Université de Montréal

DNMT3A P904L : Un nouveau variant dans la tumeur de Wilms

Par

Anne-Marie Roy

Département de Biochimie et médecine moléculaire

Faculté de Médecine

Mémoire présenté en vue de l'obtention du grade de maitrise ès science en biochimie, option génomique humaine

Septembre 2019

© Roy, Anne-Marie (2019)

Université de Montréal

Département de Biochimie et médecine moléculaire, Faculté de Médecine

---

Ce mémoire intitulé

DNMT3A P904L : un nouveau variant dans la tumeur de Wilms

Présenté par Anne-Marie Roy

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes

Martine Raymond

Président-rapporteur

Daniel Sinnett

Directeur de recherche

Francine Durocher

Membre du jury

I — Résumé

La tumeur de Wilms est la tumeur du rein la plus courante chez les enfants. Actuellement, près de 80 % à 90 % des patients survivent, mais quelques patients ne répondront pas aux traitements ou auront une rechute. L'objectif de ce projet est de caractériser la nouvelle mutation P904L dans le gène *DNMT3A* retrouvée chez un patient atteint de la tumeur de Wilms qui était en rechute. L'impact de cette nouvelle mutation est encore inconnu, mais des mutations dans le gène de *DNMT3A* sont fréquemment retrouvées dans le cancer.

Le contexte de la mutation dans le patient et sa récurrence dans d'autres cancers et syndrome nous portent à croire que cette mutation affecte la fonction de DNMT3A. La perte de fonction de DNMT3A ainsi que certains de ses mutants sont connus pour altérer des caractéristiques du cancer comme la différenciation et l'immortalisation des cellules. On sait aussi que les tumeurs de Wilms ont des cellules qui gardent un aspect non différencié ou embryonnaire. Nous supposons que l'impact de la mutation P904L sur *DNMT3A* contribue au développement de la tumeur de Wilms.

Pour démontrer l'impact de cette nouvelle mutation sur la protéine et sur le développement tumoral, nous avons utilisé à la fois des tests fonctionnels classiques et le séquençage de nouvelle génération. Puisque *DNMT3A* est un gène qui affecte la méthylation de l'ADN et régule l'expression, nous avons évalué le profil d'expression de la mutation P904L pour voir son impact sur la fonction du gène *DNMT3A*.

Nos travaux démontrent que la nouvelle mutation P904L cause une perte de fonction de l'enzyme DNMT3A. Cette mutation altère le renouvellement cellulaire et la migration en plus de moduler la réponse à des agents thérapeutiques. Nous avons aussi constaté que la mutation module l'expression génique et que cette modulation est cohérente avec le profil d'expression du patient.

En conclusion, nous suggérons trois mécanismes par lesquels le mutant contribue à la progression et au développement de la tumeur de Wilms. Nous démontrons aussi la nécessité d'approfondir nos connaissances sur cette tumeur afin de pouvoir proposer de nouvelles options thérapeutiques aux patients en rechute ou qui ne répondent pas aux traitements classiques.

Mots clés : Tumeur de Wilms, DNMT3A, épigénétique, cancer, mutation

II – Abstract

Wilms tumours are the most common kidney tumour in children. As of now, almost 80 % to 90 % of the patients survive but there is still some who do not respond. This project objective is to study the novel mutation P904L in the *DNMT3A* gene discovered in a relapse Wilms tumour's patient. The impact of this variant is unknown, but mutations in *DNMT3A* are frequently found in cancer.

The context of the mutation in the patient and the recurrence of this mutation in other cancers and syndrome make us believe that it is affecting the function of the DNMT3A protein. Loss of function and some mutations of *DNMT3A* are known to affect crucial characteristics of cancers such as differentiation and immortalization. It is also known that Wilms tumours are made of undifferentiated or embryonic looking cells. We supposed that the impact of the mutation on DNMT3A protein contribute to the development of the tumour.

To prove that this new mutation is affecting the protein and the development of the tumour, we used both functional assays and next generation sequencing technologies. Because *DNMT3A* is a gene affecting the methylation of the DNA and thus regulating gene expression, we used expression profile to assess the impact of the mutation on the enzyme DNMT3A.

We demonstrate that the new mutation P904L causes a loss of function of the DNMT3A protein. This mutation affects the self-renew and the migration of the cells. Moreover, it modulates the response to drugs. We also found that the mutation modulates the gene expression in the cell line and this modulation is coherent with the expression pattern of the patient.

In conclusion, we suggest three mechanisms by which this new mutant contributes to the development and progression of Wilms tumours. We also show that there is a need to further our knowledge of this tumour in order to propose new therapeutics options to non-responsive patient.

Keywords: Wilms Tumour, DNMT3A, epigenetics, cancer, mutation

III – Table des matières

I — Résumé 3

II – Abstract 4

III – Table des matières 5

IV – Table des illustrations 11

V — Liste des tableaux 13

VI — Liste des abréviations 14

VII — Remerciements 17

Section 1 — Introduction 18

1.1 – Généralités 19

1.2 – Cancer pédiatrique 20

1.2.1 – Cancer et génétique 20

1.2.2 – Les caractéristiques du cancer 22

1.2.3 – Cancer et modifications épigénétiques 24

1.3 – Tumeur de Wilms 27

1.3.1 – Le rein et sa fonction 27

1.3.2 – Développement de la tumeur de Wilms 29

1.3.3 – Aspect génétique 31

1.3.3.1 – Altérations du nombre de copies (CNA) 31

1.3.3.2 – Gène *WT1* 32

1.3.3.3 – Gène *CTNNB1* 32

1.3.3.4 – Gène *WTX* 33

1.3.3.5 – Gène *TP53* 33

1.3.3.6 – Autres gènes 33

1.3.4 – Aspect épigénétique 34

1.3.4.1 – Locus WT2 34

1.3.5 – Traitement de la tumeur de Wilms 36
1.4 – *DNMT3A* 37
1.4.1 – ADN méthyltransférases 37
1.4.1.1 – Structures des gènes et protéines 37
1.4.1.2 – Réaction de méthylation et fonctions biologiques 39
1.4.2 – Impact physiologique de DNMT3A 40
1.4.3 – *DNMT3A* : variants somatiques et cancer 41
1.4.3.1 – Variants dans la leucémie myéloïde aiguë (LMA) 42
1.4.3.2 – Variants dans la leucémie lymphoïde aiguë (LLA) 42
1.4.3.3 – Variants dans le syndrome myélodysplasique (MDS) 43
1.4.3.4 – Variant R882* dans *DNMT3A* 43
1.4.4 – *DNMT3A* : variants germinaux et syndrome de Tatton-Browns 44
1.5 – Agents thérapeutiques 46
1.5.1 – Vincristine 46
1.5.2 – Décitabine 47
1.6 – But du projet et hypothèse 49
1.6.1 – Hypothèse et but principal 49
1.6.1.1 – But principal. 49
1.7 – Objectifs spécifiques 50
1.7.1 – Impacts attendus 50
Section 2 — Matériels et méthodes 51
2.1 – Préparation du modèle d'étude 52
2.1.1 – Culture cellulaire 52
2.1.2 – Production des plasmides 53
2.1.3 – Extraction d'ADN 54
2.1.3.1 – Carte des plasmides 55

2.1.4 – Production de virus 56

2.1.5 – Infections des lignées cellulaires 56

2.1.6 – Validation des lignées par Q-PCR 57

2.2 – Tests fonctionnels 59

2.2.1 – Traitement des cellules avec des agents thérapeutiques 59

2.2.2. — Immunobuvardage (Western Blot) 59

2.2.2.1 – Migration sur gel 60

2.2.2.2 – Transfert sur membrane 60

2.2.2.3 – Blocage et anticorps 60

2.2.2.4 – Révélation 61

2.2.3 – Test de prolifération 61

2.2.4 – Essai Clonogénique 61

2.2.5 – Essai de migration 62

2.2.5.1 – Essai de migration par plaie 62

2.2.5.2 – Essai de migration de type « Transwell » 63

2.2.6 – Tests d'apoptose 63

2.2.7 – Test d'activité méthyltransférase 65

2.3 – Transcriptome des lignées cellulaires 66

2.3.1 – Préparation des librairies 66

2.3.2 – Traitement des données de transcriptome 66

2.3.2.1 – Groupes de gènes différentiellement exprimés 68

2.3.2.2 – Intersection des groupes différentiellement exprimés 68

2.3.2.3 – Filtres pour les gènes communs 69

2.3.3 – Analyse d'enrichissement des termes GO 69

2.3.4 – Comparaison avec la littérature et le patient 70

2.4 – Analyses statistiques 70

Section 3 — Résultats 71
3.1 – Contexte de la mutation DNMT3A P904L 72
3.1.1 – Projet TRICEPS 72
3.1.2 – Autres occurrences de la mutation 73
3.2 – Création de la mutation et validation des contrôles 74
3.2.1 – Création des plasmides 74
3.2.2 – Validation du shARN 76
3.3 – Validation de l'expression de DNMT3A dans les populations cellulaires 77
3.3.1 – Analyse de l'expression des différentes constructions dans la lignée cellulaire ACHN 77
3.3.2 – Validation de la traduction de DNMT3A dans les modèles cellulaires 79
3.4 – Analyses transcriptionnelles 80
3.4.1 – Regroupement des échantillons avant et après l'application de filtres 80
3.4.2 – Test d'enrichissement de termes *Gene Ontology* (GO) 82
3.4.3 – Expression des gènes candidats chez le patient TC0040 85
3.5 – Analyse de l'impact fonctionnel du mutant P904L 88
3.5.1 – Essai clonogénique 88
3.5.2 – Test de la capacité de migration cellulaire 89
3.5.3 – Essai de prolifération 90
3.5.4 – Mesure de l'activité méthyltransférase 92
3.6 – Impact des agents thérapeutiques 93
3.6.1 – Essai d'apoptose 93
3.6.1.1 – Essai d'apoptose avec la vincristine 93
3.6.1.2 – Essai d'apoptose avec la décitabine 95
3.6.2 – Essai clonogénique avec agents thérapeutiques 97
Section 4 — Discussion 99
4.1 – Le mutant P904L cause une perte de fonction de DNMT3A 100

4.1.1 – Contexte de la mutation 100
4.2 – Impacts du mutant P904L 101
4.2.1 – Impact du mutant P904L sur la fonction de l'enzyme DNMT3A..... 101
4.2.1.1 – Le mutant P904L augmente la présence d'une isoforme de DNMT3A..... 101
4.2.1.2 – Le mutant P904L enrichit des voies métaboliques liées au cancer 102
4.2.2 – Impact du mutant P904L sur les fonctions classiques du cancer..... 103
4.2.2.1 – Le mutant P904L augmente la capacité clonale des cellules..... 103
4.2.2.2 – Le mutantP904L diminue la migration des cellules 103
4.2.3 – Le mutant P904L module la sensibilité à différents agents thérapeutiques 103
4.2.3.1 – Le mutant P904L module la réponse à la vincristine 104
4.2.3.2 – La décitabine induit moins d'apoptose chez le mutant P904L 104
4.3 – Critique des résultats et des méthodes 105
4.3.1 – Modèle cellulaire de recherche 105
4.3.2 – Quantification de l'activité méthyltransférase 106
4.3.3 – Essais de migration..... 106
4.3.4 – Essai d'apoptose et analyse des résultats..... 107
4.3.5 – Analyse des données du transcriptome..... 107
4.4 – Mise en contexte de l'impact du mutant..... 109
4.4.1 – Impact du mutant sur la cellule 109
4.4.2 – Impact du mutant dans la tumeur de Wilms 111
4.5 – Perspectives 112
4.5.1 – Impact sur la fonction de méthylation..... 112
4.5.2 – Impact sur l'initiation de la tumeur de Wilms 113
4.6 – Conclusions 114
Section 5 — Conclusion 115
5.1 – Le mutant P904L affecte la progression tumorale..... 116

Section 6 — Bibliographie 117

Section 7 — Annexes 125

7.1 – Annexe A : Résultats supplémentaires 126

7.1.1 – Validation de l'intégrité des plasmides 126

7.1.1.1 – Séquence de DNMT3A natif 126

7.1.1.2 - Séquence de DNMT3A P904L 127

7.1.2 – Valeurs d'expression des constructions 128

7.1.2.1 – Validation du shARN par « rescue » 128

7.1.2.2 – Validation des populations cellulaires 128

7.1.3 – Essai d'apoptose 129

7.1.3.1 – Résultats à 48 heures d'exposition aux agents thérapeutiques 129

IV – Table des illustrations

Figure 1 : Mutations passagères et conductrices dans une cellule tumorale 21
Figure 2 : Les dix caractéristiques du cancer selon Hanahan 22
Figure 3 : Les caractéristiques actualisées du cancer selon Fouad 22
Figure 4 : Principes d'auteurs, lecteurs et effaceurs épigénétiques chez les histones 25
Figure 5 : Remodeleurs de la chromatine 26
Figure 6 : Développement embryonnaire du rein 28
Figure 7 : Structure du rein mature 29
Figure 8 : Niche néphrologique 30
Figure 9 : Cellules anaplasiques 31
Figure 10 : Altérations du chromosome 11 dans la tumeur de Wilms 34
Figure 11 : Région soumise à l'empreinte parentale IGF2/H19 35
Figure 12 : Domaines protéiques de DNMT3A et DNMT3L 37
Figure 13 : Réaction de méthylation 38
Figure 14 : Tétramère DNMT3A-DNMT3L 39
Figure 15 : Mutations du gène DNMT3A dans la LMA 42
Figure 16 : Mutations du gène DNMT3A dans les MDS 43
Figure 17 : Mutations de DNMT3A dans le syndrome de Tatton-Brown 44
Figure 18 : Modèle du mécanisme d'action de la vincristine 46
Figure 19 : Structure de la cytosine et de la décitabine 47
Figure 20 : Production de plasmides pour la transfection et la formation de virus 53
Figure 21 : Cartes des plasmides utilisés pour la transfection 55
Figure 22 : Production des virus pour l'infection des lignées cellulaires 56
Figure 23 : Doubles infections des cellules ACHN 57
Figure 24 : Arbre décisionnel de l'analyse du transcriptome 67
Figure 25 : Altération génomique du patient TC0040 72
Figure 26 : Expression de DNMT3A chez le patient TC0040 73
Figure 27 : Schéma PECAN des mutations de DNMT3A 74
Figure 28 : Carte du plasmide DNMT3A 75
Figure 29 : Expression relative DNMT3A dans la validation du shARN 76
Figure 30 : Expression de DNMT3A dans les lignées cellulaires 78
Figure 31 : Immunobuvardage des protéines DNMT3A et GPADH 79

Figure 32 : Corrélation entre les échantillons du transcriptome 80
Figure 33 : Regroupement des échantillons après l'analyse différentielle 81
Figure 34 : Regroupement des échantillons après le filtre final 81
Figure 35 : Enrichissement des 239 gènes restants à la suite de l'analyse différentielle corrigée 82
Figure 36 : Enrichissement des 953 gènes restants à la suite de l'analyse différentielle 83
Figure 37 : Enrichissement et visualisation des termes GO 84
Figure 38 : Expression chez le patient des gènes les plus différentiellement exprimés 85
Figure 39 : Expression chez le patient des 20 gènes les plus significatifs dans l'analyse différentielle 86
Figure 40 : Expression chez le patient des gènes liés à DNMT3A et impliqués dans d'autres pathologies 87
Figure 41 : Efficacité d'implantation des cellules en essai clonogénique 88
Figure 42 : Migration des cellules 89
Figure 43 : Courbe logarithmique moyenne de la prolifération des lignées cellulaires 90
Figure 44 : Temps de doublement des cellules 91
Figure 45 : Test d'activité méthyltransférase des DNMTs 92
Figure 46 : Apoptose normalisée à 72 heures et apoptose à 72h, normalisée sur le non-traité, pour le traitement à la vincristine. 93
Figure 47 : Aire sous la courbe pour l'apoptose des cellules traitées à la vincristine 94
Figure 48 : Apoptose normalisée à 72 heures et apoptose à 72h, normalisée sur le non-traité, pour le traitement à la décitabine 95
Figure 49 : Apoptose des cellules selon l'aire sous la courbe pour la décitabine 96
Figure 50 : Taux de survie dans les cellules traitées à la vincristine 97
Figure 51 : Pourcentage de survie dans les cellules traitées à la décitabine 98
Figure 52 : Modèle proposé de l'impact du mutant P904L dans l'initiation et la progression tumorale. 109
Figure 53 : Apoptose à 48 heures pour le traitement à la vincristine. 129
Figure 54 : Apoptose à 48 heures pour le traitement à la décitabine 129

V — Liste des tableaux

Tableau 1 : Amorces mutagenèse dirigée 54
Tableau 2 : Amorces de séquençage Sanger 54
Tableau 3 : Réaction de RT-PCR 58
Tableau 4 : Amorces Q-PCR 58
Tableau 5 : Programme Q-PCR 58
Tableau 6 : Composition du tampon d'extraction RIPA 59
Tableau 7 : Composition du tampon de migration 5X 60
Tableau 8 : Composition du tampon de transfert 60
Tableau 9 : Anticorps pour l'immunobuvardage 61
Tableau 10 : Paramètre de l'Incucyte, analyse de confluence 61
Tableau 11 : Paramètre de l'Incucyte, analyse des colonies 62
Tableau 12 : Paramètres de l'Incucyte, analyse des plaies 62
Tableau 13 : Paramètres de l'Incucyte, analyse d'apoptose 64
Tableau 14 : Intégrité de l'ARN dans les extraits cellulaires 77
Tableau 15 : Valeurs d'expression relative de DNMT3A 128
Tableau 16 : Expression relative de DNMT3A dans les lignées cellulaires 128

VI — Liste des abréviations

5mC : Cytosine méthylée en position 5
ABL2 : *ABL Proto-Oncogene 2, Non-Receptor Tyrosine Kinase*
Ac : Groupement acétyle
ActD : Actinomycine D
ADD : *Atrx-DNMT3-DNMT3L,* Domaine de DNMT3A et DNMT3B
ADN : Acide désoxyribonucléique
AdoMet : S-adénosyl-L-méthionine
AMEM : *Alpha Modification of Eagle's Medium,* Milieu de culture d'Eagle avec modification alpha
AMER1 : *Adenomatous Polyposis Coli Membrane Recruitment 1*
ANX V : Annexine 5
ARID1A : *AT-Rich Interaction Domain 1A*
ARN : Acide ribonucléique
CGH : *Comparative Genomic Hybridization,* Hybridation génomique comparative sur puce
CHD1L : *Chromodomain Helicase DNA Binding Protein 1 Like*
CLIP1 : *CAP-Gly Domain Containing Linker Protein 1*
CMV : Cytomégalovirus
C-MYC : *MYC Proto-Oncogene, BHLH Transcription Factor*
CNA : *copy number alteration,* Altération du nombre de copies
COG : *Children oncology group*
CRABP2 : *Cellular Retinoic Acid Binding Protein 2*
CTCF : *CCCTC-Binding Facto*
CTNNB1 : *Catenin Beta 1*
CT SCAN : *Computed tomography scan,* tomodensitométrie
DAC : Décitabine
DDR2 : *Discoidin Domain Receptor Tyrosine Kinase 2*
DGCR8 : *DiGeorge Syndrome Critical Region Gene 8*
DICER1 : *Dicer 1, Ribonuclease III*
DMEM : *Dulbecco's Modified Eagle Medium*
DNMT1 : *DNA methyltransferase 1*
DNMT3A : *DNA methyltransferase 3A*
DNMT3A2 : *DNA methyltransferase 3A isoform 2*
DNMT3B : *DNA methyltransferase 3B*
DNMT3L : *DNA methyltransferase 3L*
DNMTs : *DNA methyltransferases*
DROSHA : *Drosha Ribonuclease III*
ECL : Électrochemiluminescence
EDTA : *Ethylenediaminetetraacetic Acid*
ELISA : *Enzyme-linked immunosorbent assay*
EZH2 : *Enhancer of Zeste 2 Polycomb Repressive Complex 2 Subunit*
FBS : *Fetal bovine serum,* Serum fœtal bovin
FC : *Fold change,* Changement d'expression

FPKM	:	*Fragments per kilobase of exon model per million reads mapped*
GAPDH	:	*Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase*
GJA8	:	*Gap Junction Protein Alpha 8*
GO	:	*Gene Ontology*
GUSB	:	*Glucuronidase Beta*
H19	:	*Non-Protein Coding RNA 8, H19 Imprinted Maternally Expressed Transcript*
HATs	:	*Histone acetyl transferase*
HDACs	:	*Histone deacetylase*
His-MBD2b	:	*His tagged Methyl-CpG Binding Domain Protein 2*
HMTs	:	*Histone methyltransferase*
HRP	:	*Horseradish peroxidase*
IDH1/2	:	*Isocitrate Dehydrogenase (NADP (+)) 1 / 2*
IGF2	:	*Insulin Like Growth Factor 2*
IL6	:	*Interleukin 6*
ILNR	:	*Intralobar nephrologic rest,* Niche néphrologique intralobaire
IRM	:	*Imagerie par résonnance magnétique*
KDM	:	*Lysine demethylases*
KRAS	:	*KRAS Proto-Oncogene, GTPase*
LLA	:	Leucémie lymphoblastique aiguë
LMA	:	Leucémie myéloïde aiguë
MAPKs	:	*Mitogen-Activated Protein Kinase*
MAPs	:	*Microtubule Associated Protein*
MDS	:	*Myelodysplastic syndrome,* Syndrome myélodysplastique
Me	:	Groupement méthyle
MEX3A	:	*Mex-3 RNA Binding Family Member A*
MLLT1	:	*MLLT1 Super Elongation Complex Subunit, Myeloid/Lymphoid or Mixed-Lineage Leukemia; Translocated To, 1*
MTase	:	Activité méthyltransférase
MYCN	:	*MYCN Proto-Oncogene, BHLH Transcription Factor*
NSD1	:	*Nuclear Receptor Binding SET Domain Protein 1*
P	:	Groupement phosphate
PBS	:	*Phosphate Buffered Saline,* Saline avec tampon phosphate
PDCD4	:	*Programmed Cell Death 4*
PECAN	:	*Pediatric Cancer genome project*
PLNR	:	*Perilobar nephrologic rest,* Niche néphrologique périlobaire
PRC1	:	*Protein Regulator of Cytokinesis 1*
PRMTs	:	*Protein arginine methyltransferases*
PWWP	:	Proline-tyrosine-tyrosine-proline, motif du domaine de DNMT3A et DNMT3B
Q-PCR	:	Réaction de polymérase en chaine en temps réel
RAD21	:	*RAD21 Cohesin Complex Component*
RHOA	:	*Ras Homolog Family Member A*
RICTOR	:	*RPTOR Independent Companion Of MTOR Complex 2*
RIN	:	*RNA integrity number*
RT-PCR	:	Réaction de polymérisation en chaine avec transcription inverse
SAM	:	S-adénosyl-L-méthionine
SDS	:	*Sodium dodecyl sulfate*

shARN	:	*Small hairpins RNA*
SIOP	:	Société International d'oncologie pédiatrique
SIX1	:	*SIX Homeobox 1*
SIX2	:	*SIX Homeobox 2*
SMARCA4	:	*SWI/SNF Related, Matrix Associated, Actin Dependent Regulator of Chromatin, Subfamily A, Member 4*
STBR	:	Syndrome de Tatton-Brown Rahman
SUZ12	:	*SUZ12 Polycomb Repressive Complex 2 Subunit*
TARBP2	:	*TARBP2 Subunit Of RISC Loading Complex*
TBS	:	*Tris-Buffered saline,* Saline avec tampon Tris
TDG	:	*Tyrosine DNA glycosylase*
TET2	:	*Tet Methylcytosine Dioxygenase 2*
TETs	:	*Tet Methylcytosine Dioxygenase*
TEM	:	Transition épithéliale mésenchymateuse
TME	:	Transition mésenchyme épithélial
TP53	:	*Tumour protein 53*
Tx	:	*Traitement*
UTR	:	*Untranslated Transcribed Region,* Région transcrite non traduite
UV	:	Ultraviolet
VNC	:	Vincristine
WGS	:	*Whole genome sequencing*, Séquençage du génome complet
WNT4	:	*Wingless-Type MMTV Integration Site Family, Member 4*
WT	:	*Wild type*, Natif
WT1	:	*Wilms tumour 1*
WT2	:	*Wilms tumour 2*
WTX	:	*Wilms Tumour on The chr X*
XPO5	:	*Exportin 5*
ZNF	:	*zinc finger domain*, domaine en doigt de Zinc

VII — Remerciements

Je remercierai d'abord mon directeur de recherche, Daniel Sinnett, de m'avoir accueillie dans son laboratoire et m'avoir permis de prendre les rênes dans ce projet.

Je remercie ensuite Jasmine et Simon pour leur aide dans le début du projet et la confiance qu'ils ont placée en moi. Merci à Alain pour les nombreuses corrections, rencontres et questions bio-informatiques et scientifiques.

Je tiens à adresser un remerciement spécial à Pauline pour m'avoir montré les rouages du laboratoire et sans qui ce projet ne serait pas ce qu'il est aujourd'hui. Merci pour ta bonne humeur, ta passion et ta motivation hors du commun, tu as su enrichir grandement ma formation.

Merci à Chantale pour les nombreuses idées et théories suggérées et l'aide technique. J'admire ton esprit scientifique ainsi que ta volonté d'aller toujours plus loin et de sortir des sentiers battus. Merci à Pascal, Maxime et François pour l'aide et l'appui lors des analyses bio-informatiques. Merci à Sylvie et Thomas d'avoir répondu à mes questions sur les aspects cliniques en amont de projet. Merci à Manon pour sa présence solide et sa rigueur dans le laboratoire. Merci à Fida pour l'aide professionnelle et la joie de vivre au laboratoire. Merci à Claire, Lucas P. et Angela pour les nombreuses discussions scientifiques ou banales que nous avons eues au laboratoire. Merci à Romain, Alexandre, Caroline et Julie C. d'avoir enrichi nos diners et organisé nos activités de laboratoire.

Finalement, un merci spécial à Lucas G. et Jean-Paul pour avoir égayé ma maisonnée et m'avoir appuyée sans condition même si je semblais parfois parler une autre langue. Merci à Manon, Sonia, Yves, Julie R., Benjamin, Christian et Marie-Claude pour leur support infaillible durant cet été.

Section 1 — Introduction

1.1 – Généralités

Le cancer est une maladie qui fait des ravages dans la population, surtout dans les pays occidentaux [1]. Les recherches démontrent qu'il ne s'agit pas d'une seule maladie, mais plutôt d'un groupe de maladies très différentes qui requièrent des traitements et des approches distinctes [2, 3]. Le cancer est également considéré comme une maladie du génome qui implique des mutations dans de nombreux gènes et des réarrangements chromosomiques. Chaque cancer présente un profil génomique unique qui requiert un traitement adapté. Les cancers peuvent toucher autant les adultes que les enfants ; il s'agit là d'un défi de taille pour la recherche puisque le développement et l'évolution de la maladie sont bien différents entre un adulte et un enfant. De plus, l'étude des cancers dans la population pédiatrique est complexifiée par la taille des cohortes pédiatriques, plus faible et la toxicité des agents thérapeutiques, souvent plus élevée. Enfin, les patients pédiatriques ont un risque augmenté de développer des comorbidités et des impacts à long terme suivant la thérapie [4-6].

La tumeur de Wilms est la tumeur du rein la plus répandue chez les jeunes enfants [7]. Lors du séquençage d'une tumeur de Wilms chez un patient, nous avons détecté une mutation non répertoriée du gène *DNMT3A,* soit la mutation P904L. Cette mutation est particulièrement intéressante puisque *DNMT3A* occupe une place importante dans la régulation épigénétique par la méthylation de l'ADN [8].

Dans l'introduction, j'aborderai tout d'abord les enjeux des cancers pédiatriques et les connaissances que nous en avons, puis ce qui est connu sur les tumeurs de Wilms et les implications au point de vue génétique et épigénétique. Ensuite, je ferai une revue des connaissances sur la famille des DNMTs et le gène *DNMT3A*. Finalement, j'énoncerais mon hypothèse de recherche et les divers objectifs du projet seront détaillés.

1.2 – Cancer pédiatrique

Le cancer touche près de 14 millions de personnes par année dans le monde [3, 9]. Il affecte à la fois la population adulte et pédiatrique, toutefois son développement diffère dans les deux populations. Chaque année, le cancer touchera 882 enfants au Canada [10]. Bien que la science et les traitements des cancers pédiatriques aient progressé dans les dernières années, environ 20 % de ces enfants vivront une rechute ou ne répondront pas aux traitements chaque année au Canada [10, 11]. Malheureusement, ces derniers décèderont. Ceci constitue la principale cause de décès par maladie chez les enfants. Pour ces enfants, la science cherche encore des solutions pour augmenter le taux de survie et la qualité de vie à la suite du traitement.

1.2.1 – Cancer et génétique

Le cancer est une maladie qui est causée par l'accumulation de mutations et de réarrangements dans le génome tumoral. Ces mutations peuvent être également germinales, c'est-à-dire transmises par les parents et présentes depuis la conception, ou somatiques, acquise au cours de la vie d'un individu. Plus la longévité augmente, plus les probabilités d'accumuler suffisamment de mutations pour déclencher la progression tumorale augmentent [12, 13].

L'une des premières caractéristiques observées du cancer est la prolifération excessive et indépendante d'un groupe de cellules qui forme ainsi une tumeur. Les cellules se divisent alors plus rapidement et acquièrent des mutations supplémentaires. Lorsqu'un cancer est séquencé chez l'adulte, souvent un nombre considérable de mutations dans la tumeur complique l'application d'un traitement de précision. Toutefois, chez l'enfant la probabilité d'observer un haut nombre de mutations est faible ce qui facilite l'analyse de ces mutations et l'application d'une thérapie ciblée [14]. La principale complexité lorsque l'on analyse les différentes mutations présentes dans une tumeur consiste à différencier les mutations conductrices (*drivers*) des mutations passagères (Figure 1) [13].

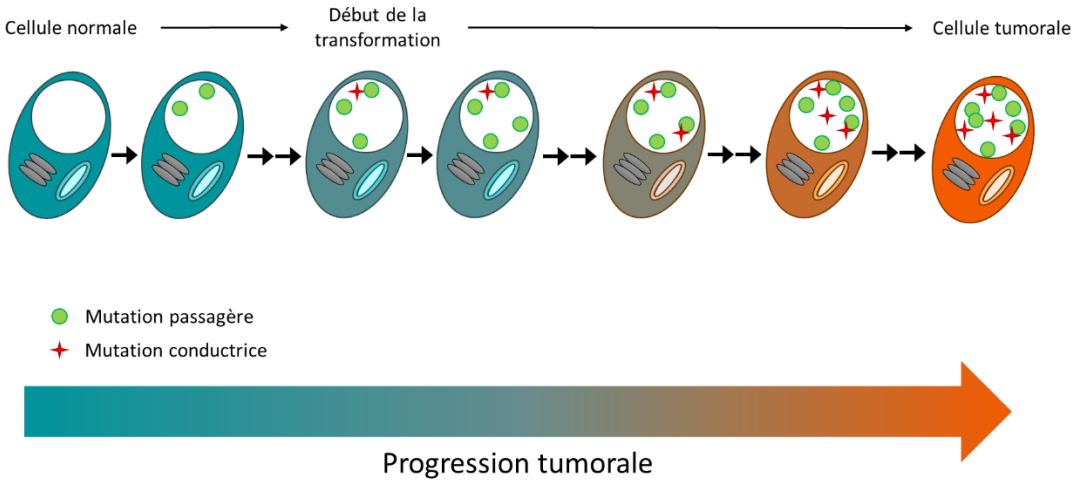

Figure 1 : Mutations passagères et conductrices dans une cellule tumorale
Accumulation et contribution des mutations passagères et conductrices dans la progression tumorale. Image adaptée de Stratton, Campbell et Futreal, 2009 [1].

Les mutations passagères sont des mutations qui n'apportent pas d'avantage significatif à la cellule, elles sont simplement transmises de division en division. Ces mutations sont souvent aléatoires et se retrouvent rarement dans plus d'une tumeur [1]. Au contraire, les mutations conductrices confèrent un avantage sélectif à la cellule et contribuent au développement tumoral [1, 9, 13]. Dans ce cas, on retrouve fréquemment la même mutation ou une mutation du même domaine dans plusieurs tumeurs [1]. Les mutations conductrices sont souvent subdivisées en deux catégories, soit les mutations activatrices dominantes dans des oncogènes et les mutations inactivatrices récessives dans des gènes suppresseurs de tumeur [15]. Les oncogènes sont généralement des gènes dont l'expression est soumise à un contrôle strict permettant la régulation précise des différents processus de prolifération, de division cellulaire ou de survie [9, 16]. Lorsqu'un oncogène est muté, il échappe au contrôle cellulaire et transmet un signal de prolifération en continu. Les oncogènes n'ont besoin que d'une seule mutation activatrice pour contribuer à la progression tumorale [15]. Les gènes suppresseurs de tumeur agissent de façon opposée, en freinant la croissance cellulaire. Leurs mutations doivent donc être inactivatrices et présentes sur les deux copies d'un même gène pour contribuer à la progression tumorale [15].

1.2.2 – Les caractéristiques du cancer

En 2000, Hanahan *et al.* [17] ont décrit six caractéristiques classiques des tumeurs. En 2011, ils ont fait une révision pour ajouter quatre nouvelles caractéristiques [18]. Au total, ces dix caractéristiques sont présentées à la Figure 2. En 2017, Fouad [19] a choisi de les distribuer en sept caractéristiques qui sont plus descriptives et inclusives des connaissances actuelles (Figure 3).

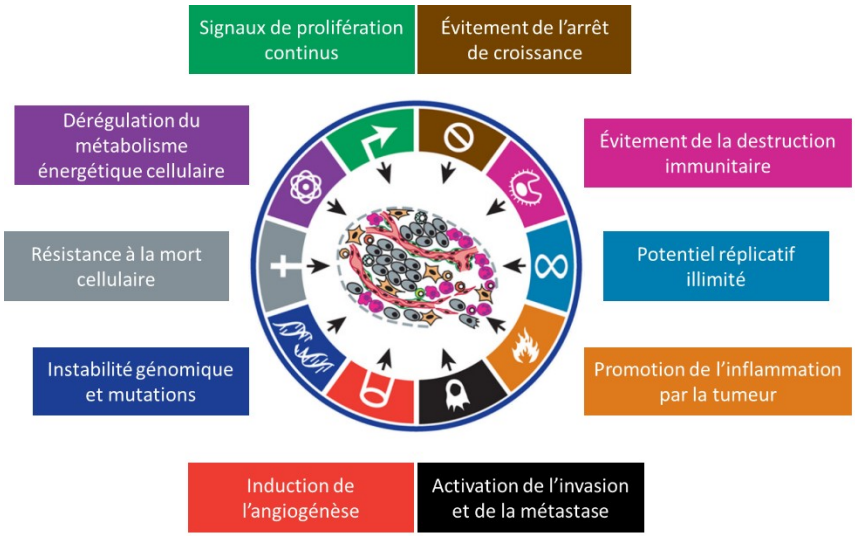

Figure 2 : Les dix caractéristiques du cancer selon Hanahan
Image adaptée de Hanahan et Weinberg, 2011 [18]

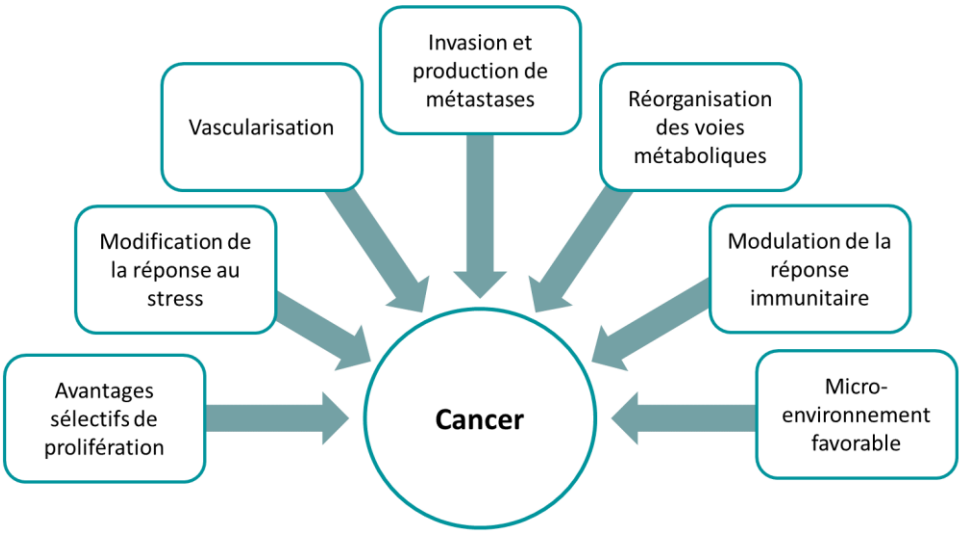

Figure 3 : Les caractéristiques actualisées du cancer selon Fouad
Image adaptée de Fouad et Aanei, 2017 [19]

L'une des premières caractéristiques étudiées dans le cancer est l'augmentation de la capacité de croissance cellulaire. Celle-ci peut être causée par des mutations qui augmentent les signaux prolifératifs, qui inactivent les régulateurs de la prolifération ou du cycle cellulaire ou qui donnent à la cellule un potentiel de réplication illimité [19, 20]. Ces mutations permettent aux cellules tumorales de croître plus vite que les cellules normales et d'engendrer la formation d'une sous population tumorale dans l'organe atteint [13].

Cette croissance incontrôlée engendre une demande accrue en énergie et en nutriments. Pour continuer sa progression, la tumeur doit acquérir un nouveau circuit de vascularisation [21]. Le développement de ce nouveau réseau implique principalement les voies d'angiogenèse, mais d'autres processus de vascularisation sont aussi impliqués, comme la subdivision des vaisseaux déjà existants [22].

Pendant le processus tumoral, les cellules sont soumises à diverses sources de stress comme la réponse immunitaire, la thérapie, les changements métaboliques ou encore la présence de toxines et de déchets dans l'environnement. La réponse cellulaire à ces stress joue un rôle primordial dans la progression tumorale. Plusieurs voies métaboliques sont impliquées dans la réponse au stress et leurs dérégulations positives ou négatives peuvent conférer un avantage sélectif [18]. Les principales voies affectées sont la réparation de l'ADN, l'apoptose, l'autophagie et la sénescence [19].

La réponse immunitaire joue également un rôle important dans l'oncogenèse. Il est bien connu que l'inflammation chronique peut initier la transformation des cellules [23]. Toutefois, le système immunitaire possède un système de surveillance qui permet l'élimination des cellules tumorales émergentes [24]. Pour que la tumeur persiste, les cellules qui réussissent le mieux à éviter cette surveillance sont sélectionnées [25].

Lorsque la tumeur atteint un stade plus avancé, les cellules acquièrent la capacité d'envahir d'autres organes et de migrer ailleurs dans le corps. Ceci correspond à la capacité d'invasion et de former des métastases. À ce stade, les options de traitement classique deviennent limitées et les probabilités de survie du patient sont plus faibles [26]. Les cellules atteignent ce stade par la dérégulation de plusieurs voies métaboliques notamment la transformation des cellules épithéliales par transition épithéliale mésenchymateuse, la présence de cellules tumorales dans la circulation ou la colonisation de nouveaux environnements [19].

Comme mentionné plus haut, les cellules tumorales ont une consommation de nutriments et une production de déchets accrus. Pour subvenir à ces nouveaux besoins ou produire des métabolites en quantité suffisante, les cellules réorganisent leurs voies métaboliques [19]. On observe des changements principalement dans les voies de consommation du glucose et des acides aminés, mais aussi dans les voies alternatives de production de métabolites ou d'énergie [27].

Finalement, la dernière caractéristique du cancer est son micro-environnement. De récentes études ont démontré que l'environnement propre à des cellules tumorales était impliqué dans la progression de la maladie et dans sa réponse aux traitements [28]. Il est évident que la progression tumorale engendre des changements dans les cellules avoisinantes et que ces changements contribuent eux aussi à la progression. De plus, on suspecte que les différentes populations clonales d'une tumeur contribuent elles aussi à moduler le micro-environnement de la tumeur [29].

1.2.3 – Cancer et modifications épigénétiques

Le terme épigénétique décrit des changements de phénotype qui ne sont pas associés avec des changements irréversibles dans les gènes [30]. D'un point de vue moléculaire, l'épigénétique englobe l'ensemble des modifications réversibles qui affectent la chromatine et l'expression des gènes sans affecter la séquence de l'ADN [31]. On constate alors que l'état de la chromatine peut prédire le statut d'expression d'un gène soit actif sous la forme d'euchromatine ou réprimé sous la forme d'hétérochromatine [31]. Chacune de ces modifications est établie et interprétée grâce à trois groupes d'enzymes : les « auteurs » (*writers*) qui apposent les marques épigénétiques ; les « effaceurs » (*erasers*) qui les enlèvent ; et les « lecteurs » (*readers*) qui les reconnaissent (Figure 4) [32, 33].

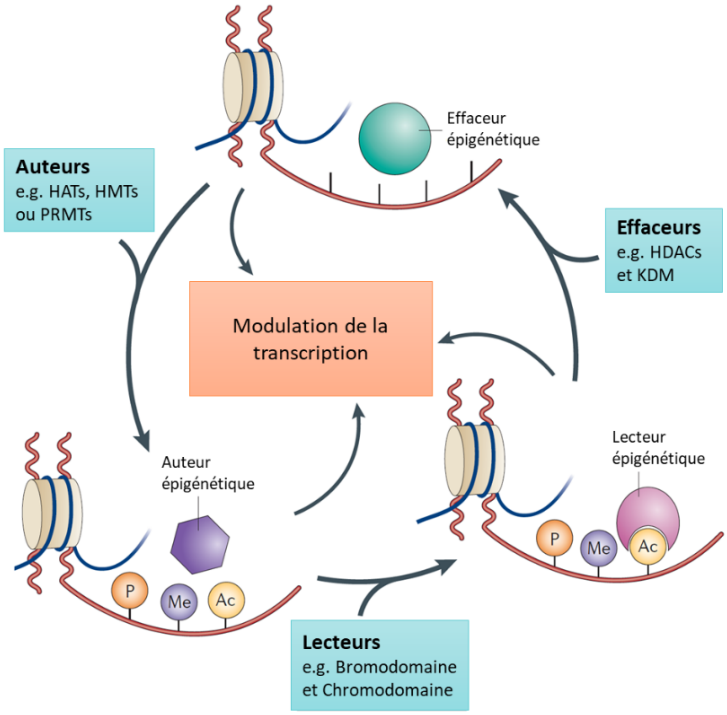

Figure 4 : Principes d'auteurs, lecteurs et effaceurs épigénétiques chez les histones
Image adaptée de Falkenberg et Johnstone, 2014 [32].

Le rôle principal des marques épigénétiques est de réguler l'expression des gènes, mais elles servent aussi de sécurité pour empêcher la reprogrammation spontanée des cellules [31]. Trois mécanismes contribuent à l'établissement de marques épigénétiques, la méthylation des cytosines de l'ADN, les modifications post-traductionnelles des queues des histones et les changements de conformation de la chromatine [33]. En 1980, des études démontrent le lien entre la méthylation de l'ADN et la répression des gènes [34]. Les ADN méthyltransférases (DNMTs) méthylent les cytosines de l'ADN, causant ainsi la répression de la transcription. Cette marque épigénétique est au cœur de la fonction de *DNMT3A* et sera abordée en détail dans les sections suivantes. Les queues des histones sont sujettes à plusieurs modifications comme la phosphorylation, l'acétylation et la méthylation. Selon le type de modification, le type d'histone modifiée et le résidu ciblé, les modifications sur les queues des histones peuvent promouvoir ou inhiber la transcription. L'acétylation des histones sur les lysines est généralement une marque d'activation de la transcription [33]. Elle est apposée par les histones acétylases (HAT) et est retirée par les histones déacétylases (HDAC). Selon le résidu, la méthylation des histones peut marquer à la fois la chromatine active et inactive [33]. Elle est apposée par les histones méthylases (HMT) et est retirée par les histones déméthylases (HDM). Finalement, la conformation de la chromatine est régulée par divers complexes protéiques. Ces remodeleurs de la chromatine, divisés en quatre familles (Figure 5), sont dépendants de l'ATP [35]. Chacun des complexes comporte plusieurs sous-unités et interagit avec

les queues des histones pour réguler la structure et le repliement de la chromatine contribuant ainsi à la régulation des gènes [32].

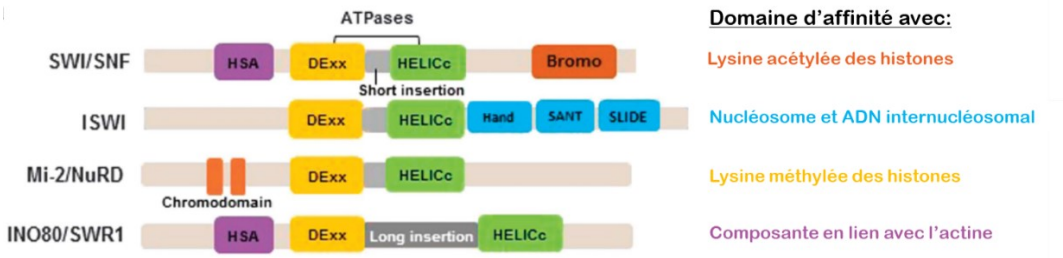

Figure 5 : Remodeleurs de la chromatine
Image adaptée de Kumar et al. 2016 [35].

Puisque DNMT3A est une méthylase de l'ADN, notre étude s'intéresse à l'implication de la méthylation de l'ADN dans le processus d'oncogenèse. Les marques de méthylations sont acquises lors du développement fœtal et certaines sont dépendantes de l'origine allélique des gènes. Ces derniers sont soumis à une empreinte parentale, c'est-à-dire qu'un seul allèle est méthylé selon sa provenance parentale [36]. La méthylation de l'ADN marque une répression de la transcription au niveau du promoteur puisqu'elle engendre le recrutement d'un complexe qui vient compacter la chromatine ce qui bloque la transcription [9]. Dans la cellule cancéreuse, on observe une hypométhylation globale accompagnée d'une hyperméthylation focale principalement au niveau des suppresseurs de tumeurs [31]. Toutefois, la relation entre l'expression de gènes et leur méthylation est plus complexe que premièrement envisagé. L'analyse des transcriptomes et des méthylomes de diverses tumeurs permet d'observer deux types de promoteurs hyperméthylés. Le premier type n'est pas corrélé avec une diminution significative de l'expression des gènes associés, car ceux-ci sont déjà peu exprimés dans le tissu sain. Le deuxième type de promoteurs affecte l'expression des gènes de façon spécifique à un tissu ou à un type cellulaire [37].

On rapporte aussi l'implication des autres modificateurs épigénétiques, ce qui incite l'intérêt des chercheurs puisqu'il s'agit de modifications réversibles [31]. De nouveaux agents thérapeutiques pourraient inhiber des modificateurs épigénétiques spécifiques avec des effets ciblés. Il a été démontré que l'utilisation d'inhibiteur de méthylation de l'ADN comme la décitabine entraîne un effet à long terme sur les cellules alors que l'utilisation d'inhibiteur des HDAC (modificateurs d'histone) a un effet plus transitoire [38].

1.3 – Tumeur de Wilms

La tumeur de Wilms est une tumeur du rein qui se développe généralement entre 3 et 4 ans. Après l'âge de 5 ans, l'apparition de cette tumeur est rare, cependant quelques cas ont été répertoriés chez des patients adolescents et adultes [7, 39]. La tumeur de Wilms affecte 1 enfant sur 10 000 chaque année [7]. Cette tumeur est légèrement plus fréquente chez les jeunes filles et chez les enfants afro-américains [7]. Les enfants se présentent chez le médecin dû à l'apparition d'une masse dans l'abdomen qui dans la majorité des cas n'est pas accompagné d'autres symptômes [40]. Le diagnostic se fait à l'aide de technique d'imagerie comme l'échographie suivi d'une tomodensitométrie (CT scan) ou d'une imagerie par résonance magnétique (IRM) [7]. Le taux de réponse au traitement est en moyenne de 80 %, mais ce nombre varie selon le stade de la tumeur au diagnostic [7]. La tumeur de Wilms a le potentiel de devenir métastatique, dans ce cas, la survie moyenne tombe à 70 % [39]. Seulement 5-10 % des patients atteints ont des mutations germinales ou des syndromes génétiques qui les prédisposent au développement de la tumeur de Wilms [39]. Dans sa forme sporadique, la tumeur ne touche généralement qu'un seul rein, alors qu'on observe 5-10 % d'atteintes bilatérales dans la forme héréditaire [39]. L'observation des cellules tumorales permet de constater qu'elles ont une apparence semblable aux cellules rénales du stade embryonnaire [39].

1.3.1 – Le rein et sa fonction

Pour mieux comprendre le développement de la tumeur de Wilms, il faut d'abord comprendre le développement normal du rein. Les reins sont deux organes en forme de haricot situés à l'arrière de la cage thoracique. Leur principale fonction consiste à filtrer le sang pour en éliminer les déchets et le surplus d'eau. Ils jouent aussi un rôle dans la régulation de la tension artérielle, la production de globule rouge et la régulation du phosphate et du calcium grâce aux glandes surrénales [41].

Le développement du rein débute à la troisième semaine de gestation et va se poursuivre pendant toute la vie fœtale [42]. Le rein se forme en trois structures successives : le pronéphros, le mésonéphros et le métanéphros. Le pronéphros se forme à partir de la segmentation cervicale du mésoblaste intermédiaire [41]. Le mésonéphros se forme à partir de la partie dorsale et lombaire. Le mésonéphros devient le corps de Wolff, celui-ci rejoint le pronéphros qui régresse alors pour donner lieu au canal de Wolff (Figure 6). Le métanéphros se développe à partir du tissu mésenchymateux nommé blastème métanéphrogène et deviendra les néphrons du rein mature [42, 43].

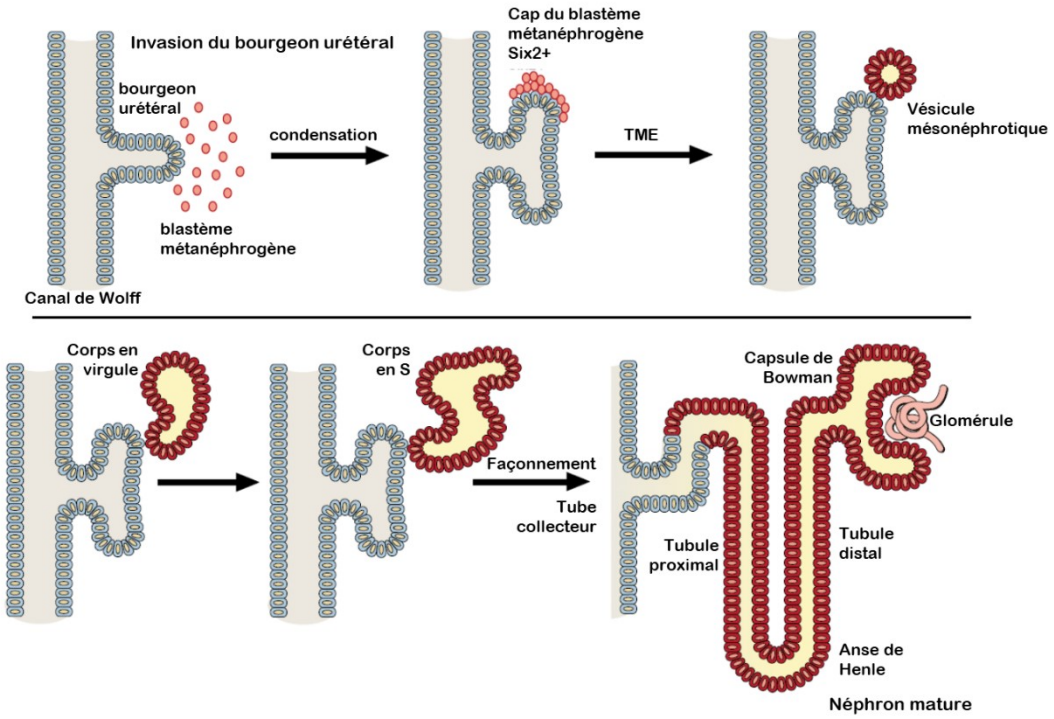

Figure 6 : Développement embryonnaire du rein
Image adaptée de Hohenstein, Pritchard-Jones et Charlton, 2015 [44].

Le blastème mésenchymateux se condense à la suite de la signalisation du bourgeon urétéral (Figure 6). Ensuite, les cellules font une transition mésenchyme-épithélium (TME) pour devenir la vésicule rénale qui sera façonnée jusqu'à son état final de néphron. Les premiers néphrons fonctionnels apparaissent à partir de la cinquième semaine de gestation. La maturation du mésonéphros se termine vers la huitième semaine de gestation et le mésonéphros va régresser jusqu'à disparaître chez les femmes ou former les voies génitales chez les hommes [42]. Le rein mature comprend 3 parties principales : la médulla, le cortex et le bassinet tel que présenté à la Figure 7 [45].

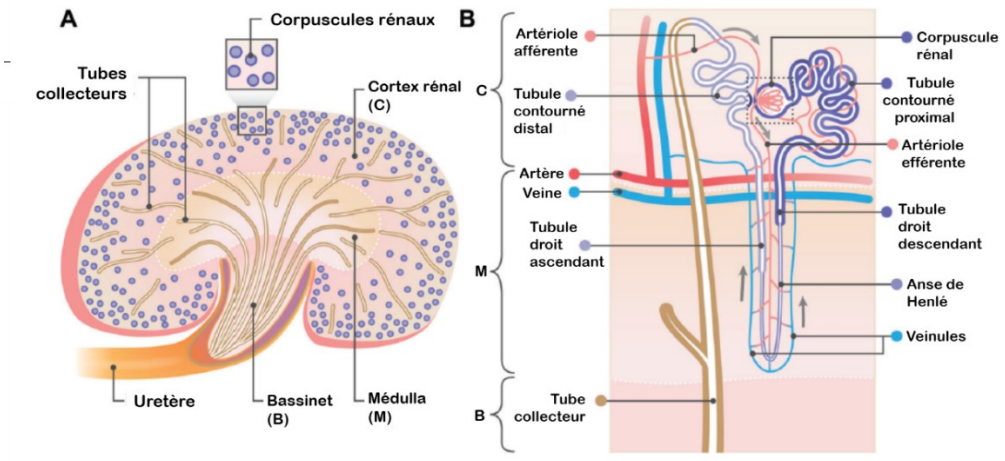

Figure 7 : Structure du rein mature
A) *Les parties du rein.* ***B)*** *détails des parties du néphron. Image adaptée de McMahon, 2016 [41]*

Dans le rein, le sang est filtré par le glomérule, situé dans le cortex rénal, puis l'urine se forme dans la médulla avant d'être sécrétée dans le bassinet. Le sang arrive dans le glomérule par l'artériole afférente. Le filtrat passe par les tubules du néphron, mais le reste du sang repart par l'artériole efférente. Dans les tubules, certains éléments du filtrat sont réabsorbés dans les veinules et l'urine formée est sécrétée dans le tube collecteur vers le bassinet.

1.3.2 – Développement de la tumeur de Wilms

Le développement des tumeurs de Wilms est intimement lié avec le développement normal du rein. Ces tumeurs sont la conséquence directe d'une anomalie lors du développement du rein, où les structures deviennent désorganisées [44]. Lors du développement normal du rein, il arrive que certaines zones du rein ne terminent pas la maturation et conservent une proportion de blastèmes métanéphrogènes. Ces zones sont appelées des zones néphrologiques (*nephrologic rest*). On retrouve ces zones dans environ 1 % des reins normaux, mais elles sont présentes dans 40 % des tumeurs de Wilms [7]. L'hypothèse actuelle est que ces zones sont les lésions précurseurs des tumeurs de Wilms. Ces lésions sont classées en deux catégories selon leur lieu d'origine, soit la niche intralobaire (ILNR), à l'intérieur du lobe rénal et la niche périlobaire (PLNR), au pourtour du lobe rénal tel que présenté à la Figure 8[39]. La localisation de ces zones corrèle avec le type de mutation ou d'altération que l'on retrouve dans la tumeur. Chez les Caucasiens, les ILNR sont moins courantes et sont souvent associées avec des mutations ou des délétions au niveau de *WT1* alors que les PLNR sont plus courantes et démontrent souvent des pertes alléliques au niveau du locus *WT2* [39]. Toutefois, chez les populations asiatiques, on observe généralement l'inverse et les ILNR qui sont plus courantes [7].

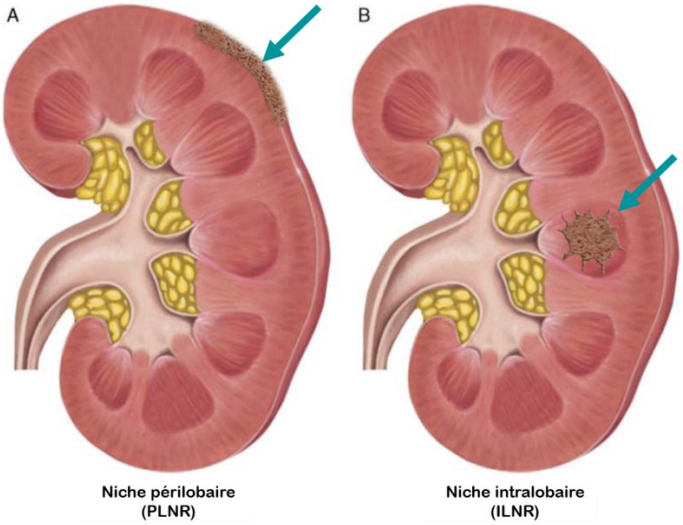

Figure 8 : Niche néphrologique
Image adaptée de Al-Hussain, Ali et Akthar, 2014 [39].

Dans les tumeurs de Wilms, on observe trois types cellulaires ; stromal, épithélial et blastémal [39, 46]. Ces types cellulaires sont aussi retrouvés dans le développement normal du rein. Ainsi le canal de Wolff est constitué de cellules épithéliales, le blastème métanéphrogène de cellules du mésenchyme et les tubules sont constitués de cellules stromales [44, 47]. La tumeur peut être constituée d'un seul type cellulaire ou d'une combinaison de types cellulaires. Le type cellulaire retrouvé dans la tumeur corrèle avec les altérations génomiques et le type de niche du patient [39]. Les niches PLNR avec l'altération du locus *WT2* ont un type cellulaire épithélial ou blastémal alors que les niches ILNR avec mutation de *WT1* sont plutôt de type stromal ou mixte [39].

Dans environ 10 % de tumeurs de Wilms, il existe aussi une autre particularité histologique des cellules qui est nommée la capacité anaplasique et dont les caractéristiques sont un élargissement du noyau cellulaire et de la chromatine ainsi que la présence de mitoses multipolaires [48]. L'anaplasie est déterminée lors de l'analyse histologique des cellules (voir Figure 9) [7]. La présence de cette caractéristique est un signe de mauvais pronostic puisqu'elle confère une résistance à la chimiothérapie [39]. Les mutations de TP53 sont associées au phénomène d'anaplasie et sont présentes dans 75 % des cas [39, 48].

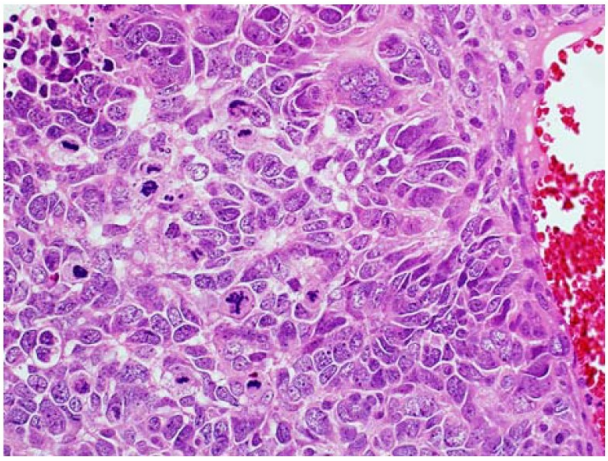

Figure 9 : Cellules anaplasiques
Cellules avec un élargissement du noyau et présentant de multiples pôles de mitose. Image adaptée de Al-Hussain, Ali et Akthar, 2014 [39].

1.3.3 – Aspect génétique

Les études génétiques des tumeurs de Wilms se penchent surtout sur les mutations au niveau des gènes *WT1*, *WT2*, mais aussi *WTX* (ou *AMER1*), *CTNNB1* et *TP53*. Ces gènes ont été étudiés à l'aide d'essai comparatif sur puce (CGH) et du séquençage du transcriptome, du méthylome (ensemble des méthylations sur l'ADN) et du génome entier (WGS) [49-51]. Récemment, de nouveaux gènes ont été ajoutés à cette liste soit *DGCR8*, *DROSHA*, *MLLT1*, *SIX1*, et *SIX2* [52]. Dans les tumeurs de Wilms, l'impact des différentes mutations conduit à un arrêt partiel de la différentiation ce qui permet une certaine maturation des cellules de la tumeur [52]. Toutefois, bien qu'il s'agisse des gènes les plus fréquemment mutés, environ 65 % des tumeurs de Wilms ne présentent aucune mutation de ces gènes [53].

1.3.3.1 – Altérations du nombre de copies (CNA)

Dans les tumeurs de Wilms, la perte d'hétérozygotie aux chromosomes 1p, 11q, 16q et 22q ainsi que la délétion des chromosomes 12q et 18q sont indicatrices d'un mauvais pronostic [49]. Le gain du chromosome 1q complet ou en partie est retrouvé dans plus de 50 % des tumeurs de Wilms et dans 63 % des rechutes [49, 50]. La région la plus fréquemment amplifiée est située sur le chromosome 1 (entre 1q21.1 à 1q23.2) et comprend des gènes souvent surexprimés dans les tumeurs de Wilms comme *CHD1L*, *CRABP2*, *GJA8*, *MEX3A* et *MLLT11* [49].

1.3.3.2 – Gène *WT1*

Le gène *WT1* situé sur le bras court du chromosome 11 encode un facteur de transcription essentiel au développement embryonnaire du rein [42, 54]. WT1 se lie à l'ADN au niveau des promoteurs d'une centaine de gènes [55], notamment *WNT4*, impliqué dans la transition mésenchyme épithéliale (TME), et *DNMT3A* [44]. *WT1* joue un rôle essentiel dans la formation des néphrons [41] et est aussi impliqué dans la MET et dans la différenciation des tissus rénaux [39, 41]. Bien qu'il soit l'un des gènes suppresseurs de tumeurs à l'origine de la théorie du double « hit » de Knudson [15], les mutations de *WT1* ne sont présentes que dans environ 12 % des tumeurs de Wilms [44]. Elles sont surtout retrouvées dans les tumeurs dont le tissu est majoritairement stromal [56]. Le gène *WT1* est aussi muté dans 8 % des leucémies lymphoblastiques aiguës (LLA) [54]. Les mutations retrouvées dans *WT1* affectent surtout sa capacité à se lier avec l'ADN et causent ainsi une perte de fonction [39]. Les protéines natives de WT1 se localisent au noyau alors que les protéines mutées sont localisées dans le cytoplasme [56].

WT1 régule la transcription de DNMT3A. Ainsi lorsque l'expression de *WT1* est atténuée, l'expression de *DNMT3A* est drastiquement réduite, l'effet inverse est aussi observé [57]. La fixation de WT1 au niveau du promoteur de DNMT3A est démontrée par immunoprécipitation de chromatine [57]. De plus, on constate que l'activité méthyltransférase de DNMT3A est réduite lorsque l'expression de *WT1* est faible, ce qui correspond avec l'hypométhylation observée au niveau des tumeurs [57]. WT1 affecte également d'autres gènes liés aux changements épigénétiques comme certaines protéines du complexe Polycomb (*SUZ12* et *EZH2*) et *DNMT1* [58]. Dans les tumeurs de Wilms, il est possible que le paysage épigénétique soit altéré à la suite d'un défaut de la fonction de WT1 [44].

1.3.3.3 – Gène *CTNNB1*

CTNNB1, muté dans environ 15 % des tumeurs de Wilms, est positionné sur le bras court du chromosome 3 et code pour la β caténine [44]. Sa protéine joue un rôle important au niveau de l'adhésion cellulaire, de la transcription et de la voie de signalisation des WNT. Cette voie est très active dans les tumeurs de Wilms. Il est suggéré que les mutations au niveau de *CTNNB1* soient nécessaires pour la progression des tumeurs de Wilms [39]. L'activation de la voie de signalisation WNT est essentielle pour permettre l'épithélialisation du tissu rénal à la suite de la MET [44].

1.3.3.4 – Gène *WTX*

WTX, aussi connu sous le nom de *AMER1*, est un gène muté dans environ 18 % des tumeurs de Wilms. Il se situe sur le chromosome X et sa protéine régule négativement la voie de signalisation des Wnt [44]. *WTX* agit comme un suppresseur de tumeurs et les altérations tumorales sont des mutations inactivatrices ou des délétions du gène.

1.3.3.5 – Gène *TP53*

TP53 est un gène classique du cancer. Il se retrouve muté dans environ 5 % des tumeurs de Wilms et joue un rôle important dans plusieurs étapes essentielles à l'oncogenèse. Par exemple, *TP53* influence la réparation de l'ADN, la prolifération cellulaire, la différenciation et l'apoptose. Comme mentionné plus tôt, les mutations dans le gène *TP53* sont associées avec l'anaplasie ce qui indique un pronostique défavorable [44]. *TP53* aurait aussi un rôle à jouer dans la progression tumorale et les rechutes [39].

1.3.3.6 – Autres gènes

Parmi les autres gènes qui contribuent au paysage des tumeurs de Wilms, on compte notamment l'oncogène *MYCN*. Celui-ci est surexprimé ou amplifié dans environ 9 % des tumeurs de Wilms [59]. On retrouve aussi des mutations récurrentes qui confèrent un gain de fonction à la protéine [44]. Dans environ 4 % des tumeurs de Wilms, on remarque aussi des mutations ou une délétion du gène *FBXW7* qui joue un rôle dans la dégradation de MYCN [44].

Récemment, on a découvert plusieurs altérations de gènes impliqués dans la transformation des microARNs comme *DICER1*, *DROSHA*, *XPO5*, *DGCR8* et *TARBP2* [44, 60] ou impliqués dans la réorganisation de la chromatine comme *SMARCA4* et *ARID1A*. Enfin, des études ont aussi démontré la présence d'une mutation récurrente dans *SIX1* et *SIX2* qui sont des gènes impliqués dans le développement rénal (Figure 6) [60].

1.3.4 – Aspect épigénétique

Bien que plusieurs gènes soient fréquemment mutés dans les tumeurs de Wilms, le génome de ces tumeurs est assez stable, 65 % des tumeurs ne présentent aucune mutation dans ces gènes [44, 49, 53]. Par contre, les défauts d'empreinte parentale au locus WT2 sont présents dans les deux tiers des tumeurs de Wilms. L'importance de la méthylation dans le développement et la progression de la tumeur de Wilms est mise en valeur par la présence d'un biomarqueur épigénétique situé sur l'ADN circulant dans le sang de la vaste majorité des patients (environ 98 %) [61]. Ce biomarqueur est constitué d'une région du chromosome 6 différentiellement méthylée entre les tumeurs de Wilms, les lésions précurseurs et les cellules embryonnaires du rein [61]. L'analyse du méthylome des tumeurs de Wilms permet de constater que les gènes de développement rénal sont hypométhylés alors que plusieurs suppresseurs de tumeurs sont hyperméthylés [53]. L'épigénome des tumeurs de Wilms garde les caractéristiques établies lors du développement embryonnaire, correspondant à des cellules non différenciées [44]. Cet état permettrait aux cellules de conserver des avantages comme une prolifération accrue et une meilleure capacité clonale [44].

1.3.4.1 – Locus WT2

Le locus WT2, situé sur le chromosome 11p15.5, contient deux régions soumises à l'empreinte parentale (Figure 8).

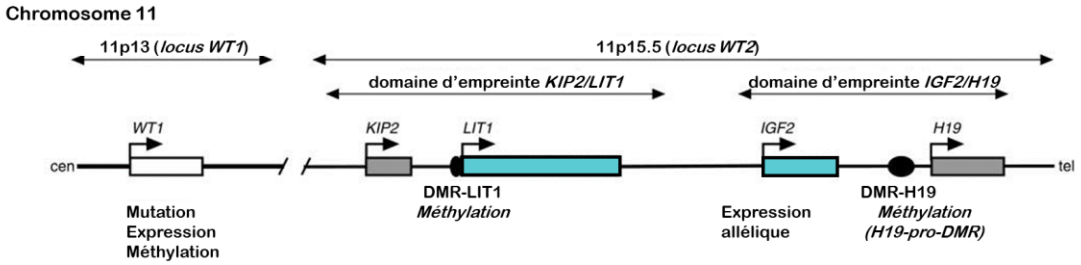

Figure 10 : Altérations du chromosome 11 dans la tumeur de Wilms
Gènes du locus WT2. En gris, les gènes sont exprimés sur l'allèle maternel, en bleu, les gènes sont exprimés sur l'allèle paternel. DMR : Région différentiellement méthylée. Image adaptée de Satoh et al., 2006 [62].

Bien que le locus englobe deux régions, seuls les gènes IGF2 et H19 présents sur ce locus semblent impliqués dans la tumeur de Wilms [62]. Le gène IGF2 code pour un facteur de croissance alors que le gène H19 est reconnu comme un suppresseur de tumeurs [39, 62]. Puisque ces gènes sont soumis à l'empreinte parentale, ils ne sont exprimés que par l'un de deux allèles selon leur origine parentale. L'allèle maternel n'est pas méthylé ce qui permet l'attachement de CTCF et permet l'expression de H19 en bloquant l'expression de IGF2 [63]. Inversement, l'allèle paternel est méthylé ce qui empêche l'attachement du répresseur de transcription CTCF sur l'ADN et permet l'expression de IGF2 [44, 63] (Figure 11).

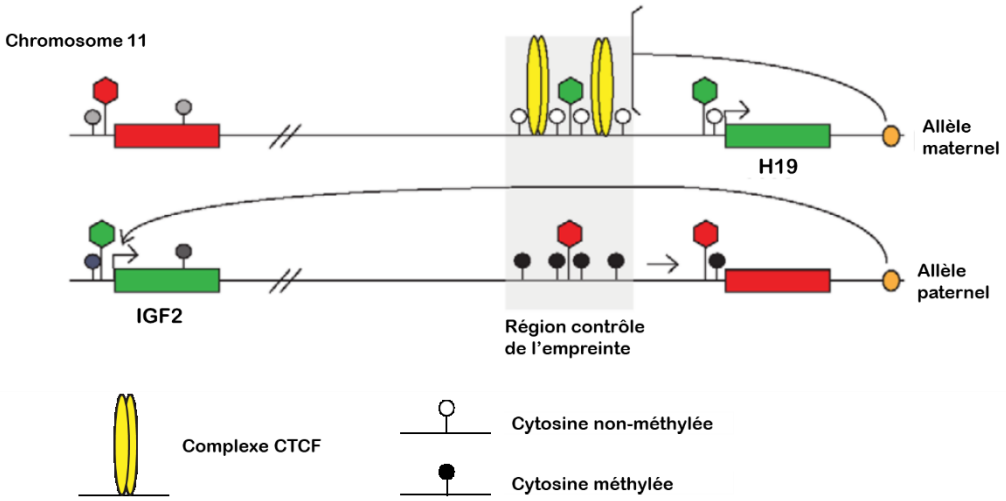

Figure 11 : Région soumise à l'empreinte parentale IGF2/H19
Image adaptée de Lee et al., 2010 [63]

Dans les tumeurs de Wilms, on observe une perte d'empreinte ou d'hétérozygotie qui entraîne la surexpression de IGF2 et la perte d'expression de H19 [39, 44]. Bien que ni l'une ni l'autre de ces deux altérations n'entraînent à elle seule la formation de tumeur, elles causent néanmoins une augmentation de la croissance du rein dans les modèles murins [44].

1.3.5 – Traitement de la tumeur de Wilms

Le traitement des patients atteints d'une tumeur de Wilms suit les lignes conductrices du SIOP (Société International d'oncologie pédiatrique) ou du COG (Children's Oncology Group). Principalement, les deux protocoles recommandent une combinaison de traitement entre l'opération chirurgicale et la chimiothérapie. Dans le protocole du SIOP, on recommande un prétraitement chimiothérapeutique avant la chirurgie alors que le COG recommande généralement une chimiothérapie adjuvante c'est-à-dire après la chirurgie [7]. Malgré ces différences, les deux protocoles ont sensiblement le même taux de survie et de rémissions. Dans les deux groupes, la classification des tumeurs se fait après la chirurgie. Le COG classifie les tumeurs comme favorables s'il y a absence d'anaplasie. Le SIOP classifie les tumeurs en trois groupes de risques ; faible, intermédiaire et élevé. Le groupe de risque élevé comprend les tumeurs avec une anaplasie diffuse ou des cellules majoritairement blastémales [7]. Les agents thérapeutiques utilisés en chimiothérapie dépendent du stade de la tumeur et de son niveau de risque. Principalement, le traitement comprend l'utilisation combinée de vincristine (VNC) et d'actinomycine D (ActD) avec au besoin l'ajout d'agent supplémentaire comme la doxycycline, la carboplatine, les cyclophosphamides, l'etoposide ou l'irinotecan. L'utilisation d'agents thérapeutiques peut aussi être faite en conjonction avec un traitement de radiothérapie [7]. Le traitement utilisé au CHU Sainte-Justine suit les recommandations du COG. Le patient portant la mutation P904L a été traité selon le protocole EE4A, soit une ablation de la tumeur suivie d'un traitement de 19 semaines avec les agents thérapeutiques VNC et ActD [64].

Le retrait du rein atteint étant l'élément principal de la thérapie contre la tumeur de Wilms, la qualité de vie à long terme des patients dépend surtout de l'état fonctionnel du rein restant [65]. Les survivants devront être surveillés pour l'apparition d'effets secondaires à long terme comme un deuxième cancer causé par la thérapie, des problèmes cardiaques dus à la toxicité des agents thérapeutiques, une défaillance rénale ou des troubles musculosquelettiques [7, 39]. Récemment, il a été reporté que lorsque le suivi est fait sur plus de cinq ans, les patients ont tendance à développer des défaillances de filtration au niveau des glomérules [65]. Comme la tumeur de Wilms atteint de jeunes enfants et que le taux de survie s'améliore grandement, il est important de prendre en compte les effets à long terme de la thérapie. Il faut aussi chercher à les diminuer en améliorant les options thérapeutiques pour permettre à ces patients une meilleure qualité de vie à long terme.

1.4 – *DNMT3A*

1.4.1 – ADN méthyltransférases

Les ADN méthyltransférases (*DNMTs*) représentent une famille de gènes dont le rôle est d'apposer un groupement méthyle sur les cytosines de l'ADN. Cette famille inclut les enzymes DNMT3A, DNMT3B et DNMT1 ainsi que la protéine sans activité catalytique nommée DNMT3L [8]. La méthylation de l'ADN permet la régulation de l'expression des gènes, particulièrement les gènes liés au développement [66]. Les marques de méthylation sont principalement apposées lors de l'embryogenèse par DNMT3A et DNMT3B. Elles sont ensuite maintenues lors des divisions cellulaires par DNMT1 [67]. Les deux enzymes DNMT3A et DNMT3AB ciblent préférentiellement de l'ADN non méthylé et apportent des méthylations *de novo* [68]. La DNMT3B a une préférence pour l'hétérochromatine et cible surtout les régions péricentriques des chromosomes [69]. DNMT3A cible également les régions péricentriques, mais a une affinité particulière pour les régions d'empreinte parentale [70]. La DNMT1 a une préférence pour l'ADN hémiméthylé et est responsable de la maintenance des marques de méthylation lors de la division cellulaire. La DNMT3L ne possède pas d'activité catalytique, mais il a été démontré qu'elle a un rôle d'adjuvant et permet d'optimiser l'activité des autres DNMTs [71].

1.4.1.1 – Structures des gènes et protéines

D'un point de vue structurel, le gène *DNMT3A* est situé sur le bras court du chromosome 2 et encode une protéine prédite de 908 acides aminés (Figure 12) [8]. La protéine comporte 3 principaux domaines soit le domaine PWWP, le domaine ADD et le domaine catalytique (Figure 12) [8]. Le gène est divisé en 24 exons et donne lieu à un produit d'épissage alternatif, *DNMT3A2* (689 acides aminés) qui ne comporte pas la partie N-terminale de DNMT3A et débute directement avec le domaine PWWP [72, 73]. La fonction de DNMT3A2 est similaire à celle de DNMT3A, toutefois cette isoforme serait plutôt localisée au niveau de l'euchromatine et aurait un rôle important à jouer au niveau du système cognitif et de la mémoire [72, 74].

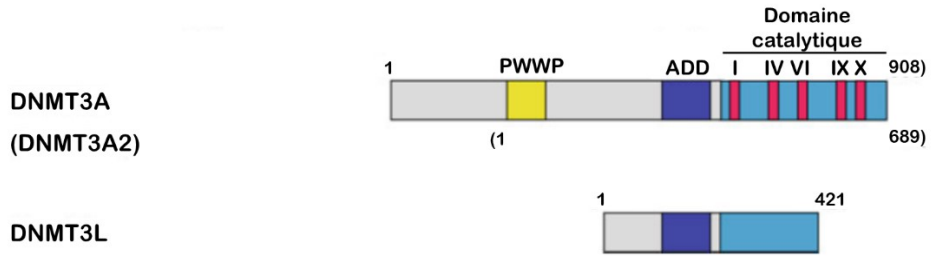

Figure 12 : Domaines protéiques de DNMT3A et DNMT3L
Image adaptée de Tajima et al., 2016 [8]

Le domaine PWWP, nommé ainsi à cause d'un motif caractéristique proline-tyrosine-tyrosine-proline, sert principalement aux interactions entre DNMT3A et diverses protéines. Parmi celles-ci se trouve la tyrosine ADN glycosylase (TDG) qui a un effet inhibiteur sur les DNMT3 [8]. Cette inhibition serait le résultat de l'achèvement de la déméthylation entamée par l'enzyme de translocation « ten-eleven » (TET). La TDG contribue aux étapes finales de déméthylation, soit le retrait des cytosines méthylées et oxydées [8]. Le domaine PWWP contribue également à la liaison avec l'ADN par un motif de feuillet bêta enroulé en baril. Le domaine PWWP permet également une interaction avec les histones 3 triméthylées sur la lysine 36 (H3K36me3) qui marque les zones de chromatine active [8, 33]. Cette interaction est essentielle pour que les DNMT3 ciblent correctement la chromatine.

Le domaine ADD, soit Atrx-DNMT3-DNMT3L, est reconnu pour lier plusieurs protéines telles que C-MYC et plusieurs types d'histones modifiées. La queue de l'histone 3 a une grande affinité pour le domaine ADD. Toutefois, cette affinité est réduite par l'ajout de méthylation au niveau de la lysine 4 (H3K4me3), ce qui permet de protéger les régions actives du génome de la méthylation. La liaison avec les queues des histones 3 entraîne un changement de conformation de DNMT3A qui passe d'une forme auto-inhibée à une forme active, où l'ADN est capable d'accéder au domaine catalytique de la protéine [8].

Le domaine catalytique est celui responsable de l'activité méthyltransférase de la protéine (voir Figure 13). Ce domaine, composé de dix motifs qui sont conservés entre DNMT3A et DNMT3B, permet la liaison avec DNMT3L qui a pour effet d'amplifier l'activité méthyltransférase de DNMT3A [8]. DNMT3A et DNMT3L se polymérisent pour former un tétramère composé d'un dimère de DNMT3A et d'une protéine DNMT3L de chaque côté (Figure 14). Le complexe DNMT3A-DNMT3L permet une grande spécificité pour les régions d'empreintes parentales. Ce complexe méthyle simultanément deux îlots CpG distancés de 8 à 10 nucléotides. Le complexe travaille de façon séquentielle, c'est-à-dire en se liant à un site, apposant la méthylation puis se détachant pour poursuivre ailleurs [75].

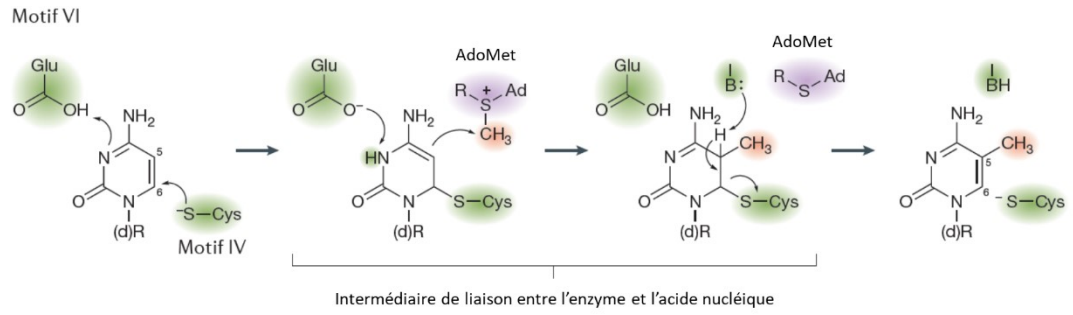

Figure 13 : Réaction de méthylation
Image adaptée de Lyko, 2017 [71]

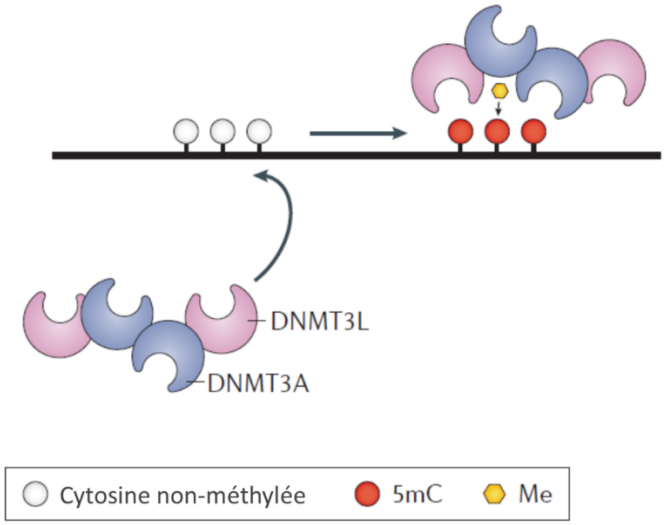

Figure 14 : Tétramère DNMT3A-DNMT3L
Image adaptée de Lyko, 2017 [71]

La partie N-terminale de DNMT3A n'est pas un domaine protéique, mais elle exerce quand même une fonction importante dans l'activité de DNMT3A. En effet, cette région contient des motifs en doigt de zinc qui permettent une forte liaison à l'ADN et sont responsables de la localisation nucléaire de DNMT3A, ce qui n'est pas le cas pour DNMT3A2 [8]. Il a récemment été observé que des modifications post-traductionnelles de cette région aideraient à stabiliser la protéine et ainsi optimiser l'activité méthyltransférase [8].

1.4.1.2 – Réaction de méthylation et fonctions biologiques

La méthylation est une modification réversible de l'ADN qui permet de moduler l'expression des gènes. Elle est impliquée dans l'apposition et le maintien de l'empreinte parentale, l'inactivation du chromosome X chez les femmes, la répression des éléments transposables et la répression sélective de certains promoteurs [67]. Les DNMTs reconnaissent des dinucléotides CpG (îlots CpG) et ajoutent un groupement méthyle sur le carbone 5 des cytosines (5mC) en utilisant le S-adénosyl-L-méthionine (AdoMet) comme source de groupement méthyle (Figure 13) [76]. Le groupement méthyle de l'AdoMet est particulièrement réactif puisqu'il est lié à un atome de soufre qui diminue la stabilité de la molécule [76] ce qui permet le transfert de ce groupement à un carbanion (Figure 13) [76]. Les régions les plus densément méthylées sont les séquences dérivées des éléments transposables, les promoteurs de gène ainsi que le premier exon de ces gènes [67]. Toutefois, 75 % des îlots CpG au niveau des promoteurs ne sont pas méthylés [67]. Le processus qui protège ces îlots de la méthylation est encore méconnu.

Les protéines qui effectuent la déméthylation des cytosines sont les enzymes TETs. DNMT3A et TET2 sont antagonistes, méthylant et déméthylant l'ADN dans un équilibre précis [71]. Bien que la méthylation de l'ADN soit généralement connue pour avoir un effet répresseur sur l'expression des gènes, DNMT3A peut aussi coopérer avec les TETs [77] et causer une activation de l'expression. Dans ce cas, la méthylation de l'ADN par DNMT3A entraîne le recrutement de la machinerie de déméthylation mené par les TETs entraînant l'activation du gène.

Lors de l'embryogenèse, l'ADN sera méthylé et déméthylé à deux reprises. Cette double méthylation permettra essentiellement de redéfinir l'empreinte parentale, mais aussi de réguler le développement [67]. La première vague de déméthylation a lieu dans les gamètes avant la fécondation et permet d'effacer les méthylations liées à l'empreinte parentale afin de réapposer des marques spécifiques au sexe de l'individu porteur [67]. La deuxième vague affecte principalement les régions non fonctionnelles du génome et son impact est encore mal défini [67]. La méthylation embryonnaire est effectuée par les DNMT3 [78]. Les deux DNMT3 participent à la méthylation des éléments répétés du génome. DNMT3B effectue l'inactivation du chromosome X et la méthylation des centrosomes [79]. DNMT3A cible les régions soumises à l'empreinte parentale et est essentiel pour l'acquisition de nouvelles marques de méthylations [70, 80]. La régulation des gènes par méthylation permet aux cellules de s'engager dans différentes voies de différentiation [81].

1.4.2 – Impact physiologique de DNMT3A

Après la naissance, peu de nouvelles méthylations ont lieu dans les lignées germinales. Toutefois, un défaut de méthylation peut avoir un impact sur la cellule en déréglant la méthylation essentielle à un développement normal [67]. *DNMT3A* joue aussi un rôle important dans la capacité clonale et l'immortalisation des cellules.

DNMT3A est essentielle pour la différenciation des cellules [81] et est reconnue pour être impliquée dans les cancers hématopoïétiques. La perte de *DNMT3A* cause l'immortalisation des cellules souches hématopoïétiques [82]. La perte de fonction de DNMT3A dans les cellules souches hématopoïétiques entraîne la formation de tumeur et affecte la différenciation et la prolifération des cellules [82]. Dans ce type de cancer, certaines mutations de *DNMT3A* ont été associées avec un blocage de la différentiation et une accélération de la croissance [83]. Dans des cellules avec la mutation *DNMT3A* R882C ou R882H (mutations R882*), il a été démontré que ce blocage est en partie causé par le recrutement anormal de PRC1 puis du complexe Polycomb sur certains promoteurs de gènes de différentiation [84].

Les protéines qui interagissent avec le domaine PWWP de DNMT3A sont surtout impliquées au niveau de la division cellulaire, de la croissance ou de la différentiation [85]. Le domaine PWWP sert à la liaison à l'ADN et détermine la spécificité de DNMT3A pour certaines régions de la chromatine [8]. La perte de fonction de DNMT3A mène à une perte de stabilité du génome et affecte les mécanismes de réponse aux dommages à l'ADN [86].

1.4.3 – *DNMT3A* : variants somatiques et cancer

Comme mentionné ci-dessus, le cancer se caractérise par une hypométhylation globale avec des points focaux d'hyperméthylation [31]. Comme DNMT3A est une enzyme qui permet la méthylation *de novo* (avec DNMT3B), il est probable qu'elle soit impliquée dans les dérèglements de méthylation qui sont fréquents dans les cellules tumorales. Les atteintes au niveau des complexes protéiques qui recrutent les DNMTs pourraient causer un recrutement et une méthylation aberrante du génome [66]. Certaines des cibles potentielles de l'hyperméthylation sont les gènes portant une empreinte parentale qui sont souvent liés au développement et donc précisément régulés [66]. Pour ce qui est de l'hypométhylation globale de l'ADN tumoral, elle semble causer la réactivation de gènes qui devraient être inhibés dans une cellule normale. On retrouve aussi une déméthylation au niveau des régions centromériques, ce qui aurait pour effet de déstabiliser la structure de l'ADN, le rendant plus propice à des remaniements [66]. On sait que *DNMT3A* est impliqué dans la différenciation et la croissance des cellules [81], dans la stabilité du génome [86] et dans le processus d'immortalisation des cellules [82]. Toutes ces caractéristiques sont très importantes dans le développement tumoral.

En plus d'être impliqués dans des processus importants de la cellule, plusieurs variants de *DNMT3A* ont été identifiés dans différents types de tumeurs. Ces mutations sont plus fréquentes dans les cancers hématologiques comme la leucémie myéloïde aiguë (LMA) (Figure 15) [87] et les syndromes myélodysplasiques (MDS) (Figure 16) [88]. Toutefois, des altérations de *DNMT3A* sont également présentes dans les tumeurs des poumons, du foie et dans les mélanomes [89].

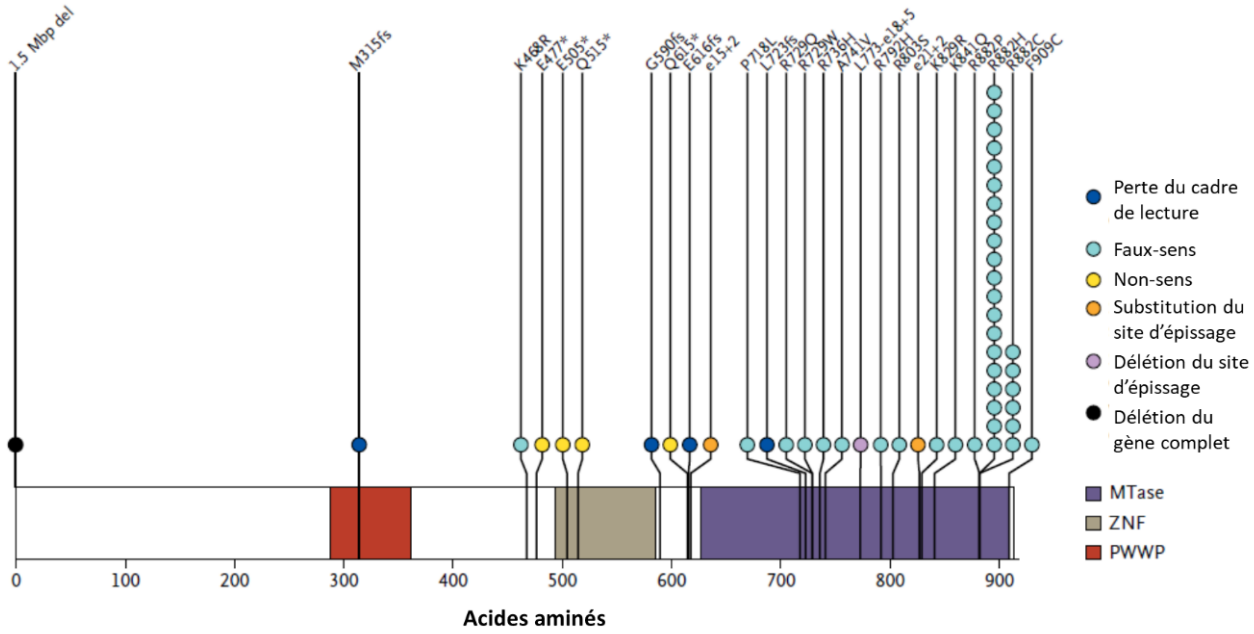

Figure 15 : Mutations du gène DNMT3A dans la LMA
Figure adaptée de Ley et al., 2010 [87]

1.4.3.1 – Variants dans la leucémie myéloïde aiguë (LMA)

La LMA est un cancer hématopoïétique avec de fréquentes mutations de *DNMT3A* (Figure 15). Plusieurs études sur l'impact de ces variants ont été menées. Les mutations dans *DNMT3A* ainsi que dans d'autres gènes impliqués dans la régulation épigénétique, comme TET2 et IDH1/2, sont responsables de l'initiation de la transformation tumorale des cellules souches hématopoïétiques en cellules souches leucémiques [90]. L'insertion conditionnelle de la mutation R882H dans un modèle murin est suffisante pour initier le développement de cette leucémie [91]. On remarque aussi que le développement de la LMA implique la voie des MTOR ce qui ouvre la voie à de nouvelles options thérapeutiques [91]. Les mutations dans *DNMT3A* sont associées avec un mauvais pronostic et un âge d'apparition de la tumeur plus avancé [92].

1.4.3.2 – Variants dans la leucémie lymphoïde aiguë (LLA)

La LLA est un autre cancer hématopoïétique où l'implication de *DNMT3A* a été étudiée. Il a été démontré que la coopération entre un mutant KRAS G12D et la perte d'un allèle de *DNMT3A* suffit à initier le développement de cette leucémie [93]. Toutefois, dans ce type de leucémie, on observe plutôt des mutations sur les deux allèles de *DNMT3A* ce qui supporte un rôle de suppresseur de tumeur pour *DNMT3A* [94].

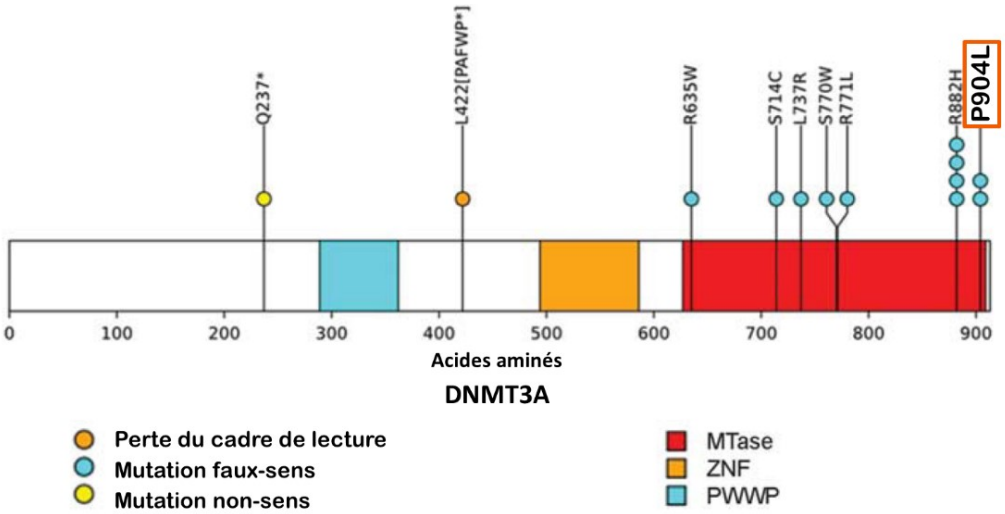

Figure 16 : Mutations du gène DNMT3A dans les MDS
Figure adaptée de Walter et al., 2011 [88]

1.4.3.3 – Variants dans le syndrome myélodysplasique (MDS)

DNMT3A est également impliqué dans des syndromes myéloïdes comme le syndrome myélodysplasique [88] (Figure 16). Toutefois, l'implication exacte et la valeur clinique des mutations de *DNMT3A* dans ce syndrome sont encore mal comprises [94].

1.4.3.4 – Variant R882* dans *DNMT3A*

La récurrence d'une ou de plusieurs mutations dans un même gène suggère que celui-ci a un effet conducteur sur la tumeur [95]. Dans plusieurs types de tumeurs, un point focal de mutation a été observé à la position de l'arginine 882 de DNMT3A (R882C, R882H) [96]. La présence d'un point focal pour les mutations suggère qu'elles ont un effet de gain de fonction plutôt qu'un effet de perte de fonction, caractérisé par une plus grande dispersion des mutations [87]. Toutefois, ces mutations sont réputées pour inhiber l'activité méthyltransférase de DNMT3A et engendrent un taux de méthylation globale de l'ADN significativement moindre que celui des tumeurs avec *DNMT3A* natif ou avec des mutations non-R882[96]. Ce qui permet de conclure que R882 est une mutation dont l'effet est spécifique par rapport aux autres mutations de *DNMT3A* [96]. Malgré cette différence, l'analyse de l'expression génique ne permet pas de regrouper les tumeurs R882 dans un groupe distinctif. Les mutations R882 causent donc une diminution de la méthylation caractéristique, mais ne sont pas liées à un profil d'expression génique caractéristique [96]. Le mutant R882C est particulièrement dommageable dans le contexte d'une hétérozygotie avec le gène natif. En effet, le résidu R882 fait partie d'un motif « RD » constitué d'une arginine et d'un aspartate qui est impliqué dans le site de liaison avec l'ADN ainsi que le cofacteur AdoMet [97]. Lorsque le résidu R882 est muté, l'arginine est perdue et le site de liaison pour la dimérisation est

modifié. L'activité enzymatique du complexe homodimère DNMT3A R882C n'est que légèrement plus basse que celle du complexe homodimère de DNMT3A natif. Toutefois, l'activité du complexe hétérodimère de DNMT3A R882C/DNMT3A natif est nettement plus basse [98]. *In vivo*, la formation d'un hétérodimère de mutant R882/DNMT3A natif rend le complexe inactif et inhibe l'activité méthyltransférase [96].

1.4.4 – *DNMT3A* : variants germinaux et syndrome de Tatton-Browns

Comme il a été mentionné plus tôt, les mutations peuvent être somatiques ou germinales. Les mutations germinales de *DNMT3A* peuvent causer le syndrome de Tatton-Brown. La mutation P904L qui a été étudiée dans ce mémoire a été rapportée comme causatrice chez 2 patients atteints du syndrome de Tatton-Browns [99]. Ce syndrome est caractérisé par des mutations germinales dominantes dans le gène de *DNMT3A* [67]. Les principales caractéristiques associées à ce syndrome sont : un faciès caractéristique, une augmentation de la croissance, ainsi qu'un retard intellectuel [100]. D'un point de vue génétique, les mutations répertoriées sont toutes localisées dans un des domaines protéiques de *DNMT3A* (Figure 17).

Figure 17 : Mutations de DNMT3A dans le syndrome de Tatton-Brown
Figure adaptée de Tatton-Brown, 2014 [100]

Les mutations liées au syndrome de Tatton-Brown auraient un impact sur l'interaction entre les domaines de DNMT3A et l'histone 3. Comme il a été mentionné, l'interaction avec la queue d'histone permet une reconfiguration de la protéine permettant à l'ADN d'entrer au site actif [8]. Une diminution de l'accès à l'ADN pourrait diminuer ou perturber la méthylation [100]. Le phénotype de ce syndrome s'apparente à trois autres syndromes, soit le syndrome de Weaver (gène *EZH2*), le syndrome de Sotos (gène *NSD1*) et le syndrome de Beckwith-Wiedmann (Locus *WT2*, gène *H19/IGF2*). Ceci soulève l'hypothèse que ces syndromes sont dus à un défaut d'empreinte parentale [67]. Un cas clinique du syndrome de Weaver où l'on a observé une duplication de *DNMT3A* laisse penser que le dosage de *DNMT3A* est également un facteur important dans ce type de syndrome [101].

Le mécanisme qui cause l'augmentation de la croissance dans le syndrome de Tatton-Brown est encore méconnu, mais certaines études avancent l'hypothèse qu'une diminution de l'activité de DNMT3A serait favorable à la division cellulaire et défavorable à la différentiation [83]. Cette observation est faite à partir des cellules pré-lésion des LMA, mais ce mécanisme est certainement intéressant à explorer pour mieux comprendre la fonction de DNMT3A ainsi que l'impact des différentes mutations.

1.5 – Agents thérapeutiques

1.5.1 – Vincristine

La vincristine (VNC) est un agent thérapeutique qui est utilisé en combinaison avec d'autres agents thérapeutiques dans le traitement des tumeurs depuis 1962 [102-104]. Dans les modèles cellulaires, la vincristine interagit avec le cytosquelette et prévient la formation des microtubules ce qui empêche la mitose [105]. Plus précisément, la vincristine inhibe la polymérisation des microtubules en se liant à la tubuline (Figure 18) [106].

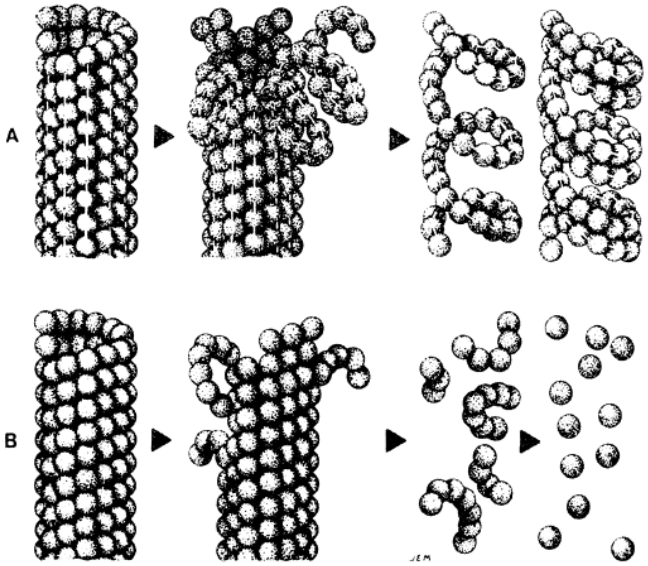

Figure 18 : Modèle du mécanisme d'action de la vincristine
A) *Formation normale des microtubules. Les protéines associées aux microtubules (MAPs) relient les sous-unités entre elles (lignes blanches).* ***B)*** *Interférence de la vincristine dans la formation des microtubules. Les MAPs sont absentes et les sous-unités du microtubule ne sont pas reliées entre elles. Image adaptée de Donoso, Haskins et Himes, 1979 [107].*

L'absence d'un réseau de microtubules fonctionnels bloque la cellule en phase M ce qui induit l'apoptose [106]. Dans les modèles animaux, la vincristine interfère avec la vascularisation de la tumeur et empêche l'apport sanguin ce qui cause la nécrose du tissu tumoral [105]. La vincristine a pour avantage de causer peu de toxicité au niveau de la moelle osseuse, mais elle présente parfois des effets secondaires neurologiques sérieux [108]. Les enfants sont particulièrement à risque de développer des neuropathies périphériques suite à l'administration de vincristine [102].

La vincristine est administrée par voie veineuse [109]. Une fois entrée dans l'organisme, la vincristine pénètre rapidement dans les cellules pour ensuite s'accumuler dans les tissus avant d'être excrétée lentement dans la bile et les selles [105]. Une partie de la vincristine est transformée en métabolite et une partie reste sous sa forme d'origine jusqu'à l'excrétion [105].

1.5.2 – Décitabine

La décitabine (DAC) est un agent thérapeutique connu et utilisé contre le cancer depuis les années 80. La décitabine est aussi nommée 5-aza-2'— deoxycytidine et il s'agit d'un analogue de la cytosine dans lequel le carbone 5 est remplacé par un azote (Figure 19) [110].

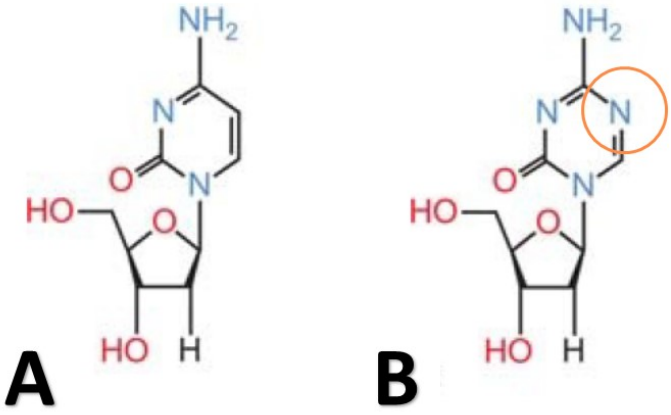

Figure 19 : Structure de la cytosine et de la décitabine
A) *Structure de la cytosine.* ***B)*** *Structure de la décitabine, un analogue de la cytosine dans lequel le carbone 5 est remplacé par un azote (cercle orange). Figure adaptée de Da Costa et al., 2017 [110]*

Cet agent inhibe la méthylation de l'ADN, provoque une diminution de la croissance et induit la différenciation des cellules [111]. Une fois dans l'organisme, la DAC s'incorpore dans l'ADN à la place des cytosines. Lorsque les DNMTs rencontrent cet analogue, elles s'y attachent, mais sont incapables de les méthyler ce qui entraîne une déméthylation globale de l'ADN [112]. Cette insertion affecte surtout la DNMT1 lors de l'apposition des méthylations de maintenance. Toutefois, une étude démontre que les effets de la DAC sont augmentés chez les patients qui sont porteurs de mutations dans le gène de *DNMT3A* [113]. En grande concentration, la DAC est toxique pour les cellules puisqu'elle interfère avec la synthèse des thymines et bloque la division cellulaire [114].

La DAC est surtout utilisée dans la thérapie contre les tumeurs hématopoïétiques [110]. Elle a d'abord été utilisée pour ses effets cytotoxiques avant que l'on ne découvre son potentiel en tant qu'agent déméthylant [115]. Maintenant, la décitabine est utilisée à de beaucoup plus petites doses et les effets bénéfiques sont augmentés [116]. La DAC est aussi utilisée en combinaison avec d'autres agents thérapeutiques et est connue pour potentialiser l'effet de la radiothérapie et d'autres composés [117]. Dans une étude, le traitement à la décitabine a permis d'augmenter le nombre de transcrit de *H19* (un gène souvent réprimé dans les tumeurs de Wilms) [118].

1.6 – But du projet et hypothèse

Au laboratoire, nous avons mis sur pieds un programme expérimental de médecine de précision nommé TRICEPS [119]. Dans le cadre de TRICEPS, nous avons trouvé un patient atteint d'une tumeur de Wilms qui portait une mutation non caractérisée P904L dans le gène *DNMT3A*. Cette mutation se trouvait dans un contexte de perte d'hétérozygotie chez un patient en rechute avec métastases aux poumons. Cette mutation était la seule mutation de cette tumeur dont l'impact était incertain et qui n'avait jamais été caractérisée. Le patient avait aussi deux variations du nombre de copies. Soit une perte au niveau du gène *RAD21* et un gain englobant les gènes *DDR2* et *ABL2*.

Le gène de *DNMT3A* est fréquemment muté dans diverses tumeurs et l'impact de certaines de ces mutations a été démontré. Les impacts de *DNMT3A* comme la diminution de la différentiation et l'augmentation de la prolifération sont des caractéristiques des tumeurs de Wilms et il est connu que les défauts de méthylation jouent un rôle important dans les tumeurs de Wilms. Les deux principaux gènes/locus impliqués dans ces tumeurs sont *WT1* et *WT2*. *WT1* agit comme facteur de transcription pour *DNMT3A* et *WT2* est un locus affecté par l'empreinte parentale.

De plus, la mutation *DNMT3A* P904L est une mutation récurrente qui a été répertoriée dans 16 autres cas de cancer. Cette récurrence de la mutation est indicatrice d'une mutation conductrice [95]. Elle est identifiée comme l'une des mutations causatrices du syndrome de Tatton-Brown lorsqu'elle est d'origine germinale (*germline*). Ce syndrome est lié à un défaut d'empreinte parentale et partage des similarités avec le syndrome de Beckman-Wiedemann qui est reconnu pour augmenter le risque de tumeur de Wilms.

1.6.1 – Hypothèse et but principal

La mutation P904L dans le gène *DNMT3A* est une mutation conductrice (*driver*) qui mène à une perte de fonction dans la tumeur de Wilms.

1.6.1.1 – But principal.

Pour vérifier cette hypothèse, je vais utiliser une combinaison d'essais fonctionnels pour déterminer l'impact de cette mutation dans un modèle cellulaire (lignée cellulaire ACHN)

1.7 – Objectifs spécifiques

Pour atteindre ce but, j'ai proposé les 3 objectifs suivants :

1- Étudier l'impact du mutant *DNMT3A* P904L sur la fonction de méthyltransférase
2- Déterminer l'impact du mutant P904L sur la prolifération cellulaire, la capacité clonale, la migration et l'apoptose.
3- Tester la sensibilité du mutant P904L à la vincristine et la décitabine, deux agents thérapeutiques utilisés pour le traitement du cancer de l'enfant.

1.7.1 – Impacts attendus

Considérant le contexte du patient, nous supposons que le mutant P904L causera une perte de fonction de la protéine DNMT3A [15]. Cette perte de fonction devrait causer une augmentation du renouvellement cellulaire et de la prolifération [82]. Comme les mutations de *DNMT3A* sont associées à de mauvais pronostics [92], je m'attends à ce que les cellules mutées P904L soient moins sensibles à la VNC. La DAC étant connue pour produire de bons résultats chez les patients avec des mutations dans *DNMT3A* [113], je m'attends à ce que le mutant soit plus sensible à cet agent thérapeutique.

Section 2 — Matériels et méthodes

2.1 – Préparation du modèle d'étude

La production des lignées stables est faite à l'aide d'une infection virale avec des plasmides produits par mutagenèse dirigée et recombinaisons. Les plasmides sont transfectés dans des cellules pour produire des virus et procéder à une infection pour générer les différents modèles cellulaires.

2.1.1 – Culture cellulaire

Les lignées cellulaires utilisées pour ce projet sont les lignées HEK293 et ACHN. Les cellules HEK293 proviennent de cellules de rein fœtal. Ces cellules sont utilisées pour la production des virus qui serviront à l'établissement des lignées cellulaires stables. Les cellules ACHN proviennent des métastases pulmonaires d'une tumeur d'un adénocarcinome des cellules rénales (ATCC® CRL1611™). Ces cellules seront utilisées comme modèle d'étude puisqu'elles se rapprochent de la tumeur du patient qui avait une origine rénale et des métastases aux poumons.

Les deux types de cellules adhérentes sont cultivés dans du DMEM (Wisent Inc) supplémenté avec 10 % de sérum bovin fœtal (FBS) (Wisent Inc) et 1X de pénicilline/streptomycine (1µg/ml). Lorsqu'elles atteignent une confluence de 80 %, les cellules sont passées en utilisant une dilution 1:5. Lors des passages, les cellules sont lavées au PBS (Wisent Inc) puis décollées avec de la trypsine (solution 0.05 % trypsine et 0.53mM EDTA, Wisent Inc) et une incubation de 2 min à 37°C. Les cellules sont cultivées à 37°C et 5 % de CO_2. Les lignées cellulaires sont jetées avant le passage 50.

2.1.2 – Production des plasmides

L'infection des cellules ACHN s'est faite à partir de plasmides produits dans des bactéries compétentes Stbl3 (ThermoFischer). Le plasmide DNMT3A de type natif (WT) a été acheté chez Harvard Medical School, PlasmID (HsCD00377499). La Figure 20 présente la réaction de mutagenèse dirigée et de recombinaison ainsi que les différents plasmides qui sont impliqués.

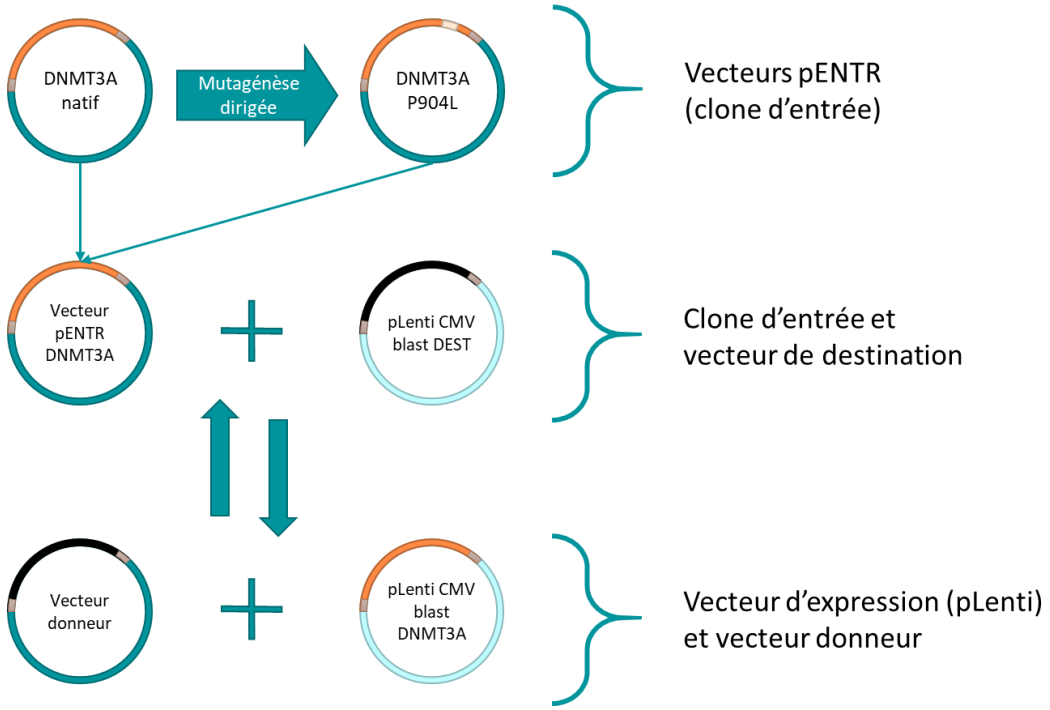

Figure 20 : Production de plasmides pour la transfection et la formation de virus

Les mutagenèses dirigées sont d'abord faites dans les plasmides pENTR puis les gènes d'intérêts sont recombinés dans des plasmides pLenti.

Les amorces utilisées pour faire l'ajout d'un codon STOP puis de la mutation P904L sont présentées au Tableau 1 : Amorces mutagenèse dirigée. Les mutagenèses dirigées ont été effectuées avec la trousse QuickChange XL de Agilent. Les bactéries XLGold (Agilent) ont ensuite été transformées avec les plasmides DNMT3A natif et DNMT3A avec la mutation P904L. Des clones ont été sélectionnés et séquencés avec les amorces présentées au Tableau 2 : Amorces de séquençage Sanger. Une fois les séquences validées, les plasmides donneurs sont recombinés dans des plasmides pLenti CMV blast à l'aide du système « *gateway* » (Figure 20) [120]. Les plasmides pLenti sont ensuite amplifiés par culture bactérienne puis l'ADN est extrait et conservé à -20°C jusqu'à son utilisation.

Tableau 1 : Amorces mutagenèse dirigée

Nom de l'amorce	Séquence
DNMT3A_c2711t_sens (P904L)	CGCCACCTCTTCGCTCTGCTGAAGGAGTATTTT
DNMT3A_c2711t_as (P904L)	AAAATACTCCTTCAGCAGAGCGAAGAGGTGGCG
DNMT3A_stop_sens	GAGTATTTTGCGTGTGTGTAATGCCCAACTTTCTTGTAC
DNMT3A_stop_as	GTACAAGAAAGTTGGGCATTACACACACGCAAAATACTC

Tableau 2 : Amorces de séquençage Sanger

Nom de l'amorce	Séquence
DNMT3A_seq_F1	AGGACCGAAAGGACGGAGAG
DNMT3A_seq_F2	TGCAGAAGCGGGCAAAGAA
DNMT3A_seq_F3	TGTGTCTTGGTGGATGACGG
DNMT3A_seq_F4	GGACATCTGCATCTCCTGTGG
DNMT3A_seq_F5	TCCTGGTGCTGAAGGACTTG
DNMT3A_seq_F6	AGGGTATTTGGTTTCCCAGTCC
DNMT3A_seq_R1	CAGCAGCCATTTTCCACTGC

2.1.3 – Extraction d'ADN

L'extraction d'ADN à partir de bactérie est faite avec la trousse « QIAprep Spin Miniprep » de Qiagen selon les instructions du manufacturier. Brièvement, il s'agit d'une extraction sur colonne où l'ADN est précipité avant d'être capturé sur une colonne, lavé puis relâché. Les échantillons sont ensuite dosés à l'aide d'un spectrophotomètre de type Nanodrop ND-1000.

2.1.3.1 – Carte des plasmides

Au total, cinq plasmides seront utilisés pour la production de virus et l'infection des lignées cellulaires. Nous utiliserons trois plasmides de type pLenti (Addgene) avec un gène de résistance à la blasticidine et deux plasmides de type Sh (Sigma-Aldrich) avec un gène de résistance à la puromycine. Les cartes des différents plasmides sont présentées à la Figure 21.

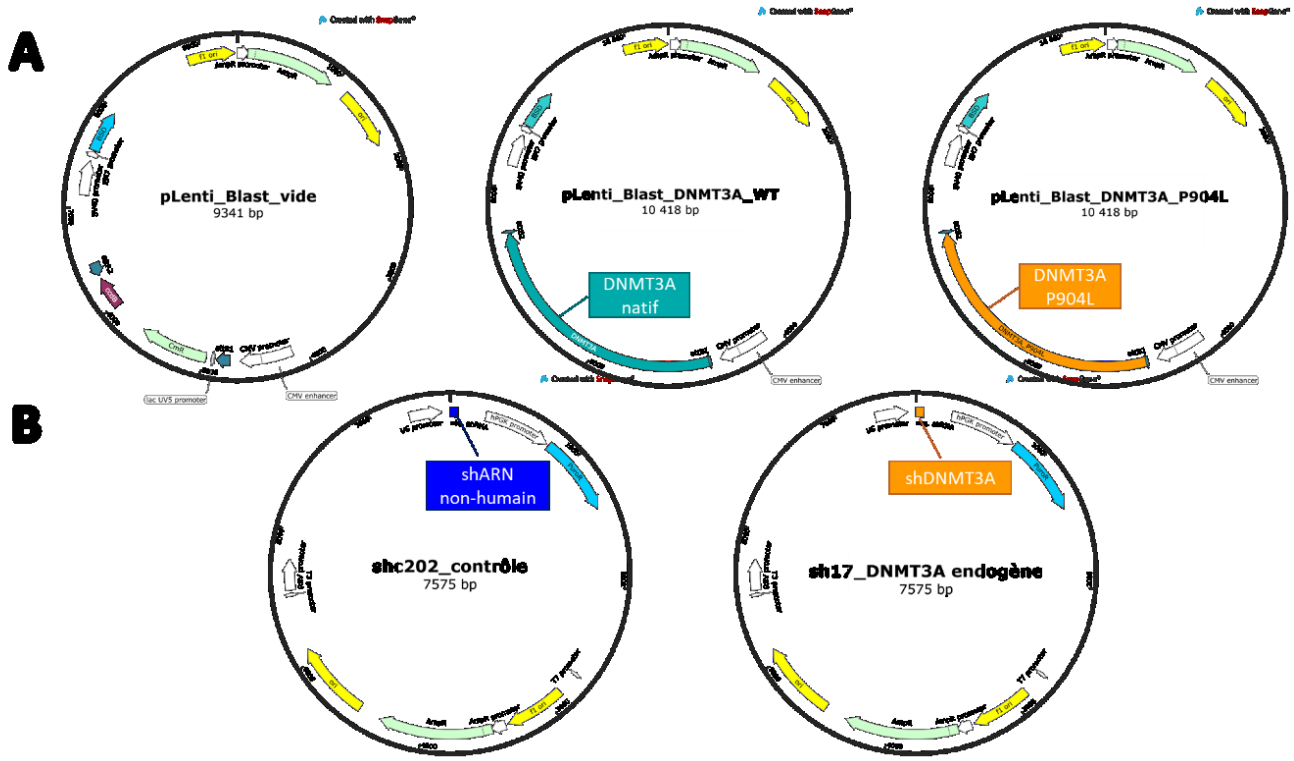

Figure 21 : Cartes des plasmides utilisés pour la transfection

A. Plasmide de type pLenti. *De gauche à droite, Vecteur vide, DNMT3A natif, DNMT3A P904L.* ***B. Plasmide de type Sh.*** *De gauche à droite, Shc202 (contrôle) et sh17 (DNMT3A endogène). Les cartes sont simplifiées pour ne garder que les éléments intéressants.*

2.1.4 – Production de virus

Les virus sont produits par transfection dans des cellules HEK293 en utilisant un système de lentivirus de 3e génération. La transfection se fait avec 4 plasmides, le pRSV-rev (2643ng ; capside virale), le pMD2.G (3436ng ; enveloppe virale), le pMDLg (6609ng ; capside virale) et le plasmide d'intérêt (3965ng ; Vide, DNMT3A natif, DNMT3A P904L, sh17 (dnmt3a endo) ou shc202 (ctrl scramble)). Les plasmides sont incubés 1 heure avec de la Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen™) dans du milieu de culture Opti-MEM™ (Gibco™), puis ajoutés aux cellules HEK293. Les cellules sont incubées à 37C sans antibiotique durant 16 heures puis le milieu de culture est changé pour du RPMI avec 10 % de FBS et un antibiotique. Les virus sont alors relâchés dans le milieu de culture. Les cellules sont incubées durant 24 heures à 37°C puis le surnageant est récolté et conservé à -80°C jusqu'à son utilisation.

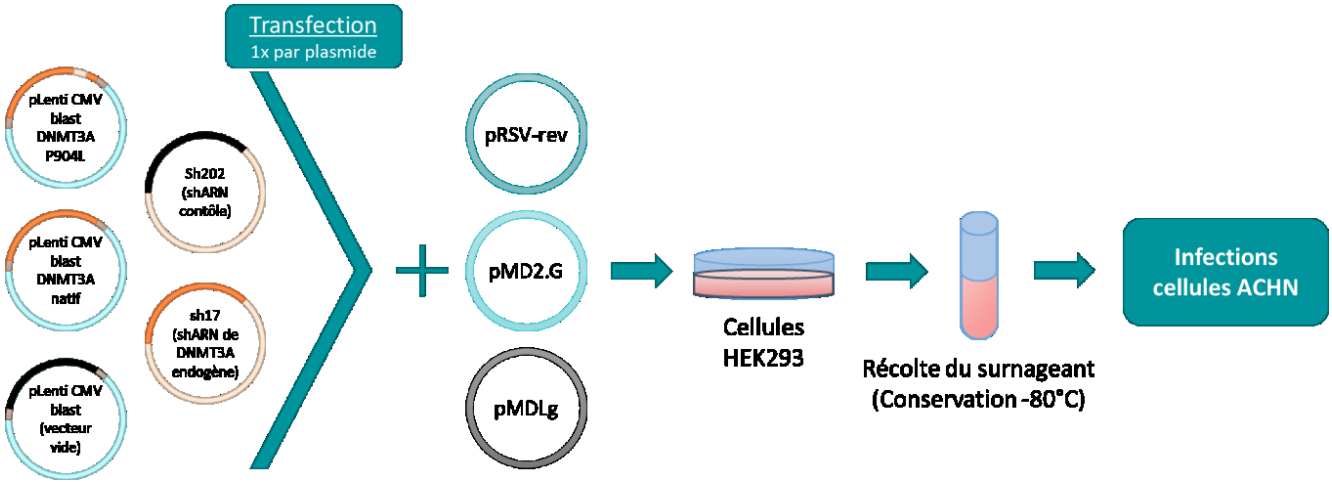

Figure 22 : Production des virus pour l'infection des lignées cellulaires

2.1.5 – Infections des lignées cellulaires

Pour procéder à l'infection, les cellules sont décollées et resuspendues selon le protocole usuel. Ensuite 1 x 10^6 cellules sont infectées avec 150µl de surnageant contenant le virus et 1,25µl de polybrene (Sigma) dans une plaque 6 puits dans un volume final de 1ml. Les cellules sont incubées à 37°C durant 24 heures puis le milieu de culture est remplacé par un milieu de culture sans virus. 24 heures plus tard, un antibiotique de sélection, Blasticidine ou Puromycine selon le gène de résistance, est ajouté dans le milieu de culture. La sélection se poursuit jusqu'à ce que les cellules non infectées soient entièrement mortes, les populations de cellules infectées ne sont pas soumises à une sélection clonale. L'expression des différentes populations est ensuite validée par Q-PCR.

Les cellules ACHN ont été produites avec deux infections successives selon le schéma de la Figure 23. La deuxième infection est faite à partir des cellules de la première infection (1 x 10^6 cellules). Les infections ont été faites en triplicata biologique pour un total de 12 lignées cellulaires.

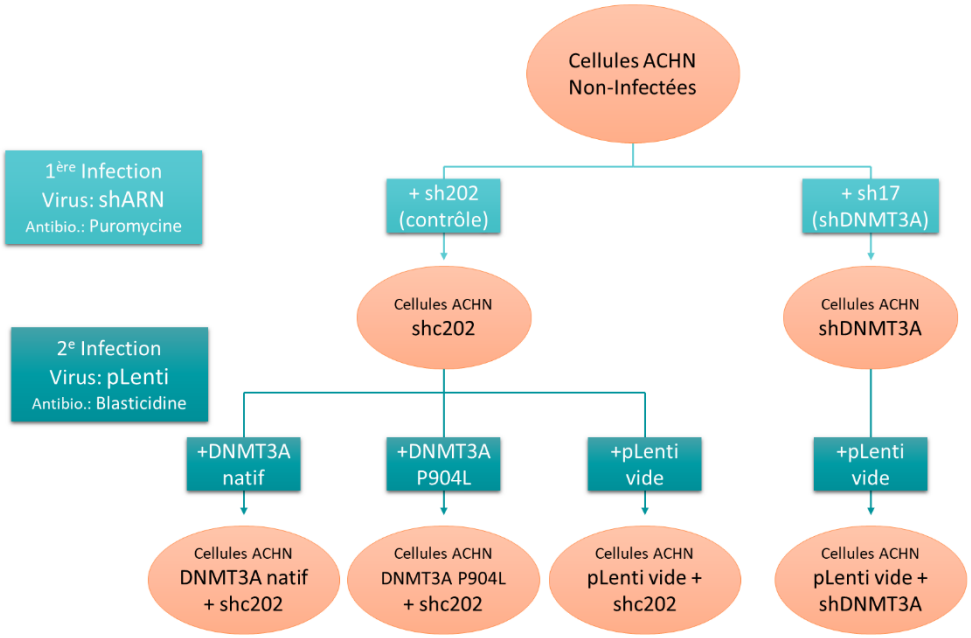

Figure 23 : Doubles infections des cellules ACHN

2.1.6 – Validation des lignées par Q-PCR

La validation du processus d'infection des cellules est faite à l'aide de la résistance à des antibiotiques. Toutefois, cela n'indique pas le niveau d'expression de DNMT3A dans chacune des lignées cellulaires. Ce niveau d'expression est validé par Q-PCR.

L'extraction d'ARN à partir de culot de cellules est faite avec la trousse « Reliaprep » de Promega selon les instructions du manufacturier. Brièvement, les cellules sont récoltées directement dans le tampon de lyse. Puis, l'ARN est précipité avant d'être capturé sur une colonne, lavé, traité avec une DNase, puis relâché. Les échantillons sont ensuite dosés à l'aide d'un spectrophotomètre de type Nanodrop ND-1000.

La RT-PCR se fait avec la trousse iScript RT SuperMix de BioRad selon les instructions du manufacturier. Brièvement, le SuperMix de BioRad est mélangé avec 300ng d'ARN puis la réaction de transcriptase inverse se fait selon les conditions du Tableau 3 : Réaction de RT-PCR.

Tableau 3 : Réaction de RT-PCR

Étape	Température	Durée
Liaison des amorces	25°C	5 min
Transcription inverse	46°C	20 min
Inactivation	95°C	1 min

Les échantillons de RT-PCR sont dilués 1:2 et analysés en triplicata technique. Pour chaque paire d'amorces (Tableau 4, IDT), un contrôle négatif « sans échantillon » est fait en triplicata.

Tableau 4 : Amorces Q-PCR

Gènes ciblés	Séquence sens	Séquence anti-sens
GAPDH	GATCATCAGCAATGCCTC	TGTGGTCATGAGTCCTTCCA
GUSB	CTATCTGTATTCATTGGAGGTGCAG	ATGCTTGTTGACACCGTGGA
DNMT3A	CGAGTCCAACCCTGTGATGA	CTGCCATGCTCCAGACACTC

Le mélange final comporte l'échantillon (4µl), les amorces « forward » et « reverse » à 500nM (1µl) et le SsoAdvanced™ Universal SYBR® Green Supermix de BioRad (6µl). Le programme du Q-PCR LightCycler 96 de Roche se trouve au Tableau 5 : Programme Q-PCR.

Tableau 5 : Programme Q-PCR

Étape	Température	Durée	Répétition
Préincubation	95°C	30 sec	1x
Amplification	95°C	10 sec	45x
	58°C	10 sec	
	72°C **s	10 sec	
Dénaturation thermique	95°C	10 sec	1x
	65°C	60 sec	
	97°C **c	1 sec	

** : acquisition de fluorescence, ^{s} simple, ^{c} continue

2.2 – Tests fonctionnels

2.2.1 – Traitement des cellules avec des agents thérapeutiques

La vincristine est un médicament utilisé pour le traitement des tumeurs de Wilms. La dose physiologique utilisée dans le traitement des tumeurs de Wilms est de 1,5mg/m^2 (SIOP protocole). Les cellules sont traitées durant 48 heures avec des concentrations de 5 à 200 nM de vincristine (Sigma).

La décitabine est un agent déméthylant utilisé surtout pour le traitement des cancers hématopoïétiques. Les cellules sont traitées durant 72 heures avec des concentrations de 5nM à 1mM. À chaque 24 heures, le milieu de culture est changé et la dose de décitabine (Sigma) est renouvelée tel que décrit par [38].

2.2.2. — Immunobuvardage (Western Blot)

Pour déterminer si le gène mutant est traduit, la présence de protéine est vérifiée par Immunobuvardage. L'extraction des protéines à partir des cellules se fait selon la méthode décrite par Burnette [121]. Brièvement, les cellules sont lavées avec du PBS puis lysées avec un tampon RIPA (composition au Tableau 6 : Composition du tampon d'extraction RIPA). Le lysat est passé quatre fois dans une seringue 21G, incubé 30 min sur glace puis centrifugé durant 5 min à 13 000 rpm à 4°C (Centrifugeuse Legend Micro 21R, Thermo-Fisher). Le surnageant est conservé et dosé avec le kit DC™ Protein Assay Kit (Bio-Rad) selon les instructions du manufacturier qui sont basées sur la méthode de Lowry [122].

Tableau 6 : Composition du tampon d'extraction RIPA

Composante	Concentration
Tris-HCl pH8, 0 (Invitrogen)	50 mM
NaCl (Fisher)	150mM
NP-40 (Roche)	1 %
NaDeoxy (Sigma)	0,5 %
SDS (Gibco)	0,1 %
Protease Inhibitor Cocktail Set III (Calbiochem®)	1X

2.2.2.1 – Migration sur gel

L'Immunobuvardage débute avec l'ajout du tampon Laemmli (1X final, Bio-Rad) aux échantillons suivi d'une incubation du mélange pendant 4 min à 95°C. Ensuite, on dépose de 20 à 200ng de protéine sur un gel de polyacrylamide 10 % Mini-PROTEAN TGX Stain-free (Bio-Rad). La migration est faite à 100-150V durant 60-90 minutes avec un tampon de migration (Composition au Tableau 7). À la suite de la migration, le gel StainFree est activé aux UV durant 1min (GelBox).

Tableau 7 : Composition du tampon de migration 5X

Composante	Concentration/quantité
Tris (Fisher)	3g
Glycine (Fisher)	14,4g
SDS (Gibco)	0,1 %
Volume total : 1000ml	

2.2.2.2 – Transfert sur membrane

Le transfert sur membrane de PVDF se fait à 100mA durant 1 heure dans un tampon de transfert (composition au Tableau 8) à l'aide d'une boîte de transfert Mini Trans Blot® (Bio-Rad). Une fois le transfert terminé, il est validé en imageant la membrane aux UV pour détecter les protéines totales. Cette image sera utilisée pour quantifier les protéines d'intérêt dans les différents échantillons.

Tableau 8 : Composition du tampon de transfert

Composante	Concentration/quantité
Tris (Fisher)	3g
Glycine (Fisher)	14,4g
Méthanol (EMD)	10 %
Volume total : 1000ml	

2.2.2.3 – Blocage et anticorps

Ensuite, la membrane est bloquée à l'aide d'une incubation de 1 heure dans une solution de TBS 1X avec 5 % de lait et 0,05 % de Tween. La membrane est ensuite incubée toute la nuit avec les anticorps contre DNMT3A 1:800 ou GAPDH 1:10 000. Le lendemain, la membrane est lavée au TBS-Tween 0,05 % puis incubée 1 heure avec les anticorps secondaires conjugués à la Horseradish Peroxidase (HRP) (Tableau 9). La membrane est lavée avec du TBS-Tween 0,05 % puis avec du TBS.

Tableau 9 : Anticorps pour l'immunobuvardage

Anticorps	Fournisseur	Concentration
Anti-DNMT3A (lapin, monoclonal)	Cell Signaling Technology	1:800
Anti-GAPDH (souris)	Invitrogen	1:10 000
Anti-souris (lapin, IgG-HRP)	Santa-Cruz	1:50 000
Anti-lapin (souris, IgG-HRP)	Santa-Cruz	1:50 000

2.2.2.4 – Révélation

Lorsque les lavages sont terminés, la membrane est incubée avec l'ECL Clarity ou Clarity Max de Bio-Rad puis imagée avec le G:Box (Syngene). Les images issues du G:Box sont analysées avec le logiciel ImageLab (BioRad).

2.2.3 – Test de prolifération

Pour faire le test de prolifération, 2 x 10^3 cellules sont mises en culture dans une plaque 96 puits pendant 8 à 10 jours dans un volume final de 250ul de DMEM 10 % FBS avec les antibiotiques de sélection appropriée. La prolifération des cellules est mesurée par imagerie en temps réel avec l'IncuCyte S3 (Sartorius). La confluence de chaque puits est mesurée à l'aide de 2 captures d'images en phase toutes les 6 heures. La confluence des cellules est déterminée avec les paramètres décrits au Tableau 10.

Tableau 10 : Paramètre de l'Incucyte, analyse de confluence

Paramètre	Valeur
Segmentation	1,4
Hole Fill	800 μm^2
Adjust size	-3 pixels
Area minimum	275 μm^2

2.2.4 – Essai Clonogénique

L'essai clonogénique est basé sur le protocole décrit par Puck [123] que j'ai optimisé pour l'analyse avec l'IncuCyte S3. Brièvement, les cellules sont décollées selon le protocole usuel et comptées à l'aide d'un compteur cellulaire de type Beckman Coulter. 750 cellules sont mises en culture dans une plaque 24 puits dans un volume final de 2 ml avec ou sans décitabine 100, 25 ou 5 nM ou vincristine 100 ou 25 nM durant 10-14 jours. Ensuite, tous les puits ont été capturés à l'aide de l'Incucyte S3 et les colonies ont été comptées à l'aide des paramètres suivants (Tableau 11). Les colonies ont aussi été colorées au violet de Gentiane selon la méthode décrite dans Rafehi et al. [124] et comptées manuellement.

Tableau 11 : Paramètre de l'Incucyte, analyse des colonies

Paramètre	Valeur
Segmentation	0,5
Hole Fill	4 x 105 µ m^2
Adjust size	0 pixel
Area minimum	9 x 104 µ m^2
Processing Keep-out	50 pixels

2.2.5 – Essai de migration

2.2.5.1 – Essai de migration par plaie

Pour l'essai de réparation de plaie par migration (Wound Assay, [125]), les cellules sont mises en culture à 50 000 cellules par puits en plaques 96 puits pour environ 48 heures ou jusqu'à une confluence minimum de 85 % (mesurée avec l'IncuCyte S3). Une strie verticale est alors faite manuellement dans chaque puits et le milieu de culture est changé pour retirer les cellules décollées. La plaque est ensuite déposée dans l'IncuCyte S3 pour 12-18 heures avec une capture d'image à 4X en phase toutes les heures. Les images sont ensuite analysées avec les paramètres d'analyse décrits au Tableau 12. Ces paramètres définissent l'aire occupée par les cellules dans l'image et le programme en déduit un pourcentage de confluence. Lorsque la plaie est faite, la confluence totale dans l'image augmente au fur et à mesure que les cellules migrent vers le centre de la plaie. La vitesse de migration est calculée avec le pourcentage de confluence dans le temps pour les 10 à 12 premières heures de migrations dans le but d'exclure les effets de la prolifération [126, 127].

Tableau 12 : Paramètres de l'Incucyte, analyse des plaies

Paramètre	Valeur
Segmentation	0,6
Hole Fill	0 µm^2
Adjust size	0 pixel
Area minimum	1 x 104 µ m^2

2.2.5.2 – Essai de migration de type « Transwell »

Avant le début de la migration, les cellules sont incubées au moins 24 heures sans FBS, puis décollées selon le protocole usuel. L'essai de migration se fait avec les inserts Millicell de 12 mm avec des pores de 8µm (Merk Millipore) selon le protocole de Sheng et al. [128]. Brièvement, 500ul de milieu avec 10 % FBS est déposé dans la chambre inférieure et 20 000 cellules (200ul) sont déposées dans la chambre supérieure. Les cellules sont incubées pendant 6 heures à 37°C. Ensuite, le milieu de culture des deux chambres est aspiré. La chambre supérieure est alors nettoyée avec un coton-tige. Les cellules qui ont adhéré sur la partie inférieure de l'insert sont fixées puis colorées avec une solution de violet de Gentiane 0,01 %. Les cellules sont dénombrées manuellement dans 5 champs aléatoires à l'aide d'un microscope inversé avec un objectif 20 x.

2.2.6 – Tests d'apoptose

L'apoptose a été mesurée par imagerie cellulaire en temps réel avec l'appareil IncuCyte d'Essen. La détection des cellules en apoptose se fait selon le protocole décrit par Gelles et Chipuk [129]. Brièvement, les cellules sont incubées au moins 24 heures dans du milieu de culture AMEM (pauvre en riboflavine ce qui diminue la fluorescence verte en arrière-plan). Ensuite, les cellules sont décollées normalement et 5 $x10^3$ cellules par puits sont mises en culture dans une plaque 96 puits et incubées pendant un minimum de 2 heures pour permettre aux cellules d'adhérer à la plaque. Ensuite, le milieu de culture est changé pour de l'AMEM avec ANX V 594 (1:40) et les agents thérapeutiques mentionnés (VNC ou DAC). Les cellules sont ensuite incubées dans l'IncuCyte avec 2 captures dans les 2 canaux (phase et rouge) toutes les 2 heures (pour limiter le photoblanchiment) durant 72 heures. Les résultats sont ensuite extraits et analysés selon la méthode présentée par Gelles et Chipuk [129]. Brièvement, des masques sont appliqués sur les captures en phase et en fluorescence verte et rouge selon les paramètres décrits dans le Tableau 13. Les éléments ANX V positifs sont normalisés avec la moyenne de la confluence (

Équation 1). Un facteur de correction est calculé en divisant l'écart maximal des mesures d'ANX V normalisé par 100 (Équation 2). Finalement, la valeur finale est calculée en divisant le pourcentage brut par le facteur de correction pour obtenir un pourcentage ajusté d'apoptose ayant une valeur entre 0 et 100 inclusive (Équation 3).

Tableau 13 : Paramètres de l'Incucyte, analyse d'apoptose

Paramètre	Valeur
Phase	
Segmentation	0,4
Hole Fill	800 µm^2
Adjust size	-4 pixels
Area minimum	50 µm2
Fluorescence rouge	
Segmentation	Top-Hat
Radius	10 µm
Threshold	2 GCU
Edge Split	ON
Edge sensitivity	-45
Adjust size	0 pixels
Area minimum	100 µm^2
Mean intensity	3,00
Superposition	
Area minimum	80 µm^2

Équation 1 : Ratio d'apoptose non ajusté

$$R_j^i = \frac{A_j^i}{C_{[t_0,t_f]}^{i,i',i''}}$$

Où : R_j^i = Ratio d'apoptose non ajusté au temps *j* pour le réplica *i*;

A_j^i = Éléments ANX V positifs au temps *j* pour le réplica *i*;

$C_{[t_0,t_f]}^{i,i',i''}$ = Moyenne de la confluence dans le temps pour tous les réplicas

Équation tirée de Gelles et Chipuk, 2016 [129]

Équation 2

$$F = \frac{\Delta R_{[t_0,t_f]}^{[w_0,w_f]}}{100}$$

Où : F = Facteur de correction du ratio initial;

$\Delta R_{[t_0,t_f]}^{[w_0,w_f]}$ = delta entre la valeur minimum et la valeur maximum du ratio non ajusté de tous les puits et tous les temps

Équation tirée de Gelles et Chipuk, 2016 [129]

Équation 3

$$P_j^i = \frac{R_j^i}{F}$$

Où : P_j^i = Pourcentage ajusté d'apoptose au temps *j* pour le réplica *i*;

R_j^i = Ratio d'apoptose non ajusté au temps *j* pour le réplica *i*;

F = Facteur de correction du ratio initial (même valeur pour tous les échantillons)

Équation tirée de Gelles et Chipuk, 2016 [129]

2.2.7 – Test d'activité méthyltransférase

La mesure de l'activité méthyltransférase a été faite avec le kit DNMT Activity/Inhibition Assay (Active Motif) selon le protocole du fabricant. L'essai est similaire à un essai de type ELISA. Premièrement, on fait une réaction enzymatique où les enzymes présentes dans les échantillons méthylent un substrat universel (SAM) aux trois DNMTs humaines. Ensuite, le substrat méthylé est lié par une protéine (His-MBD2b) et reconnu par un anticorps lié avec HRP ce qui permet la détection colorimétrique du substrat méthylé et la quantification de l'activité méthyltransférase de l'échantillon.

2.3 – Transcriptome des lignées cellulaires

2.3.1 – Préparation des librairies

La validation de la qualité des ARN a été réalisée à l'aide du BioAnalyzer de Agilent. Nous avons utilisé le kit de micropuce RNA 6000 Nano selon les instructions du fabricant. Brièvement, la micropuce est apprêtée avec le gel de migration puis les échantillons et l'échelle de mesure sont ajoutés. La micropuce est ensuite installée dans l'appareil et le programme de migration des ARN est lancé.

La préparation de librairies pour le séquençage du transcriptome s'est faite avec le kit TruSeq Straded mRNA Sample Preparation d'Illumina selon les instructions du fabricant. Brièvement, les fragments d'ARN messager sont d'abord isolés à l'aide de billes polyT. Ensuite, les deux brins d'ADN complémentaire sont synthétisés successivement et les queues 3' sont adénylées. Puis, les aptamères sont ajoutés sur chaque fragment avant une dernière amplification. Les librairies sont ensuite validées avec le BioAnalyzer avant d'être envoyées à la plateforme de séquençage du centre intégré de génomique clinique pédiatrique du CHU Sainte-Justine. La validation de la qualité des librairies d'ADNc a été faite à l'aide du BioAnalyzer de Agilent. Nous avons utilisé le kit de micropuce DNA 1000 selon les instructions du fabricant. Brièvement, la micropuce est apprêtée avec le gel de migration puis les échantillons et l'échelle de mesure sont ajoutés. La micropuce est ensuite installée dans l'appareil et le programme de migration des ADN est lancé.

2.3.2 – Traitement des données de transcriptome

Les données brutes de transcriptome sont alignées et normalisées à l'aide de la procédure décrite dans l'article de Ouimet et al. [130]. Brièvement, l'ARN messager a été isolé puis séquencé par la plateforme de séquençage. Au moins 20 millions de lectures ont été prises par échantillon avec une longueur moyenne de 100 pb. Les lectures ont été alignées avec le génome humain version hg19 puis le nombre de comptes (FPKM) a été déterminé avec le logiciel HTseq-count. Finalement, une analyse différentielle des données est faite à l'aide du module R DESeq2 [131] entre les paires d'échantillons suivantes : Vecteur vide et DNMT3A natif, Vecteur vide et DNMT3A P904L et DNMT3A natif et DNMT3A P904L.

Comme le niveau de surexpression de DNMT3A natif et du mutant est largement différent entre les deux échantillons, nous avons mis en place des filtres pour exclure, ou du moins réduire, l'impact de cette différence dans notre analyse. Les filtres appliqués sont présentés à la Figure 24 sous forme d'arbre décisionnel (*flowchart*).

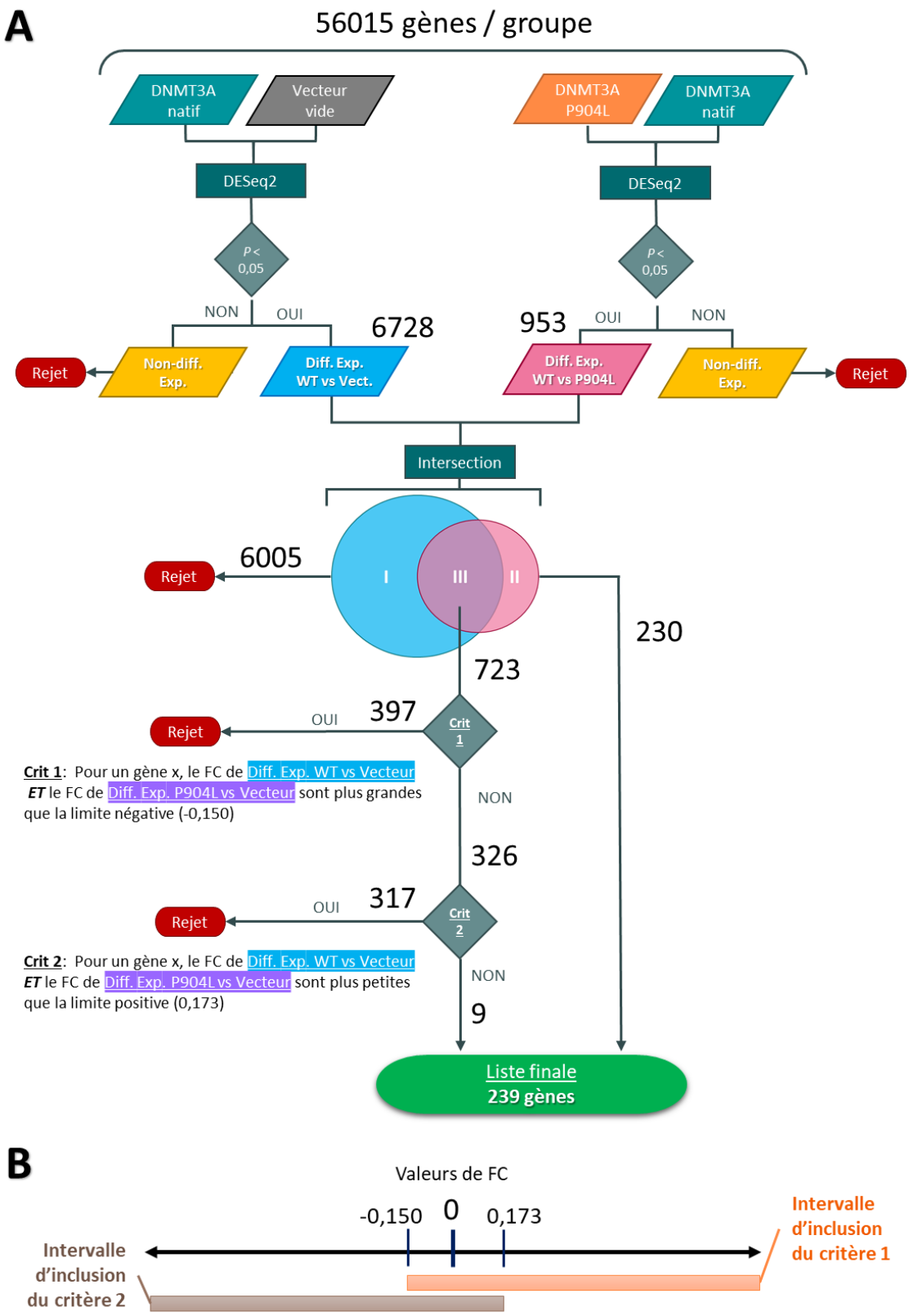

Figure 24 : Arbre décisionnel de l'analyse du transcriptome

(Légende page suivante)

A. Arbre décisionnel. *Les FPKM sont comparées selon les groupes auxquels elles appartiennent à l'aide de l'algorithme DESeq2. Les deux listes de gènes différentiellement exprimés sont comparées et séparées en trois groupes. Le* ***groupe I*** *contient les gènes différentiellement exprimés dans DNMT3A natif seulement, le* ***groupe II*** *contient les gènes différentiellement dans le mutant P904L seulement et le* ***groupe III*** *contient les gènes différentiellement dans DNMT3A natif et DNMT3A P904L. Les gènes uniques au mutant P904L sont conservés. Les gènes communs sont filtrés suivant les critères d'exclusion 1 et 2. La liste finale représente les gènes sur lesquels le mutant P904L a un impact. (suite page suivante)* ***B. Critères 1 et 2.*** *Pour chaque critère, si les valeurs de FC de DNMT3A natif et de DNMT3A P904L se trouvent dans l'intervalle d'inclusion du critère, le gène est rejeté*.

2.3.2.1 – Groupes de gènes différentiellement exprimés

Le module R DEseq2 est utilisé pour la comparaison des échantillons (Figure 24). Une valeur p ajustée de 0,05 (calculée par l'algorithme) est utilisée pour déterminer si un gène est différentiellement exprimé entre les deux échantillons.

Les gènes qui sont non différemment exprimés entre les lignées DNMT3A natif et le vecteur vide constituent le bruit de fond associé à la transformation et ils sont écartés. Les gènes affectés par DNMT3A P904L sont retenus dans l'analyse différentielle entre DNMT3A natif et DNMT3A P904L. Les gènes non différemment exprimés entre le gène natif et mutant ne sont pas affectés par le mutant P904L et sont donc écartés.

2.3.2.2 – Intersection des groupes différentiellement exprimés

Après avoir terminé la comparaison des données brutes (FPKM), j'ai fait l'intersection entre les deux groupes de gènes différentiellement exprimés. On obtient alors trois nouveaux groupes de gènes, les gènes affectés uniquement par la surexpression de DNMT3A natif, les gènes affectés uniquement par la mutation P904L et les gènes sur lesquels l'impact du mutant P904L est mal défini par rapport au DNMT3A natif. Le premier groupe (Diff. exp. WT seul., Figure 24A) contient les gènes qui sont différentiellement exprimés entre le vecteur vide et DNMT3A natif, mais pas entre DNMT3A natif et DNMT3A P904L et donc représente les gènes qui sont affectés par la surexpression de DNMT3A. Ils sont donc rejetés.

Le deuxième groupe (Diff. exp. P904L seul., Figure 24A) contient les gènes qui sont différentiellement exprimés seulement entre DNMT3A P904L et DNMT3A natif et donc en théorie affectés uniquement par la mutation P904L. Ces gènes sont conservés dans la liste finale qui regroupe les gènes sur lesquels la mutation P904L a un impact.

Le dernier groupe (Groupe III, gènes communs, Figure 24A) contient les gènes pour lesquels l'impact du mutant P904L et de la surexpression de DNMT3A n'est pas clairement défini. Ces gènes sont à la fois différentiellement exprimés entre le vecteur et DNMT3A natif et entre DNMT3A natif et mutant.

2.3.2.3 – Filtres pour les gènes communs

Ce filtre sert à faire le tri dans les gènes communs pour éviter de rejeter des gènes dont l'expression pourrait être affectée par le mutant P904L. Pour ce faire, chaque gène sera évalué selon son changement d'expression (*Fold Change* ou FC). Deux seuils seront calculés selon la distribution des valeurs positives et négatives de FC. La limite positive représentera le 5e percentile des valeurs positives et la limite négative le 95e percentile des valeurs négatives (environ 0 ± 5 % de la distribution). Le premier critère d'exclusion (crit 1, Figure 24B) permet de rejeter les gènes qui sont surexprimés à la fois dans le DNMT3A natif par rapport au vecteur vide et dans le DNMT3A P904L par rapport au vecteur vide. On considère que la différence d'expression entre ces gènes est simplement due à la différence de surexpression du vecteur DNMT3A inséré dans les cellules. Les gènes restants sont ensuite soumis au deuxième critère d'exclusion (crit 2, Figure 24B). Ce critère est très similaire au crit 1, mais son rôle est de rejeter les gènes qui sont réprimés dans les deux groupes et dont la différence d'expression serait aussi attribuée à la différence d'expression de DNMT3A. Les gènes qui ne sont pas rejetés par l'un des deux critères sont affectés de manière opposée par la surexpression du gène natif et du gène muté, c'est-à-dire qu'ils sont surexprimés dans une comparaison, mais réprimés dans l'autre. On considère que la différence d'effet est alors due au mutant P904L.

2.3.3 – Analyse d'enrichissement des termes GO

Les analyses d'enrichissement sont faites à l'aide du module R ClusterProfiler [132] en utilisant les paramètres spécifiés pour chaque figure. Pour chaque analyse, seuls les gènes avec une valeur p ajustée de moins de 0,05 ont été conservés. À la suite de l'analyse d'enrichissement, seuls les termes GO qui ont une valeur p d'enrichissement de moins que 0,05 sont conservés.

2.3.4 – Comparaison avec la littérature et le patient

Pour comparer les résultats obtenus avec le profil du patient, les 20 gènes les plus variables sont sélectionnés. L'expression de ces gènes est observée chez le patient en le comparant avec la cohorte de patients atteints de la tumeur de Wilms provenant des données TARGET [52].

Dernièrement, certains gènes impliqués dans le syndrome de Tatton-Brown et dans d'autres occurrences de cancer impliquant DNMT3A sont observés dans le patient par rapport aux données de la cohorte de Wilms (TARGET) [91, 100, 133].

2.4 – Analyses statistiques

Les valeurs de prolifération comme le temps de doublement de la population ont été calculées à l'aide du modèle de croissance logistique. Les données de migration ont été modélisées avec une régression linéaire pour établir la vitesse de migration par plaie. J'ai utilisé un test de student/t-test ou un test de Mann-Whitney selon la variance pour évaluer l'hypothèse que les cellules surexprimant DNMT3A P904L avaient les mêmes propriétés que les cellules surexprimant DNMT3A natif (H_0). Les valeurs p pour chacun des tests sont présentées dans les résultats. Les t-test et les graphiques ont été obtenus avec le logiciel GraphPad Prism version 5.03 pour Windows.

Les tests et les analyses statistiques faits sur les données du transcriptome ont été effectués avec différents modules du langage R qui sont mentionnés aux figures concernées.

Section 3 — Résultats

3.1 – Contexte de la mutation DNMT3A P904L

3.1.1 – Projet TRICEPS

Dans le cadre du projet TRICEPS [119], 84 tumeurs d'enfants atteints d'un cancer en rechute ou ne répondant pas au traitement ont été séquencées. Les données de séquençage des tumeurs sont comparées avec celles du tissu normal de l'enfant dans le but de découvrir des mutations conductrices (*driver mutations*) qui expliqueraient les difficultés de traitement de la tumeur. Chez un patient atteint d'une tumeur de Wilms, nous avons découvert la mutation P904L dans le gène DNMT3A. Cette mutation était accompagnée d'une perte d'hétérozygotie sur l'allèle du gène natif. Dans cette situation, le gène mutant est la seule copie exprimée dans la tumeur. Les autres altérations génomiques du patient sont présentées à la Figure 25. La Figure 26 représente le niveau d'expression de DNMT3A du patient et de différentes cohortes. Par rapport à la cohorte de patients avec tumeur de Wilms (Étude TARGET, COG), le patient TC0040 se trouve dans la moyenne haute (71e percentile) avec un changement d'expression (Fold change, FC) de 0,568. Le gène DNMT3A P904L est donc exprimé chez le patient.

Tumor type: Wilms' Tumor
Four years old male with Wilms' tumor with relapse at lungs (metastasis) (May 2016). Initial diagnose at kidney (November 2015).
FISH: Gain 1q (sonde 1p36/1q25) (96%) (12/11/15)
Tumor purity of the sample sequenced: 87%

Copy Number Anomalies (CNAs)

Copy-neutral lost of heterozygosity on chromosome 2p (not validated by PCR but supported by LOH mutations)

CNA	Gene	Fold	FDA Approved	Active Clinical Trial
Del (8) (q23.3-q24.3)	RAD21	1 copy	No	No
Amp (1q)	DDR2	3 copies	**Dasatinib**	**Yes**
	ABL2	3 copies	**Dasatinib, regorafenib**	**Yes**

Sequence mutations

Gene	Amino acid	Mutation fraction	FDA Approved	Active Clinical Trial
DNMT3A	P904L	86,60%	**Decitabine**	**Yes**

Rearrangements

Genes	Type	Positions	Expressed	FDA Approved	Active Clinical Trial
None	None	None	None	None	None

Figure 25 : Altération génomique du patient TC0040
Rapport du patient soumis à l'équipe de traitement dans le cadre du projet TRICEPS. Le rapport décrit les différentes altérations génomiques dans la tumeur et le portrait global du patient. On remarque une perte d'hétérozygotie sur les chromosomes 2p qui porte aussi le gène DNMT3A avec la mutation P904L.

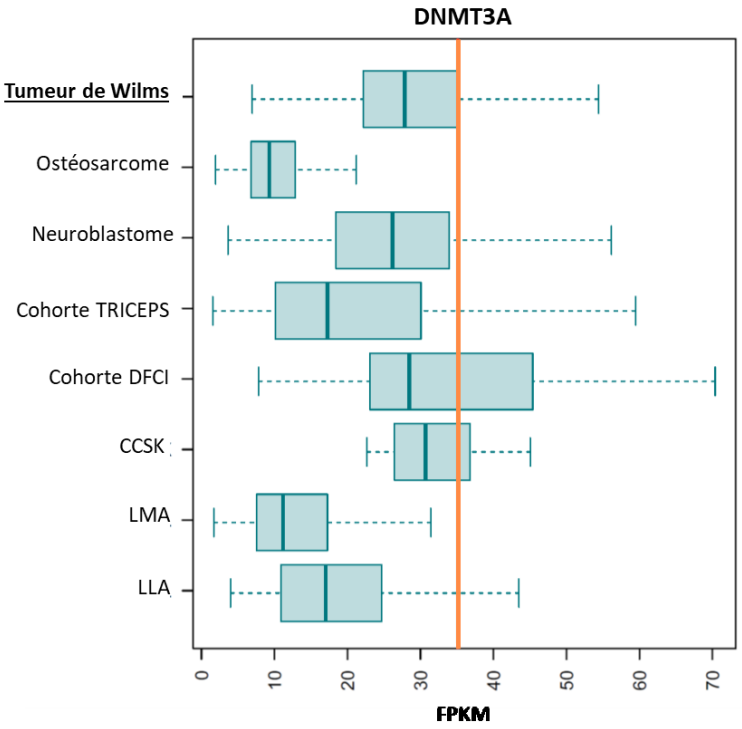

Figure 26 : Expression de DNMT3A chez le patient TC0040
La ligne orange représente le niveau d'expression du patient TC0040 à 36,0 FPKM. Les boîtes représentent l'expression de DNMT3A dans différentes cohortes de patients.

3.1.2 – Autres occurrences de la mutation

Les mutations dans DNMT3A sont principalement retrouvées dans des tumeurs hématopoïétiques. La mutation P904L a été rapportée dans 16 autres tumeurs chez l'adulte [134] (Figure 27) et a également été classée dans les mutations causatrices du syndrome de Tatton-Brown (STBR) [100]. Dans ce syndrome, la mutation cause une déficience intellectuelle et une augmentation de la croissance de l'individu, mais n'augmente pas le risque de cancer [100]. La présence de la mutation P904L dans une tumeur de Wilms trouvée par notre équipe est le seul cas répertorié et documenté jusqu'à ce jour. On remarque aussi une autre mutation affectant le résidu P904 où la proline est changée pour une sérine (P904S). Cette mutation est retrouvée deux fois dans des cancers hématopoïétiques et une fois dans un cancer de l'œsophage.

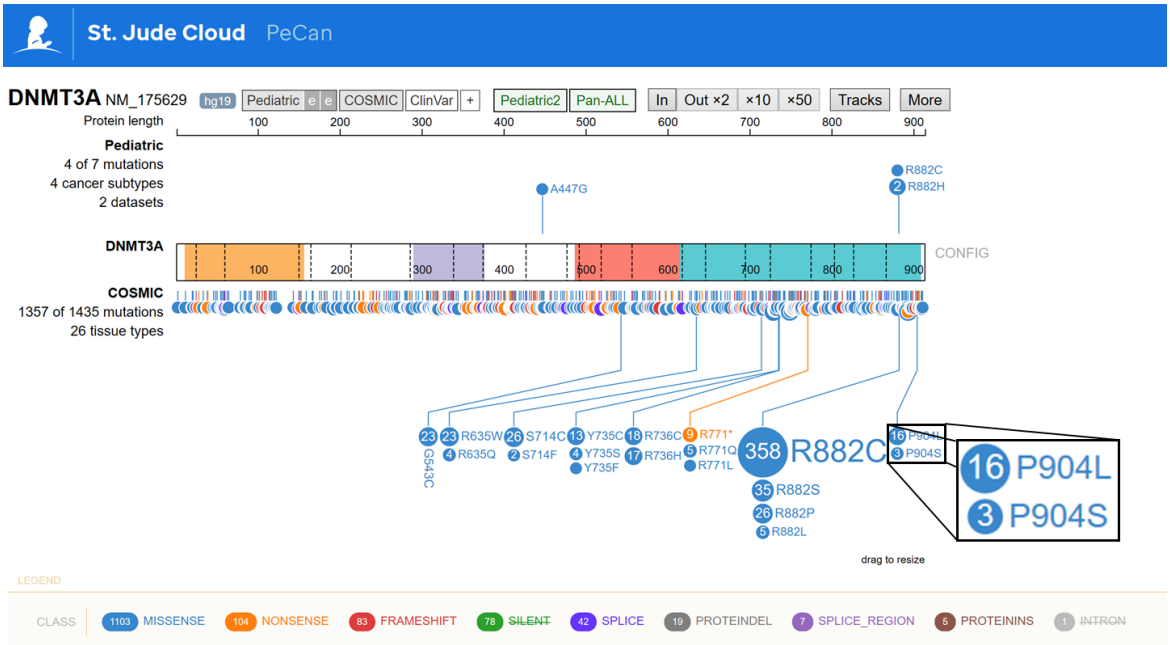

Figure 27 : Schéma PECAN des mutations de DNMT3A

Les mutations de DNMT3A rapportées dans les cancers pédiatriques sont indiquées au-dessus du schéma de la protéine. Les mutations rapportées dans des cancers chez l'adulte sont indiquées au-dessous du schéma [135].

3.2 – Création de la mutation et validation des contrôles

3.2.1 – Création des plasmides

À partir d'un plasmide contenant le gène DNMT3A natif, nous avons introduit la mutation P904L à l'aide de la technique de mutagenèse dirigée. Ensuite, nous avons validé la présence de la mutation par séquençage Sanger afin de nous assurer de l'insertion du vecteur, et ce, sans autre modification dans le gène DNMT3A. La Figure 28 présente le plasmide avec la localisation des amorces de mutagenèse et les résultats du séquençage.

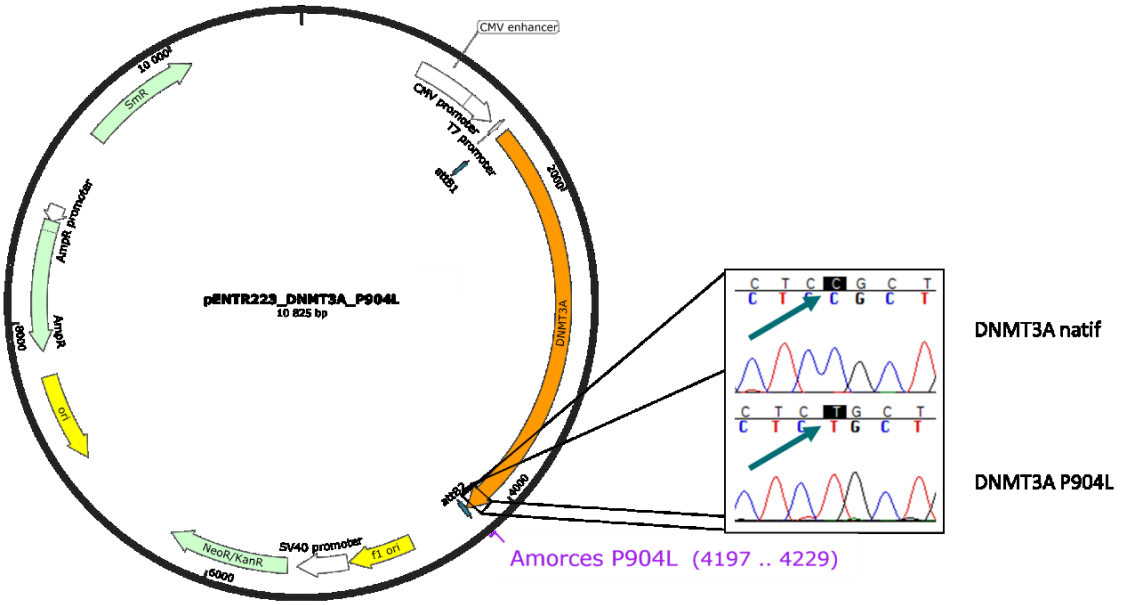

Figure 28 : Carte du plasmide DNMT3A

Carte des différents éléments du vecteur pENTR_DNMT3A. Le gène DNMT3A est représenté en orange et l'amorce de mutagenèse dirigée est représentée en mauve à droite du plasmide. À droite de l'image, on trouve le chromatogramme issu du séquençage des plasmides DNMT3A natif et DNMT3A P904L.

Le changement de base (C > T) en position 2711 de la séquence codante pour l'isoforme a de DNMT3A s'est bien effectué et le plasmide comporte maintenant la mutation d'intérêt, soit la mutation P904L (CCG > CTG) (Figure 28). Nous avons aussi fait le séquençage complet du gène DNMT3A dans les deux plasmides. La séquence complète de DNMT3A natif et DNMT3A P904L est disponible dans les résultats supplémentaires (Annexe A — 7.1.1 – Validation de l'intégrité des plasmides). Une fois la validation terminée, le gène a été transféré dans un vecteur pLenti_CMV_Blast (Figure 21).

3.2.2 – Validation du shARN

Pour valider que le shARN cible bien le gène endogène de DNMT3A, j'ai fait un sauvetage de l'expression avec le vecteur contenant DNMT3A natif. Le sauvetage de l'expression est une méthode courante pour valider un shARN (Figure 29). Le gène de DNMT3A natif ne comporte pas la séquence 3'UTR qui est ciblée par le shARN contre DNMT3A.

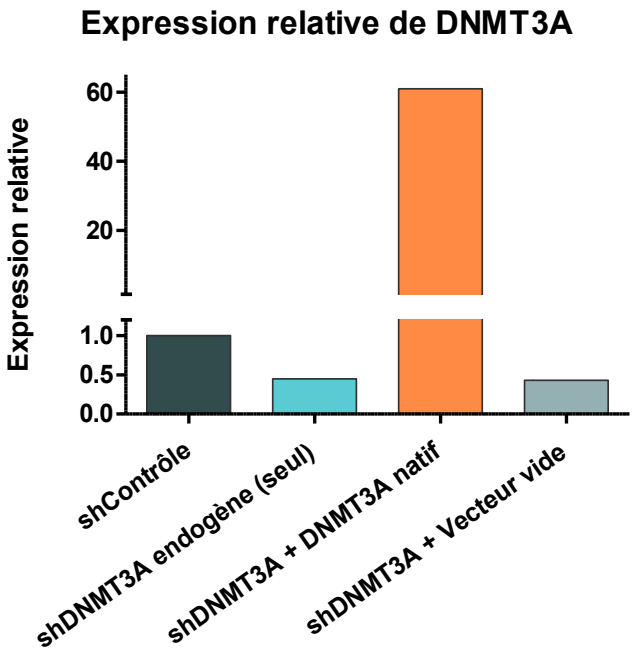

Figure 29 : Expression relative DNMT3A dans la validation du shARN
Niveau d'expression relative de DNMT3A mesuré par Q-PCR avec GAPDH en gène de référence.

L'introduction dans la cellule d'un shARN ciblant son transcrit diminue l'expression de DNMT3A jusqu'à 0,45. L'ajout d'un second vecteur contenant le gène DNMT3A natif, entraîne une augmentation de l'expression de DNMT3A jusqu'à 61 fois celui du contrôle. Cette augmentation n'est pas observée lorsque l'on infecte les cellules avec un vecteur vide (expression de 0,43).

3.3 – Validation de l'expression de DNMT3A dans les populations cellulaires

L'effet du mutant P904L sur la fonction de DNMT3A est inconnu. On propose que cette mutation soit fonctionnelle, probablement attribuable à une perte de la fonction de DNMT3A. Cette hypothèse est basée sur l'expression de la mutation dans le patient (pas de forme native), qu'elle se trouve dans le domaine catalytique de la protéine, et sa récurrence dans de nombreux types de cancers. J'ai donc choisi de comparer l'impact de la mutation P904L avec la surexpression de DNMT3A, mais aussi avec la perte de fonction obtenue à l'aide de la répression par un shARN ciblant le transcrit endogène de DNMT3A.

3.3.1 – Analyse de l'expression des différentes constructions dans la lignée cellulaire ACHN

J'ai transfecté les vecteurs contenant les différentes constructions dans des cellules ACHN par infection virale. Pour valider la présence et l'expression des différents vecteurs, j'ai utilisé la technique de Q-PCR avec une quantification relative des gènes.

Préalablement à l'expérience de Q-PCR, j'ai validé la qualité de la préparation d'ARN total avec le Bionalyzer. Cet appareil renvoie une valeur nommée « RIN » (RNA integrity number, Tableau 14) qui est une valeur d'intégrité des ARNs. Cette valeur doit se situer au-dessus de 8,00 pour que l'échantillon soit accepté. Dans le cas contraire, l'extraction est reprise jusqu'à l'obtention d'un score supérieur à 8,00. Les échantillons d'ARN sont ensuite utilisés pour l'analyse de l'expression par Q-PCR et pour l'analyse du transcriptome. Comme démontré au Tableau 14, l'ensemble des échantillons d'ARN analysés montrent une valeur RIN adéquate.

Tableau 14 : Intégrité de l'ARN dans les extraits cellulaires

Échantillon	Valeur d'intégrité moyenne
Vecteur vide	8 467
DNMT3A WT	9 300
DNMT3A P904L	9 867
shDNMT3A endogène	8 533

À la suite de la réaction de Q-PCR, les cellules ACHN infectées montrent l'expression des gènes désirés (Figure 30). Dans cette figure, l'expression est normalisée sur le vecteur vide qui représente l'expression endogène de DNMT3A. La valeur du vecteur vide est donc de 1,0.

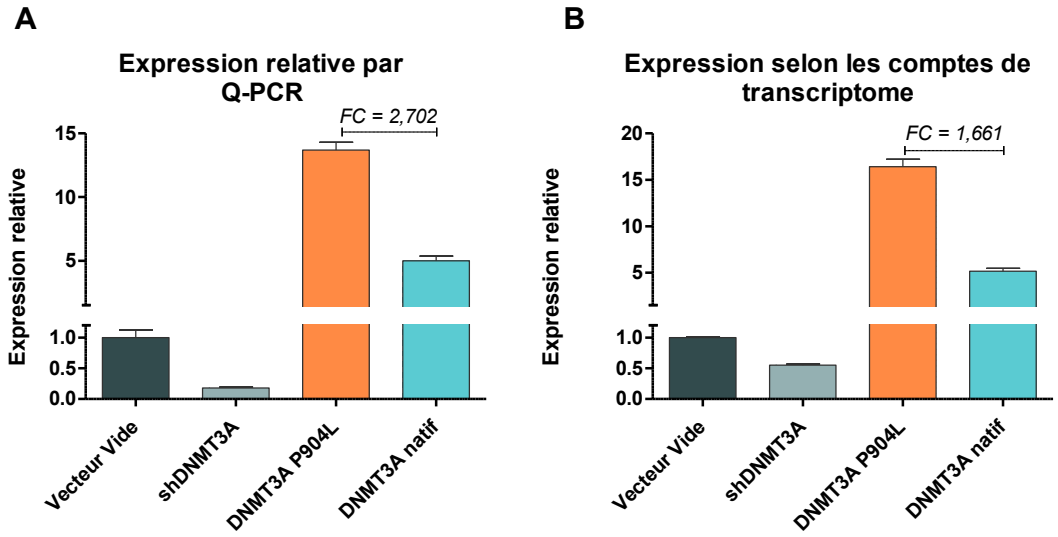

Figure 30 : Expression de DNMT3A dans les lignées cellulaires

Niveau d'expression de DNMT3A dans les lignées cellulaires par rapport à l'expression dans le vecteur vide. ***A) Mesure de l'expression par Q-PCR.*** *La différence d'expression (FC) moyenne entre la surexpression de DNMT3A natif et DNMT3A P904L est de 2,7 x.* ***B) Mesure de l'expression par séquençage du transcriptome.*** *La différence d'expression (FC) entre la surexpression de DNMT3A natif et DNMT3A P904L est de 1,7 x (à la suite de la normalisation des comptes par l'algorithme DESeq2).*

En comparant avec la forme endogène (vecteur vide, expression normalisée à 1,0), la répression de la forme endogène par shARN est efficace avec une expression résiduelle de 18 %. Les constructions DNMT3A mutante (P904L) et native montrent une surexpression de 13,3 et de 4,9, respectivement (Figure 30A). La différence d'expression entre les formes DNMT3A native et mutante est donc de 2,7 x. Des valeurs similaires ont été obtenues lors de l'analyse du transcriptome (Figure 30B), expression de 16,4 et de 5,2 pour DNMT3A P904L et DNMT3A natif respectivement.

3.3.2 – Validation de la traduction de DNMT3A dans les modèles cellulaires

Suite aux infections, j'ai également validé la traduction des constructions DNMT3A avec la méthode d'Immunobuvardage (Figure 31). Ce dernier s'est révélé difficile à effectuer de façon quantitative à cause du faible niveau de protéine endogène (Figure 31, puits 4 et 6). J'ai donc considéré les résultats uniquement de façon qualitative, car l'objectif était de vérifier la présence de la protéine DNMT3A P904L dans les cellules.

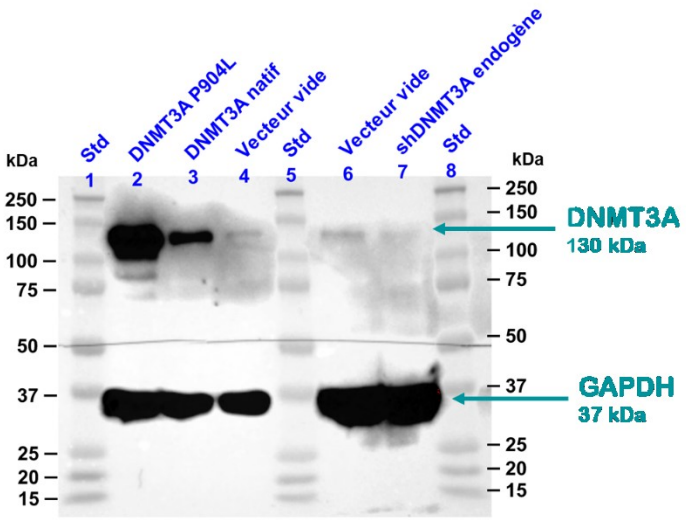

Figure 31 : Immunobuvardage des protéines DNMT3A et GPADH

Membrane d'Immunobuvardage représentative. L'identification des bandes et de l'échelle est faite à l'aide du logiciel ImageLab de BioRad. Les échantillons 2 à 4 contiennent 100ng de protéine et les échantillons 6 et 7 contiennent 200ng de protéine.

La Figure 31 montre que les puits du vecteur vide et du shARN contiennent une faible quantité de protéine DNMT3A endogène. Même lorsque l'on augmente la quantité de protéine totale, les bandes restent à peine perceptibles. Il est difficile de faire une quantification des protéines puisque la différence d'intensité des bandes entre le vecteur vide et les surexpressions de DNMT3A est très grande. Il est ainsi difficile d'exposer la membrane assez pour obtenir une bande dans le vecteur vide sans saturer les bandes de DNMT3A. Toutefois, ce résultat démontre que la mutation P904L n'empêche pas la traduction de DNMT3A. On peut donc tester son impact fonctionnel. On remarque aussi la présence faible d'une deuxième bande à 85,5 kDa dans le mutant P904L qui sera discuté plus loin.

3.4 – Analyses transcriptionnelles

3.4.1 – Regroupement des échantillons avant et après l'application de filtres

Pour évaluer la ressemblance entre les échantillons utilisés dans l'étude du transcriptome, j'ai calculé la corrélation entre ceux-ci à chaque étape du traitement des résultats (Figure 32, Figure 33 et Figure 34).

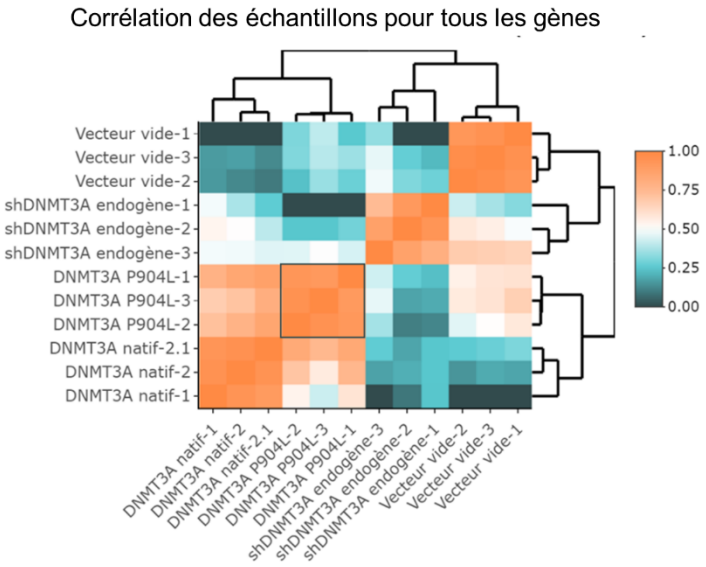

Figure 32 : Corrélation entre les échantillons du transcriptome
« Heatmap » des échantillons avant l'application des filtres, l'expression de tous les gènes est considérée dans le calcul de la corrélation. Graphique produit avec le module « heatmaply » dans R.

Dans la Figure 32, on remarque que les trois réplicas du mutant P904L sont regroupés. Lorsque l'on applique le premier filtre et que l'on ne considère que les 953 gènes qui sont les plus différentiellement exprimés entre DNMT3A natif et le mutant P904L, la distinction est encore plus marquée (Figure 33). Dans ce regroupement, on voit que les deux groupes les plus proches sont le mutant P904L et le shDNMT3A endogène.

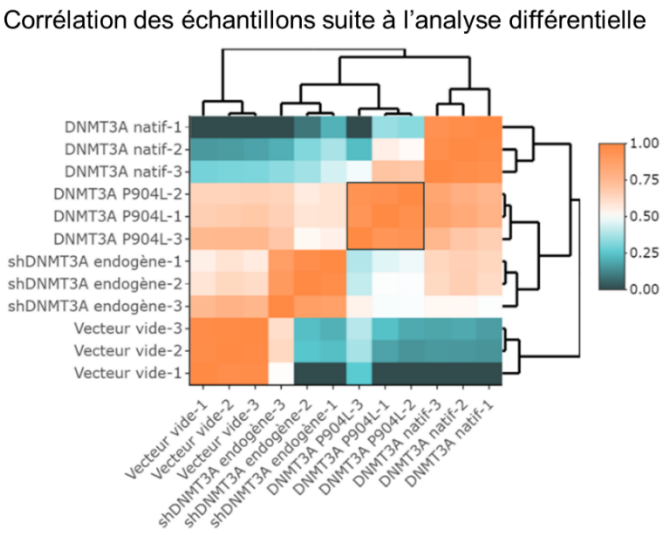

Figure 33 : Regroupement des échantillons après l'analyse différentielle
« Heatmap » des échantillons selon les 953 gènes différentiellement exprimés entre le DNMT3A natif et le mutant P904L. Graphique produit avec le module « heatmaply » dans R.

Lorsque l'on utilise les 239 gènes restant à la suite des deux filtres, on perd la distinction entre les échantillons de DNMT3A natif et ceux du vecteur vide (Figure 34). On note aussi que l'un des réplicas du mutant P904L (DNMT3A P904L-1) corrèle plutôt avec le groupe Vecteur vide/DNMT3A natif. Les deux autres échantillons corrèlent ensemble et sont plus proches du shDNTM3A.

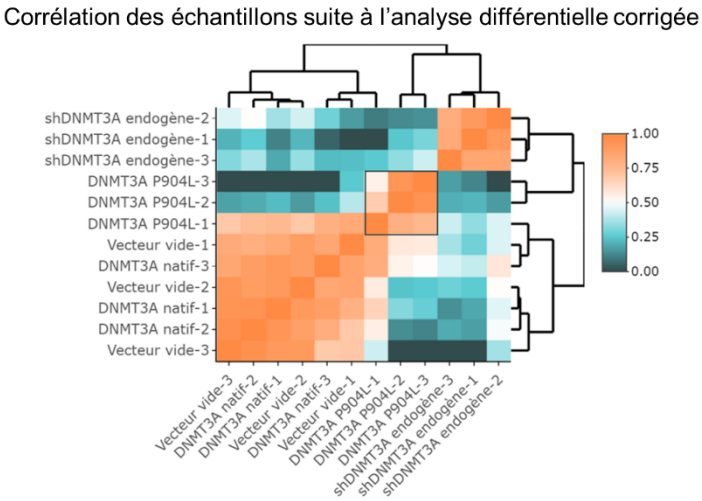

Figure 34 : Regroupement des échantillons après le filtre final
« Heatmap » des échantillons selon les 239 gènes dont l'expression est affectée uniquement par le mutant P904L. Graphique produit avec le module « heatmaply » dans R.

3.4.2 – Test d'enrichissement de termes *Gene Ontology* (GO)

Pour évaluer l'impact des changements d'expression causé par le mutant P904L, j'ai fait une analyse d'enrichissement de termes GO dans le but de déterminer la signification de l'expression différentielle de gènes. Dans la Figure 35, on voit l'enrichissement de voies métaboliques pour les 239 gènes affectés par le mutant P904L seulement.

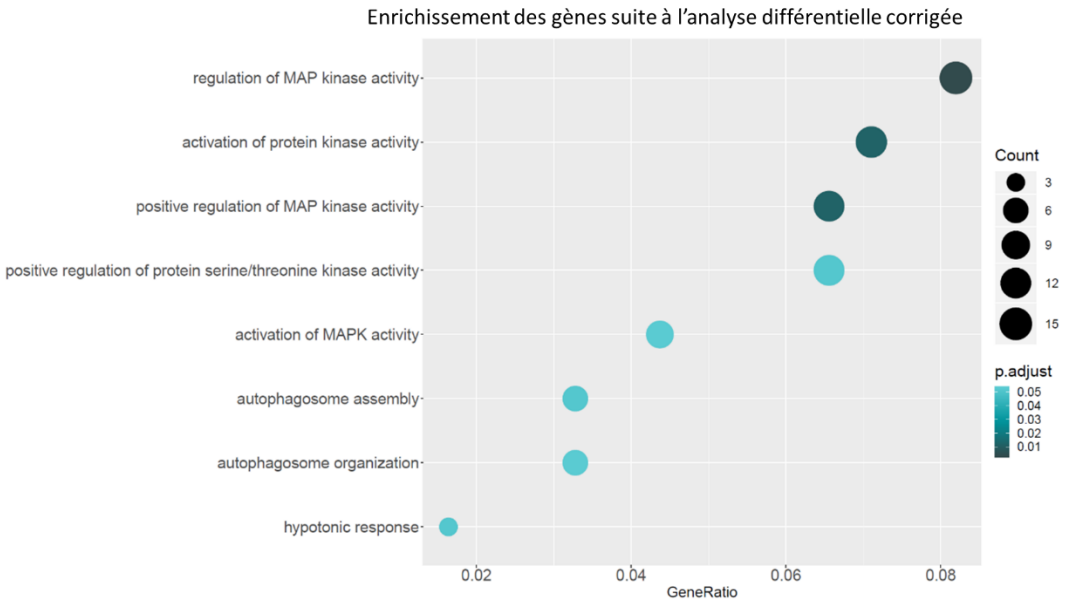

Figure 35 : Enrichissement des 239 gènes restants à la suite de l'analyse différentielle corrigée
Graphique des voies métaboliques enrichies dans le groupe de gènes différentiellement exprimés entre DNMT3A natif et le mutant P904L, mais non différentiellement exprimés entre DNMT3A natif et le vecteur vide. (Figure obtenue avec le module ClusterProfiler dans R, vu le faible nombre de gènes, le seuil de la valeur p est de 0,1)

Les gènes affectés par le mutant P904L sont peu nombreux et le seuil de la valeur p doit être augmenté à 0,1. Les principales voies affectées, comme présentées à la Figure 35, sont en relation avec les MAP kinases. On voit aussi quelques voies impliquées dans l'autophagie.

À fin de comparaison, j'ai aussi fait l'enrichissement des 953 gènes différentiellement exprimés entre le mutantP904L et DNMT3A natif (Figure 36)

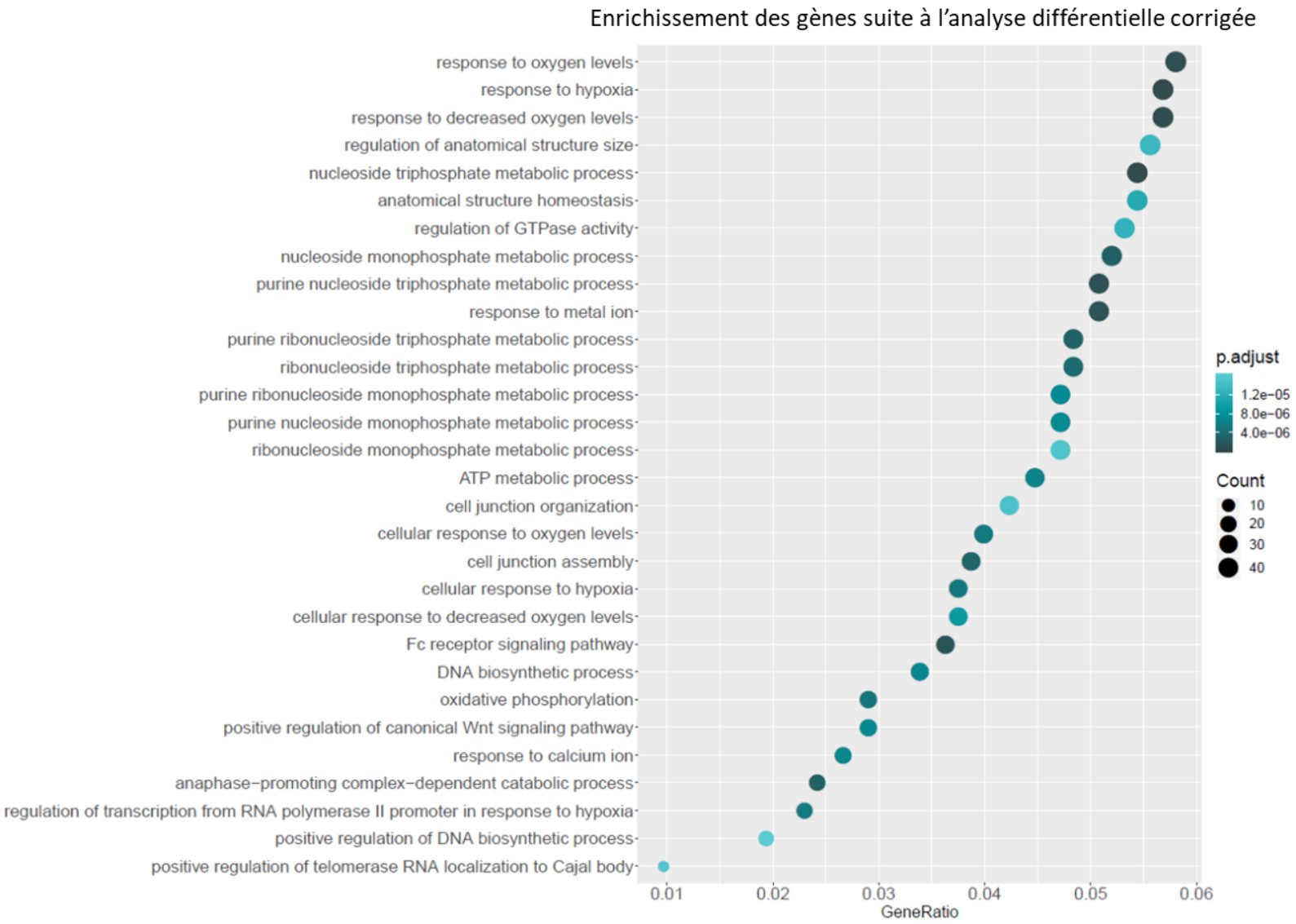

Figure 36 : Enrichissement des 953 gènes restants à la suite de l'analyse différentielle

Graphique des 30 voies métaboliques les plus enrichies dans le groupe de gènes différentiellement exprimés entre DNMT3A natif et le mutant P904L. (Figure obtenue avec le module ClusterProfiler dans R, le seuil de la valeur p est de 0,05)

Dans ce cas-ci (Figure 36), on observe une trentaine de voies métaboliques enrichies. Pour simplifier l'interprétation de ce résultat, j'ai utilisé l'outil REVIGO pour regrouper et visualiser les termes GO de l'enrichissement [136]. La Figure 37 présente cet enrichissement.

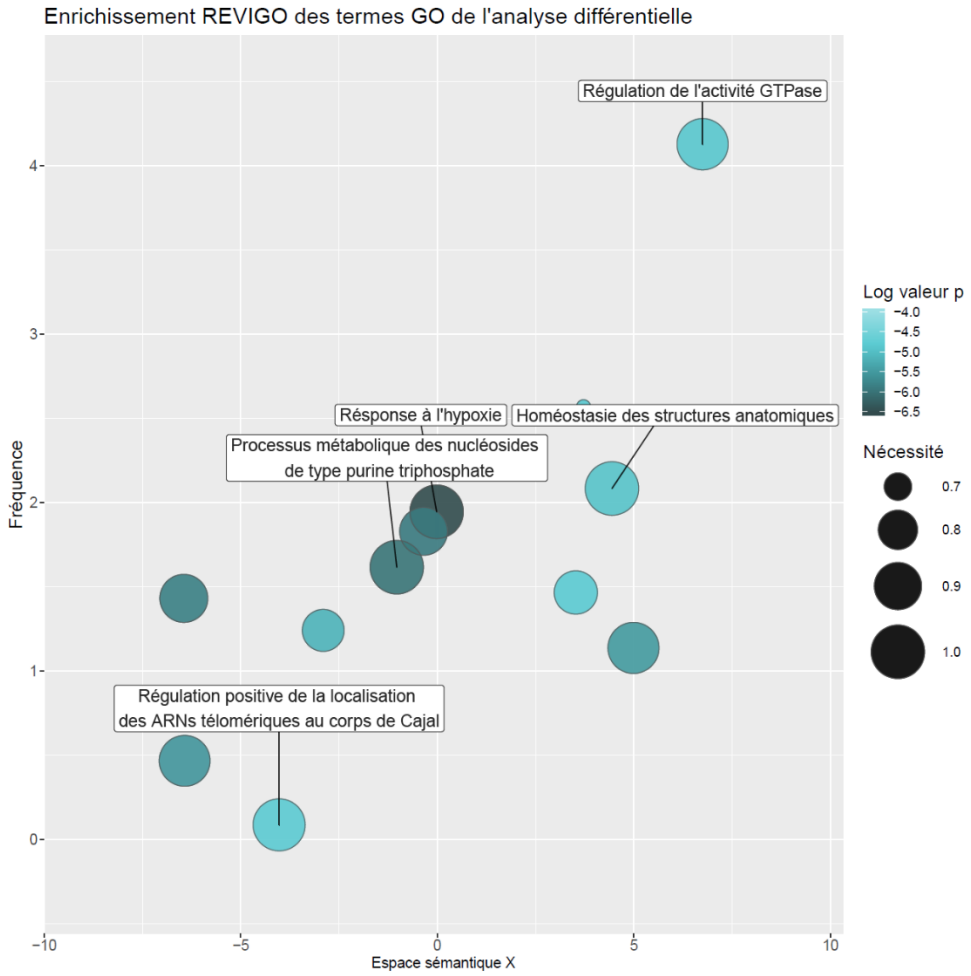

Figure 37 : Enrichissement et visualisation des termes GO

Graphique des voies métaboliques les plus enrichies dans le groupe de termes GO. Le seuil de nécessité est de 0,3, les valeurs au-dessus de ce seuil sont groupées avec le terme GO le plus proche. (La valeur seuil de la valeur p est de 0,05.)

La Figure 37 présente les voies métaboliques qui représentent le mieux les gènes différentiellement exprimés entre le mutant P904L et DNMT3A natif. Notamment, le processus de réponse à l'hypoxie, la synthèse des nucléosides particulièrement les purines, l'homéostasie des structures anatomiques, la régulation de l'activité GTPase et la régulation de la localisation des ARNs télomériques au niveau du corps de Cajal.

3.4.3 – Expression des gènes candidats chez le patient TC0040

Les 20 gènes les plus différentiellement exprimés entre le mutant P904L et DNMT3A natif sont utilisés pour comparer les valeurs d'expression du patient TC0040 avec celles d'autres tumeurs de Wilms (Figure 38).

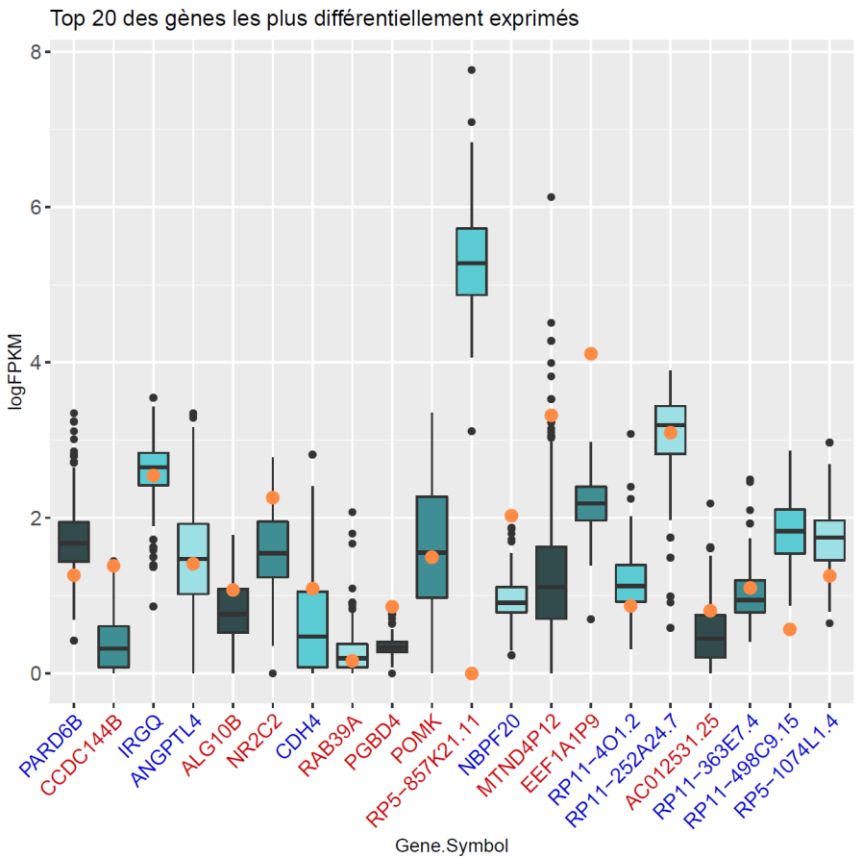

Figure 38 : Expression chez le patient des gènes les plus différentiellement exprimés
Comparaison entre l'expression du patient TC0040 et la cohorte TARGET pour les tumeurs de Wilms. L'expression du patient est représentée par le point orange pour chacun des gènes. Les boîtes à moustache représentent l'expression du gène dans la cohorte TARGET pour les tumeurs de Wilms. Les gènes en rouge sont surexprimés entre le mutant P904L et DNMT3A natif alors que ceux en bleu sont réprimés. Les gènes choisis représentent le top 10 des gènes surexprimés et le top 10 des gènes réprimés dans les 239 gènes différentiellement exprimés dans le mutant seulement.

La Figure 38 présente les gènes les plus différentiellement exprimés selon la valeur de FC, les 20 gènes choisis représentent les 10 plus grandes valeurs de FC et les 10 plus petites valeurs de FC. Il est aussi possible de comparer les 20 gènes avec les plus petites valeurs p (Figure 39).

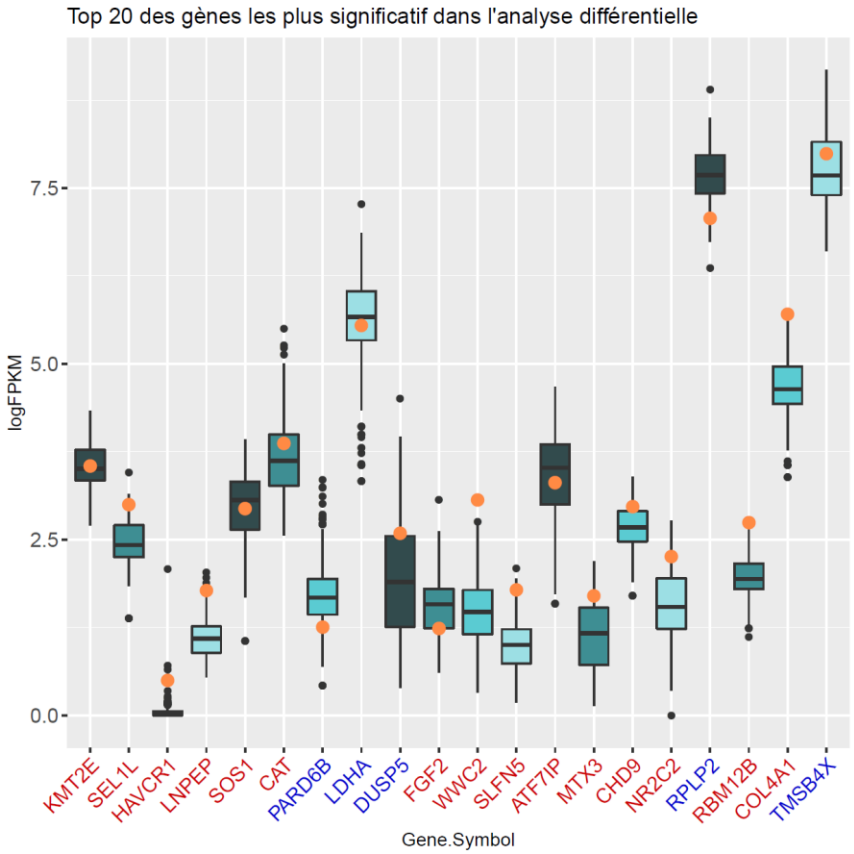

Figure 39 : Expression chez le patient des 20 gènes les plus significatifs dans l'analyse différentielle
Comparaison entre l'expression du patient TC0040 et la cohorte TARGET pour les tumeurs de Wilms. L'expression du patient est représentée par le point orange pour chacun des gènes. Les boîtes à moustache représentent l'expression du gène dans la cohorte TARGET pour les tumeurs de Wilms. Les gènes en rouge sont surexprimés entre le mutant P904L et DNMT3A natif alors que ceux en bleu sont réprimés. Les gènes choisis représentent le top 20 des gènes ayant la plus petite valeur p dans les 239 gènes différentiellement exprimés dans le mutant seulement.

Dans les Figure 38 et Figure 39, on constate que certains gènes ne sont pas différentiellement exprimés dans le patient par rapport à la cohorte (12 gènes). Cinq gènes sont exprimés en sens contraire entre le mutant et le patient soit CDH4, RP5-857K21.11, NBPF20, DUSP5 ET FGF2. Les 23 gènes restants ont des valeurs d'expression chez le patient en dehors de la boîte définie par le premier et troisième quartile des valeurs de la cohorte. Pour six gènes, les valeurs d'expression sont particulièrement éloignées de la cohorte : le gène PGBD4 (valeur FPKM : 1,36, percentile : 99), le gène MTND4P12 (valeur FPKM : 26,8, percentile : 95), le gène EEF1A1P9 (valeur FPKM : 60,3, percentile : 99), le gène RP11-498C9.15 (valeur FPKM : 0,8, percentile : 1), le gène HAVCR1 (valeur FPKM : 0,7, percentile : 1) et le gène WWC2 (valeur FPKM : 20,5, percentile : 99).

En révisant la littérature sur le syndrome de Tatton-Brown et le rôle de la mutation R882 dans différents cancers, j'ai identifié 97 gènes susceptibles d'être affectés par DNMT3A en situation pathologique. Sur ces 97 gènes, 11 sont différentiellement exprimés entre le mutant P904L et DNMT3A natif et seulement deux sont seulement affectés par le mutant (Figure 40).

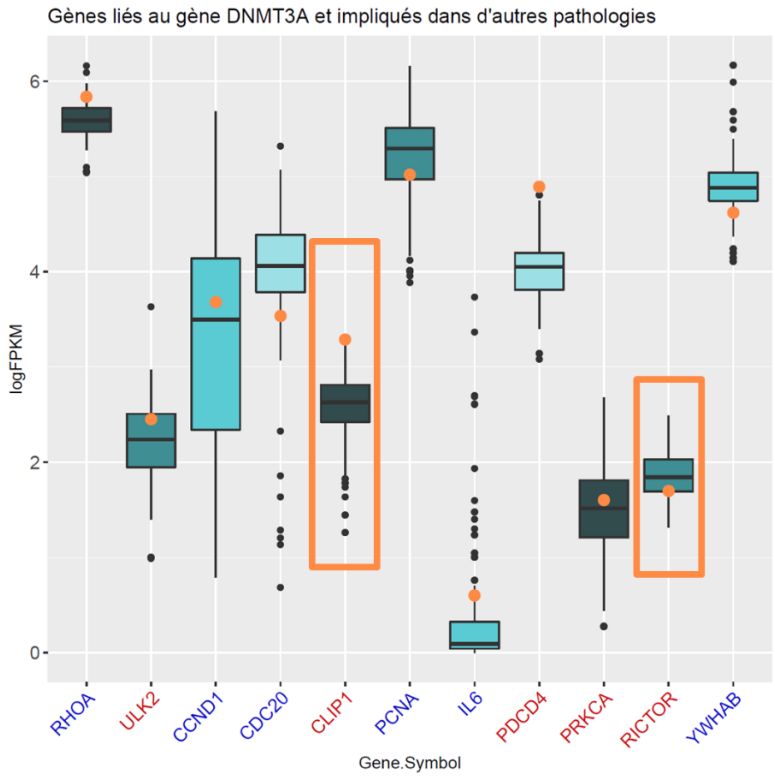

Figure 40 : Expression chez le patient des gènes liés à DNMT3A et impliqués dans d'autres pathologies
Comparaison entre l'expression du patient TC0040 et la cohorte TARGET pour les tumeurs de Wilms. L'expression du patient est représentée par le point orange pour chacun des gènes. Les boîtes à moustache représentent l'expression du gène dans la cohorte TARGET pour les tumeurs de Wilms. Les gènes en rouge sont surexprimés entre le mutant P904L et DNMT3A natif alors que ceux en bleu sont réprimés. Les deux rectangles orange représentent les deux gènes affectés par le mutant P904L seulement.

Dans la Figure 40, on constate deux gènes pour lesquels les valeurs d'expression sont particulièrement éloignées de la cohorte : le gène CLIP1 (affecté uniquement par le mutant P904L) (valeur FPKM : 25,9, percentile : 99) et le gène PDCD4 (valeur FPKM : 132,0, percentile : 99). Le gène RICTOR, aussi affecté uniquement par le mutant P904L, est au rang percentile 8 de la cohorte avec une valeur de FPKM de 4,5. Les gènes RHOA et IL6 sont surexprimés dans le patient alors qu'ils sont réprimés dans la comparaison du mutant P904L et de DNMT3A natif.

3.5 – Analyse de l'impact fonctionnel du mutant P904L

3.5.1 – Essai clonogénique

Le cancer est une maladie dont la progression s'appuie sur la capacité clonale des cellules. Lors d'un essai clonogénique, on teste ce potentiel en déposant un nombre précis d'une solution cellulaire dissociée en cellules uniques (*single cell*) et en observant le nombre de cellules produisant une colonie. La Figure 41 présente l'efficacité d'implantation des différentes lignées cellulaires. L'efficacité d'implantation est calculée avec le nombre de colonies final selon le nombre de cellules mises en culture au départ.

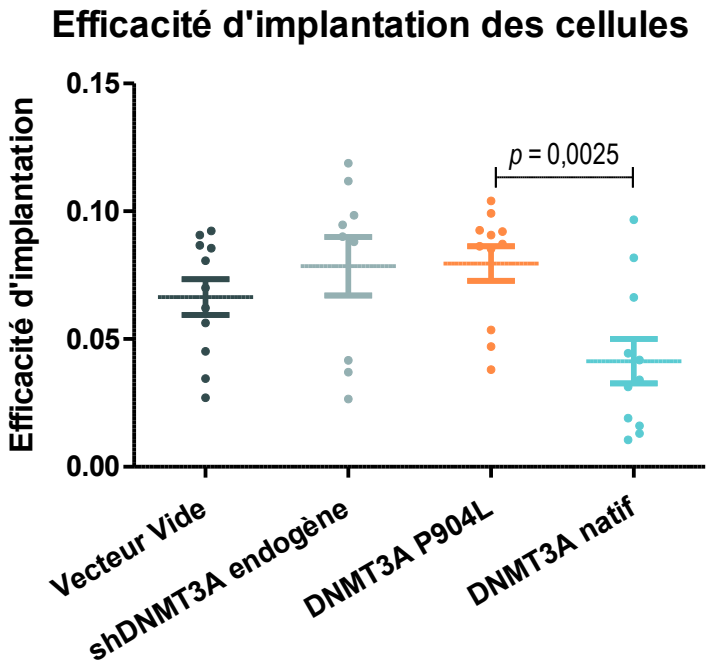

Figure 41 : Efficacité d'implantation des cellules en essai clonogénique
L'efficacité d'implantation est calculée en fonction du nombre de cellules déposées dans la plaque au jour 0. Valeur p (p-value) calculée avec un test de Student.

Les cellules surexprimant DNMT3A P904L ont un taux d'implantation 92 % plus élevé que les cellules surexprimant DNMT3A natif (p=0,002 5) (Figure 41). Le mutant P904L a une valeur d'implantation moyenne de 0,08 alors que DNMT3A natif a une valeur moyenne de 0,04. Les cellules qui expriment le shDNMT3A (m=0,079) ont aussi un taux d'implantation 18 % plus élevé que le vecteur vide (m=0,066), mais cette différence n'est pas significative (p=0,36). On observe que le mutant P904L a un effet semblable au shDNMT3A sur la capacité clonale des cellules.

3.5.2 – Test de la capacité de migration cellulaire

La tumeur du patient est à un stade métastatique. Pour atteindre un tel état, les cellules doivent acquérir une certaine capacité de migration. Pour évaluer l'impact de la mutation P904L sur la capacité migratoire des cellules, j'ai fait deux tests de migration (Figure 42) soit un test de migration par plaie et un test de migration de type Transwell®. Le premier est un test où l'on fait une plaie dans une monocouche de cellules puis l'on calcule la vitesse de rapprochement des bords de la plaie. Le deuxième test estime la capacité des cellules à migrer à travers les pores d'une membrane. Dans le test par Transwell®, les cellules migrent vers un agent chimioattractant. Elles effectuent un mouvement migratoire en trois dimensions alors que dans la migration par plaie, le mouvement migratoire est en deux dimensions et sans agent chimioattractant [137].

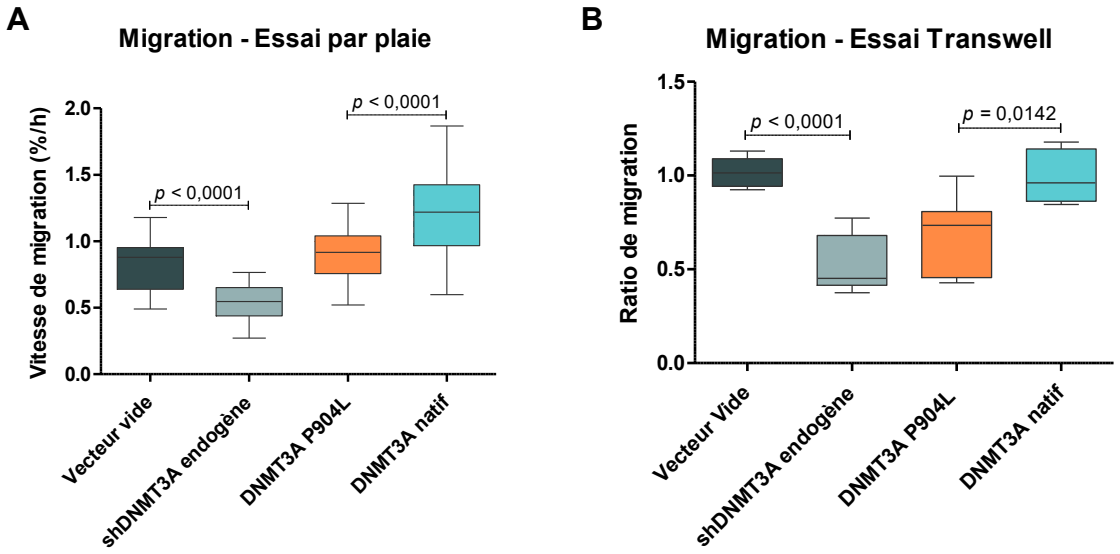

Figure 42 : Migration des cellules

Représentation des deux tests utilisés pour évaluer la capacité de migration des cellules. ***A) Vitesse de migration.*** *Graphique de la vitesse de migration des cellules dans l'essai de migration par plaie. La vitesse est calculée avec le pourcentage de confluence des cellules en fonction du temps. Les cellules ont une confluence d'au moins 75 % avant les plaies.* ***B) Migration par Transwell®.*** *La capacité de migration des cellules est calculée par rapport au vecteur vide dont le ratio de migration est fixé à 1,0. Les cellules DNMT3A natif ont un ratio de 1,0, les cellules DNMt3A P904L ont un ratio de 0,65 et les cellules avec le shARN ont un ratio de 0,5. Les valeurs ont été calculées à l'aide d'un test de Student.*

La Figure 42A montre que les cellules avec le mutant P904L migrent 24 % moins vite que celle avec le DNMT3A natif (p <0,000 1). La valeur moyenne de migration pour le mutant P904L est de 0,9 %/h alors que celle de DNMT3A natif est de 1,2 %/h. L'expression du shARN contre DNMT3A endogène cause également une diminution de 36 % de la migration (p <0,000 1). La Figure 42B montre que les cellules avec

le mutant P904L ont une diminution de 31 % du ratio de migration si nous comparons avec les cellules DNMT3A natif (p = 0,014 6). Le ratio moyen de migration pour le mutant P904L est de 0,68 alors que celui de DNMT3A natif est de 0,99. L'expression du shARN contre DNMT3A endogène cause également une diminution de 49 % du ratio de migration (p <0,000 1). Les résultats obtenus pour les deux tests vont dans le même sens. Toutefois, lors de l'essai de migration par plaie, on observait une augmentation de migration dans les cellules DNMT3A natif qui n'est pas observée dans l'essai de migration par Transwell®.

3.5.3 – Essai de prolifération

La croissance incontrôlée des cellules est un facteur important dans le développement des tumeurs. Les cellules acquièrent souvent des mutations qui leur donnent une capacité de prolifération accrue. Pour évaluer l'impact de la mutation P904L, j'ai fait un essai de prolifération présenté à la Figure 43. J'ai aussi comparé le temps requis pour que la population de cellules double (Figure 44).

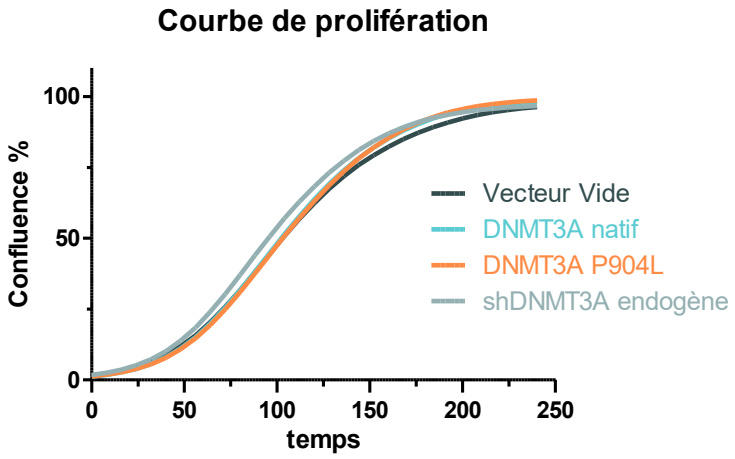

Figure 43 : Courbe logarithmique moyenne de la prolifération des lignées cellulaires
La courbe de prolifération des cellules rapporte le pourcentage de confluence en fonction du temps. Les courbes de prolifération ont la même allure et ne sont pas significativement différentes entre les échantillons. Les valeurs p ont été calculées avec un test de Students.

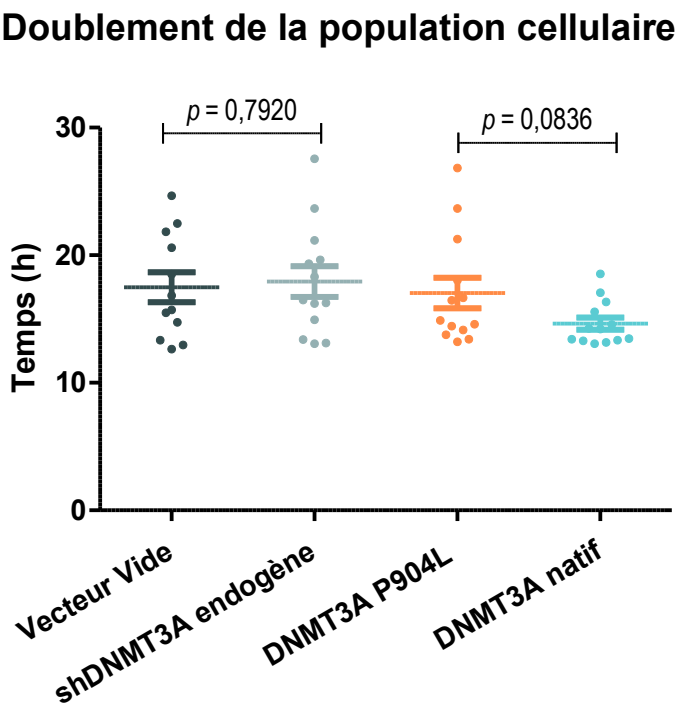

Figure 44 : Temps de doublement des cellules

Le temps de doublement de la population cellulaire est établi à l'aide d'un modèle logistique. Bien que les cellules DNMT3A natif semblent doubler dans un laps de temps plus court, la différence entre les échantillons est non significative. Les valeurs p ont été calculées avec un test de Student.

Les cellules avec la mutation P904L ne prolifèrent pas de façon significativement différente des autres cellules (Figure 44). La surexpression de DNMT3A natif a un temps moyen de doublement de 15 heures alors que les cellules du mutant P904L ont un temps de doublement moyen de 17 heures. La différence n'est cependant pas significative (p=0,083 6). Le vecteur vide et le shDNMT3A ont des temps de doublement moyen de 17 heures et 18 heures respectivement. La différence n'est pas significative (p=0,792).

3.5.4 – Mesure de l'activité méthyltransférase

La fonction première des DNMTs est la méthylation de l'ADN. Comme la mutation P904L est localisée dans le domaine catalytique de DNMT3A, il est probable qu'elle ait un impact sur son activité enzymatique. La Figure 45 montre les résultats du test conçu pour mesurer l'activité méthyltransférase des DNMTs utilisé pour évaluer cet impact.

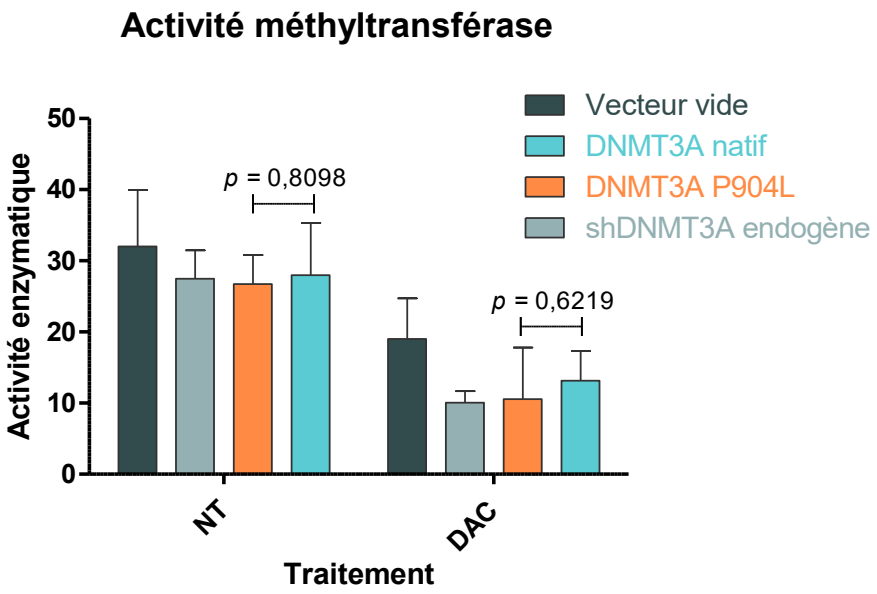

Figure 45 : Test d'activité méthyltransférase des DNMTs
Niveau d'activité méthyltransférase des différents échantillons en fonction du traitement (NT : échantillon non traité; DAC : échantillon traité avec 100 nM de décitabine durant 72h). Les valeurs p ont été calculées avec un test de Student.

L'activité de méthylation observée ne change pas significativement entre les différentes lignées cellulaires (Figure 45). L'activité de méthylation observée dans la lignée cellulaire surexprimant DNMT3A natif n'est pas significativement différente de celle du vecteur vide (27,9 et 32,0 respectivement, p = 0,550 5). De même, la lignée cellulaire exprimant le shDNMT3A endogène n'a pas de différence notable avec le niveau du vecteur vide (27,5 et 32,0 respectivement, p = 0,426 6). Le traitement préalable avec la décitabine réduit l'activité globale de méthylation, mais ne permet pas de distinguer les lignées cellulaires de façon significative. Cette expérience n'a pas permis de mettre en évidence un impact de la mutation P904L sur l'activité de la protéine DNMT3A. Toutefois, il faut noter que ce test ne discrimine pas entre les différentes DNMTs et que, comme mentionné plus tôt, la DNMT1 est responsable de 90 % de l'activité méthyltransférase de la cellule. Les limites de ce test seront discutées plus loin.

3.6 – Impact des agents thérapeutiques

3.6.1 – Essai d'apoptose

Comme le patient a rechuté pendant son traitement, j'ai voulu vérifier l'impact de la mutation sur la résistance à l'apoptose. Pour ce faire, deux agents thérapeutiques ont été sélectionnés pour cette expérience. La vincristine fait partie du protocole classique de traitement des tumeurs de Wilms et la décitabine a été proposée comme option thérapeutique dans le rapport remis à l'équipe de soins du patient avec la mutation P904L (Figure 25).

3.6.1.1 – Essai d'apoptose avec la vincristine

La Figure 46 présente les résultats d'apoptose 72 heures suivant le traitement des cellules avec la vincristine.

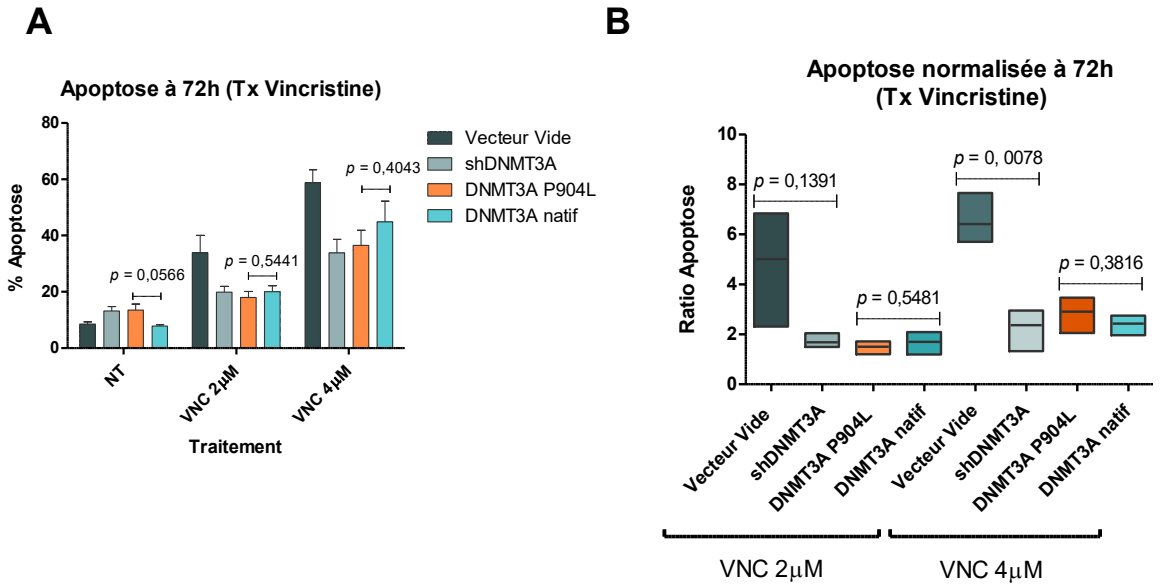

Figure 46 : Apoptose normalisée à 72 heures et apoptose à 72h, normalisée sur le non-traité, pour le traitement à la vincristine.
A) Pourcentage d'apoptose dans les cellules en fonction de la dose de vincristine. *T-test effectué pour évaluer la différence entre le mutant P904L et DNMT3A natif.* ***B) Ratio d'apoptose normalisé selon l'essai non traité.*** *T-test effectué pour évaluer la différence entre le mutant P904L et DNMT3A natif.*

Lorsque l'on quantifie et normalise l'apoptose 72 heures après l'addition de vincristine, on observe peu d'impact de la mutation P904L (Figure 46B). À une dose de 2µM de vincristine, le mutant a un ratio d'apoptose de 1,6 alors que DNMT3A a un ratio de 1,7 et donc une différence non significative entre les deux conditions (p = 0,5481). Lorsque la dose est augmentée à 4µM, le mutant a un ratio d'apoptose de 2,9 alors que DNMT3A natif a un ratio de 2,4. Encore une fois, la différence n'est pas significative (p = 0,3816). Toutefois, on remarque que la différence entre le vecteur vide et le shDNMT3A est significative (p = 0,0078). Le vecteur vide a un ratio d'apoptose 1,7 X plus élevé que le shDNMT3A.

Une autre méthode d'analyse est de mesurer et de comparer l'aire sous la courbe des différents échantillons [138-140]. La Figure 47 présente les résultats de ce type d'analyse pour le traitement à la vincristine.

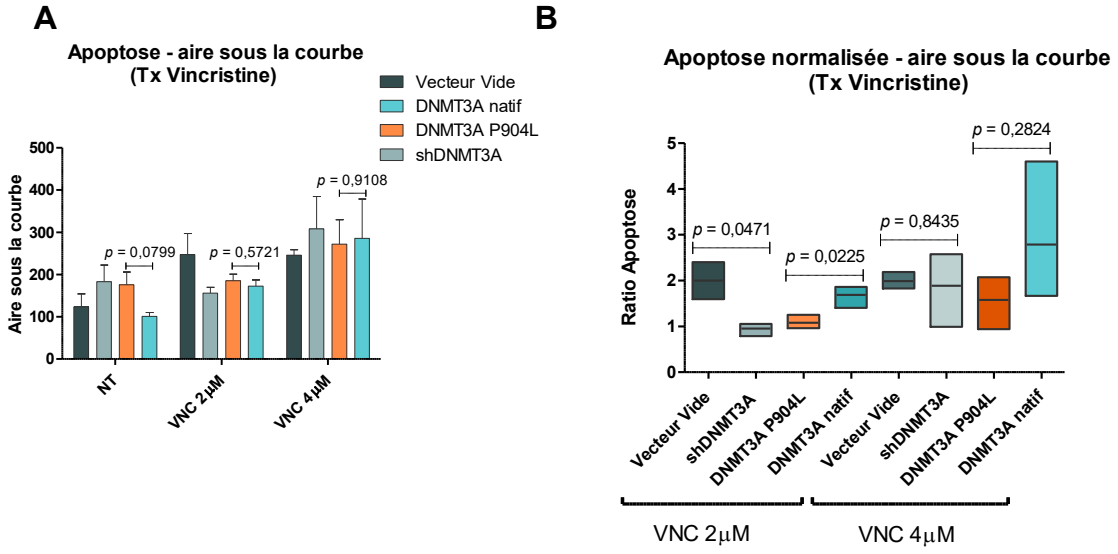

Figure 47 : Aire sous la courbe pour l'apoptose des cellules traitées à la vincristine
A) Aire sous la courbe des différentes doses de vincristine. *Différences non significatives entre le mutant P904L et DNMT3A natif, les valeurs p sont déterminées à l'aide d'un t-test.* ***B) Aire sous la courbe normalisée par rapport à l'essai non traité.*** *Différences statistiques calculées à l'aide d'un t-test. Différence significative entre les cellules du mutant P904L et le DNMT3A natif pour la dose de 2µM de vincristine.*

On observe que l'aire sous la courbe pour le mutant P904L est significativement inférieure à celle de DNMT3A natif à de plus faibles doses de vincristine (Figure 47B). Cet effet disparaît lorsque l'on observe uniquement les données à 72 heures ou à 48 heures (Annexe A — 7.1.3 – Essai d'apoptose). À une dose de 2µM de vincristine, le mutant P904L obtient un ratio moyen d'apoptose 35 % plus petit que le ratio moyen du DNMT3A natif soit respectivement un ratio de 1,1 et de 1,7. Cette différence entre les deux

conditions est significative (p = 0,0225). On remarque aussi que la différence entre le vecteur vide et le shDNMT3A est significative (p = 0,0471). Le vecteur vide a un ratio d'apoptose 2X plus élevé que le shDNMT3A. Lorsque la dose est augmentée à 4µM, la différence n'est pas significative (p = 0,2824) bien que le ratio moyen du mutant P904L soit 43 % plus petit que celui de DNMT3A natif.

3.6.1.2 – Essai d'apoptose avec la décitabine

La décitabine a été proposée comme option thérapeutique pour le patient. La Figure 48 présente les résultats obtenus lors des essais d'apoptose suite au traitement à la décitabine.

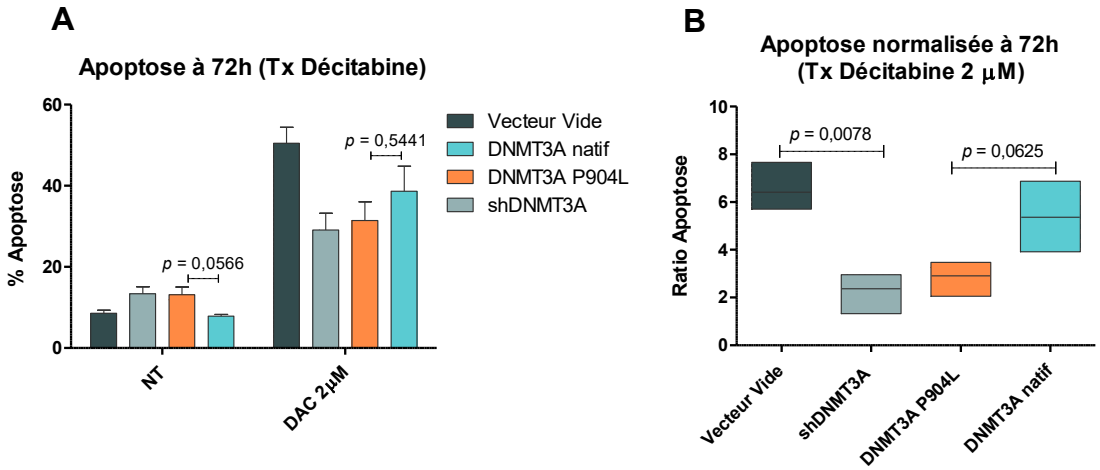

Figure 48 : Apoptose normalisée à 72 heures et apoptose à 72h, normalisée sur le non-traité, pour le traitement à la décitabine

A) pourcentage d'apoptose dans les cellules en fonction de la dose de décitabine. *T-test effectué pour évaluer la différence entre le mutant P904L et DNMT3A natif.* ***B) Ratio d'apoptose normalisé selon l'essai non traité.*** *Le test de Student entre le mutant P904L et DNMT3A natif révèle une tendance vers un ratio plus bas d'apoptose dans le mutant.*

Les cellules traitées à la décitabine démontrent une diminution de 46 % du taux d'apoptose dans le mutant P904L par rapport à DNMT3A natif qui ont des ratios d'apoptose de 2,9 et de 5,4 respectivement (Figure 48B). Toutefois, cette diminution n'est pas significative (p = 0,0625). Les cellules du shDNMT3A ont une diminution significative de 63 % en comparaison avec le vecteur vide (p = 0,0078).

La Figure 49 présente les résultats à la suite de l'analyse de l'aire sous la courbe pour les données d'apoptose suite au traitement avec la décitabine.

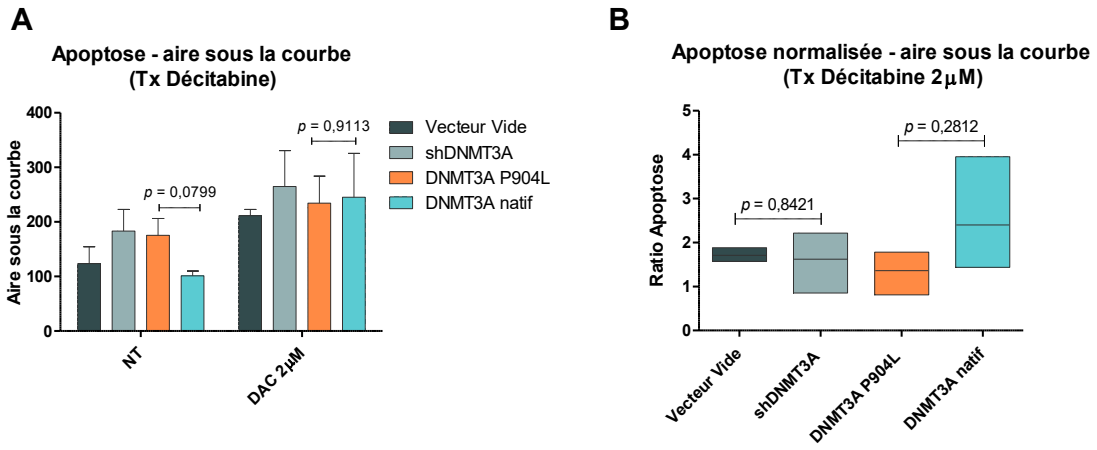

Figure 49 : Apoptose des cellules selon l'aire sous la courbe pour la décitabine
A) Aire sous la courbe des différentes doses de Décitabine. *Différences non significatives entre le mutant P904L et DNMT3A natif, les valeurs p sont déterminées à l'aide d'un t-test.* ***B) Aire sous la courbe normalisée sur l'essai non traité.*** *Différences statistiques calculées à l'aide d'un t-test.*

Les cellules du mutant P904L ont tendance à avoir un taux d'apoptose plus bas (Figure 49B). Bien que non significatif (p = 0,2812), ce résultat concorde avec ceux obtenus lorsque l'on observe le niveau d'apoptose à 72 heures (Figure 48B). Les cellules du mutant P904L ont un ratio d'apoptose 42 % plus petit que les cellules DNMT3A natif, soit des ratios respectifs de 1,4 et 2,4. Contrairement à l'analyse de l'apoptose à 72h, on ne voit pas de diminution du taux d'apoptose entre le vecteur vide et le shDNMT3A.

3.6.2 – Essai clonogénique avec agents thérapeutiques

Comme mentionné plus tôt, l'essai clonogénique permet de mesurer la capacité de renouvellement des cellules. Cet essai permet aussi d'évaluer l'impact des agents thérapeutiques sur les cellules. J'ai donc testé les deux mêmes agents thérapeutiques que pour les tests d'apoptoses dans un essai clonogénique pour lequel les cellules étaient déposées en plaque avant le traitement. La Figure 50 présente les données de l'essai clonogénique avec traitement des cellules avec la vincristine.

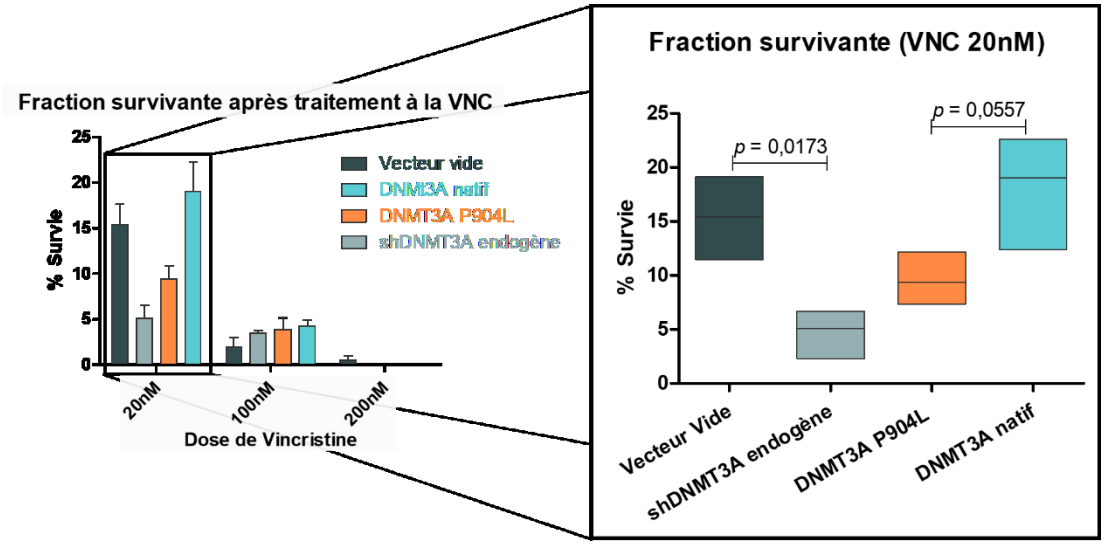

Figure 50 : Taux de survie dans les cellules traitées à la vincristine

Le pourcentage de survie est établi en fonction du nombre de cellules dans les puits non traités (DMSO) et les puits traités avec la vincristine. Les valeurs p sont calculées à l'aide d'un test de Student.

Bien que la différence soit non significative (p = 0,0557), le mutant P904L a une survie réduite de 51 % par rapport aux cellules DNMT3A natif (Figure 50). Le pourcentage moyen de survie du mutant P904L est de 9,4 % alors que le DNMT3A natif a un pourcentage moyen de survie de 19 %. On remarque aussi que le shDNMT3A est significativement différent du vecteur vide avec une diminution de 67 % de la survie.

La Figure 51 présente les pourcentages de survie des différentes lignées cellulaires lors de l'essai clonogénique avec traitement à la décitabine.

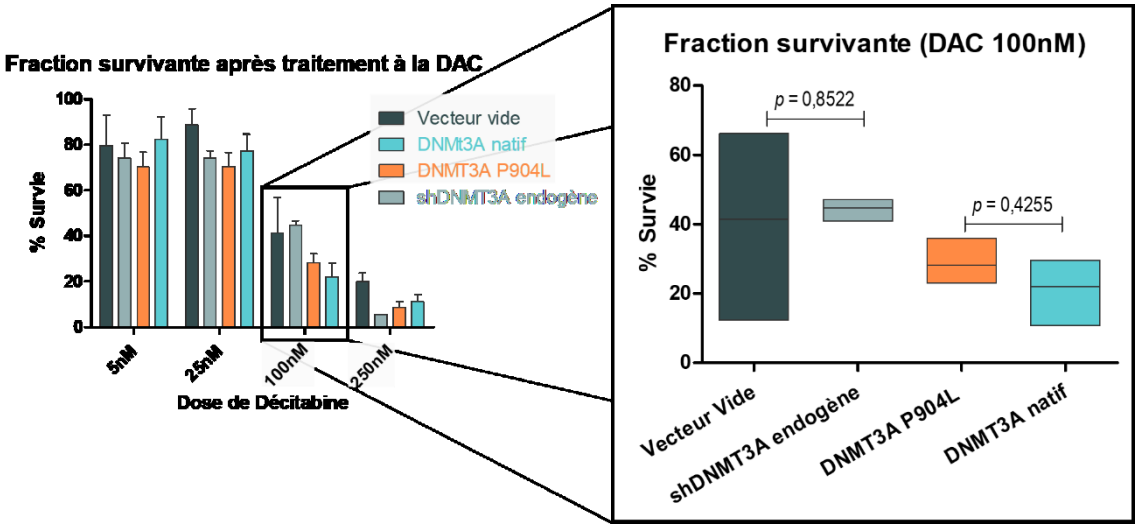

Figure 51 : Pourcentage de survie dans les cellules traitées à la décitabine

Le pourcentage de survie est établi en fonction du nombre de cellules dans les puits non traités (PBS) et les puits traités avec la décitabine. Les valeurs p sont calculées à l'aide d'un test de Student.

Le mutant P904L et DNMT3A ne sont pas significativement différents (p = 0,4255) (Figure 51). Le pourcentage moyen de survie du mutant P904L est de 28 % alors que le DNMT3A natif a un pourcentage moyen de survie de 22 %. En général, les cellules ACHN sont plus sensibles à la vincristine qu'à la décitabine.

Section 4 — Discussion

4.1 – Le mutant P904L cause une perte de fonction de DNMT3A

4.1.1 – Contexte de la mutation

Mon projet avait pour but d'étudier la mutation P904L dans le gène *DNMT3A.* Cette mutation a été identifiée chez un patient atteint d'une tumeur de Wilms et se trouve dans un contexte d'homozygotie puisque l'allèle sauvage avait été perdu dans la tumeur. C'est la première fois que cette mutation est retrouvée dans une tumeur de Wilms. Par contre, la mutation P904L a été répertoriée dans 16 autres cancers et deux fois comme causatrice du syndrome de Tatton-Brown. Toutefois, l'impact de cette mutation n'a jamais été caractérisé ni sur l'activité enzymatique de DNMT3A ni dans l'oncogenèse.

A l'aide d'une combinaison d'approches, j'ai démontré que le mutant P904L entraîne une perte de fonction de l'enzyme DNMT3A. Les études d'expression ont montré que les gènes différentiellement exprimés dans le mutant sont enrichis pour des voies métaboliques propres au cancer, incluant celle des MAP kinases, la réponse au stress comme l'hypoxie et de la synthèse de nucléosides. La majorité des gènes affectés par la surexpression de la protéine mutante dans les cellules ACHN sont similairement affectés chez le patient TC0040 démontrant la pertinence de ce système. Les études fonctionnelles montrent que le mutant P904L se comporte de la même façon que l'inhibition de *DNMT3A* dans la majorité des phénotypes étudiés. On peut donc conclure que le mutant P904L cause une perte de fonction de la protéine DNMT3A. Cette perte de fonction engendre une augmentation de la capacité clonale, une diminution de la capacité migratoire et semble avoir un impact sur la sensibilité aux agents thérapeutiques. Le mutant P904L ne semble pas contribuer à la propagation de la tumeur puisqu'il diminue la capacité migratoire des cellules.

Les résultats obtenus nous permettent d'émettre certaines hypothèses sur l'impact du mutant P904L sur le développement tumoral, particulièrement dans le contexte de la tumeur de Wilms et du développement de la résistance aux traitements.

4.2 – Impacts du mutant P904L

4.2.1 – Impact du mutant P904L sur la fonction de l'enzyme DNMT3A

4.2.1.1 – Le mutant P904L augmente la présence d'une isoforme de DNMT3A

Nos résultats montrent que la mutation P904L n'empêche ni la transcription ni la traduction du gène. Toutefois, on remarque la présence d'une bande, d'un poids moléculaire plus faible que la protéine native, à environ 85kDa chez le mutant. Il est peu probable qu'elle soit la résultante de modifications post-traductionnelles sur la protéine comme la phosphorylation ou la sumoylation qui ont plutôt tendance à augmenter le poids moléculaire [141]. L'isoforme de DNMT3A, DNMT3A2 a un poids moléculaire de 81 kDa et pourrait être à l'origine de la deuxième bande observée [142]. Toutefois, l'anticorps utilisé reconnaît la partie N-terminale et ne devrait donc pas détecter cette isoforme. Il est aussi possible que la mutation déstabilise la protéine et cause une dégradation. Toutefois, ce cas de figure est généralement distingué par la présence d'une traînée (*« smear »*) ou d'une multitude de bandes de plus faible poids moléculaire que la bande recherchée. Bien que la protéine ne semble pas dégradée, il est possible que la présence de la mutation provoque un clivage spécifique. Ce type de clivage a déjà été observé chez les DNMTs et peut mener à la suractivation de l'activité méthyltransférase [143].

La fonction de *DNMT3A2* a surtout été étudiée dans les cellules neurales où l'expression de cette isoforme est associée aux fonctions mémorielles [74, 144]. DNMT3A2 est parfois localisé au niveau de la chromatine active contrairement à l'isoforme DNMT3A1 qui est majoritairement localisée sur la chromatine inactive [74]. DNMT3A2 interagit avec DNMT3L et le recruterait aux sites de méthylation [145]. DNMT3L agit comme cofacteur de DNMT3A et DNMT3B et est essentiel à la méthylation [8]. La surexpression de *DNMT3A2* et *DNMT3L* chez des souris cause une hyperméthylation de plusieurs loci après la naissance [146] et est létale chez les souriceaux. DNMT3A2 est présent dans les cellules souches, mais diminue suite à la différenciation cellulaire [72]. Il a aussi été démontré que l'isoforme DNMT3A2 est nécessaire pour la méthylation des régions soumises à l'empreinte parentale [146].

4.2.1.2 – Le mutant P904L enrichit des voies métaboliques liées au cancer

Au départ, nous voulions quantifier directement l'activité méthyltransférase globale du mutant dans les cellules. Toutefois, la redondance des activités méthyltransférases a grandement complexifié cette approche et nous avons opté pour évaluer l'impact du mutant par l'expression différentielle des gènes puisque la méthylation de l'ADN affecte la régulation de l'expression génique. Cette analyse montre que les gènes différentiellement exprimés en présence du mutant sont enrichis dans des voies métaboliques liées aux MAP kinases. Les MAP kinases englobent plusieurs gènes qui affectent une variété de caractéristiques propres au cancer. Cette voie métabolique est impliquée dans l'apoptose, la prolifération, la différenciation, la migration et l'inflammation [147]. Dans les cellules contenant le mutant P904L, on observe que la migration et l'apoptose semblent affectées. La prolifération n'est pas affectée. La différenciation et l'inflammation n'ont pas été testées.

On retrouve également un enrichissement au sein de cinq autres processus (Analyse non corrigée) : la réponse à l'hypoxie, le métabolisme des purines, la régulation de l'activité GTPase, la localisation des ARNs télomériques et l'homéostasie des structures anatomiques. Chacun de ces processus est connu pour affecter le développement ou la progression tumorale. La réponse à l'hypoxie est reliée au stress oxydatif qui est connu pour initier des changements épigénétiques et le développement tumoral dans le contexte rénal [148, 149]. La régulation du métabolisme des purines affecte la synthèse de l'ADN et donc la division cellulaire et la prolifération ainsi que les processus de réparation de l'ADN [150-152]. La régulation de l'activité GTPase a un impact sur la prolifération et la différenciation des cellules [153]. Des altérations dans cette voie métabolique ont été démontrées comme causatrices de l'initiation tumorale en affectant la voie des MAP kinases [153]. L'activité GTPase affecte aussi la structure d'actine de la cellule ce qui a un impact sur la migration et l'invasion [154]. Les structures cellulaires comme l'actine sont aussi affectées par le processus d'homéostasie des structures anatomiques. De plus, ce dernier est impliqué dans la régulation de la matrice extracellulaire, dont l'altération est connue pour contribuer au cancer [155, 156]. Finalement, l'accumulation d'ARN télomérique au corps de Cajal a été retrouvée dans certaines tumeurs et semble faciliter l'élongation des télomères [157] ce qui mène à l'immortalisation cellulaire et à la progression tumorale [157, 158].

4.2.2 – Impact du mutant P904L sur les fonctions classiques du cancer

4.2.2.1 – Le mutant P904L augmente la capacité clonale des cellules

Le mutant permet aux cellules une meilleure capacité clonale. L'inhibition de *DNMT3A* produit le même effet à une intensité moindre ce qui supporte l'hypothèse d'une mutation entraînant la perte de fonction de l'enzyme. L'augmentation de la capacité clonale contribue au développement tumoral en permettant la formation d'une sous-population ayant un avantage sélectif. Il a déjà été démontré que la perte de *DN*MT3A dans les cellules souches hématopoïétiques cause l'immortalisation de ce type cellulaire, et bloque la différenciation cellulaire [82]. La combinaison de ces deux caractéristiques génère une sous-population cellulaire engagée dans le processus tumoral. De plus, les mutations de *DNMT3A* sont connues pour apparaître tôt dans le développement tumoral [159]. Dans le cas des tumeurs de Wilms, l'augmentation de la capacité clonale tôt dans le développement ajouté à une possible diminution de la différenciation empêcherait la maturation des cellules rénales qui formeront alors une niche néphrologique [39].

4.2.2.2 – Le mutantP904L diminue la migration des cellules

Le mutant diminue la capacité de migration des cellules similairement à l'inhibition de *DNMT3A*. Cet impact a été démontré à l'aide de deux tests de migration ; l'essai par plaie qui représente une migration dans un espace en deux dimensions (2D) impliquant moins de déformation pour la cellule et l'essai Transwell® qui représente plutôt une migration en trois dimensions (3D) similaires au processus d'invasion [137]. Dans ces deux situations, la migration des cellules mutées est diminuée, ce qui laisse penser que le mutant n'est pas impliqué dans la propagation métastatique observée chez le patient. Le mutant n'aide pas à la migration ou à l'invasion et semblerait plutôt avoir un effet protecteur sur ce type de phénotype. Dans le contexte du patient, on peut supposer que la capacité de métastase serait déterminée par d'autres altérations.

4.2.3 – Le mutant P904L module la sensibilité à différents agents thérapeutiques

Lorsque traitées avec de la vincristine, les cellules avec la mutation P904L ont un taux d'apoptose diminuée ce qui démontre une perte de sensibilité à cet agent. Toutefois, comme les résultats de survie clonale démontrent une plus faible survie chez le mutant P904L, il semblerait que la vincristine ne cause pas directement la mort cellulaire chez le mutant P904L, mais plutôt limite sa croissance et son potentiel clonogénique. Ce comportement pourrait expliquer la réponse initiale au traitement suivi d'une rechute lors de l'arrêt du traitement.

4.2.3.1 – Le mutant P904L module la réponse à la vincristine

Le patient a reçu un traitement standard pour les tumeurs de Wilms c'est-à-dire une combinaison de vincristine et d'actinomycine D avec ablation chirurgicale de la tumeur. Suivant ce traitement, le patient a rechuté avec métastases aux poumons. Nous avons démontré que le mutant P904L avait une perte de sensibilité à l'apoptose causée par la vincristine. Et ce, bien que la vincristine réduise la capacité clonale des cellules mutées. Il est donc possible que les cellules cessent leur expansion clonale ce qui mettrait la tumeur en « pause », sans pour autant mourir. Lors de l'arrêt du traitement, les cellules reprendraient leur expansion. Ceci serait une façon d'expliquer la contribution de la mutation à la rechute du patient.

4.2.3.2 – La décitabine induit moins d'apoptose chez le mutant P904L

Lors du traitement à la décitabine, le niveau d'apoptose du mutant P904L est diminué par rapport à celui de *DNMT3A* natif. La suggestion d'utiliser la décitabine comme alternative ne serait donc pas pertinente. On connaît encore mal le mécanisme d'action de la décitabine dans le contexte des tumeurs avec des mutations de *DNMT3A*. Contrairement aux cellules mutantes P904L, les tumeurs hématopoïétiques avec une mutation *DNMT3A* R882* répondent bien à cet agent. Il est donc possible que l'impact soit spécifique à un contexte cellulaire.

4.3 – Critique des résultats et des méthodes

4.3.1 – Modèle cellulaire de recherche

Le modèle choisi est la lignée cellulaire ACHN qui correspond à une lignée dérivée de l'épanchement pleural d'un patient atteint d'un sarcome rénal à cellules claires (CCSK) avec métastases aux poumons. Cette lignée a été choisie pour sa ressemblance avec le portrait clinique du patient soit une tumeur rénale avec métastases pulmonaires.

Le modèle d'infection choisi inclut une infection avec un shARN contrôle dans chaque lignée cellulaire. Nous avons choisi d'utiliser le shARN contrôle dans les lignées *DNMT3A* puisque la contribution du transcrit endogène était faible. Toutefois, même si la contribution de *DNMT3A* endogène est faible, elle pourrait être suffisante pour masquer l'effet du mutant P904L. Une autre option aurait été de contrôler les lignées *DNMT3A* avec le shARN contre *DNMT3A* endogène.

La différence peut être importante dans ce cas, car le mutant R882* n'agit comme perte de fonction qu'en situation hétérozygote où il a la possibilité de former des hétérodimères inactifs avec DNMT3A natif [96]. Le mutant R882* forme des homodimères qui sont actifs catalytiquement quoiqu'un peu moins que ceux de DNMT3A natif [96]. Le défaut de notre modèle est qu'il ne permet pas de déterminer si le mutant P904L forme des homodimères actifs ou inactifs. Dans ce cas-ci, comme la mutation est en situation de perte d'hétérozygotie dans le contexte du patient, il serait pertinent de valider cette hypothèse. On remarque fréquemment que le mutant a un impact plus faible que l'inhibition de *DNMT3A*. Il est possible qu'on assiste à un effet de dosage causé par la présence de l'endogène ou alors par la présence d'homodimères actifs de P904L. Cet effet de dosage a déjà été observé dans le syndrome de Tatton-Brown dont la mutation P904L est identifiée comme causatrice lorsque présente dans la lignée germinale du patient. Ce syndrome est causé par des mutations dominantes dans *DNMT3A* et cause principalement un défaut de croissance et une déficience intellectuelle [100]. Ceci est intéressant puisque l'on sait que les souris avec un « knock-down » de DNMT3A meurent peu après leur naissance, mais ont une apparence physique normale [160]. Cela souligne la possibilité d'un effet de dosage présent chez les patients atteints du syndrome de Tatton-Brown qui ont une copie native du gène et une copie mutée.

Finalement, il aurait peut-être été pertinent d'utiliser un modèle plus proche des cellules souches, ce qui aurait permis d'étudier l'impact de la mutation sur la différenciation cellulaire qui est un phénotype communément étudié dans l'étude des méthyltransférases, incluant DNMT3A.

4.3.2 – Quantification de l'activité méthyltransférase

La quantification de l'activité méthyltransférase n'a pas été fructueuse. Le test utilisé ne permettait pas de distinguer l'activité méthyltransférase des trois DNMTs individuellement. Dans la cellule normale, la DNMT1 est responsable de la majorité de l'activité de méthylation et pourrait masquer l'activité de DNMT3 [161]. Bien que le niveau de surexpression de *DNMT3A* soit près de 20 fois l'endogène, on ne mesure pas de différence d'activité méthyltransférase entre l'endogène et la surexpression. Il est également possible que malgré la présence de l'enzyme en grande quantité, il n'y ait pas assez de partenaires pour permettre une augmentation de son activité.

Le traitement à la décitabine a été effectué dans le but de diminuer l'impact de l'activité méthyltransférase de la DNMT1 [110]. Malgré ce traitement, la distinction entre les différentes situations d'expression de *DNMT3A* était encore absente. Le choix a donc été fait d'étudier l'impact de DNMT3A à l'aide de l'expression des gènes par le transcriptome. Une autre approche aurait été d'isoler DNMT3A pour ensuite en mesurer l'activité, mais comme les anticorps disponibles ne démontraient pas une bonne spécificité, cette approche a été écartée.

4.3.3 – Essais de migration

Comme mentionné plus tôt, deux tests de migration ont été utilisés pour évaluer la capacité migratoire des cellules exprimant *DNMT3A* P904L. Cela a permis d'évaluer la migration dans un espace en 2D et en 3D. L'utilisation de deux méthodes différentes pour évaluer le même phénotype permet de valider l'impact observé. Chacun de ces essais comportait des éléments de variabilité qui pourraient être améliorés. L'essai par Transwell® comporte un compte manuel des cellules qui ont traversé la membrane poreuse. Pour diminuer la variabilité, on pourrait imager les membranes et utiliser un système de reconnaissance pour compter les cellules [162]. Pour ce qui est de l'essai par plaie, l'analyse était facilement automatisable ce qui permettait d'analyser un grand volume de réplicas et d'obtenir une bonne puissance statistique. Toutefois, la taille de la plaie initiale et la confluence de départ représentent une source de variation [163]. Nous nous sommes donc assurés d'appliquer des critères de confluence, mais l'utilisation d'un outil spécialisé aurait permis l'obtention de plaies plus uniformes. Nous aurions également pu utiliser des inserts pour créer une zone sans cellules à l'intérieur du puits [164]; [137].

4.3.4 – Essai d'apoptose et analyse des résultats

Les essais d'apoptose sont généralement faits à l'aide de la cytométrie de flux. Il a été observé que les manipulations des cellules en préparation à l'analyse en cytométrie de flux sont particulièrement dommageables pour les cellules adhérentes [129]. En effet, la préparation des échantillons cause à elle seule un certain pourcentage d'apoptose [129]. Pour éviter cette interférence et puisque nous disposions de l'imagerie cellulaire en temps réel, j'ai décidé de quantifier l'apoptose en temps réel.

Toutefois, cela ajoute de la complexité à l'analyse des résultats. L'analyse en cytométrie de flux évalue le niveau d'apoptose d'un échantillon à un point unique dans le temps contrairement à l'analyse de l'imagerie cellulaire qui évalue le niveau d'apoptose d'un échantillon à plusieurs points dans le temps. Nous avons l'option de faire une analyse sur un seul point dans le temps ou d'analyser l'aire sous la courbe pour obtenir le niveau d'apoptose globale dans le temps [138]. Lorsque l'on observe les résultats obtenus avec les deux agents thérapeutiques, on constate que pour la vincristine la méthode de l'aire sous la courbe produit un résultat significatif. Pour la décitabine, c'est l'analyse du point d'activité maximale à 72 heures qui donne le résultat le plus significatif. Cette différence peut s'expliquer par le temps d'action des agents. L'activité de la vincristine est maximale autour de 48 heures, en observant l'aire sous la courbe des 72 heures suivant l'ajout de vincristine, on peut alors mieux apprécier l'impact de cet agent. Pour la décitabine, le pic d'activité se trouve autour de 72 heures, ou trois cycles de division cellulaire. Donc l'analyse de l'aire sous la courbe dans les 72 premières heures ne fournit peut-être pas autant d'information que la mesure du pic d'apoptose à 72 heures.

4.3.5 – Analyse des données du transcriptome

La différence des niveaux d'expression du mutant P904L et du *DNMT3A* natif rendait l'analyse transcriptomique problématique. Comme le mutant est plus exprimé que le natif, il est difficile de savoir si les effets différentiels observés sont dus à l'expression du mutant ou simplement à la différence de surexpression entre le mutant et le natif [165]. Face à ce problème, deux options s'offraient à nous ; reprendre la construction des lignées cellulaires en corrigeant le niveau d'expression du mutant et du natif ou essayer d'apporter des corrections pertinentes aux résultats déjà obtenus pour pouvoir en tirer des conclusions significatives et non biaisées.

Pour corriger ce problème en amont, le niveau d'expression aurait pu être contrôlé de plusieurs façons. La première est d'introduire la mutation avec la technique CRISPR. De cette façon, le niveau d'expression du mutant est inchangé et l'on peut comparer les cellules mutées P904L directement avec les cellules exprimant *DNMT3A* endogène. Il aurait aussi été possible de faire un dosage de la quantité de virus utilisée pour l'infection des lignées cellulaires et d'optimiser le protocole jusqu'à obtenir des niveaux d'expression similaire. Suite à l'infection des lignées cellulaires, une sélection clonale aurait permis d'isoler des clones ayant un taux d'expression similaire.

Nous avons décidé de traiter les données obtenues et d'examiner les conclusions que l'on pouvait en tirer. Les analyses faites sont donc exploratoires et permettent de confirmer que le mutant a en effet un impact, mais elles ne permettent pas de définir avec précision cet impact. Pour mieux définir l'impact du mutant P904L, nous avons mis en place différents filtres qui ont pour but de retenir les gènes différentiellement exprimés, mais sur lesquels *DNMT3A* natif n'a pas d'impact. Les gènes sélectionnés seraient alors uniquement affectés par le mutant P904L.

Toutefois, si l'analyse différentielle entre le mutant P904L et *DNMT3A* natif permet de sélectionner les gènes qui distinguent le mutant, l'application subséquente du filtre discrimine un groupe de gènes qui ne permet pas une distinction claire du mutant. Lorsque l'on compare les regroupements hiérarchiques avant et après la correction faite par les filtres, on remarque que les échantillons du mutant ne se groupent plus ensemble. Les tests des différents phénotypes ont démontré que le mutant a un impact qui se rapproche surtout de celui d'un sh*DNMT3A*, soit un impact de perte de fonction. Suivant cette logique, le regroupement qui représente le mieux cet impact est le regroupement des 953 gènes différentiellement exprimés entre le mutant et le natif. Toutefois, il reste vrai que certains gènes sont probablement affectés par la différence d'expression de *DNMT3A* dans les deux lignées et les résultats et conclusions que l'on en tire doivent donc en tenir compte.

Dans cette approche, nous avons choisi de retirer les gènes qui étaient différentiellement exprimés entre le vecteur vide et la surexpression de *DNMT3A* natif. Comme le mutant est exprimé plus fortement que *DNMT3A* natif, l'hypothèse est que les gènes affectés par *DNMT3A* seraient aussi affectés chez le mutant et sont donc retirés de l'analyse. Si l'on pousse l'hypothèse plus loin, on s'attend à ce que les gènes surexprimés dans le *DNMT3A* natif soient encore plus surexprimés chez le mutant P904L (et inversement pour la répression). Nous aurions donc pu retirer uniquement les gènes qui correspondent à ce comportement. Cette approche est moins astringente que celle utilisée dans ce projet, mais aurait pu permettre une meilleure distinction des échantillons du mutant P904L.

4.4 – Mise en contexte de l'impact du mutant

Mes travaux ont permis de réunir de l'information sur les voies métaboliques enrichies et les phénotypes affectés par la mutation *DNMT3A* P904L. La Figure 52 présente la mise en relation des différents résultats dans un contexte tumoral.

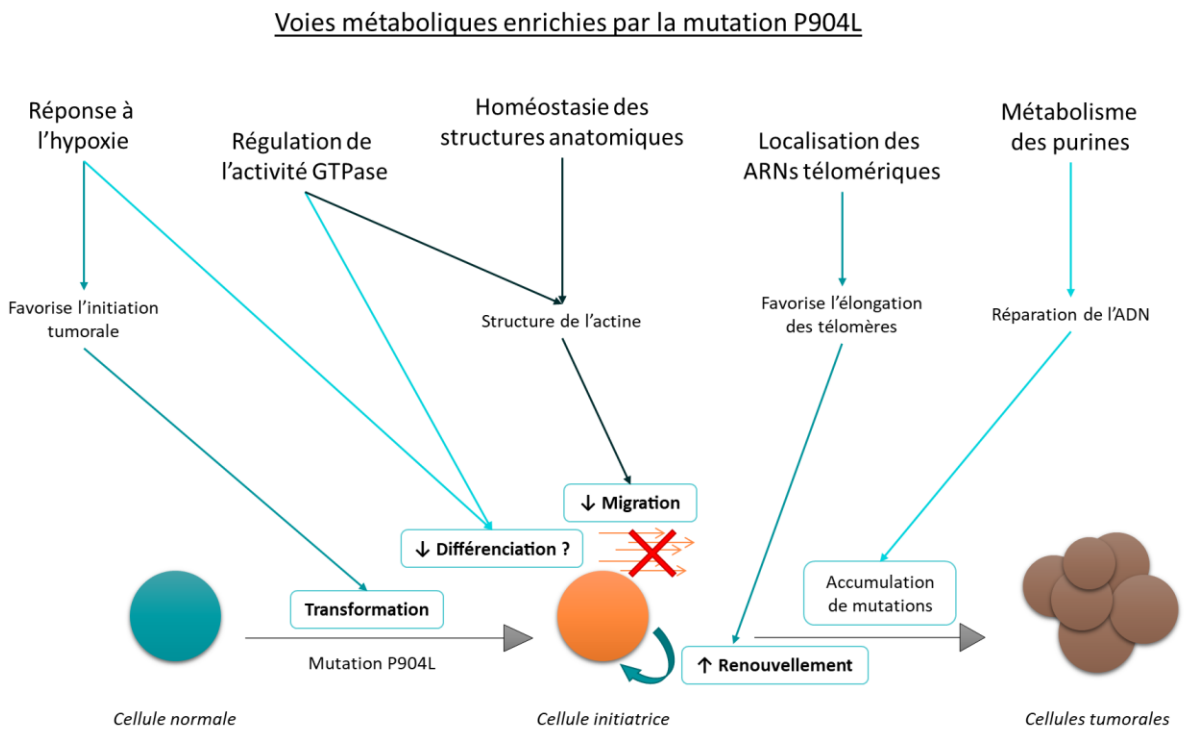

Figure 52 : Modèle proposé de l'impact du mutant P904L dans l'initiation et la progression tumorale

4.4.1 – Impact du mutant sur la cellule

Nous avons démontré que le mutant P904L a un impact similaire à la perte de fonction sur l'enzyme DNMT3A. En effet, le mutant P904L tout comme la perte de fonction de DNMT3A augmente la capacité de renouvellement des cellules tout en diminuant la migration. D'autres études ont démontré que la suppression de *DNMT3A* cause une diminution de la différenciation des cellules et incite le développement de tumeurs hématologiques et solides [81, 82, 166].

La réponse à l'hypoxie est reliée au stress oxydatif. Ce dernier est reconnu comme un agent initiateur de tumeurs rénales en association avec des changements épigénétiques comme la méthylation [148]. Il a également été rapporté que cette voie affecte la différenciation [149]. Nous suspectons que la différenciation est diminuée dans les cellules portant la mutation P904L puisque la perte de fonction de DNMT3A et l'augmentation de la capacité clonale sont toutes deux associées à un blocage de la différenciation cellulaire [81, 82].

La régulation de l'activité des GTPases est aussi connue pour affecter la différenciation cellulaire. De plus, elle joue un rôle important dans la régulation de l'actine [154] qui est une protéine essentielle au cytosquelette et joue un rôle dans la migration cellulaire. Avec la régulation de l'activité GTPase, cette voie métabolique joue potentiellement un rôle dans la diminution de la migration des cellules ayant la mutation P904L. De plus, elles pourraient influencer la réponse à la vincristine puisqu'il s'agit d'un agent qui cible une des structures du cytosquelette [105]. En l'absence d'une suractivation des voies métaboliques qui régulent le cytosquelette, la vincristine devient potentiellement moins efficace expliquant ainsi la diminution de sensibilité à cet agent des cellules mutantes P904L.

L'accumulation d'ARN télomériques au corps de Cajal est reconnue pour favoriser l'élongation des télomères [157, 158] qui permet l'immortalisation des cellules et explique l'augmentation de la capacité clonale observée chez les cellules ayant une mutation P904L.

L'impact du métabolisme des purines dans ce contexte est moins évident. Toutefois, je suppose que des mutations supplémentaires ont été nécessaires pour augmenter la capacité d'invasion. Dans cette optique, le métabolisme des purines est impliqué dans la réparation de l'ADN et donc pourrait favoriser l'accumulation de nouvelles mutations dans les cellules P904L [150-152].

4.4.2 – Impact du mutant dans la tumeur de Wilms

L'impact de la méthylation dans la tumeur de Wilms a déjà été établi [44, 167], mais c'est la première fois qu'une mutation dans une DNMTs est caractérisée dans cette tumeur. Les altérations dans les *DNMT*s sont connues pour avoir des effets parfois oncogéniques et parfois suppresseurs de tumeurs. Dans ce cas-ci, la mutation P904L avec perte d'hétérozygotie a un effet oncogène. Le mutant P904L affecte potentiellement le développement de la tumeur de Wilms selon trois mécanismes. Premièrement, la mutation est présente à une phase précoce du développement rénal et permet d'augmenter la rétention des niches néphrologiques en augmentant la capacité clonale et en diminuant la différenciation cellulaire. Deuxièmement, le mutant P904L reproduit en partie l'impact des mutations de WT1 qui agit comme facteur de transcription de *DNMT3A*. Troisièmement, le mutant P904L affecte l'état de méthylation du locus WT2 et cause une hyperméthylation qui entraîne une surexpression de l'oncogène IGF2 et réprime H19.

J'ai mentionné plus tôt que l'augmentation de la capacité clonale est associée à un blocage de la différenciation dans la cellule. Dans le contexte des tumeurs de Wilms, c'est un fait particulièrement intéressant puisque les cellules tumorales sont décrites comme ayant un aspect embryonnaire non différentié [39]. Si la mutation P904L se produit dans une cellule non mature, il est probable que cette cellule conserve un état embryonnaire et forme une sous-population non mature qui deviendra une niche néphrologique. Ces niches sont suspectées d'être des lésions précurseurs des tumeurs de Wilms et l'augmentation du nombre de niches est associée avec le développement de la tumeur [7].

Le facteur de transcription WT1 est fréquemment muté dans les tumeurs de Wilms. *DNMT3A* fait partie des cibles de WT1 et l'expression de *DNMT3A* est directement modulée par celle de WT1 [57]. Le gène *WT1* est un suppresseur de tumeur altéré dans les tumeurs de Wilms par délétion ou perte de fonction. Ces mutations vont entraîner la diminution d'expression de DNMT3A reproduite ici par la mutation de perte de fonction P904L. *WT1* joue un rôle dans la différenciation cellulaire et le développement rénal [57]. Les mutations dans *WT1* sont associées à un mauvais pronostic [56]. La mutation P904L reproduit potentiellement une partie de ces effets et contribue ainsi à la progression tumorale.

Finalement, j'ai mentionné que le mutant pourrait affecter le locus *WT2* de façon à favoriser la progression tumorale par hyperméthylation. La méthylation du locus *WT2* cause l'expression de l'oncogène *IGF2* [63]. Ce dernier mécanisme est plus indirect que les deux autres. Le mutant P904L semble augmenter la production de l'isoforme DNMT3A2. Bien que la mutation cause une perte d'activité enzymatique, l'isoforme DNMT3A2 est connue pour être essentielle à l'établissement de l'empreinte parentale et favorise le recrutement du cofacteur DNMT3L [145]. DNMT3L est essentiel à l'activité de méthylation et il est probable que sa présence augmente légèrement la méthylation par DNMT3B [8]. Ainsi, le locus de *WT2* pourrait être hyperméthylé même si la mutation P904L est une perte de fonction. Ce troisième mécanisme, bien qu'indirect, reste possible.

Nous proposons aussi un mécanisme selon lequel le mutant P904L pourrait influencer la réponse aux traitements et la rechute observée chez le patient. Le mutant enrichit des voies métaboliques qui influencent la structure de la cellule. Cette influence est perceptible dans la réduction de la migration des cellules mutantes P904L. De plus, nous avons constaté que les cellules du mutant sont moins sensibles à la mort cellulaire causée par la vincristine bien que celle-ci affecte la survie clonale des cellules mutantes P904L. Nous supposons que l'influence du mutant sur les voies d'homéostasie des structures est à l'origine de la diminution de la sensibilité à l'apoptose observée chez le mutant P904L.

4.5 – Perspectives

4.5.1 – Impact sur la fonction de méthylation

La perte de fonction causée par le mutant P904L sur DNMT3A est claire, mais le mécanisme d'action de la mutation est encore incertain. De futurs travaux pourraient se focaliser sur l'activité enzymatique de la protéine mutante P904L. Pour ce faire, nous pourrions isoler et purifier la protéine mutante et la protéine native afin de tester l'activité de méthylation des homodimères ou des hétérodimères. En effet, le mutant R882* reste fonctionnel lorsqu'il forme des homodimères, mais a un effet dominant négatif en situation d'hétérozygotie puisque l'hétérodimère DNMT3A natif et DNMT3A R882* est inactif [96]. La mutation P904L est classifiée comme causatrice du syndrome de Tatton-Brown en situation d'hétérozygotie alors que chez notre patient, elle est contributrice du développement tumoral en situation homozygote. Il serait intéressant de valider l'impact de ces différentes situations sur l'activité de méthylation de cette enzyme.

La relation entre la méthylation et l'expression des gènes est complexe, par exemple certains promoteurs sont hyperméthylés sans impact puisque leur niveau d'expression est déjà faible dans le tissu [37]. Pour établir une meilleure relation entre la différence d'expression entre le mutant P904L et *DNMT3A* natif, on pourrait faire l'étude du méthylome des lignées cellulaires. Ceci aurait pour but d'établir une relation entre les sites de méthylations différentielles et l'expression des gènes associés.

Dans un de nos modèles, nous proposons que la mutation influence la différenciation cellulaire dans le rein puisque les mutations de *DNMT3A* bloquent la différenciation des cellules hématopoïétiques [82]. Nous pourrions tester cet effet sur les cellules souches rénales. Pour cela, une intégration de la mutation par une approche de type CRISPR dans un modèle cellulaire non différentié serait optimale.

4.5.2 – Impact sur l'initiation de la tumeur de Wilms

Nos travaux démontrent une fois de plus l'importance de la méthylation dans ce type de tumeur [44, 57, 61]. Nous croyons que faire le méthylome des patients atteints de tumeurs de Wilms dans la cohorte de patient TRICEPS permettrait une meilleure classification des patients. Cela permettrait ainsi d'approfondir la contribution de la méthylation dans la progression de la tumeur de Wilms. À l'aide du méthylome, nous pourrions essayer de trouver des paramètres permettant de regrouper et de différencier des sous-groupes de tumeurs de Wilms cliniquement distincts. Nous pourrions aussi essayer de combiner les informations issues du méthylome et du transcriptome pour faire ce genre de regroupement.

Dans notre modèle, nous suggérons que la mutation P904L arrive à une étape précoce dans le mécanisme de l'oncogenèse et contribue à l'initiation de la tumeur. De futurs travaux pourraient évaluer le potentiel initiateur de la mutation P904L à l'aide d'une xénogreffe. Nous pourrions aussi utiliser cette mutation pour tenter de produire un modèle murin de type natif (*autochthonous mouse models*) [168]. On pourrait ensuite caractériser les reins de ces souris à différents points dans le temps suite à la naissance pour évaluer l'apparition de niches néphrologiques ou de tumeurs. Nous pourrions aussi produire un modèle murin dans lequel l'expression de *DNMT3A* P904L est régulée par un système de type Cre/LoxP.

4.6 – Conclusions

Nous suspections que la mutation P904L causerait une perte de fonction due au contexte tumoral dans lequel elle a été identifiée. Cette hypothèse a été validée par les tests fonctionnels où la mutation P904L produit le même impact que l'inhibition du gène *DNMT3A*. Nous avons aussi démontré que la mutation affecte des caractéristiques propres au cancer contribuant ainsi au développement et à la progression tumorale. Nos résultats ont permis de suggérer des mécanismes qui décrivent la contribution de cette mutation dans le contexte de la tumeur de Wilms. Nous avons observé que la mutation P904L modulait les effets de certains agents thérapeutiques ce qui explique son implication dans un contexte de rechute. Finalement, nous avons aussi exploré quelques pistes pour approfondir notre compréhension de cette mutation sur le gène *DNMT3A*, mais aussi dans le contexte de la tumeur de Wilms.

Section 5 — Conclusion

5.1 – Le mutant P904L affecte la progression tumorale

Nos travaux ont permis de démontrer que la nouvelle mutation P904L dans le gène DNMT3A retrouvé chez un patient atteint de la tumeur de Wilms est conductrice de la progression tumorale.

Nos travaux mettent en lumière la contribution potentielle de DNMT3A P904L dans le développement des tumeurs de Wilms. Nous avons proposé trois mécanismes pour expliquer l'implication de la mutation. Nous supposons que la mutation réplique des altérations déjà connues dans la progression de la tumeur de Wilms. Nous proposons aussi un nouveau mécanisme qui explique comment la mutation contribue à la tumeur. Ce mécanisme intègre les différents impacts observés chez le mutant P904L, mais aussi des conséquences connues de la perte de fonction de DNMT3A sur les différents processus cellulaires.

Nos travaux amènent aussi des informations sur la résistance aux traitements utilisés dans la tumeur de Wilms. Comme les options de traitements de cette tumeur sont encore limitées aux techniques utilisées depuis les années 1950, nous mettons en valeur le besoin de développer des alternatives thérapeutiques efficaces pour les patients en rechute. Il faut aussi pousser plus loin les connaissances sur cette tumeur pour développer des options qui seront moins dommageables au long terme pour les patients.

Dans le futur, nous croyons que l'impact de ce mutant devrait être étudié plus en profondeur et pourrait permettre de mieux comprendre cette tumeur et son développement. Nous suggérons aussi l'utilisation combinée des données de méthylation et de transcriptomique pour distinguer des sous-groupes pertinents dans cette tumeur.

Section 6 — Bibliographie

1. Stratton MR, Campbell PJ, Futreal PA. The cancer genome. Nature. 2009;458(7239):719-24. Epub 2009/04/11.
2. Bailar JC, 3rd, Gornik HL. Cancer undefeated. N Engl J Med. 1997;336(22):1569-74. Epub 1997/05/29.
3. Verma M. Personalized medicine and cancer. J Pers Med. 2012;2(1):1-14.
4. Forrest SJ, Geoerger B, Janeway KA. Precision medicine in pediatric oncology. Curr Opin Pediatr. 2018;30(1):17-24. Epub 2017/12/01.
5. Burdach SEG, Westhoff MA, Steinhauser MF, Debatin KM. Precision medicine in pediatric oncology. Mol Cell Pediatr. 2018;5(1):6. Epub 2018/09/02.
6. Marcoux S, Drouin S, Laverdiere C, Alos N, Andelfinger GU, Bertout L, et al. The PETALE study: Late adverse effects and biomarkers in childhood acute lymphoblastic leukemia survivors. Pediatr Blood Cancer. 2017;64(6). Epub 2016/12/06.
7. Szychot E, Apps J, Pritchard-Jones K. Wilms' tumor: biology, diagnosis and treatment. Transl Pediatr. 2014;3(1):12-24.
8. Tajima S, Suetake I, Takeshita K, Nakagawa A, Kimura H. Domain Structure of the Dnmt1, Dnmt3a, and Dnmt3b DNA Methyltransferases. Adv Exp Med Biol. 2016;945:63-86. Epub 2016/11/09.
9. Nussbaum RL, McInnes RR, Willard HF, Thompson JS. Thompson & Thompson genetics in medicine. Eighth edition.e éd. Philadelphia: Elsevier; 2016.
10. Canada, Agence Santé Publique. Le cancer chez les enfants (de 0 à 14 ans) au Canada [Feuillet d'information]. Canada: 2012 ; . Disponible: https://www.canada.ca/fr/sante-publique/services/maladies-chroniques/cancer/cancer-chez-enfants-0-a-14-ans-canada.html
11. Ellison LF, De P, Mery LS, Grundy PE, Canadian Cancer Society's Steering Committee for Canadian Cancer S. Canadian cancer statistics at a glance: cancer in children. CMAJ. 2009;180(4):422-4.
12. White MC, Holman DM, Boehm JE, Peipins LA, Grossman M, Henley SJ. Age and cancer risk: a potentially modifiable relationship. Am J Prev Med. 2014;46(3 Suppl 1):S7-15. Epub 2014/02/12.
13. Vogelstein B, Papadopoulos N, Velculescu VE, Zhou S, Diaz LA, Jr., Kinzler KW. Cancer genome landscapes. Science. 2013;339(6127):1546-58. Epub 2013/03/30.
14. Worst BC, van Tilburg CM, Balasubramanian GP, Fiesel P, Witt R, Freitag A, et al. Next-generation personalised medicine for high-risk paediatric cancer patients - The INFORM pilot study. Eur J Cancer. 2016;65:91-101.
15. Knudson AG. The genetics of childhood cancer. Bull Cancer. 1988;75(1):135-8. Epub 1988/01/01.
16. Goyns MH, Hancock BW. Importance of oncogene research to the cancer clinician. Clin Oncol (R Coll Radiol). 1991;3(3):168-76. Epub 1991/05/01.
17. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. Cell. 2000;100(1):57-70. Epub 2000/01/27.
18. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. Cell. 2011;144(5):646-74. Epub 2011/03/08.
19. Fouad YA, Aanei C. Revisiting the hallmarks of cancer. Am J Cancer Res. 2017;7(5):1016-36. Epub 2017/06/01.
20. Malumbres M, Barbacid M. Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. Nat Rev Cancer. 2009;9(3):153-66. Epub 2009/02/25.
21. Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. N Engl J Med. 1971;285(21):1182-6. Epub 1971/11/18.
22. Krishna Priya S, Nagare RP, Sneha VS, Sidhanth C, Bindhya S, Manasa P, et al. Tumour angiogenesis-Origin of blood vessels. Int J Cancer. 2016;139(4):729-35. Epub 2016/03/05.
23. Chen R, Alvero AB, Silasi DA, Mor G. Inflammation, cancer and chemoresistance: taking advantage of the toll-like receptor signaling pathway. Am J Reprod Immunol. 2007;57(2):93-107. Epub 2007/01/16.
24. Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. Nat Immunol. 2002;3(11):991-8. Epub 2002/10/31.
25. Malmberg KJ. Effective immunotherapy against cancer: a question of overcoming immune suppression and immune escape? Cancer Immunol Immunother. 2004;53(10):879-92. Epub 2004/09/01.
26. Steeg PS. Tumor metastasis: mechanistic insights and clinical challenges. Nat Med. 2006;12(8):895-904. Epub 2006/08/08.

27. Pavlova NN, Thompson CB. The Emerging Hallmarks of Cancer Metabolism. Cell Metab. 2016;23(1):27-47. Epub 2016/01/16.
28. Chen F, Zhuang X, Lin L, Yu P, Wang Y, Shi Y, et al. New horizons in tumor microenvironment biology: challenges and opportunities. BMC Med. 2015;13:45. Epub 2015/04/11.
29. Tabassum DP, Polyak K. Tumorigenesis: it takes a village. Nat Rev Cancer. 2015;15(8):473-83. Epub 2015/07/15.
30. Waddington CH. The epigenotype. 1942. Int J Epidemiol. 2012;41(1):10-3. Epub 2011/12/22.
31. Allis CD, Jenuwein T. The molecular hallmarks of epigenetic control. Nat Rev Genet. 2016;17(8):487-500. Epub 2016/06/28.
32. Falkenberg KJ, Johnstone RW. Histone deacetylases and their inhibitors in cancer, neurological diseases and immune disorders. Nat Rev Drug Discov. 2014;13(9):673-91.
33. Shen H, Laird PW. Interplay between the cancer genome and epigenome. Cell. 2013;153(1):38-55. Epub 2013/04/02.
34. Razin A, Riggs AD. DNA methylation and gene function. Science. 1980;210(4470):604-10. Epub 1980/11/07.
35. Kumar R, Li DQ, Muller S, Knapp S. Epigenomic regulation of oncogenesis by chromatin remodeling. Oncogene. 2016;35(34):4423-36. Epub 2016/01/26.
36. Wolffe AP, Matzke MA. Epigenetics: regulation through repression. Science. 1999;286(5439):481-6.
37. Moarii M, Boeva V, Vert JP, Reyal F. Changes in correlation between promoter methylation and gene expression in cancer. BMC Genomics. 2015;16:873. Epub 2015/10/30.
38. Raynal NJ, Si J, Taby RF, Gharibyan V, Ahmed S, Jelinek J, et al. DNA methylation does not stably lock gene expression but instead serves as a molecular mark for gene silencing memory. Cancer Res. 2012;72(5):1170-81. Epub 2012/01/06.
39. Al-Hussain T, Ali A, Akhtar M. Wilms tumor: an update. Adv Anat Pathol. 2014;21(3):166-73. Epub 2014/04/10.
40. Davidoff AM. Wilms tumor. Adv Pediatr. 2012;59(1):247-67. Epub 2012/07/14.
41. McMahon AP. Development of the Mammalian Kidney. Curr Top Dev Biol. 2016;117:31-64. Epub 2016/03/13.
42. Baumelou A. Néphrologie. Paris: Éditions Vernazobres-Gréco; 2000.
43. Jeanpierre C. [FGF9 and FGF20 maintain the stemness of nephron progenitors during kidney development]. Med Sci (Paris). 2013;29(3):254-6. Epub 2013/04/03. Role crucial de FGF20 et FGF9 pour le maintien des progeniteurs renaux lors du developpement renal.
44. Hohenstein P, Pritchard-Jones K, Charlton J. The yin and yang of kidney development and Wilms' tumors. Genes Dev. 2015;29(5):467-82. Epub 2015/03/05.
45. Fogo AB. Fundamentals of renal pathology. New York, NY: Springer; 2006.
46. Popov SD, Sebire NJ, Vujanic GM. Wilms' Tumour - Histology and Differential Diagnosis. Dans: van den Heuvel-Eibrink MM, rédacteur. Wilms Tumor. Brisbane (AU)2016.
47. Costantini F, Kopan R. Patterning a complex organ: branching morphogenesis and nephron segmentation in kidney development. Dev Cell. 2010;18(5):698-712. Epub 2010/05/25.
48. Lu J, Tao YF, Li ZH, Cao L, Hu SY, Wang NN, et al. Analyzing the gene expression profile of anaplastic histology Wilms' tumor with real-time polymerase chain reaction arrays. Cancer Cell Int. 2015;15:44.
49. Krepischi ACV, Maschietto M, Ferreira EN, Silva AG, Costa SS, da Cunha IW, et al. Genomic imbalances pinpoint potential oncogenes and tumor suppressors in Wilms tumors. Mol Cytogenet. 2016;9:20. Epub 2016/02/26.
50. Perotti D, Spreafico F, Torri F, Gamba B, D'Adamo P, Pizzamiglio S, et al. Genomic profiling by whole-genome single nucleotide polymorphism arrays in Wilms tumor and association with relapse. Genes Chromosomes Cancer. 2012;51(7):644-53.
51. Gadd S, Huff V, Huang CC, Ruteshouser EC, Dome JS, Grundy PE, et al. Clinically relevant subsets identified by gene expression patterns support a revised ontogenic model of Wilms tumor: a Children's Oncology Group Study. Neoplasia. 2012;14(8):742-56. Epub 2012/09/07.
52. Gadd S, Huff V, Walz AL, Ooms A, Armstrong AE, Gerhard DS, et al. A Children's Oncology Group and TARGET initiative exploring the genetic landscape of Wilms tumor. Nat Genet. 2017;49(10):1487-94.
53. Charlton J, Williams RD, Sebire NJ, Popov S, Vujanic G, Chagtai T, et al. Comparative methylome analysis identifies new tumour subtypes and biomarkers for transformation of nephrogenic rests into Wilms tumour. Genome Med. 2015;7(1):11. Epub 2015/03/13.

54. Ho PA, Zeng R, Alonzo TA, Gerbing RB, Miller KL, Pollard JA, et al. Prevalence and prognostic implications of WT1 mutations in pediatric acute myeloid leukemia (AML): a report from the Children's Oncology Group. Blood. 2010;116(5):702-10.
55. Dong L, Pietsch S, Englert C. Towards an understanding of kidney diseases associated with WT1 mutations. Kidney Int. 2015;88(4):684-90. Epub 2015/07/15.
56. Schumacher V, Schuhen S, Sonner S, Weirich A, Leuschner I, Harms D, et al. Two molecular subgroups of Wilms' tumors with or without WT1 mutations. Clin Cancer Res. 2003;9(6):2005-14. Epub 2003/06/11.
57. Szemes M, Dallosso AR, Melegh Z, Curry T, Li Y, Rivers C, et al. Control of epigenetic states by WT1 via regulation of de novo DNA methyltransferase 3A. Hum Mol Genet. 2013;22(1):74-83. Epub 2012/10/09.
58. Xu B, Zeng DQ, Wu Y, Zheng R, Gu L, Lin X, et al. Tumor suppressor menin represses paired box gene 2 expression via Wilms tumor suppressor protein-polycomb group complex. J Biol Chem. 2011;286(16):13937-44. Epub 2011/03/08.
59. Williams RD, Al-Saadi R, Chagtai T, Popov S, Messahel B, Sebire N, et al. Subtype-specific FBXW7 mutation and MYCN copy number gain in Wilms' tumor. Clin Cancer Res. 2010;16(7):2036-45. Epub 2010/03/25.
60. Walz AL, Ooms A, Gadd S, Gerhard DS, Smith MA, Guidry Auvil JM, et al. Recurrent DGCR8, DROSHA, and SIX homeodomain mutations in favorable histology Wilms tumors. Cancer Cell. 2015;27(2):286-97. Epub 2015/02/12.
61. Charlton J, Williams RD, Weeks M, Sebire NJ, Popov S, Vujanic G, et al. Methylome analysis identifies a Wilms tumor epigenetic biomarker detectable in blood. Genome Biol. 2014;15(8):434. Epub 2014/08/20.
62. Satoh Y, Nakadate H, Nakagawachi T, Higashimoto K, Joh K, Masaki Z, et al. Genetic and epigenetic alterations on the short arm of chromosome 11 are involved in a majority of sporadic Wilms' tumours. Br J Cancer. 2006;95(4):541-7. Epub 2006/08/16.
63. Lee DH, Singh P, Tsai SY, Oates N, Spalla A, Spalla C, et al. CTCF-dependent chromatin bias constitutes transient epigenetic memory of the mother at the H19-Igf2 imprinting control region in prospermatogonia. PLoS Genet. 2010;6(11):e1001224. Epub 2010/12/03.
64. COG, Children's Oncology Group : n.d. [cité le September, 4, 2019 2019]. Disponible: https://www.childrensoncologygroup.org/aren0532
65. Kostel Bal AS, Yalcin B, Susam-Sen H, Aydin B, Varan A, Kutluk T, et al. Renal Late Effects After the Treatment of Unilateral Nonsyndromic Wilms Tumor. J Pediatr Hematol Oncol. 2016;38(4):e147-50. Epub 2016/03/19.
66. Chopin VL, Dominique. Deltour, Sophie. Modifications épigénétiques et cancer. Médecine sciences. 2017.
67. Edwards JR, Yarychkivska O, Boulard M, Bestor TH. DNA methylation and DNA methyltransferases. Epigenetics Chromatin. 2017;10:23. Epub 2017/05/16.
68. Lei H, Oh SP, Okano M, Juttermann R, Goss KA, Jaenisch R, et al. De novo DNA cytosine methyltransferase activities in mouse embryonic stem cells. Development. 1996;122(10):3195-205. Epub 1996/10/01.
69. Bachman KE, Rountree MR, Baylin SB. Dnmt3a and Dnmt3b are transcriptional repressors that exhibit unique localization properties to heterochromatin. J Biol Chem. 2001;276(34):32282-7. Epub 2001/06/28.
70. Kaneda M, Okano M, Hata K, Sado T, Tsujimoto N, Li E, et al. Essential role for de novo DNA methyltransferase Dnmt3a in paternal and maternal imprinting. Nature. 2004;429(6994):900-3. Epub 2004/06/25.
71. Lyko F. The DNA methyltransferase family: a versatile toolkit for epigenetic regulation. Nat Rev Genet. 2017. Epub 2017/10/17.
72. Chen T, Ueda Y, Xie S, Li E. A novel Dnmt3a isoform produced from an alternative promoter localizes to euchromatin and its expression correlates with active de novo methylation. J Biol Chem. 2002;277(41):38746-54. Epub 2002/07/26.
73. Weisenberger DJ, Velicescu M, Preciado-Lopez MA, Gonzales FA, Tsai YC, Liang G, et al. Identification and characterization of alternatively spliced variants of DNA methyltransferase 3a in mammalian cells. Gene. 2002;298(1):91-9. Epub 2002/10/31.
74. Oliveira AM, Hemstedt TJ, Freitag HE, Bading H. Dnmt3a2: a hub for enhancing cognitive functions. Mol Psychiatry. 2016;21(8):1130-6. Epub 2015/11/26.
75. Ferguson-Smith AC, Greally JM. Epigenetics: perceptive enzymes. Nature. 2007;449(7159):148-9. Epub 2007/09/14.
76. Hermann A, Gowher H, Jeltsch A. Biochemistry and biology of mammalian DNA methyltransferases. Cell Mol Life Sci. 2004;61(19-20):2571-87. Epub 2004/11/05.

77. Rinaldi L, Datta D, Serrat J, Morey L, Solanas G, Avgustinova A, et al. Dnmt3a and Dnmt3b Associate with Enhancers to Regulate Human Epidermal Stem Cell Homeostasis. Cell Stem Cell. 2016;19(4):491-501. Epub 2016/08/02.
78. Okano M, Bell DW, Haber DA, Li E. DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. Cell. 1999;99(3):247-57. Epub 1999/11/11.
79. Auclair G, Guibert S, Bender A, Weber M. Ontogeny of CpG island methylation and specificity of DNMT3 methyltransferases during embryonic development in the mouse. Genome Biol. 2014;15(12):545. Epub 2014/12/06.
80. Liao J, Karnik R, Gu H, Ziller MJ, Clement K, Tsankov AM, et al. Targeted disruption of DNMT1, DNMT3A and DNMT3B in human embryonic stem cells. Nat Genet. 2015;47(5):469-78. Epub 2015/03/31.
81. Challen GA, Sun D, Jeong M, Luo M, Jelinek J, Berg JS, et al. Dnmt3a is essential for hematopoietic stem cell differentiation. Nat Genet. 2011;44(1):23-31. Epub 2011/12/06.
82. Jeong M, Park HJ, Celik H, Ostrander EL, Reyes JM, Guzman A, et al. Loss of Dnmt3a Immortalizes Hematopoietic Stem Cells In Vivo. Cell Rep. 2018;23(1):1-10. Epub 2018/04/05.
83. Yang L, Rau R, Goodell MA. DNMT3A in haematological malignancies. Nat Rev Cancer. 2015;15(3):152-65. Epub 2015/02/20.
84. Koya J, Kataoka K, Sato T, Bando M, Kato Y, Tsuruta-Kishino T, et al. DNMT3A R882 mutants interact with polycomb proteins to block haematopoietic stem and leukaemic cell differentiation. Nat Commun. 2016;7:10924. Epub 2016/03/25.
85. Stec I, Nagl SB, van Ommen GJ, den Dunnen JT. The PWWP domain: a potential protein-protein interaction domain in nuclear proteins influencing differentiation? FEBS Lett. 2000;473(1):1-5. Epub 2000/05/10.
86. Banaszak LG, Giudice V, Zhao X, Wu Z, Gao S, Hosokawa K, et al. Abnormal RNA splicing and genomic instability after induction of DNMT3A mutations by CRISPR/Cas9 gene editing. Blood Cells Mol Dis. 2018;69:10-22. Epub 2018/01/13.
87. Ley TJ, Ding L, Walter MJ, McLellan MD, Lamprecht T, Larson DE, et al. DNMT3A mutations in acute myeloid leukemia. N Engl J Med. 2010;363(25):2424-33. Epub 2010/11/12.
88. Walter MJ, Ding L, Shen D, Shao J, Grillot M, McLellan M, et al. Recurrent DNMT3A mutations in patients with myelodysplastic syndromes. Leukemia. 2011;25(7):1153-8.
89. Zhang W, Xu J. DNA methyltransferases and their roles in tumorigenesis. Biomark Res. 2017;5:1. Epub 2017/01/28.
90. Chan SM, Majeti R. Role of DNMT3A, TET2, and IDH1/2 mutations in pre-leukemic stem cells in acute myeloid leukemia. Int J Hematol. 2013;98(6):648-57. Epub 2013/08/21.
91. Dai YJ, Wang YY, Huang JY, Xia L, Shi XD, Xu J, et al. Conditional knockin of Dnmt3a R878H initiates acute myeloid leukemia with mTOR pathway involvement. Proc Natl Acad Sci U S A. 2017;114(20):5237-42. Epub 2017/05/04.
92. Hou HA, Kuo YY, Liu CY, Chou WC, Lee MC, Chen CY, et al. DNMT3A mutations in acute myeloid leukemia: stability during disease evolution and clinical implications. Blood. 2012;119(2):559-68. Epub 2011/11/15.
93. Chang YI, Kong G, Ranheim EA, Tu PS, Yu YS, Zhang J. Dnmt3a haploinsufficiency cooperates with oncogenic Kras to promote an early-onset T-cell acute lymphoblastic leukemia. Am J Transl Res. 2017;9(3):1326-34. Epub 2017/04/08.
94. Brunetti L, Gundry MC, Goodell MA. DNMT3A in Leukemia. Cold Spring Harb Perspect Med. 2017;7(2).
95. D'Antonio M, Ciccarelli FD. Integrated analysis of recurrent properties of cancer genes to identify novel drivers. Genome Biol. 2013;14(5):R52.
96. Russler-Germain DA, Spencer DH, Young MA, Lamprecht TL, Miller CA, Fulton R, et al. The R882H DNMT3A mutation associated with AML dominantly inhibits wild-type DNMT3A by blocking its ability to form active tetramers. Cancer Cell. 2014;25(4):442-54. Epub 2014/03/25.
97. Holz-Schietinger C, Reich NO. RNA modulation of the human DNA methyltransferase 3A. Nucleic Acids Res. 2012;40(17):8550-7. Epub 2012/06/26.
98. Kim SJ, Zhao H, Hardikar S, Singh AK, Goodell MA, Chen T. A DNMT3A mutation common in AML exhibits dominant-negative effects in murine ES cells. Blood. 2013;122(25):4086-9. Epub 2013/10/30.
99. Tatton-Brown K, Zachariou A, Loveday C, Renwick A, Mahamdallie S, Aksglaede L, et al. The Tatton-Brown-Rahman Syndrome: A clinical study of 55 individuals with de novo constitutive DNMT3A variants. Wellcome Open Res. 2018;3:46. Epub 2018/06/15.

100. Tatton-Brown K, Seal S, Ruark E, Harmer J, Ramsay E, Del Vecchio Duarte S, et al. Mutations in the DNA methyltransferase gene DNMT3A cause an overgrowth syndrome with intellectual disability. Nat Genet. 2014;46(4):385-8. Epub 2014/03/13.
101. Polonis K, Blackburn PR, Urrutia RA, Lomberk GA, Kruisselbrink T, Cousin MA, et al. Co-occurrence of a maternally inherited DNMT3A duplication and a paternally inherited pathogenic variant in EZH2 in a child with growth retardation and severe short stature: atypical Weaver syndrome or evidence of a DNMT3A dosage effect? Cold Spring Harb Mol Case Stud. 2018;4(4). Epub 2018/05/29.
102. van de Velde ME, Kaspers GL, Abbink FCH, Wilhelm AJ, Ket JCF, van den Berg MH. Vincristine-induced peripheral neuropathy in children with cancer: A systematic review. Crit Rev Oncol Hematol. 2017;114:114-30. Epub 2017/05/10.
103. Takahashi T, Honma Y, Miyake T, Adachi K, Takami S, Okada M, et al. Synergistic combination therapy with cotylenin A and vincristine in multiple myeloma models. Int J Oncol. 2015;46(4):1801-9. Epub 2015/02/13.
104. Wang L, Wei D, Han X, Zhang W, Fan C, Zhang J, et al. The combinational effect of vincristine and berberine on growth inhibition and apoptosis induction in hepatoma cells. J Cell Biochem. 2014;115(4):721-30. Epub 2013/11/19.
105. Gidding CE, Kellie SJ, Kamps WA, de Graaf SS. Vincristine revisited. Crit Rev Oncol Hematol. 1999;29(3):267-87. Epub 1999/05/05.
106. Mollinedo F, Gajate C. Microtubules, microtubule-interfering agents and apoptosis. Apoptosis. 2003;8(5):413-50. Epub 2003/09/17.
107. Donoso JA, Haskins KM, Himes RH. Effect of microtubule-associated proteins on the interaction of vincristine with microtubules and tubulin. Cancer Res. 1979;39(5):1604-10. Epub 1979/05/01.
108. Weiden PL, Wright SE. Vincristine neurotoxicity. N Engl J Med. 1972;286(25):1369-70. Epub 1972/06/22.
109. Gilbar P, Chambers CR, Larizza M. Medication safety and the administration of intravenous vincristine: international survey of oncology pharmacists. J Oncol Pharm Pract. 2015;21(1):10-8. Epub 2014/01/15.
110. Da Costa EM, McInnes G, Beaudry A, Raynal NJ. DNA Methylation-Targeted Drugs. Cancer J. 2017;23(5):270-6. Epub 2017/09/20.
111. Momparler RL. Molecular, cellular and animal pharmacology of 5-aza-2'-deoxycytidine. Pharmacol Ther. 1985;30(3):287-99. Epub 1985/01/01.
112. Brank AS, Eritja R, Garcia RG, Marquez VE, Christman JK. Inhibition of HhaI DNA (Cytosine-C5) methyltransferase by oligodeoxyribonucleotides containing 5-aza-2'-deoxycytidine: examination of the intertwined roles of co-factor, target, transition state structure and enzyme conformation. J Mol Biol. 2002;323(1):53-67.
113. Metzeler KH, Walker A, Geyer S, Garzon R, Klisovic RB, Bloomfield CD, et al. DNMT3A mutations and response to the hypomethylating agent decitabine in acute myeloid leukemia. Leukemia. 2012;26(5):1106-7. Epub 2011/11/30.
114. Christman JK. 5-Azacytidine and 5-aza-2'-deoxycytidine as inhibitors of DNA methylation: mechanistic studies and their implications for cancer therapy. Oncogene. 2002;21(35):5483-95.
115. Jones PA, Taylor SM. Cellular differentiation, cytidine analogs and DNA methylation. Cell. 1980;20(1):85-93. Epub 1980/05/01.
116. Issa JP, Garcia-Manero G, Giles FJ, Mannari R, Thomas D, Faderl S, et al. Phase 1 study of low-dose prolonged exposure schedules of the hypomethylating agent 5-aza-2'-deoxycytidine (decitabine) in hematopoietic malignancies. Blood. 2004;103(5):1635-40. Epub 2003/11/08.
117. Kim HJ, Kim JH, Chie EK, Young PD, Kim IA, Kim IH. DNMT (DNA methyltransferase) inhibitors radiosensitize human cancer cells by suppressing DNA repair activity. Radiat Oncol. 2012;7:39. Epub 2012/03/21.
118. Klco JM, Spencer DH, Lamprecht TL, Sarkaria SM, Wylie T, Magrini V, et al. Genomic impact of transient low-dose decitabine treatment on primary AML cells. Blood. 2013;121(9):1633-43.
119. Khater F, Vairy S, Langlois S, Dumoucel S, Sontag T, St-Onge P, et al. Molecular Profiling of Hard-to-Treat Childhood and Adolescent Cancers. JAMA Netw Open. 2019;2(4):e192906. Epub 2019/04/27.
120. Liang X, Peng L, Baek CH, Katzen F. Single step BP/LR combined Gateway reactions. Biotechniques. 2013;55(5):265-8. Epub 2013/11/13.
121. Burnette WN. "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. Anal Biochem. 1981;112(2):195-203. Epub 1981/04/01.
122. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem. 1951;193(1):265-75. Epub 1951/11/01.

123. Puck TT, Marcus PI, Cieciura SJ. Clonal growth of mammalian cells in vitro; growth characteristics of colonies from single HeLa cells with and without a feeder layer. J Exp Med. 1956;103(2):273-83. Epub 1956/02/01.
124. Rafehi H, Orlowski C, Georgiadis GT, Ververis K, El-Osta A, Karagiannis TC. Clonogenic assay: adherent cells. J Vis Exp. 2011(49). Epub 2011/03/30.
125. Cory G. Scratch-wound assay. Methods Mol Biol. 2011;769:25-30. Epub 2011/07/13.
126. Jonkman JE, Cathcart JA, Xu F, Bartolini ME, Amon JE, Stevens KM, et al. An introduction to the wound healing assay using live-cell microscopy. Cell Adh Migr. 2014;8(5):440-51. Epub 2014/12/09.
127. Iwanabe Y, Masaki C, Tamura A, Tsuka S, Mukaibo T, Kondo Y, et al. The effect of low-intensity pulsed ultrasound on wound healing using scratch assay in epithelial cells. J Prosthodont Res. 2016;60(4):308-14. Epub 2016/10/25.
128. Sheng Z, Liu Y, Qin C, Liu Z, Yuan Y, Hu F, et al. IgG is involved in the migration and invasion of clear cell renal cell carcinoma. J Clin Pathol. 2016;69(6):497-504. Epub 2015/11/01.
129. Gelles JD, Chipuk JE. Robust high-throughput kinetic analysis of apoptosis with real-time high-content live-cell imaging. Cell Death Dis. 2016;7(12):e2493. Epub 2016/12/03.
130. Ouimet M, Drouin S, Lajoie M, Caron M, St-Onge P, Gioia R, et al. A childhood acute lymphoblastic leukemia-specific lncRNA implicated in prednisolone resistance, cell proliferation, and migration. Oncotarget. 2017;8(5):7477-88. Epub 2016/12/17.
131. Love MI, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. Genome Biol. 2014;15(12):550. Epub 2014/12/18.
132. Yu G, Wang LG, Han Y, He QY. clusterProfiler: an R package for comparing biological themes among gene clusters. OMICS. 2012;16(5):284-7. Epub 2012/03/30.
133. Garg S, Reyes-Palomares A, He L, Bergeron A, Lavallee VP, Lemieux S, et al. Hepatic leukemia factor is a novel leukemic stem cell regulator in DNMT3A, NPM1, and FLT3-ITD triple-mutated AML. Blood. 2019. Epub 2019/05/12.
134. Bamford S, Dawson E, Forbes S, Clements J, Pettett R, Dogan A, et al. The COSMIC (Catalogue of Somatic Mutations in Cancer) database and website. Br J Cancer. 2004;91(2):355-8.
135. Zhou X, Edmonson MN, Wilkinson MR, Patel A, Wu G, Liu Y, et al. Exploring genomic alteration in pediatric cancer using ProteinPaint. Nat Genet. 2016;48(1):4-6. Epub 2015/12/30.
136. Supek F, Bosnjak M, Skunca N, Smuc T. REVIGO summarizes and visualizes long lists of gene ontology terms. PLoS One. 2011;6(7):e21800. Epub 2011/07/27.
137. Kramer N, Walzl A, Unger C, Rosner M, Krupitza G, Hengstschlager M, et al. In vitro cell migration and invasion assays. Mutat Res. 2013;752(1):10-24. Epub 2012/09/04.
138. Kitamura T, Doughty-Shenton D, Pollard JW, Carragher NO. Real Time Detection of In Vitro Tumor Cell Apoptosis Induced by CD8+ T Cells to Study Immune Suppressive Functions of Tumor-infiltrating Myeloid Cells. J Vis Exp. 2019(143). Epub 2019/02/19.
139. Piras V, Hayashi K, Tomita M, Selvarajoo K. Enhancing apoptosis in TRAIL-resistant cancer cells using fundamental response rules. Sci Rep. 2011;1:144. Epub 2012/02/23.
140. Hsieh YF, Liu GY, Lee YJ, Yang JJ, Sandor K, Sarang Z, et al. Transglutaminase 2 contributes to apoptosis induction in Jurkat T cells by modulating Ca2+ homeostasis via cross-linking RAP1GDS1. PLoS One. 2013;8(12):e81516. Epub 2013/12/19.
141. Ling Y, Sankpal UT, Robertson AK, McNally JG, Karpova T, Robertson KD. Modification of de novo DNA methyltransferase 3a (Dnmt3a) by SUMO-1 modulates its interaction with histone deacetylases (HDACs) and its capacity to repress transcription. Nucleic Acids Res. 2004;32(2):598-610. Epub 2004/01/31.
142. de Nijs L, Choe K, Steinbusch H, Schijns O, Dings J, van den Hove DLA, et al. DNA methyltransferase isoforms expression in the temporal lobe of epilepsy patients with a history of febrile seizures. Clin Epigenetics. 2019;11(1):118. Epub 2019/08/21.
143. Bestor TH. Activation of mammalian DNA methyltransferase by cleavage of a Zn binding regulatory domain. EMBO J. 1992;11(7):2611-7. Epub 1992/07/01.
144. Cannella N, Oliveira AMM, Hemstedt T, Lissek T, Buechler E, Bading H, et al. Dnmt3a2 in the Nucleus Accumbens Shell Is Required for Reinstatement of Cocaine Seeking. J Neurosci. 2018;38(34):7516-28. Epub 2018/07/22.
145. Nimura K, Ishida C, Koriyama H, Hata K, Yamanaka S, Li E, et al. Dnmt3a2 targets endogenous Dnmt3L to ES cell chromatin and induces regional DNA methylation. Genes Cells. 2006;11(10):1225-37. Epub 2006/09/27.

146. Sasaki K, Hara S, Yamakami R, Sato Y, Hasegawa S, Kono T, et al. Ectopic expression of DNA methyltransferases DNMT3A2 and DNMT3L leads to aberrant hypermethylation and postnatal lethality in mice. Mol Reprod Dev. 2019;86(6):614-23. Epub 2019/03/06.
147. Dhillon AS, Hagan S, Rath O, Kolch W. MAP kinase signalling pathways in cancer. Oncogene. 2007;26(22):3279-90. Epub 2007/05/15.
148. Witasp A, Van Craenenbroeck AH, Shiels PG, Ekstrom TJ, Stenvinkel P, Nordfors L. Current epigenetic aspects the clinical kidney researcher should embrace. Clin Sci (Lond). 2017;131(14):1649-67. Epub 2017/07/02.
149. Mahalingaiah PK, Ponnusamy L, Singh KP. Oxidative stress-induced epigenetic changes associated with malignant transformation of human kidney epithelial cells. Oncotarget. 2017;8(7):11127-43. Epub 2016/09/23.
150. Aird KM, Zhang R. Nucleotide metabolism, oncogene-induced senescence and cancer. Cancer Lett. 2015;356(2 Pt A):204-10. Epub 2014/02/04.
151. Buj R, Aird KM. Deoxyribonucleotide Triphosphate Metabolism in Cancer and Metabolic Disease. Front Endocrinol (Lausanne). 2018;9:177. Epub 2018/05/04.
152. Lane AN, Fan TW. Regulation of mammalian nucleotide metabolism and biosynthesis. Nucleic Acids Res. 2015;43(4):2466-85. Epub 2015/01/30.
153. Prieto-Dominguez N, Parnell C, Teng Y. Drugging the Small GTPase Pathways in Cancer Treatment: Promises and Challenges. Cells. 2019;8(3). Epub 2019/03/20.
154. Haga RB, Ridley AJ. Rho GTPases: Regulation and roles in cancer cell biology. Small GTPases. 2016;7(4):207-21. Epub 2016/09/16.
155. Nelson CM, Bissell MJ. Of extracellular matrix, scaffolds, and signaling: tissue architecture regulates development, homeostasis, and cancer. Annu Rev Cell Dev Biol. 2006;22:287-309. Epub 2006/07/11.
156. Cox TR, Erler JT. Remodeling and homeostasis of the extracellular matrix: implications for fibrotic diseases and cancer. Dis Model Mech. 2011;4(2):165-78. Epub 2011/02/18.
157. Cristofari G, Adolf E, Reichenbach P, Sikora K, Terns RM, Terns MP, et al. Human telomerase RNA accumulation in Cajal bodies facilitates telomerase recruitment to telomeres and telomere elongation. Mol Cell. 2007;27(6):882-9. Epub 2007/09/25.
158. Zhu Y, Tomlinson RL, Lukowiak AA, Terns RM, Terns MP. Telomerase RNA accumulates in Cajal bodies in human cancer cells. Mol Biol Cell. 2004;15(1):81-90. Epub 2003/10/07.
159. Cole CB, Russler-Germain DA, Ketkar S, Verdoni AM, Smith AM, Bangert CV, et al. Haploinsufficiency for DNA methyltransferase 3A predisposes hematopoietic cells to myeloid malignancies. J Clin Invest. 2017;127(10):3657-74. Epub 2017/09/06.
160. Jin B, Robertson KD. DNA methyltransferases, DNA damage repair, and cancer. Adv Exp Med Biol. 2013;754:3-29. Epub 2012/09/08.
161. Liu K, Wang YF, Cantemir C, Muller MT. Endogenous assays of DNA methyltransferases: Evidence for differential activities of DNMT1, DNMT2, and DNMT3 in mammalian cells in vivo. Mol Cell Biol. 2003;23(8):2709-19. Epub 2003/04/01.
162. Cortesi M, Llamosas E, Henry CE, Kumaran RA, Ng B, Youkhana J, et al. I-AbACUS: a Reliable Software Tool for the Semi-Automatic Analysis of Invasion and Migration Transwell Assays. Sci Rep. 2018;8(1):3814. Epub 2018/03/02.
163. Jin W, Shah ET, Penington CJ, McCue SW, Chopin LK, Simpson MJ. Reproducibility of scratch assays is affected by the initial degree of confluence: Experiments, modelling and model selection. J Theor Biol. 2016;390:136-45. Epub 2015/12/10.
164. Valster A, Tran NL, Nakada M, Berens ME, Chan AY, Symons M. Cell migration and invasion assays. Methods. 2005;37(2):208-15. Epub 2005/11/18.
165. Prelich G. Gene overexpression: uses, mechanisms, and interpretation. Genetics. 2012;190(3):841-54. Epub 2012/03/16.
166. Rinaldi L, Avgustinova A, Martin M, Datta D, Solanas G, Prats N, et al. Loss of Dnmt3a and Dnmt3b does not affect epidermal homeostasis but promotes squamous transformation through PPAR-gamma. Elife. 2017;6. Epub 2017/04/21.
167. Ehrlich M, Jiang G, Fiala E, Dome JS, Yu MC, Long TI, et al. Hypomethylation and hypermethylation of DNA in Wilms tumors. Oncogene. 2002;21(43):6694-702. Epub 2002/09/21.
168. Gargiulo G. Next-Generation in vivo Modeling of Human Cancers. Front Oncol. 2018;8:429. Epub 2018/10/27.

Section 7 — Annexes

7.1 – Annexe A : Résultats supplémentaires

7.1.1 – Validation de l'intégrité des plasmides

7.1.1.1 – Séquence de DNMT3A natif

ATGCCCGCCATGCCCTCCAGCGGCCCCGGGGACACCAGCAGCTCTGCTGCGGAGCGGGAGGAGGACCGAAAGGACGG
AGAGGAGCAGGAGGAGCCGCGTGGCAAGGAGGAGCGCCAAGAGCCCAGCACCACGGCACGGAAGGTGGGGCGGCCTG
GGAGGAAGCGCAAGCACCCCCCGGTGGAAAGCGGTGACACGCCAAAGGACCCTGCGGTGATCTCCAAGTCCCCATCC
ATGGCCCAGGACTCAGGCGCCTCAGAGCTATTACCCAATGGGGACTTGGAGAAGCGGAGTGAGCCCCAGCCAGAGGA
GGGGAGCCCTGCTGGGGGGCAGAAGGGCGGGGCCCCAGCAGAGGGAGAGGGTGCAGCTGAGACCCTGCCTGAAGCCT
CAAGAGCAGTGGAAAATGGCTGCTGCACCCCCAAGGAGGGCCGAGGAGCCCCTGCAGAAGCGGGCAAAGAACAGAAG
GAGACCAACATCGAATCCATGAAAATGGAGGGCTCCCGGGGCCGGCTGCGGGGTGGCTTGGGCTGGGAGTCCAGCCT
CCGTCAGCGGCCCATGCCGAGGCTCACCTTCCAGGCGGGGGACCCCTACTACATCAGCAAGCGCAAGCGGGACGAGT
GGCTGGCACGCTGGAAAAGGGAGGCTGAGAAGAAAGCCAAGGTCATTGCAGGAATGAATGCTGTGGAAGAAAACCAG
GGGCCCGGGGAGTCTCAGAAGGTGGAGGAGGCCAGCCCTCCTGCTGTGCAGCAGCCCACTGACCCCGCATCCCCCAC
TGTGGCTACCACGCCTGAGCCCGTGGGGTCCGATGCTGGGGACAAGAATGCCACCAAAGCAGGCGATGACGAGCCAG
AGTACGAGGACGGCCGGGGCTTTGGCATTGGGGAGCTGGTGTGGGGGAAACTGCGGGGCTTCTCCTGGTGGCCAGGC
CGCATTGTGTCTTGGTGGATGACGGGCCGGAGCCGAGCAGCTGAAGGCACCCGCTGGGTCATGTGGTTCGGAGACGG
CAAATTCTCAGTGGTGTGTGTTGAGAAGCTGATGCCGCTGAGCTCGTTTTGCAGTGCGTTCCACCAGGCCACGTACA
ACAAGCAGCCCATGTACCGCAAAGCCATCTACGAGGTCCTGCAGGTGGCCAGCAGCCGCGCGGGGAAGCTGTTCCCG
GTGTGCCACGACAGCGATGAGAGTGACACTGCCAAGGCCGTGGAGGTGCAGAACAAGCCCATGATTGAATGGGCCCT
GGGGGGCTTCCAGCCTTCTGGCCCTAAGGGCCTGGAGCCACCAGAAGAAGAGAAGAATCCCTACAAAGAAGTGTACA
CGGACATGTGGGTGGAACCTGAGGCAGCTGCCTACGCACCACCTCCACCAGCCAAAAAGCCCCGGAAGAGCACAGCG
GAGAAGCCCAAGGTCAAGGAGATTATTGATGAGCGCACAAGAGAGCGGCTGGTGTACGAGGTGCGGCAGAAGTGCCG
GAACATTGAGGACATCTGCATCTCCTGTGGGAGCCTCAATGTTACCCTGGAACACCCCCTCTTCGTTGGAGGAATGT
GCCAAAACTGCAAGAACTGCTTTCTGGAGTGTGCGTACCAGTACGACGACGACGGCTACCAGTCCTACTGCACCATC
TGCTGTGGGGGCCGTGAGGTGCTCATGTGCGGAAACAACAACTGCTGCAGGTGCTTTTGCGTGGAGTGTGTGGACCT
CTTGGTGGGGCCGGGGGCTGCCCAGGCAGCCATTAAGGAAGACCCCTGGAACTGCTACATGTGCGGGCACAAGGGTA
CCTACGGGCTGCTGCGGCGGCGAGAGGACTGGCCCTCCCGGCTCCAGATGTTCTTCGCTAATAACCACGACCAGGAA
TTTGACCCTCCAAAGGTTTACCCACCTGTCCCAGCTGAGAAGAGGAAGCCCATCCGGGTGCTGTCTCTCTTTGATGG
AATCGCTACAGGGCTCCTGGTGCTGAAGGACTTGGGCATTCAGGTGGACCGCTACATTGCCTCGGAGGTGTGTGAGG
ACTCCATCACGGTGGGCATGGTGCGGCACCAGGGGAAGATCATGTACGTCGGGGACGTCCGCAGCGTCACACAGAAG
CATATCCAGGAGTGGGGCCCATTCGATCTGGTGATTGGGGGCAGTCCCTGCAATGACCTCTCCATCGTCAACCCTGC
TCGCAAGGGCCTCTACGAGGGCACTGGCCGGCTCTTCTTTGAGTTCTACCGCCTCCTGCATGATGCGCGGCCCAAGG
AGGGAGATGATCGCCCCTTCTTCTGGCTCTTTGAGAATGTGGTGGCCATGGGCGTTAGTGACAAGAGGGACATCTCG
CGATTTCTCGAGTCCAACCCTGTGATGATTGATGCCAAAGAAGTGTCAGCTGCACACAGGGCCCGCTACTTCTGGGG
TAACCTTCCCGGTATGAACAGGCCGTTGGCATCCACTGTGAATGATAAGCTGGAGCTGCAGGAGTGTCTGGAGCATG
GCAGGATAGCCAAGTTCAGCAAAGTGAGGACCATTACTACGAGGTCAAACTCCATAAAGCAGGGCAAAGACCAGCAT
TTTCCTGTCTTCATGAATGAGAAAGAGGACATCTTATGGTGCACTGAAATGGAAAGGGTATTTGGTTTCCCAGTCCA
CTATACTGACGTCTCCAACATGAGCCGCTTGGCGAGGCAGAGACTGCTGGGCCGGTCATGGAGCGTGCCAGTCATCC
GCCACCTCTTCGCTCCGCTGAAGGAGTATTTTGCGTGTGTGTAATGCCCAACTTTCTTGTACAAAGTTGGCATTATA
AGAAAGCATTGCT

7.1.1.2 - Séquence de DNMT3A P904L

ATGCCCGCCATGCCCTCCAGCGGCCCCGGGGACACCAGCAGCTCTGCTGCGGAGCGGGAGGAGGACCGAAAGGACGG
AGAGGAGCAGGAGGAGCCGCGTGGCAAGGAGGAGCGCCAAGAGCCCAGCACCACGGCACGGAAGGTGGGGCGGCCTG
GGAGGAAGCGCAAGCACCCCCCGGTGGAAAGCGGTGACACGCCAAAGGACCCTGCGGTGATCTCCAAGTCCCCATCC
ATGGCCCAGGACTCAGGCGCCTCAGAGCTATTACCCAATGGGGACTTGGAGAAGCGGAGTGAGCCCCAGCCAGAGGA
GGGGAGCCCTGCTGGGGGGCAGAAGGGCGGGGCCCCAGCAGAGGGAGAGGGTGCAGCTGAGACCCTGCCTGAAGCCT
CAAGAGCAGTGGAAAATGGCTGCTGCACCCCCAAGGAGGGCCGAGGAGCCCCTGCAGAAGCGGGCAAAGAACAGAAG
GAGACCAACATCGAATCCATGAAAATGGAGGGCTCCCGGGGCCGGCTGCGGGGTGGCTTGGGCTGGGAGTCCAGCCT
CCGTCAGCGGCCCATGCCGAGGCTCACCTTCCAGGCGGGGGACCCCTACTACATCAGCAAGCGCAAGCGGGACGAGT
GGCTGGCACGCTGGAAAAGGGAGGCTGAGAAGAAAGCCAAGGTCATTGCAGGAATGAATGCTGTGGAAGAAAACCAG
GGGCCCGGGGAGTCTCAGAAGGTGGAGGAGGCCAGCCCTCCTGCTGTGCAGCAGCCCACTGACCCCGCATCCCCCAC
TGTGGCTACCACGCCTGAGCCCGTGGGGTCCGATGCTGGGGACAAGAATGCCACCAAAGCAGGCGATGACGAGCCAG
AGTACGAGGACGGCCGGGGCTTTGGCATTGGGGAGCTGGTGTGGGGGAAACTGCGGGGCTTCTCCTGGTGGCCAGGC
CGCATTGTGTCTTGGTGGATGACGGGCCGGAGCCGAGCAGCTGAAGGCACCCGCTGGGTCATGTGGTTCGGAGACGG
CAAATTCTCAGTGGTGTGTGTTGAGAAGCTGATGCCGCTGAGCTCGTTTTGCAGTGCGTTCCACCAGGCCACGTACA
ACAAGCAGCCCATGTACCGCAAAGCCATCTACGAGGTCCTGCAGGTGGCCAGCAGCCGCGCGGGGAAGCTGTTCCCG
GTGTGCCACGACAGCGATGAGAGTGACACTGCCAAGGCCGTGGAGGTGCAGAACAAGCCCATGATTGAATGGGCCCT
GGGGGGCTTCCAGCCTTCTGGCCCTAAGGGCCTGGAGCCACCAGAAGAAGAGAAGAATCCCTACAAAGAAGTGTACA
CGGACATGTGGGTGGAACCTGAGGCAGCTGCCTACGCACCACCTCCACCAGCCAAAAAGCCCCGGAAGAGCACAGCG
GAGAAGCCCAAGGTCAAGGAGATTATTGATGAGCGCACAAGAGAGCGGCTGGTGTACGAGGTGCGGCAGAAGTGCCG
GAACATTGAGGACATCTGCATCTCCTGTGGGAGCCTCAATGTTACCCTGGAACACCCCCTCTTCGTTGGAGGAATGT
GCCAAAACTGCAAGAACTGCTTTCTGGAGTGTGCGTACCAGTACGACGACGACGGCTACCAGTCCTACTGCACCATC
TGCTGTGGGGGCCGTGAGGTGCTCATGTGCGGAAACAACAACTGCTGCAGGTGCTTTTGCGTGGAGTGTGTGGACCT
CTTGGTGGGGCCGGGGGCTGCCCAGGCAGCCATTAAGGAAGACCCCTGGAACTGCTACATGTGCGGGCACAAGGGTA
CCTACGGGCTGCTGCGGCGGCGAGAGGACTGGCCCTCCCGGCTCCAGATGTTCTTCGCTAATAACCACGACCAGGAA
TTTGACCCTCCAAAGGTTTACCCACCTGTCCCAGCTGAGAAGAGGAAGCCCATCCGGGTGCTGTCTCTCTTTGATGG
AATCGCTACAGGGCTCCTGGTGCTGAAGGACTTGGGCATTCAGGTGGACCGCTACATTGCCTCGGAGGTGTGTGAGG
ACTCCATCACGGTGGGCATGGTGCGGCACCAGGGGAAGATCATGTACGTCGGGGACGTCCGCAGCGTCACACAGAAG
CATATCCAGGAGTGGGGCCCATTCGATCTGGTGATTGGGGGCAGTCCCTGCAATGACCTCTCCATCGTCAACCCTGC
TCGCAAGGGCCTCTACGAGGGCACTGGCCGGCTCTTCTTTGAGTTCTACCGCCTCCTGCATGATGCGCGGCCCAAGG
AGGGAGATGATCGCCCCTTCTTCTGGCTCTTTGAGAATGTGGTGGCCATGGGCGTTAGTGACAAGAGGGACATCTCG
CGATTTCTCGAGTCCAACCCTGTGATGATTGATGCCAAAGAAGTGTCAGCTGCACACAGGGCCCGCTACTTCTGGGG
TAACCTTCCCGGTATGAACAGGCCGTTGGCATCCACTGTGAATGATAAGCTGGAGCTGCAGGAGTGTCTGGAGCATG
GCAGGATAGCCAAGTTCAGCAAAGTGAGGACCATTACTACGAGGTCAAACTCCATAAAGCAGGGCAAAGACCAGCAT
TTTCCTGTCTTCATGAATGAGAAAGAGGACATCTTATGGTGCACTGAAATGGAAAGGGTATTTGGTTTCCCAGTCCA
CTATACTGACGTCTCCAACATGAGCCGCTTGGCGAGGCAGAGACTGCTGGGCCGGTCATGGAGCGTGCCAGTCATCC

GCCACCTCTTCGCTC**T**GCTGAAGGAGTATTTTGCGTGTGTGTAATGCCCAACTTTCTTGTACAAAGTTGGCATTATA

AGAAAGCATTGCT

7.1.2 – Valeurs d'expression des constructions

7.1.2.1 – Validation du shARN par « rescue »

Tableau 15 : Valeurs d'expression relative de DNMT3A

Lignée cellulaire	Expression relative
shContrôle	1,00
shDNMT3A endogène	0,45
shDNMT3A + Vecteur vide	0,43
shDNMT3A + DNMT3A WT	61,0

7.1.2.2 – Validation des populations cellulaires

Tableau 16 : Expression relative de DNMT3A dans les lignées cellulaires

Technique	Échantillon	Valeur relative
Q-PCR	Vecteur vide	1 000
	DNMT3A natif	4 939
	DNMT3A P904L	13 346
	shDNMT3A endogène	0,178
Transcriptome*	Vecteur vide	1 000
	DNMT3A natif	5 188
	DNMT3A P904L	16 407
	shDNMT3A endogène	0,548

**Ratio des comptes bruts de transcriptomes de chaque réplica sur la moyenne des comptes bruts du vecteur vide*

7.1.3 – Essai d'apoptose

7.1.3.1 – Résultats à 48 heures d'exposition aux agents thérapeutiques

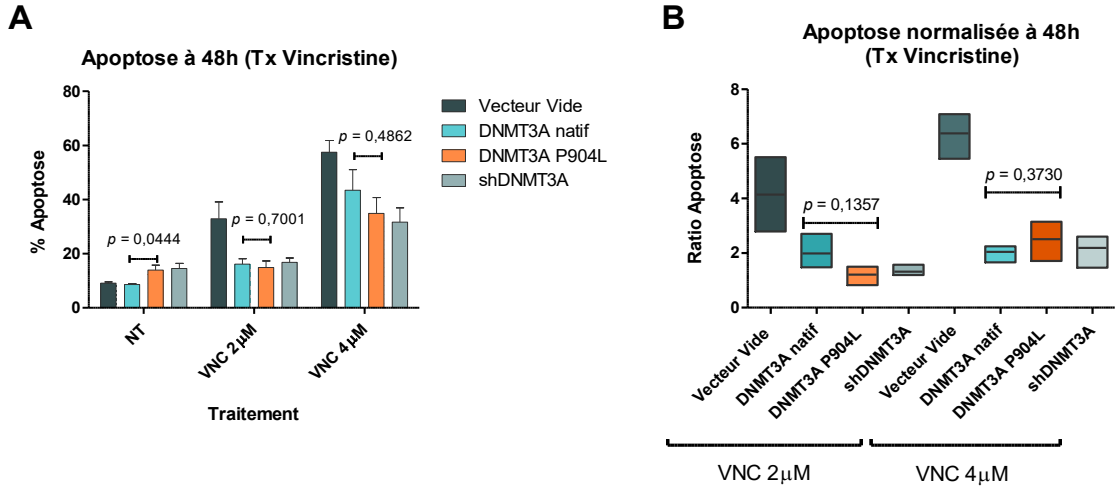

Figure 53 : Apoptose à 48 heures pour le traitement à la vincristine.
A) pourcentage d'apoptose dans les cellules en fonction de la dose de vincristine. *T-test effectué pour évaluer la différence entre le mutant P904L et DNMT3A natif.* ***B) Ratio d'apoptose normalisé selon l'essai non traité.*** *Le test de Student est effectué pour évaluer la différence entre le mutant P904L et DNMT3A natif.*

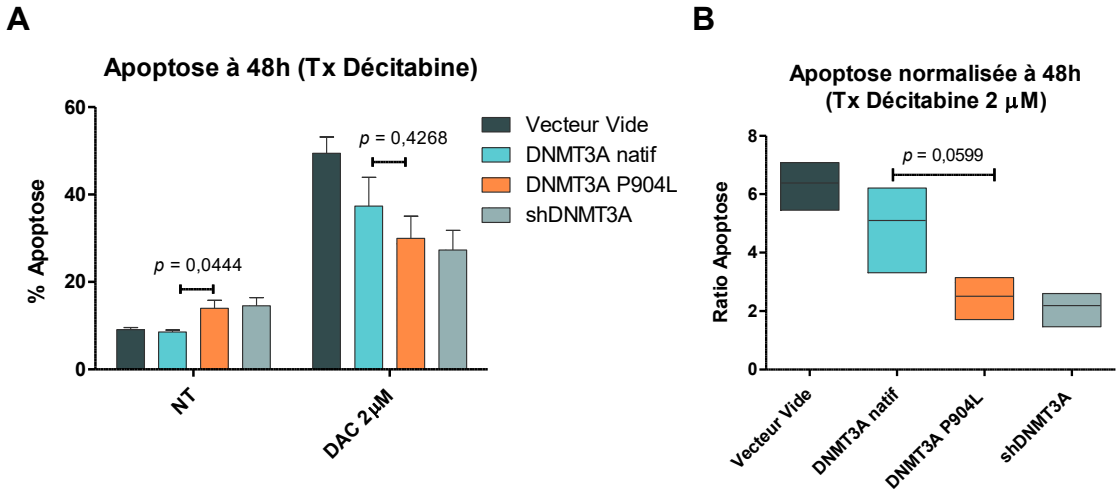

Figure 54 : Apoptose à 48 heures pour le traitement à la décitabine
A) pourcentage d'apoptose dans les cellules en fonction de la dose de décitabine. *T-test effectué pour évaluer la différence entre le mutant P904L et DNMT3A natif.* ***B) Ratio d'apoptose normalisé selon l'essai non traité.*** *Le test de Student effectué entre le mutant P904L et DNMT3A natif révèle une tendance vers un ratio plus bas d'apoptose dans le mutant.*