen species mediate MMP-3-induced EMT and genomic instability. *Nature* 2005; **436**: 123–127.
- 169 Warzecha CC, Carstens RP. Complex changes in alternative pre-mRNA splicing play a central role in the Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT). *Semin Cancer Biol* 2012; **22**: 417–427.
- 170 Brown RL, Reinke LM, Damerow MS, Perez D, Chodosh LA, Yang J *et al.* CD44 splice isoform switching in human and mouse epithelium is essential for epithelial-mesenchymal transition and breast cancer progression. *J Clin Invest* 2011; **121**: 1064–1074.
- 171 Korpál M, Lee ES, Hu G, Kang Y. The miR-200 Family Inhibits Epithelial-Mesenchymal Transition and Cancer Cell Migration by Direct Targeting of E-cadherin Transcriptional Repressors ZEB1 and ZEB2. *J Biol Chem* 2008; **283**: 14910–14914.
- 172 Gregory PA, Bert AG, Paterson EL, Barry SC, Tsykin A, Farshid G *et al.* The miR-200 family and miR-205 regulate epithelial to mesenchymal transition by targeting ZEB1 and SIP1. *Nat Cell Biol* 2008; **10**: 593–601.
- 173 Zhang H-F, Xu L-Y, Li E-M. A family of pleiotropically acting microRNAs in cancer progression, miR-200: potential cancer therapeutic targets. *Curr Pharm Des* 2014; **20**: 1896–1903.
- 174 Burk U, Schubert J, Wellner U, Schmalhofer O, Vincan E, Spaderna S *et al.* A reciprocal repression between ZEB1 and members of the miR-200 family promotes EMT and invasion in cancer cells. *EMBO Rep* 2008; **9**: 582–589.
- 175 Zhou BP, Deng J, Xia W, Xu J, Li YM, Gunduz M *et al.* Dual regulation of Snail by GSK-3 β -mediated phosphorylation in control of epithelial-mesenchymal transition. *Nat Cell Biol* 2004; **6**: 931–940.
- 176 Peinado H, del Carmen Iglesias-de la Cruz M, Olmeda D, Csiszar K, Fong KSK, Vega S *et al.* A molecular role for lysyl oxidase-like 2 enzyme in Snail regulation and tumor progression. *EMBO J* 2005; **24**: 3446–3458.

- 177 Peinado H, Portillo F, Cano A. Switching on-off Snail: LOXL2 versus GSK3beta. *Cell Cycle* 2005; **4**: 1749–1752.
- 178 Du C, Zhang C, Hassan S, Biswas MHU, Balaji KC. Protein kinase D1 suppresses epithelial-to-mesenchymal transition through phosphorylation of snail. *Cancer Res* 2010; **70**: 7810–7819.
- 179 Yang Z, Rayala S, Nguyen D, Vadlamudi RK, Chen S, Kumar R. Pak1 phosphorylation of snail, a master regulator of epithelial-to-mesenchyme transition, modulates snail's subcellular localization and functions. *Cancer Res* 2005; **65**: 3179–3184.
- 180 Zhang K, Rodriguez-Aznar E, Yabuta N, Owen RJ, Mingot JM, Nojima H *et al.* Lats2 kinase potentiates Snail1 activity by promoting nuclear retention upon phosphorylation. *EMBO J* 2012; **31**: 29–43.
- 181 Zheng H, Shen M, Cha Y-L, Li W, Wei Y, Blanco MA *et al.* PKD1 phosphorylation-dependent degradation of SNAIL by SCF-FBXO11 regulates epithelial-mesenchymal transition and metastasis. *Cancer Cell* 2014; **26**: 358–373.
- 182 Park SY, Kim HS, Kim NH, Ji S, Cha SY, Kang JG *et al.* Snail1 is stabilized by O-GlcNAc modification in hyperglycaemic condition. *EMBO J* 2010; **29**: 3787–3796.
- 183 Wang S-P, Wang W-L, Chang Y-L, Wu C-T, Chao Y-C, Kao S-H *et al.* p53 controls cancer cell invasion by inducing the MDM2-mediated degradation of Slug. *Nat Cell Biol* 2009; **11**: 694–704.
- 184 Long J, Zuo D, Park M. Pc2-mediated sumoylation of Smad-interacting protein 1 attenuates transcriptional repression of E-cadherin. *J Biol Chem* 2005; **280**: 35477–35489.
- 185 Neufeld B, Grosse-Wilde A, Hoffmeyer A, Jordan BW, Chen P, Dinev D *et al.* Serine/Threonine kinases 3pK and MAPK-activated protein kinase 2 interact with the basic helix-loop-helix transcription factor E47 and repress its transcriptional activity. *J Biol Chem* 2000; **275**: 20239–20242.
- 186 Lluís F, Ballestar E, Suelves M, Esteller M, Muñoz-Cánoves P. E47 phosphorylation by p38 MAPK promotes MyoD/E47 association and muscle-specific gene transcription. *EMBO J* 2005; **24**: 974–984.
- 187 Nie L, Xu M, Vladimirova A, Sun X-H. Notch-induced E2A ubiquitination and degradation are controlled by MAP kinase activities. *EMBO J* 2003; **22**: 5780–5792.
- 188 Wang H, Wang H-S, Zhou B-H, Li C-L, Zhang F, Wang X-F *et al.* Epithelial–Mesenchymal Transition (EMT) Induced by TNF- α Requires AKT/GSK-3 β -Mediated Stabilization of Snail in Colorectal Cancer. *PLoS One* 2013; **8**. doi:10.1371/journal.pone.0056664.
- 189 Chen Y, Wen H, Zhou C, Su Q, Lin Y, Xie Y *et al.* TNF- α derived from M2 tumor-associated macrophages promotes epithelial-mesenchymal transition and cancer stemness through the Wnt/ β -catenin pathway in SMMC-7721 hepatocellular carcinoma cells. *Experimental Cell Research* 2019; **378**: 41–50.
- 190 Hayden MS, Ghosh S. Regulation of NF- κ B by TNF Family Cytokines. *Semin Immunol* 2014; **26**: 253–266.
- 191 Liao S-J, Luo J, Li D, Zhou Y-H, Yan B, Wei J-J *et al.* TGF- β 1 and TNF- α synergistically induce epithelial to mesenchymal transition of breast cancer cells by enhancing TAK1 activation. *J Cell Commun Signal* 2019; **13**: 369–380.
- 192 Lo H-W, Hsu S-C, Xia W, Cao X, Shih J-Y, Wei Y *et al.* Epidermal Growth Factor Receptor Cooperates with Signal Transducer and Activator of Transcription 3 to Induce Epithelial-Mesenchymal Transition in Cancer Cells via Up-regulation of TWIST Gene Expression. *Cancer Res* 2007; **67**: 9066–9076.
- 193 Hugo HJ, Wafai R, Blick T, Thompson EW, Newgreen DF. Staurosporine augments EGF-mediated EMT in PMC42-LA cells through actin depolymerisation, focal contact size reduction and Snail1 induction - a model for cross-modulation. *BMC Cancer* 2009; **9**: 235.

- 194 Hardy KM, Booth BW, Hendrix MJC, Salomon DS, Strizzi L. ErbB/EGF Signaling and EMT in Mammary Development and Breast Cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2010; **15**: 191–199.
- 195 Ellerbroek SM, Halbleib JM, Benavidez M, Warmka JK, Wattenberg EV, Stack MS *et al.* Phosphatidylinositol 3-kinase activity in epidermal growth factor-stimulated matrix metalloproteinase-9 production and cell surface association. *Cancer Res* 2001; **61**: 1855–1861.
- 196 Kim J, Kong J, Chang H, Kim H, Kim A. EGF induces epithelial-mesenchymal transition through phospho-Smad2/3-Snail signaling pathway in breast cancer cells. *Oncotarget* 2016; **7**: 85021–85032.
- 197 Buonato JM, Lan IS, Lazzara MJ. EGF augments TGF β -induced epithelial–mesenchymal transition by promoting SHP2 binding to GAB1. *J Cell Sci* 2015; **128**: 3898–3909.
- 198 Sauka-Spengler T, Bronner-Fraser M. A gene regulatory network orchestrates neural crest formation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008; **9**: 557–568.
- 199 Sun X, Meyers EN, Lewandoski M, Martin GR. Targeted disruption of Fgf8 causes failure of cell migration in the gastrulating mouse embryo. *Genes Dev* 1999; **13**: 1834–1846.
- 200 Ciruna B, Rossant J. FGF signaling regulates mesoderm cell fate specification and morphogenetic movement at the primitive streak. *Dev Cell* 2001; **1**: 37–49.
- 201 Billottet C, Tuefferd M, Gentien D, Rapinat A, Thiery J-P, Broët P *et al.* Modulation of several waves of gene expression during FGF-1 induced epithelial-mesenchymal transition of carcinoma cells. *Journal of Cellular Biochemistry* 2008; **104**: 826–839.
- 202 Grotegut S, von Schweinitz D, Christofori G, Lehembre F. Hepatocyte growth factor induces cell scattering through MAPK/Egr-1-mediated upregulation of Snail. *EMBO J* 2006; **25**: 3534–3545.
- 203 Kim H-J, Litzenburger BC, Cui X, Delgado DA, Grabiner BC, Lin X *et al.* Constitutively Active Type I Insulin-Like Growth Factor Receptor Causes Transformation and Xenograft Growth of Immortalized Mammary Epithelial Cells and Is Accompanied by an Epithelial-to-Mesenchymal Transition Mediated by NF- κ B and Snail. *Mol Cell Biol* 2007; **27**: 3165–3175.
- 204 Graham TR, Zhau HE, Odeiro-Marrah VA, Osunkoya AO, Kimbro KS, Tighiouart M *et al.* Insulin-like growth factor-I-dependent up-regulation of ZEB1 drives epithelial-to-mesenchymal transition in human prostate cancer cells. *Cancer Res* 2008; **68**: 2479–2488.
- 205 Canonici A, Steelant W, Rigot V, Khomitch-Baud A, Boutaghou-Cherid H, Bruyneel E *et al.* Insulin-like growth factor-I receptor, E-cadherin and α v integrin form a dynamic complex under the control of alpha-catenin. *Int J Cancer* 2008; **122**: 572–582.
- 206 Yang AD, Camp ER, Fan F, Shen L, Gray MJ, Liu W *et al.* Vascular endothelial growth factor receptor-1 activation mediates epithelial to mesenchymal transition in human pancreatic carcinoma cells. *Cancer Res* 2006; **66**: 46–51.
- 207 Yang L, Lin C, Liu Z-R. P68 RNA helicase mediates PDGF-induced epithelial mesenchymal transition by displacing Axin from beta-catenin. *Cell* 2006; **127**: 139–155.
- 208 Mimeault M, Batra SK. Interplay of distinct growth factors during epithelial mesenchymal transition of cancer progenitor cells and molecular targeting as novel cancer therapies. *Ann Oncol* 2007; **18**: 1605–1619.
- 209 Brabletz T, Jung A, Reu S, Porzner M, Hlubek F, Kunz-Schughart LA *et al.* Variable beta-catenin expression in colorectal cancers indicates tumor progression driven by the tumor environment. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; **98**: 10356–10361.
- 210 Niehrs C. The complex world of WNT receptor signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2012; **13**: 767–779.

- 211 Li X, Deng W, Nail CD, Bailey SK, Kraus MH, Ruppert JM *et al.* Snail induction is an early response to Gli1 that determines the efficiency of epithelial transformation. *Oncogene* 2006; **25**: 609–621.
- 212 Briscoe J, Théron PP. The mechanisms of Hedgehog signalling and its roles in development and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2013; **14**: 416–429.
- 213 Timmerman LA, Grego-Bessa J, Raya A, Bertrán E, Pérez-Pomares JM, Díez J *et al.* Notch promotes epithelial-mesenchymal transition during cardiac development and oncogenic transformation. *Genes Dev* 2004; **18**: 99–115.
- 214 Niessen K, Fu Y, Chang L, Hoodless PA, McFadden D, Karsan A. Slug is a direct Notch target required for initiation of cardiac cushion cellularization. *J Cell Biol* 2008; **182**: 315–325.
- 215 Xie M, Zhang L, He C, Xu F, Liu J, Hu Z *et al.* Activation of Notch-1 enhances epithelial-mesenchymal transition in gefitinib-acquired resistant lung cancer cells. *J Cell Biochem* 2012; **113**: 1501–1513.
- 216 Sullivan NJ, Sasser AK, Axel AE, Vesuna F, Raman V, Ramirez N *et al.* Interleukin-6 induces an epithelial-mesenchymal transition phenotype in human breast cancer cells. *Oncogene* 2009; **28**: 2940–2947.
- 217 Fernando RI, Castillo MD, Litzinger M, Hamilton DH, Palena C. IL-8 signaling plays a critical role in the epithelial-mesenchymal transition of human carcinoma cells. *Cancer Res* 2011; **71**: 5296–5306.
- 218 Yang M-H, Wu M-Z, Chiou S-H, Chen P-M, Chang S-Y, Liu C-J *et al.* Direct regulation of TWIST by HIF-1 α promotes metastasis. *Nat Cell Biol* 2008; **10**: 295–305.
- 219 Yang F, Huang XR, Chung ACK, Hou C-C, Lai KN, Lan HY. Essential role for Smad3 in angiotensin II-induced tubular epithelial-mesenchymal transition. *J Pathol* 2010; **221**: 390–401.
- 220 Boutet A, De Frutos CA, Maxwell PH, Mayol MJ, Romero J, Nieto MA. Snail activation disrupts tissue homeostasis and induces fibrosis in the adult kidney. *EMBO J* 2006; **25**: 5603–5613.
- 221 Humphreys BD, Lin S-L, Kobayashi A, Hudson TE, Nowlin BT, Bonventre JV *et al.* Fate tracing reveals the pericyte and not epithelial origin of myofibroblasts in kidney fibrosis. *Am J Pathol* 2010; **176**: 85–97.
- 222 LeBleu VS, Taduri G, O’Connell J, Teng Y, Cooke VG, Woda C *et al.* Origin and function of myofibroblasts in kidney fibrosis. *Nat Med* 2013; **19**: 1047–1053.
- 223 Grande MT, Sánchez-Laorden B, López-Blau C, De Frutos CA, Boutet A, Arévalo M *et al.* Snail1-induced partial epithelial-to-mesenchymal transition drives renal fibrosis in mice and can be targeted to reverse established disease. *Nat Med* 2015; **21**: 989–997.
- 224 Borges FT, Melo SA, Özdemir BC, Kato N, Revuelta I, Miller CA *et al.* TGF- β 1-containing exosomes from injured epithelial cells activate fibroblasts to initiate tissue regenerative responses and fibrosis. *J Am Soc Nephrol* 2013; **24**: 385–392.
- 225 Lovisa S, LeBleu VS, Tampe B, Sugimoto H, Vadnagara K, Carstens JL *et al.* Epithelial-to-mesenchymal transition induces cell cycle arrest and parenchymal damage in renal fibrosis. *Nat Med* 2015; **21**: 998–1009.
- 226 Tarin D. The Fallacy of Epithelial Mesenchymal Transition in Neoplasia. *Cancer Res* 2005; **65**: 5996–6001.
- 227 Derynck R, Weinberg RA. EMT and Cancer: More Than Meets the Eye. *Developmental Cell* 2019; **49**: 313–316.
- 228 Brabletz T, Kalluri R, Nieto MA, Weinberg RA. EMT in cancer. *Nature Reviews Cancer* 2018; **18**: 128–134.
- 229 Khoo BL, Lee SC, Kumar P, Tan TZ, Warkiani ME, Ow SGW *et al.* Short-term expansion of breast circulating cancer cells predicts response to anti-cancer therapy. *Oncotarget* 2015; **6**: 15578–15593.

- 230 Gao D, Mittal V. Tumor Microenvironment Regulates Epithelial – Mesenchymal Transitions in Mestastasis. *Expert Rev Anticancer Ther* 2012; **12**: 857–859.
- 231 Eskiizmir G, Özgür E. Epithelial-Mesenchymal Transition in Tumor Microenvironment Induced by Hypoxia. *Cancer Metastasis* 2018. doi:10.5772/intechopen.78717.
- 232 Bonde A-K, Tischler V, Kumar S, Soltermann A, Schwendener RA. Intratumoral macrophages contribute to epithelial-mesenchymal transition in solid tumors. *BMC Cancer* 2012; **12**: 35.
- 233 Toh B, Wang X, Keeble J, Sim WJ, Khoo K, Wong W-C *et al.* Mesenchymal transition and dissemination of cancer cells is driven by myeloid-derived suppressor cells infiltrating the primary tumor. *PLoS Biol* 2011; **9**: e1001162.
- 234 Ieda T, Tazawa H, Okabayashi H, Yano S, Shigeyasu K, Kuroda S *et al.* Visualization of epithelial-mesenchymal transition in an inflammatory microenvironment–colorectal cancer network. *Scientific Reports* 2019; **9**: 16378.
- 235 Lyons JG, Patel V, Roue NC, Fok SY, Soon LL, Halliday GM *et al.* Snail up-regulates proinflammatory mediators and inhibits differentiation in oral keratinocytes. *Cancer Res* 2008; **68**: 4525–4530.
- 236 Luo D, Wang J, Li J, Post M. Mouse snail is a target gene for HIF. *Mol Cancer Res* 2011; **9**: 234–245.
- 237 Jing Y, Han Z, Zhang S, Liu Y, Wei L. Epithelial-Mesenchymal Transition in tumor microenvironment. *Cell Biosci* 2011; **1**: 29.
- 238 Yu M, Bardia A, Wittner BS, Stott SL, Smas ME, Ting DT *et al.* Circulating breast tumor cells exhibit dynamic changes in epithelial and mesenchymal composition. *Science* 2013; **339**: 580–584.
- 239 Fischer KR, Durrans A, Lee S, Sheng J, Li F, Wong S *et al.* EMT is not required for lung metastasis but contributes to chemoresistance. *Nature* 2015; **527**: 472–476.
- 240 Zheng X, Carstens JL, Kim J, Scheible M, Kaye J, Sugimoto H *et al.* EMT Program is Dispensable for Metastasis but Induces Chemoresistance in Pancreatic Cancer. *Nature* 2015; **527**: 525–530.
- 241 Deng J, Wang L, Chen H, Hao J, Ni J, Chang L *et al.* Targeting epithelial-mesenchymal transition and cancer stem cells for chemoresistant ovarian cancer. *Oncotarget* 2016; **7**: 55771–55788.
- 242 Hsu DS-S, Lan H-Y, Huang C-H, Tai S-K, Chang S-Y, Tsai T-L *et al.* Regulation of excision repair cross-complementation group 1 by Snail contributes to cisplatin resistance in head and neck cancer. *Clin Cancer Res* 2010; **16**: 4561–4571.
- 243 Saxena M, Stephens MA, Pathak H, Rangarajan A. Transcription factors that mediate epithelial–mesenchymal transition lead to multidrug resistance by upregulating ABC transporters. *Cell Death Dis* 2011; **2**: e179.
- 244 De Mattos-Arruda L, Bottai G, Nuciforo PG, Di Tommaso L, Giovannetti E, Peg V *et al.* MicroRNA-21 links epithelial-to-mesenchymal transition and inflammatory signals to confer resistance to neoadjuvant trastuzumab and chemotherapy in HER2-positive breast cancer patients. *Oncotarget* 2015; **6**: 37269–37280.
- 245 Terry S, Savagner P, Ortiz-Cuaran S, Mahjoubi L, Saintigny P, Thiery J *et al.* New insights into the role of EMT in tumor immune escape. *Mol Oncol* 2017; **11**: 824–846.
- 246 Kudo-Saito C, Shirako H, Takeuchi T, Kawakami Y. Cancer metastasis is accelerated through immunosuppression during Snail-induced EMT of cancer cells. *Cancer Cell* 2009; **15**: 195–206.

- 247 Akalay I, Janji B, Hasmim M, Noman MZ, André F, De Cremoux P *et al.* Epithelial-to-mesenchymal transition and autophagy induction in breast carcinoma promote escape from T-cell-mediated lysis. *Cancer Res* 2013; **73**: 2418–2427.
- 248 Dongre A, Rashidian M, Reinhardt F, Bagnato A, Keckesova Z, Ploegh HL *et al.* Epithelial-to-mesenchymal Transition contributes to Immunosuppression in Breast Carcinomas. *Cancer Res* 2017; **77**: 3982–3989.
- 249 Ferrand N, Gnanapragasam A, Dorothee G, Redeuilh G, Larsen AK, Sabbah M. Loss of WISP2/CCN5 in Estrogen-Dependent MCF7 Human Breast Cancer Cells Promotes a Stem-Like Cell Phenotype. *PLoS One* 2014; **9**. doi:10.1371/journal.pone.0087878.
- 250 Asgarova A, Asgarov K, Godet Y, Peixoto P, Nadaradjane A, Boyer-Guittaut M *et al.* PD-L1 expression is regulated by both DNA methylation and NF- κ B during EMT signaling in non-small cell lung carcinoma. *Oncoimmunology* 2018; **7**: e1423170.
- 251 Noman MZ, Janji B, Abdou A, Hasmim M, Terry S, Tan TZ *et al.* The immune checkpoint ligand PD-L1 is upregulated in EMT-activated human breast cancer cells by a mechanism involving ZEB-1 and miR-200. *Oncoimmunology* 2017; **6**. doi:10.1080/2162402X.2016.1263412.
- 252 Chen L, Gibbons DL, Goswami S, Cortez MA, Ahn Y-H, Byers LA *et al.* Metastasis is regulated via microRNA-200/ZEB1 axis control of tumour cell PD-L1 expression and intratumoral immunosuppression. *Nat Commun* 2014; **5**: 5241.
- 253 Mani SA, Guo W, Liao M-J, Eaton EN, Ayyanan A, Zhou AY *et al.* The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell* 2008; **133**: 704–715.
- 254 Ye X, Tam WL, Shibue T, Kaygusuz Y, Reinhardt F, Ng Eaton E *et al.* Distinct EMT programs control normal mammary stem cells and tumour-initiating cells. *Nature* 2015; **525**: 256–260.
- 255 Beerling E, Seinstra D, de Wit E, Kester L, van der Velden D, Maynard C *et al.* Plasticity between Epithelial and Mesenchymal States Unlinks EMT from Metastasis-Enhancing Stem Cell Capacity. *Cell Rep* 2016; **14**: 2281–2288.
- 256 Boral D, Vishnoi M, Liu HN, Yin W, Sprouse ML, Scamardo A *et al.* Molecular characterization of breast cancer CTCs associated with brain metastasis. *Nature Communications* 2017; **8**: 196.
- 257 Ou H, Huang Y, Xiang L, Chen Z, Fang Y, Lin Y *et al.* Circulating Tumor Cell Phenotype Indicates Poor Survival and Recurrence After Surgery for Hepatocellular Carcinoma. *Dig Dis Sci* 2018; **63**: 2373–2380.
- 258 Polioudaki H, Agelaki S, Chiotaki R, Politaki E, Mavroudis D, Matikas A *et al.* Variable expression levels of keratin and vimentin reveal differential EMT status of circulating tumor cells and correlation with clinical characteristics and outcome of patients with metastatic breast cancer. *BMC Cancer* 2015; **15**: 399.
- 259 Morel A-P, Lièvre M, Thomas C, Hinkal G, Ansieau S, Puisieux A. Generation of breast cancer stem cells through epithelial-mesenchymal transition. *PLoS ONE* 2008; **3**: e2888.
- 260 Ginestier C, Hur MH, Charafe-Jauffret E, Monville F, Dutcher J, Brown M *et al.* ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome. *Cell Stem Cell* 2007; **1**: 555–567.
- 261 Kong D, Banerjee S, Ahmad A, Li Y, Wang Z, Sethi S *et al.* Epithelial to mesenchymal transition is mechanistically linked with stem cell signatures in prostate cancer cells. *PLoS ONE* 2010; **5**: e12445.
- 262 Wellner U, Schubert J, Burk UC, Schmalhofer O, Zhu F, Sonntag A *et al.* The EMT-activator ZEB1 promotes tumorigenicity by repressing stemness-inhibiting microRNAs. *Nat Cell Biol* 2009; **11**: 1487–1495.

- 263 Hwang W-L, Jiang J-K, Yang S-H, Huang T-S, Lan H-Y, Teng H-W *et al.* MicroRNA-146a directs the symmetric division of Snail-dominant colorectal cancer stem cells. *Nat Cell Biol* 2014; **16**: 268–280.
- 264 Biddle A, Liang X, Gammon L, Fazil B, Harper LJ, Emich H *et al.* Cancer Stem Cells in Squamous Cell Carcinoma Switch between Two Distinct Phenotypes That Are Preferentially Migratory or Proliferative. *Cancer Res* 2011; **71**: 5317–5326.
- 265 Malek R, Wang H, Taparra K, Tran PT. Therapeutic targeting of epithelial plasticity programs – Focus on the epithelial-mesenchymal transition. *Cells Tissues Organs* 2017; **203**: 114–127.
- 266 Melisi D, Garcia-Carbonero R, Macarulla T, Pezet D, Deplanque G, Fuchs M *et al.* TGF β receptor inhibitor galunisertib is linked to inflammation- and remodeling-related proteins in patients with pancreatic cancer. *Cancer Chemother Pharmacol* 2019; **83**: 975–991.
- 267 Giannelli G, Santoro A, Kelley RK, Gane E, Paradis V, Cleverly A *et al.* Biomarkers and overall survival in patients with advanced hepatocellular carcinoma treated with TGF- β RI inhibitor galunisertib. *PLoS ONE* 2020; **15**: e0222259.
- 268 Brandes AA, Carpentier AF, Kesari S, Sepulveda-Sanchez JM, Wheeler HR, Chinot O *et al.* A Phase II randomized study of galunisertib monotherapy or galunisertib plus lomustine compared with lomustine monotherapy in patients with recurrent glioblastoma. *Neuro-oncology* 2016; **18**: 1146–1156.
- 269 Formenti SC, Hawtin RE, Dixit N, Evensen E, Lee P, Goldberg JD *et al.* Baseline T cell dysfunction by single cell network profiling in metastatic breast cancer patients. *J Immunother Cancer* 2019; **7**. doi:10.1186/s40425-019-0633-x.
- 270 Cappuzzo F, Ciuleanu T, Stelmakh L, Cicenás S, Szczésna A, Juhász E *et al.* Erlotinib as maintenance treatment in advanced non-small-cell lung cancer: a multicentre, randomised, placebo-controlled phase 3 study. *Lancet Oncol* 2010; **11**: 521–529.
- 271 Goto Y, Zeng L, Yeom CJ, Zhu Y, Morinibu A, Shinomiya K *et al.* UCHL1 provides diagnostic and antimetastatic strategies due to its deubiquitinating effect on HIF-1 α . *Nat Commun* 2015; **6**. doi:10.1038/ncomms7153.
- 272 Arima Y, Hayashi H, Sasaki M, Hosonaga M, Goto TM, Chiyoda T *et al.* Induction of ZEB Proteins by Inactivation of RB Protein Is Key Determinant of Mesenchymal Phenotype of Breast Cancer. *J Biol Chem* 2012; **287**: 7896–7906.
- 273 Yuan J, Zhang F, Niu R. Multiple regulation pathways and pivotal biological functions of STAT3 in cancer. *Sci Rep* 2015; **5**: 17663.
- 274 Ogura M, Uchida T, Terui Y, Hayakawa F, Kobayashi Y, Taniwaki M *et al.* Phase I study of OPB-51602, an oral inhibitor of signal transducer and activator of transcription 3, in patients with relapsed/refractory hematological malignancies. *Cancer Sci* 2015; **106**: 896–901.
- 275 Ardiani A, Gameiro SR, Palena C, Hamilton DH, Kwilas A, King TH *et al.* Vaccine-mediated immunotherapy directed against a transcription factor driving the metastatic process. *Cancer Res* 2014; **74**: 1945–1957.
- 276 Heery CR, Singh BH, Rauckhorst M, Marté JL, Donahue RN, Grenga I *et al.* Phase I Trial of a Yeast-Based Therapeutic Cancer Vaccine (GI-6301) Targeting the Transcription Factor Brachyury. *Cancer Immunol Res* 2015; **3**: 1248–1256.
- 277 Ma X, Ezzeldin HH, Diasio RB. Histone deacetylase inhibitors: current status and overview of recent clinical trials. *Drugs* 2009; **69**: 1911–1934.
- 278 Horn LA, Fousek K, Palena C. Tumor Plasticity and Resistance to Immunotherapy. *Trends in Cancer* 2020; **6**: 432–441.

- 279 Berger SL, Kouzarides T, Shiekhattar R, Shilatifard A. An operational definition of epigenetics. *Genes Dev* 2009; **23**: 781–783.
- 280 Waddington CH. The epigenotype. 1942. *Int J Epidemiol* 2012; **41**: 10–13.
- 281 Felsenfeld G. A Brief History of Epigenetics. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2014; **6**. doi:10.1101/cshperspect.a018200.
- 282 Riggs AD. X inactivation, differentiation, and DNA methylation. *Cytogenet Cell Genet* 1975; **14**: 9–25.
- 283 Holliday R, Pugh JE. DNA modification mechanisms and gene activity during development. *Science* 1975; **187**: 226–232.
- 284 Stedman E. Cell specificity of histones. *Nature* 1950; **166**: 780–781.
- 285 Wei J-W, Huang K, Yang C, Kang C-S. Non-coding RNAs as regulators in epigenetics (Review). *Oncology Reports* 2017; **37**: 3–9.
- 286 Peschansky VJ, Wahlestedt C. Non-coding RNAs as direct and indirect modulators of epigenetic regulation. *Epigenetics* 2014; **9**: 3–12.
- 287 Costa FF. Non-coding RNAs, epigenetics and complexity. *Gene* 2008; **410**: 9–17.
- 288 Klemm SL, Shipony Z, Greenleaf WJ. Chromatin accessibility and the regulatory epigenome. *Nature Reviews Genetics* 2019; **20**: 207–220.
- 289 Valencia AM, Kadoch C. Chromatin regulatory mechanisms and therapeutic opportunities in cancer. *Nature cell biology* 2019; **21**: 152.
- 290 Li G, Reinberg D. Chromatin higher-order structures and gene regulation. *Current opinion in genetics & development* 2011; **21**: 175.
- 291 Thurman RE, Rynes E, Humbert R, Vierstra J, Maurano MT, Haugen E *et al*. The accessible chromatin landscape of the human genome. *Nature* 2012; **489**: 75–82.
- 292 Ridgway P, Maison C, Almouzni G. Chromatine : organisation fonctionnelle du génome. Atlas of Genetics and Cytogenetics in oncology and Haematology. 2002.<http://atlasgeneticsoncology.org/Educ/ChromatinEducFr.html> (accessed 30 Aug2020).
- 293 Lara-Astiaso D, Weiner A, Lorenzo-Vivas E, Zaretzky I, Jaitin DA, David E *et al*. Immunogenetics. Chromatin state dynamics during blood formation. *Science* 2014; **345**: 943–949.
- 294 Szenker E, Ray-Gallet D, Almouzni G. The double face of the histone variant H3.3. *Cell Res* 2011; **21**: 421–434.
- 295 Ng RK, Gurdon JB. Epigenetic memory of an active gene state depends on histone H3.3 incorporation into chromatin in the absence of transcription. *Nat Cell Biol* 2008; **10**: 102–109.
- 296 Greenberg MVC, Bourc'his D. The diverse roles of DNA methylation in mammalian development and disease. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2019; **20**: 590–607.
- 297 Ben-Hattar J, Jiricny J. Methylation of single CpG dinucleotides within a promoter element of the Herpes simplex virus tk gene reduces its transcription in vivo. *Gene* 1988; **65**: 219–227.
- 298 Métivier R, Gallais R, Tiffocche C, Le Péron C, Jurkowska RZ, Carmouche RP *et al*. Cyclical DNA methylation of a transcriptionally active promoter. *Nature* 2008; **452**: 45–50.

- 299 Lister R, Pelizzola M, Downen RH, Hawkins RD, Hon G, Tonti-Filippini J *et al.* Human DNA methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences. *Nature* 2009; **462**: 315–322.
- 300 Bostick M, Kim JK, Estève P-O, Clark A, Pradhan S, Jacobsen SE. UHRF1 plays a role in maintaining DNA methylation in mammalian cells. *Science* 2007; **317**: 1760–1764.
- 301 Nishiyama A, Yamaguchi L, Sharif J, Johmura Y, Kawamura T, Nakanishi K *et al.* Uhrf1-dependent H3K23 ubiquitylation couples maintenance DNA methylation and replication. *Nature* 2013; **502**: 249–253.
- 302 Ishiyama S, Nishiyama A, Saeki Y, Moritsugu K, Morimoto D, Yamaguchi L *et al.* Structure of the Dnmt1 Reader Module Complexed with a Unique Two-Mono-Ubiquitin Mark on Histone H3 Reveals the Basis for DNA Methylation Maintenance. *Mol Cell* 2017; **68**: 350-360.e7.
- 303 Qin W, Wolf P, Liu N, Link S, Smets M, La Mastra F *et al.* DNA methylation requires a DNMT1 ubiquitin interacting motif (UIM) and histone ubiquitination. *Cell Res* 2015; **25**: 911–929.
- 304 Williams K, Christensen J, Helin K. DNA methylation: TET proteins—guardians of CpG islands? *EMBO reports* 2012; **13**: 28–35.
- 305 Lu F, Liu Y, Jiang L, Yamaguchi S, Zhang Y. Role of Tet proteins in enhancer activity and telomere elongation. *Genes Dev* 2014; **28**: 2103–2119.
- 306 Efimova OA, Koltsova AS, Krapivin MI, Tikhonov AV, Pendina AA. Environmental Epigenetics and Genome Flexibility: Focus on 5-Hydroxymethylcytosine. *International Journal of Molecular Sciences* 2020; **21**: 3223.
- 307 Efimova OA, Pendina AA, Tikhonov AV, Baranov VS. The Evolution of Ideas on the Biological Role of 5-methylcytosine Oxidative Derivatives in the Mammalian Genome. *Russ J Genet Appl Res* 2018; **8**: 11–21.
- 308 Tolsma TO, Hansen JC. Post-translational modifications and chromatin dynamics. *Essays Biochem* 2019; **63**: 89–96.
- 309 Martin C, Zhang Y. The diverse functions of histone lysine methylation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005; **6**: 838–849.
- 310 Musselman CA, Khorasanizadeh S, Kutateladze TG. Towards understanding methyllysine readout. *Biochim Biophys Acta* 2014; **1839**: 686–693.
- 311 Bannister AJ, Kouzarides T. Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Res* 2011; **21**: 381–395.
- 312 Lorenzo AD, Bedford MT. Histone Arginine Methylation. *FEBS Lett* 2011; **585**: 2024–2031.
- 313 Black JC, Van Rechem C, Whetstone JR. Histone lysine methylation dynamics: establishment, regulation, and biological impact. *Mol Cell* 2012; **48**: 491–507.
- 314 Hyun K, Jeon J, Park K, Kim J. Writing, erasing and reading histone lysine methylations. *Exp Mol Med* 2017; **49**: e324.
- 315 Tewary SK, Zheng YG, Ho M-C. Protein arginine methyltransferases: insights into the enzyme structure and mechanism at the atomic level. *Cell Mol Life Sci* 2019; **76**: 2917–2932.
- 316 Barnes CE, English DM, Cowley SM. Acetylation & Co: an expanding repertoire of histone acylations regulates chromatin and transcription. *Essays Biochem* 2019; **63**: 97–107.
- 317 Zhao S, Zhang X, Li H. Beyond histone acetylation-writing and erasing histone acylations. *Curr Opin Struct Biol* 2018; **53**: 169–177.

- 318 Cao J, Yan Q. Histone ubiquitination and deubiquitination in transcription, DNA damage response, and cancer. *Front Oncol* 2012; **2**: 26.
- 319 Latham JA, Chosed RJ, Wang S, Dent SYR. Chromatin signaling to kinetochores: transregulation of Dam1 methylation by histone H2B ubiquitination. *Cell* 2011; **146**: 709–719.
- 320 Fang J, Chen T, Chadwick B, Li E, Zhang Y. Ring1b-mediated H2A ubiquitination associates with inactive X chromosomes and is involved in initiation of X inactivation. *J Biol Chem* 2004; **279**: 52812–52815.
- 321 Rossetto D, Avvakumov N, Côté J. Histone phosphorylation: a chromatin modification involved in diverse nuclear events. *Epigenetics* 2012; **7**: 1098–1108.
- 322 Alaskhar Alhamwe B, Khalaila R, Wolf J, von Bülow V, Harb H, Alhamdan F *et al.* Histone modifications and their role in epigenetics of atopy and allergic diseases. *Allergy Asthma Clin Immunol* 2018; **14**. doi:10.1186/s13223-018-0259-4.
- 323 Watson NA, Higgins JMG. Chapter 4 - Histone Kinases and Phosphatases. In: Binda O, Fernandez-Zapico ME (eds). *Chromatin Signaling and Diseases*. Academic Press: Boston, 2016, pp 75–94.
- 324 Shiio Y, Eisenman RN. Histone sumoylation is associated with transcriptional repression. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; **100**: 13225–13230.
- 325 Hassa PO, Haenni SS, Elser M, Hottiger MO. Nuclear ADP-ribosylation reactions in mammalian cells: where are we today and where are we going? *Microbiol Mol Biol Rev* 2006; **70**: 789–829.
- 326 Wang Y, Wysocka J, Sayegh J, Lee Y-H, Perlin JR, Leonelli L *et al.* Human PAD4 regulates histone arginine methylation levels via demethyliminination. *Science* 2004; **306**: 279–283.
- 327 Hanes SD. Prolyl isomerases in gene transcription. *Biochim Biophys Acta* 2015; **1850**: 2017–2034.
- 328 Rodríguez-Paredes M, Esteller M. Cancer epigenetics reaches mainstream oncology. *Nat Med* 2011; **17**: 330–339.
- 329 Catalanotto C, Cogoni C, Zardo G. MicroRNA in Control of Gene Expression: An Overview of Nuclear Functions. *Int J Mol Sci* 2016; **17**. doi:10.3390/ijms17101712.
- 330 Paksa A, Rajagopal J. The epigenetic basis of cellular plasticity. *Curr Opin Cell Biol* 2017; **49**: 116–122.
- 331 Tata PR, Rajagopal J. Cellular plasticity: 1712 to the present day. *Curr Opin Cell Biol* 2016; **43**: 46–54.
- 332 Boland Michael J., Nazor Kristopher L., Loring Jeanne F. Epigenetic Regulation of Pluripotency and Differentiation. *Circulation Research* 2014; **115**: 311–324.
- 333 Hawkins RD, Hon GC, Lee LK, Ngo Q, Lister R, Pelizzola M *et al.* Distinct Epigenomic Landscapes of Pluripotent and Lineage-Committed Human Cells. *Cell Stem Cell* 2010; **6**: 479–491.
- 334 Zhu J, Adli M, Zou JY, Verstappen G, Coyne M, Zhang X *et al.* Genome-wide Chromatin State Transitions Associated with Developmental and Environmental Cues. *Cell* 2013; **152**: 642–654.
- 335 Gifford CA, Ziller MJ, Gu H, Trapnell C, Donaghey J, Tsankov A *et al.* Transcriptional and Epigenetic Dynamics during Specification of Human Embryonic Stem Cells. *Cell* 2013; **153**: 1149–1163.
- 336 Polo JM, Anderssen E, Walsh RM, Schwarz BA, Nefzger CM, Lim SM *et al.* A molecular roadmap of cellular reprogramming into iPS cells. *Cell* 2012; **151**: 1617–1632.
- 337 Chen J, Liu H, Liu J, Qi J, Wei B, Yang J *et al.* H3K9 methylation is a barrier during somatic cell reprogramming into iPSCs. *Nat Genet* 2013; **45**: 34–42.

- 338 Onder TT, Kara N, Cherry A, Sinha AU, Zhu N, Bernt KM *et al.* Chromatin-modifying enzymes as modulators of reprogramming. *Nature* 2012; **483**: 598–602.
- 339 Yamada Y, Haga H, Yamada Y. Concise Review: Dedifferentiation Meets Cancer Development: Proof of Concept for Epigenetic Cancer. *Stem Cells Transl Med* 2014; **3**: 1182–1187.
- 340 YAMADA Y, YAMADA Y. The causal relationship between epigenetic abnormality and cancer development: in vivo reprogramming and its future application. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* 2018; **94**: 235–247.
- 341 McDonald OG, Wu H, Timp W, Doi A, Feinberg AP. Genome-scale epigenetic reprogramming during epithelial-to-mesenchymal transition. *Nat Struct Mol Biol* 2011; **18**: 867–874.
- 342 Dong C, Wu Y, Yao J, Wang Y, Yu Y, Rychahou PG *et al.* G9a interacts with Snail and is critical for Snail-mediated E-cadherin repression in human breast cancer. *J Clin Invest* 2012; **122**: 1469–1486.
- 343 Sun L, Fang J. Epigenetic regulation of epithelial-mesenchymal transition. *Cell Mol Life Sci* 2016; **73**: 4493–4515.
- 344 Fukagawa A, Ishii H, Miyazawa K, Saitoh M. δ EF1 associates with DNMT1 and maintains DNA methylation of the E-cadherin promoter in breast cancer cells. *Cancer Med* 2015; **4**: 125–135.
- 345 Xu J, Zhu W, Xu W, Yao W, Zhang B, Xu Y *et al.* Up-regulation of MBD1 promotes pancreatic cancer cell epithelial-mesenchymal transition and invasion by epigenetic down-regulation of E-cadherin. *Curr Mol Med* 2013; **13**: 387–400.
- 346 Nam J-S, Ino Y, Kanai Y, Sakamoto M, Hirohashi S. 5-aza-2'-deoxycytidine restores the E-cadherin system in E-cadherin-silenced cancer cells and reduces cancer metastasis. *Clin Exp Metastasis* 2004; **21**: 49–56.
- 347 Vrba L, Jensen TJ, Garbe JC, Heimark RL, Cress AE, Dickinson S *et al.* Role for DNA methylation in the regulation of miR-200c and miR-141 expression in normal and cancer cells. *PLoS ONE* 2010; **5**: e8697.
- 348 Wiklund ED, Bramsen JB, Hulf T, Dyrskjøt L, Ramanathan R, Hansen TB *et al.* Coordinated epigenetic repression of the miR-200 family and miR-205 in invasive bladder cancer. *Int J Cancer* 2011; **128**: 1327–1334.
- 349 Heery R, Finn SP, Cuffe S, Gray SG. Long Non-Coding RNAs: Key Regulators of Epithelial-Mesenchymal Transition, Tumour Drug Resistance and Cancer Stem Cells. *Cancers (Basel)* 2017; **9**. doi:10.3390/cancers9040038.
- 350 Dhamija S, Diederichs S. From junk to master regulators of invasion: lncRNA functions in migration, EMT and metastasis. *Int J Cancer* 2016; **139**: 269–280.
- 351 Roche J, Gemmill RM, Drabkin HA. Epigenetic Regulation of the Epithelial to Mesenchymal Transition in Lung Cancer. *Cancers (Basel)* 2017; **9**. doi:10.3390/cancers9070072.
- 352 Zhou B, Liu Y, Kahn M, Ann DK, Han A, Wang H *et al.* Interactions between β -catenin and transforming growth factor- β signaling pathways mediate epithelial-mesenchymal transition and are dependent on the transcriptional co-activator cAMP-response element-binding protein (CREB)-binding protein (CBP). *J Biol Chem* 2012; **287**: 7026–7038.
- 353 Mizuguchi Y, Specht S, Lunz JG, Isse K, Corbitt N, Takizawa T *et al.* Cooperation of p300 and PCAF in the control of microRNA 200c/141 transcription and epithelial characteristics. *PLoS ONE* 2012; **7**: e32449.
- 354 Dhasarathy A, Phadke D, Mav D, Shah RR, Wade PA. The transcription factors Snail and Slug activate the transforming growth factor-beta signaling pathway in breast cancer. *PLoS ONE* 2011; **6**: e26514.

- 355 Bansal N, Petrie K, Christova R, Chung C-Y, Leibovitch BA, Howell L *et al.* Targeting the SIN3A-PF1 interaction inhibits epithelial to mesenchymal transition and maintenance of a stem cell phenotype in triple negative breast cancer. *Oncotarget* 2015; **6**: 34087–34105.
- 356 Aghdassi A, Sendler M, Guenther A, Mayerle J, Behn C-O, Heidecke C-D *et al.* Recruitment of histone deacetylases HDAC1 and HDAC2 by the transcriptional repressor ZEB1 downregulates E-cadherin expression in pancreatic cancer. *Gut* 2012; **61**: 439–448.
- 357 Roche J, Nasarre P, Gemmill R, Baldys A, Pontis J, Korch C *et al.* Global Decrease of Histone H3K27 Acetylation in ZEB1-Induced Epithelial to Mesenchymal Transition in Lung Cancer Cells. *Cancers (Basel)* 2013; **5**: 334–356.
- 358 Suraweera A, O’Byrne KJ, Richard DJ. Combination Therapy With Histone Deacetylase Inhibitors (HDACi) for the Treatment of Cancer: Achieving the Full Therapeutic Potential of HDACi. *Front Oncol* 2018; **8**. doi:10.3389/fonc.2018.00092.
- 359 Tam WL, Weinberg RA. The epigenetics of epithelial-mesenchymal plasticity in cancer. *Nat Med* 2013; **19**: 1438–1449.
- 360 Jiang G-M, Wang H-S, Zhang F, Zhang K-S, Liu Z-C, Fang R *et al.* Histone deacetylase inhibitor induction of epithelial-mesenchymal transitions via up-regulation of Snail facilitates cancer progression. *Biochim Biophys Acta* 2013; **1833**: 663–671.
- 361 Højfeldt JW, Agger K, Helin K. Histone lysine demethylases as targets for anticancer therapy. *Nat Rev Drug Discov* 2013; **12**: 917–930.
- 362 Lin Y, Wu Y, Li J, Dong C, Ye X, Chi Y-I *et al.* The SNAG domain of Snail1 functions as a molecular hook for recruiting lysine-specific demethylase 1. *EMBO J* 2010; **29**: 1803–1816.
- 363 Teng Y-C, Lee C-F, Li Y-S, Chen Y-R, Hsiao P-W, Chan M-Y *et al.* Histone demethylase RBP2 promotes lung tumorigenesis and cancer metastasis. *Cancer Res* 2013; **73**: 4711–4721.
- 364 Cao J, Liu Z, Cheung WKC, Zhao M, Chen SY, Chan SW *et al.* Histone demethylase RBP2 is critical for breast cancer progression and metastasis. *Cell Rep* 2014; **6**: 868–877.
- 365 Liang X, Zeng J, Wang L, Shen L, Ma X, Li S *et al.* Histone demethylase RBP2 promotes malignant progression of gastric cancer through TGF- β 1-(p-Smad3)-RBP2-E-cadherin-Smad3 feedback circuit. *Oncotarget* 2015; **6**: 17661–17674.
- 366 Zhang L, Deng L, Chen F, Yao Y, Wu B, Wei L *et al.* Inhibition of histone H3K79 methylation selectively inhibits proliferation, self-renewal and metastatic potential of breast cancer. *Oncotarget* 2014; **5**: 10665–10677.
- 367 Cho M-H, Park J-H, Choi H-J, Park M-K, Won H-Y, Park Y-J *et al.* DOT1L cooperates with the c-Myc-p300 complex to epigenetically derepress CDH1 transcription factors in breast cancer progression. *Nat Commun* 2015; **6**: 7821.
- 368 Chaffer CL, Marjanovic ND, Lee T, Bell G, Kleer CG, Reinhardt F *et al.* Poised chromatin at the ZEB1 promoter enables breast cancer cell plasticity and enhances tumorigenicity. *Cell* 2013; **154**: 61–74.
- 369 Wainwright EN, Scaffidi P. Epigenetics and Cancer Stem Cells: Unleashing, Hijacking, and Restricting Cellular Plasticity. *Trends Cancer* 2017; **3**: 372–386.
- 370 Liu S, Ye D, Guo W, Yu W, He Y, Hu J *et al.* G9a is essential for EMT-mediated metastasis and maintenance of cancer stem cell-like characters in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncotarget* 2015; **6**: 6887–6901.

- 371 Malouf GG, Taube JH, Lu Y, Roysarkar T, Panjarian S, Estecio MR *et al.* Architecture of epigenetic reprogramming following Twist1-mediated epithelial-mesenchymal transition. *Genome Biol* 2013; **14**: R144.
- 372 Yu H, Simons DL, Segall I, Carcamo-Cavazos V, Schwartz EJ, Yan N *et al.* PRC2/EED-EZH2 complex is up-regulated in breast cancer lymph node metastasis compared to primary tumor and correlates with tumor proliferation in situ. *PLoS ONE* 2012; **7**: e51239.
- 373 Laugesen A, Højfeldt JW, Helin K. Molecular Mechanisms Directing PRC2 Recruitment and H3K27 Methylation. *Molecular Cell* 2019; **74**: 8–18.
- 374 Di Carlo V, Mocavini I, Di Croce L. Polycomb complexes in normal and malignant hematopoiesis. *J Cell Biol* 2019; **218**: 55–69.
- 375 Mierlo G van, Veenstra GJC, Vermeulen M, Marks H. The Complexity of PRC2 Subcomplexes. *Trends in Cell Biology* 2019; **29**: 660–671.
- 376 Dillon SC, Zhang X, Trievel RC, Cheng X. The SET-domain protein superfamily: protein lysine methyltransferases. *Genome Biol* 2005; **6**: 227.
- 377 Denisenko O, Shnyreva M, Suzuki H, Bomsztyk K. Point Mutations in the WD40 Domain of Eed Block Its Interaction with Ezh2. *Mol Cell Biol* 1998; **18**: 5634–5642.
- 378 Birve A, Sengupta AK, Beuchle D, Larsson J, Kennison JA, Rasmuson-Lestander Å *et al.* Su(z)12, a novel Drosophila Polycomb group gene that is conserved in vertebrates and plants. *Development* 2001; **128**: 3371–3379.
- 379 Rai AN, Vargas ML, Wang L, Andersen EF, Miller EL, Simon JA. Elements of the polycomb repressor SU(Z)12 needed for histone H3-K27 methylation, the interface with E(Z), and in vivo function. *Mol Cell Biol* 2013; **33**: 4844–4856.
- 380 Hauri S, Comoglio F, Seimiya M, Gerstung M, Glatter T, Hansen K *et al.* A High-Density Map for Navigating the Human Polycomb Complexome. *Cell Rep* 2016; **17**: 583–595.
- 381 Li H, Liefke R, Jiang J, Kurland JV, Tian W, Deng P *et al.* Polycomb-like proteins link the PRC2 complex to CpG islands. *Nature* 2017; **549**: 287–291.
- 382 Brien GL, Gambero G, O’Connell DJ, Jerman E, Turner SA, Egan CM *et al.* Polycomb PHF19 binds H3K36me3 and recruits PRC2 and demethylase NO66 to embryonic stem cell genes during differentiation. *Nat Struct Mol Biol* 2012; **19**: 1273–1281.
- 383 Beringer M, Pisano P, Di Carlo V, Blanco E, Chammas P, Vizán P *et al.* EPOP Functionally Links Elongin and Polycomb in Pluripotent Stem Cells. *Mol Cell* 2016; **64**: 645–658.
- 384 Sanulli S, Justin N, Teissandier A, Ancelin K, Portoso M, Caron M *et al.* Jarid2 Methylation via the PRC2 Complex Regulates H3K27me3 Deposition during Cell Differentiation. *Mol Cell* 2015; **57**: 769–783.
- 385 Kasinath V, Faini M, Poepsel S, Reif D, Feng XA, Stjepanovic G *et al.* Structures of human PRC2 with its cofactors AEBP2 and JARID2. *Science* 2018; **359**: 940–944.
- 386 Lee C-H, Holder M, Grau D, Saldaña-Meyer R, Yu J-R, Ganai RA *et al.* Distinct Stimulatory Mechanisms Regulate the Catalytic Activity of Polycomb Repressive Complex 2. *Mol Cell* 2018; **70**: 435–448.e5.
- 387 Margueron R, Li G, Sarma K, Blais A, Zavadil J, Woodcock CL *et al.* Ezh1 and Ezh2 maintain repressive chromatin through different mechanisms. *Mol Cell* 2008; **32**: 503–518.
- 388 Højfeldt JW, Laugesen A, Willumsen BM, Damhofer H, Hedehus L, Tvardovskiy A *et al.* Accurate H3K27 methylation can be established de novo by SUZ12-directed PRC2. *Nat Struct Mol Biol* 2018; **25**: 225–232.

- 389 Margueron R, Justin N, Ohno K, Sharpe ML, Son J, Drury WJ *et al.* Role of the polycomb protein Eed in the propagation of repressive histone marks. *Nature* 2009; **461**: 762–767.
- 390 Laprell F, Finkl K, Müller J. Propagation of Polycomb-repressed chromatin requires sequence-specific recruitment to DNA. *Science* 2017; **356**: 85–88.
- 391 Oksuz O, Narendra V, Lee C-H, Descostes N, LeRoy G, Raviram R *et al.* Capturing the Onset of PRC2-Mediated Repressive Domain Formation. *Mol Cell* 2018; **70**: 1149-1162.e5.
- 392 Perino M, van Mierlo G, Karemaker ID, van Genesen S, Vermeulen M, Marks H *et al.* MTF2 recruits Polycomb Repressive Complex 2 by helical-shape-selective DNA binding. *Nat Genet* 2018; **50**: 1002–1010.
- 393 Sing A, Pannell D, Karaiskakis A, Sturgeon K, Djabali M, Ellis J *et al.* A vertebrate Polycomb response element governs segmentation of the posterior hindbrain. *Cell* 2009; **138**: 885–897.
- 394 Morey L, Helin K. Polycomb group protein-mediated repression of transcription. *Trends Biochem Sci* 2010; **35**: 323–332.
- 395 Viré E, Brenner C, Deplus R, Blanchon L, Fraga M, Didelot C *et al.* The Polycomb group protein EZH2 directly controls DNA methylation. *Nature* 2006; **439**: 871–874.
- 396 Kooistra SM, Helin K. Molecular mechanisms and potential functions of histone demethylases. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2012; **13**: 297–311.
- 397 Lan F, Bayliss PE, Rinn JL, Whetstine JR, Wang JK, Chen S *et al.* A histone H3 lysine 27 demethylase regulates animal posterior development. *Nature* 2007; **449**: 689–694.
- 398 Lee MG, Villa R, Trojer P, Norman J, Yan K-P, Reinberg D *et al.* Demethylation of H3K27 regulates polycomb recruitment and H2A ubiquitination. *Science* 2007; **318**: 447–450.
- 399 Tsukada Y, Fang J, Erdjument-Bromage H, Warren ME, Borchers CH, Tempst P *et al.* Histone demethylation by a family of JmjC domain-containing proteins. *Nature* 2006; **439**: 811–816.
- 400 Yang Y, Hu L, Wang P, Hou H, Lin Y, Liu Y *et al.* Structural insights into a dual-specificity histone demethylase ceKDM7A from *Caenorhabditis elegans*. *Cell Res* 2010; **20**: 886–898.
- 401 Tsukada Y, Ishitani T, Nakayama KI. KDM7 is a dual demethylase for histone H3 Lys 9 and Lys 27 and functions in brain development. *Genes Dev* 2010; **24**: 432–437.
- 402 Accari SL, Fisher PR. Emerging Roles of JmjC Domain-Containing Proteins. *Int Rev Cell Mol Biol* 2015; **319**: 165–220.
- 403 De Santa F, Narang V, Yap ZH, Tusi BK, Burgold T, Austenaa L *et al.* Jmjd3 contributes to the control of gene expression in LPS-activated macrophages. *EMBO J* 2009; **28**: 3341–3352.
- 404 Miller SA, Mohn SE, Weinmann AS. Jmjd3 and UTX play a demethylase-independent role in chromatin remodeling to regulate T-box family member-dependent gene expression. *Mol Cell* 2010; **40**: 594–605.
- 405 Tie F, Banerjee R, Stratton CA, Prasad-Sinha J, Stepanik V, Zlobin A *et al.* CBP-mediated acetylation of histone H3 lysine 27 antagonizes *Drosophila* Polycomb silencing. *Development* 2009; **136**: 3131–3141.
- 406 Reynolds N, Salmon-Divon M, Dvinge H, Hynes-Allen A, Balasooriya G, Leaford D *et al.* NuRD-mediated deacetylation of H3K27 facilitates recruitment of Polycomb Repressive Complex 2 to direct gene repression. *EMBO J* 2012; **31**: 593–605.
- 407 Lavarone E, Barbieri CM, Pasini D. Dissecting the role of H3K27 acetylation and methylation in PRC2 mediated control of cellular identity. *Nature Communications* 2019; **10**: 1679.

- 408 Ferrari KJ, Scelfo A, Jammula S, Cuomo A, Barozzi I, Stützer A *et al.* Polycomb-Dependent H3K27me1 and H3K27me2 Regulate Active Transcription and Enhancer Fidelity. *Molecular Cell* 2014; **53**: 49–62.
- 409 Xu B, Abourbih S, Sircar K, Kassouf W, Mansure JJ, Aprikian A *et al.* Enhancer of zeste homolog 2 expression is associated with metastasis and adverse clinical outcome in clear cell renal cell carcinoma: a comparative study and review of the literature. *Arch Pathol Lab Med* 2013; **137**: 1326–1336.
- 410 Lee HW, Choe M. Expression of EZH2 in renal cell carcinoma as a novel prognostic marker. *Pathology International* 2012; **62**: 735–741.
- 411 Yamada A, Fujii S, Daiko H, Nishimura M, Chiba T, Ochiai A. Aberrant expression of EZH2 is associated with a poor outcome and P53 alteration in squamous cell carcinoma of the esophagus. *Int J Oncol* 2011; **38**: 345–353.
- 412 Bachmann IM, Halvorsen OJ, Collett K, Stefansson IM, Straume O, Haukaas SA *et al.* EZH2 Expression Is Associated With High Proliferation Rate and Aggressive Tumor Subgroups in Cutaneous Melanoma and Cancers of the Endometrium, Prostate, and Breast. *JCO* 2006; **24**: 268–273.
- 413 Behrens C, Solis LM, Lin H, Yuan P, Tang X, Kadara H *et al.* EZH2 Protein Expression Associates With the Early Pathogenesis, Tumor Progression and Prognosis of Non-small Cell Lung Carcinoma. *Clin Cancer Res* 2013; **19**: 6556–6565.
- 414 Crea F, Hurt EM, Farrar WL. Clinical significance of Polycomb gene expression in brain tumors. *Mol Cancer* 2010; **9**: 265.
- 415 Kleer CG, Cao Q, Varambally S, Shen R, Ota I, Tomlins SA *et al.* EZH2 is a marker of aggressive breast cancer and promotes neoplastic transformation of breast epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; **100**: 11606–11611.
- 416 Matsukawa Y, Semba S, Kato H, Ito A, Yanagihara K, Yokozaki H. Expression of the enhancer of zeste homolog 2 is correlated with poor prognosis in human gastric cancer. *Cancer Science* 2006; **97**: 484–491.
- 417 Rao Z-Y, Cai M-Y, Yang G-F, He L-R, Mai S-J, Hua W-F *et al.* EZH2 supports ovarian carcinoma cell invasion and/or metastasis via regulation of TGF-beta1 and is a predictor of outcome in ovarian carcinoma patients. *Carcinogenesis* 2010; **31**: 1576–1583.
- 418 Varambally S, Dhanasekaran SM, Zhou M, Barrette TR, Kumar-Sinha C, Sanda MG *et al.* The polycomb group protein EZH2 is involved in progression of prostate cancer. *Nature* 2002; **419**: 624–629.
- 419 Wang H, Albadine R, Magheli A, Guzzo TJ, Ball MW, Hinz S *et al.* Increased EZH2 protein expression is associated with invasive urothelial carcinoma of the bladder. *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations* 2012; **30**: 428–433.
- 420 Weikert S, Christoph F, Köllermann J, Müller M, Schrader M, Miller K *et al.* Expression levels of the EZH2 polycomb transcriptional repressor correlate with aggressiveness and invasive potential of bladder carcinomas. *Int J Mol Med* 2005; **16**: 349–353.
- 421 Zingg D, Debbache J, Schaefer SM, Tuncer E, Frommel SC, Cheng P *et al.* The epigenetic modifier EZH2 controls melanoma growth and metastasis through silencing of distinct tumour suppressors. *Nat Commun* 2015; **6**: 6051.
- 422 Muto T, Sashida G, Oshima M, Wendt GR, Mochizuki-Kashio M, Nagata Y *et al.* Concurrent loss of Ezh2 and Tet2 cooperates in the pathogenesis of myelodysplastic disorders. *J Exp Med* 2013; **210**: 2627–2639.
- 423 Wang Y, Hou N, Cheng X, Zhang J, Tan X, Zhang C *et al.* Ezh2 Acts as a Tumor Suppressor in Kras-driven Lung Adenocarcinoma. *Int J Biol Sci* 2017; **13**: 652–659.

- 424 Chang JW, Gwak SY, Shim G-A, Liu L, Lim YC, Kim JM *et al.* EZH2 is associated with poor prognosis in head-and-neck squamous cell carcinoma via regulating the epithelial-to-mesenchymal transition and chemosensitivity. *Oral Oncology* 2016; **52**: 66–74.
- 425 Cardenas H, Zhao J, Vieth E, Nephew KP, Matei D. EZH2 inhibition promotes epithelial-to-mesenchymal transition in ovarian cancer cells. *Oncotarget* 2016; **7**: 84453–84467.
- 426 Xia H, Zhang W, Zhang B, Zhao Y, Zhao Y, Li S *et al.* miR-21 modulates the effect of EZH2 on the biological behavior of human lung cancer stem cells in vitro. *Oncotarget* 2017; **8**: 85442–85451.
- 427 Cakouros D, Isenmann S, Cooper L, Zannettino A, Anderson P, Glackin C *et al.* Twist-1 Induces Ezh2 Recruitment Regulating Histone Methylation along the Ink4A/Arf Locus in Mesenchymal Stem Cells. *Mol Cell Biol* 2012; **32**: 1433–1441.
- 428 Zheng M, Jiang Y, Chen W, Li K, Liu X, Gao S *et al.* Snail and Slug collaborate on EMT and tumor metastasis through miR-101-mediated EZH2 axis in oral tongue squamous cell carcinoma. *Oncotarget* 2015; **6**: 6797–6810.
- 429 Tong Z-T, Cai M-Y, Wang X-G, Kong L-L, Mai S-J, Liu Y-H *et al.* EZH2 supports nasopharyngeal carcinoma cell aggressiveness by forming a co-repressor complex with HDAC1/HDAC2 and Snail to inhibit E-cadherin. *Oncogene* 2012; **31**: 583–594.
- 430 Herranz N, Pasini D, Díaz VM, Francí C, Gutierrez A, Dave N *et al.* Polycomb Complex 2 Is Required for E-cadherin Repression by the Snail1 Transcription Factor. *Mol Cell Biol* 2008; **28**: 4772–4781.
- 431 Cho HM, Jeon HS, Lee SY, Jeong KJ, Park S-Y, Lee HY *et al.* microRNA-101 inhibits lung cancer invasion through the regulation of enhancer of zeste homolog 2. *Exp Ther Med* 2011; **2**: 963–967.
- 432 Meng C, Zhu H, Song H, Wang Z, Huang G, Li D *et al.* Targets and molecular mechanisms of triptolide in cancer therapy. *Chin J Cancer Res* 2014; **26**: 622–626.
- 433 Tamgue O, Chai C-S, Hao L, Zambe J-CD, Huang W-W, Zhang B *et al.* Triptolide inhibits histone methyltransferase EZH2 and modulates the expression of its target genes in prostate cancer cells. *Asian Pac J Cancer Prev* 2013; **14**: 5663–5669.
- 434 Ren G, Baritaki S, Marathe H, Feng J, Park S, Beach S *et al.* Polycomb protein EZH2 regulates tumor invasion via the transcriptional repression of the metastasis suppressor RKIP in breast and prostate cancer. *Cancer Res* 2012; **72**: 3091–3104.
- 435 Sato T, Kaneda A, Tsuji S, Isagawa T, Yamamoto S, Fujita T *et al.* PRC2 overexpression and PRC2-target gene repression relating to poorer prognosis in small cell lung cancer. *Scientific Reports* 2013; **3**: 1911.
- 436 Ougolkov AV, Bilim VN, Billadeau DD. Regulation of Pancreatic Tumor Cell Proliferation and Chemoresistance by the Histone Methyltransferase EZH2. *Clin Cancer Res* 2008; **14**: 6790–6796.
- 437 Fu X, Lin J, Qin F, Yang Z, Ding Y, Zhang Y *et al.* LncAPC drives Wnt/ β -catenin activation and liver TIC self-renewal through EZH2 mediated APC transcriptional inhibition. *Molecular Carcinogenesis* 2018; **57**: 408–418.
- 438 Lee ST, Li Z, Wu Z, Aau M, Guan P, Karuturi RKM *et al.* Context-specific regulation of NF- κ B target gene expression by EZH2 in breast cancers. *Mol Cell* 2011; **43**: 798–810.
- 439 Shi B, Liang J, Yang X, Wang Y, Zhao Y, Wu H *et al.* Integration of Estrogen and Wnt Signaling Circuits by the Polycomb Group Protein EZH2 in Breast Cancer Cells. *Mol Cell Biol* 2007; **27**: 5105–5119.

- 440 Martinho O, Pinto F, Granja S, Miranda-Gonçalves V, Moreira MAR, Ribeiro LFJ *et al.* RKIP Inhibition in Cervical Cancer Is Associated with Higher Tumor Aggressive Behavior and Resistance to Cisplatin Therapy. *PLoS One* 2013; **8**. doi:10.1371/journal.pone.0059104.
- 441 Yousuf S, Duan M, Moen EL, Cross-Knorr S, Brilliant K, Bonavida B *et al.* Raf Kinase Inhibitor Protein (RKIP) Blocks Signal Transducer and Activator of Transcription 3 (STAT3) Activation in Breast and Prostate Cancer. *PLoS One* 2014; **9**. doi:10.1371/journal.pone.0092478.
- 442 Liu H, Li P, Li B, Sun P, Zhang J, Wang B *et al.* RKIP suppresses gastric cancer cell proliferation and invasion and enhances apoptosis regulated by microRNA-224. *Tumour Biol* 2014; **35**: 10095–10103.
- 443 Tang B, Qi G, Tang F, Yuan S, Wang Z, Liang X *et al.* Aberrant JMJD3 Expression Upregulates Slug to Promote Migration, Invasion, and Stem Cell–Like Behaviors in Hepatocellular Carcinoma. *Cancer Res* 2016; **76**: 6520–6532.
- 444 Li Q, Hou L, Ding G, Li Y, Wang J, Qian B *et al.* KDM6B induces epithelial-mesenchymal transition and enhances clear cell renal cell carcinoma metastasis through the activation of SLUG. *Int J Clin Exp Pathol* 2015; **8**: 6334–6344.
- 445 Ohguchi H, Harada T, Sagawa M, Kikuchi S, Tai Y-T, Richardson PG *et al.* KDM6B modulates MAPK pathway mediating multiple myeloma cell growth and survival. *Leukemia* 2017; **31**: 2661–2669.
- 446 Anderton JA, Bose S, Vockerodt M, Vrzalikova K, Wei W, Kuo M *et al.* The H3K27me3 demethylase, KDM6B, is induced by Epstein–Barr virus and over-expressed in Hodgkin’s Lymphoma. *Oncogene* 2011; **30**: 2037–2043.
- 447 Ramadoss S, Chen X, Wang C-Y. Histone demethylase KDM6B promotes epithelial-mesenchymal transition. *J Biol Chem* 2012; **287**: 44508–44517.
- 448 Cregan S, Breslin M, Roche G, Wennstedt S, MacDonagh L, Albadri C *et al.* Kdm6a and Kdm6b: Altered expression in malignant pleural mesothelioma. *Int J Oncol* 2017; **50**: 1044–1052.
- 449 Liang S, Yao Q, Wei D, Liu M, Geng F, Wang Q *et al.* KDM6B promotes ovarian cancer cell migration and invasion by induced transforming growth factor- β 1 expression. *Journal of Cellular Biochemistry* 2019; **120**: 493–506.
- 450 Yamamoto K, Tateishi K, Kudo Y, Sato T, Yamamoto S, Miyabayashi K *et al.* Loss of histone demethylase KDM6B enhances aggressiveness of pancreatic cancer through downregulation of C/EBP α . *Carcinogenesis* 2014; **35**: 2404–2414.
- 451 Pereira F, Barbáchano A, Silva J, Bonilla F, Campbell MJ, Muñoz A *et al.* KDM6B/JMJD3 histone demethylase is induced by vitamin D and modulates its effects in colon cancer cells. *Hum Mol Genet* 2011; **20**: 4655–4665.
- 452 Tokunaga R, Sakamoto Y, Nakagawa S, Miyake K, Izumi D, Kosumi K *et al.* The Prognostic Significance of Histone Lysine Demethylase JMJD3/KDM6B in Colorectal Cancer. *Ann Surg Oncol* 2016; **23**: 678–685.
- 453 Ge T, Zhou Y, Lu H. The diagnostic performance of lysine(K)-specific demethylase 6B (KDM6B) in non-small cell lung cancer. *Artif Cells Nanomed Biotechnol* 2019; **47**: 2155–2160.
- 454 Xia M, Yao L, Zhang Q, Wang F, Mei H, Guo X *et al.* Long noncoding RNA HOTAIR promotes metastasis of renal cell carcinoma by up-regulating histone H3K27 demethylase JMJD3. *Oncotarget* 2017; **8**: 19795–19802.
- 455 Liao M-Y, Kuo MY-P, Lu T-Y, Wang Y-P, Wu H-C. Generation of an anti-EpCAM antibody and epigenetic regulation of EpCAM in colorectal cancer. *Int J Oncol* 2015; **46**: 1788–1800.

- 456 Zhou FQ, Qi YM, Xu H, Wang QY, Gao XS, Guo HG. Expression of EpCAM and Wnt/ β -catenin in human colon cancer. *Genet Mol Res* 2015; **14**: 4485–4494.
- 457 Mo J, Wang L, Huang X, Lu B, Zou C, Wei L *et al.* Multifunctional nanoparticles for co-delivery of paclitaxel and carboplatin against ovarian cancer by inactivating the JMJD3-HER2 axis. *Nanoscale* 2017; **9**: 13142–13152.
- 458 Yan N, Xu L, Wu X, Zhang L, Fei X, Cao Y *et al.* GSKJ4, an H3K27me3 demethylase inhibitor, effectively suppresses the breast cancer stem cells. *Experimental Cell Research* 2017; **359**: 405–414.
- 459 Williams K, Christensen J, Rappsilber J, Nielsen AL, Johansen JV, Helin K. The Histone Lysine Demethylase JMJD3/KDM6B Is Recruited to p53 Bound Promoters and Enhancer Elements in a p53 Dependent Manner. *PLoS One* 2014; **9**. doi:10.1371/journal.pone.0096545.
- 460 Park W-Y, Hong B-J, Lee J, Choi C, Kim M-Y. H3K27 Demethylase JMJD3 Employs the NF- κ B and BMP Signaling Pathways to Modulate the Tumor Microenvironment and Promote Melanoma Progression and Metastasis. *Cancer Res* 2016; **76**: 161–170.
- 461 Barradas M, Anderton E, Acosta JC, Li S, Banito A, Rodriguez-Niedenführ M *et al.* Histone demethylase JMJD3 contributes to epigenetic control of INK4a/ARF by oncogenic RAS. *Genes Dev* 2009; **23**: 1177–1182.
- 462 Lin C, Ng HLH, Pan W, Chen H, Zhang G, Bian Z *et al.* Exploring Different Strategies for Efficient Delivery of Colorectal Cancer Therapy. *Int J Mol Sci* 2015; **16**: 26936–26952.
- 463 Agger K, Cloos PAC, Rudkjær L, Williams K, Andersen G, Christensen J *et al.* The H3K27me3 demethylase JMJD3 contributes to the activation of the INK4A–ARF locus in response to oncogene- and stress-induced senescence. *Genes Dev* 2009; **23**: 1171–1176.
- 464 Ene CI, Edwards L, Riddick G, Baysan M, Woolard K, Kotliarova S *et al.* Histone Demethylase Jumonji D3 (JMJD3) as a Tumor Suppressor by Regulating p53 Protein Nuclear Stabilization. *PLoS One* 2012; **7**. doi:10.1371/journal.pone.0051407.
- 465 Ma J, Wang N, Zhang Y, Wang C, Ge T, Jin H *et al.* KDM6B Elicits Cell Apoptosis by Promoting Nuclear Translocation of FOXO1 in Non-Small Cell Lung Cancer. *Cell Physiol Biochem* 2015; **37**: 201–213.
- 466 Kruidenier L, Chung C, Cheng Z, Liddle J, Che K, Joberty G *et al.* A selective jumonji H3K27 demethylase inhibitor modulates the proinflammatory macrophage response. *Nature* 2012; **488**: 404–408.
- 467 Ntziachristos P, Tsiganos A, Welstead GG, Trimarchi T, Bakogianni S, Xu L *et al.* Contrasting roles of histone 3 lysine 27 demethylases in acute lymphoblastic leukaemia. *Nature* 2014; **514**: 513–517.
- 468 Hashizume R, Andor N, Ihara Y, Lerner R, Gan H, Chen X *et al.* Pharmacologic inhibition of histone demethylation as a therapy for pediatric brainstem glioma. *Nat Med* 2014; **20**: 1394–1396.
- 469 Daures M, Idrissou M, Judes G, Rifaï K, Penault-Llorca F, Bignon Y-J *et al.* A new metabolic gene signature in prostate cancer regulated by JMJD3 and EZH2. *Oncotarget* 2018; **9**: 23413–23425.
- 470 Warda W, Larosa F, Neto Da Rocha M, Trad R, Deconinck E, Fajloun Z *et al.* CML Hematopoietic Stem Cells Expressing IL1RAP Can Be Targeted by Chimeric Antigen Receptor-Engineered T Cells. *Cancer Res* 2019; **79**: 663–675.
- 471 Herfs M, Longuespée R, Quick CM, Roncarati P, Suarez-Carmona M, Hubert P *et al.* Proteomic signatures reveal a dualistic and clinically relevant classification of anal canal carcinoma. *J Pathol* 2017; **241**: 522–533.
- 472 Hubert P, Herman L, Roncarati P, Maillard C, Renoux V, Demoulin S *et al.* Altered α -defensin 5 expression in cervical squamocolumnar junction: implication in the formation of a viral/tumour-permissive microenvironment. *J Pathol* 2014; **234**: 464–477.

- 473 Gyórfy B, Surowiak P, Budczies J, Lánczky A. Online Survival Analysis Software to Assess the Prognostic Value of Biomarkers Using Transcriptomic Data in Non-Small-Cell Lung Cancer. *PLoS One* 2013; **8**. doi:10.1371/journal.pone.0082241.
- 474 Sen GL, Webster DE, Barragan DI, Chang HY, Khavari PA. Control of differentiation in a self-renewing mammalian tissue by the histone demethylase JMJD3. *Genes Dev* 2008; **22**: 1865–1870.
- 475 Rath BH, Waung I, Camphausen K, Tofilon PJ. Inhibition of the histone H3K27 demethylase UTX enhances tumor cell radiosensitivity. *Mol Cancer Ther* 2018; **17**: 1070–1078.
- 476 Dubuc AM, Remke M, Korshunov A, Northcott PA, Zhan SH, Mendez-Lago M *et al*. Aberrant patterns of H3K4 and H3K27 histone lysine methylation occur across subgroups in medulloblastoma. *Acta Neuropathol* 2013; **125**: 373–384.
- 477 Geng J, Li X, Zhou Z, Wu C-L, Bai X, Dai M. EZH2 promotes tumor progression via regulating VEGF-A/AKT signaling in non-small cell lung cancer. *Cancer Letters* 2015; **359**: 275–287.
- 478 Xiang Y, Zhu Z, Han G, Lin H, Xu L, Chen CD. JMJD3 is a histone H3K27 demethylase. *Cell Research* 2007; **17**: 850–857.
- 479 Ohtani K, Zhao C, Dobrava G, Manavski Y, Kluge B, Braun T *et al*. Jmjd3 controls mesodermal and cardiovascular differentiation of embryonic stem cells. *Circ Res* 2013; **113**: 856–862.
- 480 Mu W, Starmer J, Yee D, Magnuson T. EZH2 variants differentially regulate polycomb repressive complex 2 in histone methylation and cell differentiation. *Epigenetics Chromatin* 2018; **11**. doi:10.1186/s13072-018-0242-9.
- 481 O’Carroll D, Erhardt S, Pagani M, Barton SC, Surani MA, Jenuwein T. The Polycomb-Group Gene *Ezh2* Is Required for Early Mouse Development. *Mol Cell Biol* 2001; **21**: 4330–4336.
- 482 Satoh T, Takeuchi O, Vandenbon A, Yasuda K, Tanaka Y, Kumagai Y *et al*. The *Jmjd3-Irf4* axis regulates M2 macrophage polarization and host responses against helminth infection. *Nat Immunol* 2010; **11**: 936–944.
- 483 Kim KH, Roberts CWM. Targeting EZH2 in cancer. *Nat Med* 2016; **22**: 128–134.
- 484 Verma SK, Tian X, LaFrance LV, Duquenne C, Suarez DP, Newlander KA *et al*. Identification of Potent, Selective, Cell-Active Inhibitors of the Histone Lysine Methyltransferase EZH2. *ACS Med Chem Lett* 2012; **3**: 1091–1096.
- 485 Anzalone G, Arcoletto G, Bucchieri F, Montalbano AM, Marchese R, Albano GD *et al*. Cigarette smoke affects the onco-suppressor DAB2IP expression in bronchial epithelial cells of COPD patients. *Scientific Reports* 2019; **9**: 15682.
- 486 Sakaki H, Okada M, Kuramoto K, Takeda H, Watarai H, Suzuki S *et al*. GSKJ4, A Selective Jumonji H3K27 Demethylase Inhibitor, Effectively Targets Ovarian Cancer Stem Cells. *Anticancer Res* 2015; **35**: 6607–6614.
- 487 Serresi M, Gargiulo G, Proost N, Siteur B, Cesaroni M, Koppens M *et al*. Polycomb Repressive Complex 2 Is a Barrier to KRAS-Driven Inflammation and Epithelial-Mesenchymal Transition in Non-Small-Cell Lung Cancer. *Cancer Cell* 2016; **29**: 17–31.
- 488 Dhar SS, Lee S-H, Chen K, Zhu G, Oh W, Allton K *et al*. An essential role for UTX in resolution and activation of bivalent promoters. *Nucleic Acids Res* 2016; **44**: 3659–3674.
- 489 Vale W, Rivier J, Vaughan J, McClintock R, Corrigan A, Woo W *et al*. Purification and characterization of an FSH releasing protein from porcine ovarian follicular fluid. *Nature* 1986; **321**: 776–779.

- 490 Zou G, Ren B, Liu Y, Fu Y, Chen P, Li X *et al.* Inhibin B suppresses anoikis resistance and migration through the transforming growth factor- β signaling pathway in nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Science* 2018; **109**: 3416–3427.
- 491 Mylonas I, Jeschke U, Shabani N, Kuhn C, Friese K, Gerber B. Inhibin/activin subunits (inhibin-alpha, -betaA and -betaB) are differentially expressed in human breast cancer and their metastasis. *Oncol Rep* 2005; **13**: 81–88.
- 492 Jiang L, Hermeking H. miR-34a and miR-34b/c Suppress Intestinal Tumorigenesis. *Cancer Res* 2017; **77**: 2746–2758.
- 493 Kita A, Kasamatsu A, Nakashima D, Endo-Sakamoto Y, Ishida S, Shimizu T *et al.* Activin B Regulates Adhesion, Invasiveness, and Migratory Activities in Oral Cancer: a Potential Biomarker for Metastasis. *J Cancer* 2017; **8**: 2033–2041.
- 494 Jückstock J, Brüning A, Blankenstein T, Kunze S, Shabani N, Bergauer F *et al.* Immunolabeling of the inhibin- β A and - β B subunit in normal and malignant human cervical tissue and cervical cancer cell lines. *Int J Gynecol Cancer* 2010; **20**: 1117–1124.
- 495 Gherardi S, Ripoche D, Mikaelian I, Chanal M, Teinturier R, Goehrig D *et al.* Menin regulates Inhb expression through an Akt/Ezh2-mediated H3K27 histone modification. *Biochim Biophys Acta Gene Regul Mech* 2017; **1860**: 427–437.
- 496 Jiang S, Zhang M, Zhang Y, Zhou W, Zhu T, Ruan Q *et al.* WNT5B governs the phenotype of basal-like breast cancer by activating WNT signaling. *Cell Commun Signal* 2019; **17**: 109.
- 497 Harada T, Yamamoto H, Kishida S, Kishida M, Awada C, Takao T *et al.* Wnt5b-associated exosomes promote cancer cell migration and proliferation. *Cancer Sci* 2017; **108**: 42–52.
- 498 Kato S, Hayakawa Y, Sakurai H, Saiki I, Yokoyama S. Mesenchymal-transitioned cancer cells instigate the invasion of epithelial cancer cells through secretion of WNT3 and WNT5B. *Cancer Sci* 2014; **105**: 281–289.
- 499 Zhang Q, Fan H, Liu H, Jin J, Zhu S, Zhou L *et al.* WNT5B exerts oncogenic effects and is negatively regulated by miR-5587-3p in lung adenocarcinoma progression. *Oncogene* 2020; **39**: 1484–1497.
- 500 Zhang Y, Lin L, Jin Y, Lin Y, Cao Y, Zheng C. Overexpression of WNT5B promotes COLO 205 cell migration and invasion through the JNK signaling pathway. *Oncol Rep* 2016; **36**: 23–30.
- 501 Kelwick R, Desanlis I, Wheeler GN, Edwards DR. The ADAMTS (A Disintegrin and Metalloproteinase with Thrombospondin motifs) family. *Genome Biol* 2015; **16**. doi:10.1186/s13059-015-0676-3.
- 502 Porter S, Scott SD, Sassoan EM, Williams MR, Jones JL, Girling AC *et al.* Dysregulated expression of adamalysin-thrombospondin genes in human breast carcinoma. *Clin Cancer Res* 2004; **10**: 2429–2440.
- 503 Liu L, Yang Z, Ni W, Xuan Y. ADAMTS-6 is a predictor of poor prognosis in patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Exp Mol Pathol* 2018; **104**: 134–139.
- 504 Xie Y, Gou Q, Xie K, Wang Z, Wang Y, Zheng H. ADAMTS6 suppresses tumor progression via the ERK signaling pathway and serves as a prognostic marker in human breast cancer. *Oncotarget* 2016; **7**: 61273–61283.
- 505 Das P, Taube JH. Regulating Methylation at H3K27: A Trick or Treat for Cancer Cell Plasticity. *Cancers* 2020; **12**: 2792.

Titre : Rôles de la lysine déméthylase KDM6B et l'histone méthyltransférase EZH2 au cours de la Transition Epithélio-Mésenchymateuse (TEM)

Mots clés : Cancer, TEM, Epigénétique, EZH2, KDM6B

EZH2 et KDM6B catalysent respectivement la méthylation et la déméthylation de la marque épigénétique H3K27me3 (triméthylation de la lysine 27 de l'histone 3). Elles sont dérégulées dans de nombreux types de cancers. Nos travaux montrent que l'expression de KDM6B et EZH2 sont corrélées dans les cancers du poumon non à petites cellules et sont corrélées à l'expression du marqueur mésenchymateux VIMENTINE. Dans la lignée cellulaire de cancer du poumon A549, la surexpression d'EZH2 ou de KDM6B entraîne chacune les cellules vers un phénotype mésenchymateux. De plus, l'inhibition chimique d'EZH2, mais plus significativement celle de KDM6B entraîne également un phénotype mésenchymateux, au niveau moléculaire comme fonctionnel. Certains gènes sont fortement sur- ou sous-exprimés au cours de la TEM et leurs promoteurs pourraient être des cibles d'EZH2 ou KDM6B d'après nos données de CHIP-seq. Nous avons alors émis l'hypothèse que KDM6B et EZH2 ciblent des gènes différents au cours de la TEM. Nous avons montré que la sous-expression d'*INHBB* et la surexpression de *WNT5B* et *ADAMTS6* au cours de la TEM est régulée au moins en partie par H3K27me3. La modulation de l'expression de ces gènes est suffisante pour impacter les capacités d'invasion des cellules A549. Pour conclure, EZH2 et KDM6B, malgré leur activité antagoniste, sont importantes pour la régulation de la TEM dans les cellules A549.

Title: Roles of the lysine demethylase KDM6B and the histone methyltransferase EZH2 during Epithelial Mesenchymal Transition (EMT)

Keywords: Cancer, EMT, Epigenetics, EZH2, KDM6B

Epigenetic enzymes EZH2 and KDM6B catalyze respectively methylation and demethylation of the epigenetic mark H3K27me3 (trimethylation of lysine 27 of histone H3). EZH2 and KDM6B are deregulated in various types of cancers. Our study reveals that KDM6B and EZH2 expressions in non-small cell lung cancer tissues have been correlated with each other and correlated with the mesenchymal marker VIMENTIN. In the lung cancer cell line A549, overexpression of EZH2 or KDM6B both led to an activation of the mesenchymal phenotype. Moreover, chemical inhibition of EZH2, but more significantly KDM6B, led to an induced mesenchymal phenotype too, both at the molecular and the functional level. Some genes are highly up- or down-regulated during EMT and may be direct target genes of EZH2 or KDM6B according to CHIP-seq data. We therefore hypothesized that KDM6B and EZH2 may present similar or different target genes during EMT. We validated that *INHBB* under expression and *ADAMTS6* and *WNT5B* overexpression during EMT is regulated, at least in part, by H3K27me3 modulation, and that modulation of these genes expression by siRNA can affect invasion capacities of A549 lung tumor cells. To conclude, both EZH2 and KDM6B, despite their antagonist activity, showed an important function in the regulation of EMT in the A549 cell line model. Overexpression of EZH2 and KDM6B during EMT can regulate *WNT5B*, *INHBB* and *ADAMTS6* expression in order to increase invasion capacities of the cells.